

ISSN 0507-3758

ЖУРНАЛ ВХОДИТ В ПЕРЕЧЕНЬ  
РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ НАУЧНЫХ ИЗДАНИЙ ВАК

# ВОПРОСЫ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ВОПРОСЫ ОНКОЛОГИИ

ТОМ 67 – 2021

1 – 2021

TOM 67 VOL. 67

# PROBLEMS IN ONCOLOGY

# VOPROSY ONKOLOGII

1

*Журнал входит в перечень рецензируемых научных изданий ВАК,  
в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание  
ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук*

# ВОПРОСЫ ОНКОЛОГИИ

1

ТОМ 67  
2021

Problems in oncology / Voprosy onologii

---

ОСНОВАН В ЯНВАРЕ 1955 ГОДА



## УЧРЕДИТЕЛЬ

**Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор С.В. КАНАЕВ

Заместитель главного редактора В.Г. ЛЕМЕХОВ

Ответственные секретари Л.М. БЕРШТЕЙН, И.И. СЕМЕНОВ

А.М. Беляев (д-р мед. наук, проф.) (Санкт-Петербург), Г.И. Гафтон (д-р мед. наук, проф.) (Санкт-Петербург), М.И. Давыдов (д-р мед. наук, проф., академик РАН) (Москва), Е.В. Демин (д-р мед. наук) (Санкт-Петербург), М.А. Забежинский (д-р мед. наук) (Санкт-Петербург), А.Д. Каприн (д-р мед. наук, проф., академик РАН) (Москва), О.И. Кит (д-р мед. наук, проф., чл.-корр. РАН) (Ростов-на-Дону), Г.М. Манихас (д-р мед. наук, проф.) (Санкт-Петербург), Ю.А. Пунанов (д-р мед. наук, проф.) (Санкт-Петербург), В.В. Семиглазов (д-р мед. наук, проф.) (Санкт-Петербург), В.Ф. Семиглазов (д-р мед. наук, проф., чл.-корр. РАН) (Санкт-Петербург), В.А. Солодкий (д-р мед. наук, проф., академик РАН) (Москва), Ю.С. Сидоренко (д-р мед. наук, проф., академик РАН) (Ростов-на-Дону), Э.Г. Топузов (д-р мед. наук, проф.) (Санкт-Петербург), А.Ф. Урманчеева (д-р мед. наук, проф.) (Санкт-Петербург), В.П. Харченко (д-р мед. наук, проф., академик РАН) (Москва), В.И. Чиссов (д-р мед. наук, проф., академик РАН) (Москва), Е.Л. Чойнзонов (д-р мед. наук, проф., академик РАН) (Томск), А.М. Щербаков (д-р мед. наук, проф.) (Санкт-Петербург)

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Р.А. Абдылдаев (Бишкек), Д.А. Алиев (Баку), Ж.А. Арзыкулов (Алматы), Р.О. Гагуа (Тбилиси), А.М. Галстян (Ереван), И.В. Залуцкий (Минск), Д.З. Зикирходжаев (Душанбе), Д.А. Коваленко (Мурманск), В.А. Косов (Сыктывкар), А.Ф. Лазарев (Барнаул), С.Н. Наврузов (Ташкент), В.М. Репин (Киров), Л.Д. Роман (Санкт-Петербург), Н.В. Румянцев (Омск), М.Ф. Софрони (Кишинев), В.Г. Черенков (Великий Новгород), В.Ф. Чехун (Киев), Р.Ш.Хасанов (Казань), И. Б. Щепотин (Киев)

Журнал входит в рекомендованный ВАК РФ перечень рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Свидетельство о регистрации СМИ—ПИ № ФС77 47156 от 3 ноября 2011 г.

Порядковый номер журнала: 609. Подписано в печать: 04.03.2021 г. Дата выхода в свет: 04.03.2021 г.

Тираж 650 экз. Цена свободная. Рассылается по подписке. Подписной индекс по каталогу агентства «Роспечать» - 70152 (полугодичная подписка для физ. лиц), 70277 (полугодичная подписка для юр. лиц), 47487 (годовая подписка для всех).

Рукописи принимаются по адресу: **197758, г. Санкт-Петербург, а/я 8**

Адрес редакции: 197758, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, дом 68

Электронный адрес журнала: [journal@voprosyonkologii.ru](mailto:journal@voprosyonkologii.ru). Сайт журнала: <http://voprosyonkologii.ru>

---

## Издатель — АННМО «Вопросы онкологии»

Тел./факс (812) 596-89-47, e-mail: [annmo@rion.spb.ru](mailto:annmo@rion.spb.ru), [www.niioncologii.ru](http://www.niioncologii.ru)

Адрес издателя: 197758, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, дом 68

Все права защищены. Полное или частичное воспроизведение материалов, опубликованных в журнале, допускается только с письменного разрешения редакции.

Редакция не несет ответственности за содержание рекламных материалов.

Отпечатано в ООО ИПП «Издательство Ладога», СПб., ул. Пестеля, д. 13/15, литера Б, пом 6Н

## FOUNDER

***The Federal State Budget Institution "N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Public Health of Russian Federation***

## EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief S.V.KANAEV (Dr. Med. Sc., Prof.)

Deputy Editor-in-Chief V.G.LEMEKHOV (Dr. Med. Sc., Prof.)

Executive Secretaries L.M.BERSTEIN (Dr. Med. Sc., Prof.), I.I. SEMENOV (Dr. Med. Sc., Prof.)

A.M. Belyaev (Dr. Med. Sc., Prof.) (*Saint Petersburg*), G.I.Gafton (Dr. Med. Sc., Prof.) (*Saint Petersburg*), M.I.Davydov (Dr. Med. Sc., Prof., Acad RAS) (*Moscow*), E.V. Demin (Dr. Med. Sc., Prof.) (*Saint Petersburg*), M.A. Zabezhinsky (Dr. Med. Sc.) (*Saint Petersburg*), A.D. Kaprin (Dr. Med. Sc., Prof., Acad. RAS) (*Moscow*), O.I. Kit (Dr. Med. Sc., Prof., Ass. Member RAS) (*Rostov-on-Don*), G.M. Manikhas (Dr. Med. Sc., Prof.) (*Saint Petersburg*), Yu.A.Punanov (Dr. Med. Sc., Prof.) (*Saint Petersburg*), V.V. Semiglazov (Dr. Med. Sc., Prof.) (*Saint Petersburg*), V.F.Semiglazov (Dr. Med. Sc., Prof., Ass. Member RAS) (*Saint Petersburg*), Yu.S.Sidorenko (Dr. Med. Sc., Prof., Acad RAS) (*Rostov-on-Don*), V.A. Solodky (Dr. Med. Sc., Prof., Acad. RAS) (*Moscow*), E.G.Topuzov (Dr. Med. Sc., Prof.) (*Saint Petersburg*), A.F.Urmancheeva (Dr. Med. Sc., Prof.) (*Saint Petersburg*), V.P.Kharchenko (Dr. Med. Sc., Prof., Acad. RAS) (*Moscow*), V.I.Chissov (Dr. Med. Sc., Prof., Acad. RAS) (*Moscow*), E.L.Choinzonov (Dr. Med. Sc., Prof., Acad. RAS) (*Tomsk*), A.M. Shcherbakov (Dr. Med. Sc., Prof) (*Saint Petersburg*)

## EDITORIAL COUNCIL

R.A. Abdyldaev (Bishkek), D.A. Aliev (Baku), Zh.A. Arzykulov (Almaty), R.O. Gagaa (Tbilisi), A.M. Galstyan (Yerevan), I.V. Zalutsky (Minsk), D.Z. Zikiryakhodzhaev (Dushanbe), D.A. Kovalenko (Murmansk), V.A. Kosov (Syktyvkar), A.F. Lazarev (Barnaul), S.N. Navruzov (Tashkent), V.M. Repin (Kirov), L.D. Roman (Saint Petersburg), N.V. Rumyantsev (Omsk), M.F. Sofrony (Kishinev), V.G. Cherenkov (Veliky Novgorod), N.F. Chekhun (Kiev), R.Sh. Khasanov (Kazan), I.B. Shchepotin (Kiev)

The journal is included in the recommended by the Highest Attestation Commission's list of peer-reviewed scientific journals and editions for the publication of major scientific results of dissertations

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, information technologies and mass communications

The Certificate of registration № ФС77 47156 of November 3, 2011

Serial number: 609. Signed to print: 04.03.2021. Published by: 04.03.2021.

The circulation is 650 copies. Free price. Distribution by subscription. The Catalog Agency «Rospechat»'s index is 70152 (semiannual subscription for physical persons), 70277 (semiannual subscription for juridical persons) and 47487 (annual subscription for all)

Manuscripts are accepted at mail address **197758, St. Petersburg, box 8** and email address of the journal: **journal@voprosyonkologii.ru**

Editorial office address: 197758, Russia, St.Petersburg, Pesochny village, 68 Leningradskaya street.

e-mail: journal@voprosyonkologii.ru. website: <http://voprosyonkologii.ru>

---

## ***Publisher — «Problems in Oncology»***

Tel./Fax (812) 596-89-47, e-mail: [annmo@rion.spb.ru](mailto:annmo@rion.spb.ru) [www.niioncologii.ru](http://www.niioncologii.ru)

All rights reserved. Total or partial reproduction of the materials published in the journal is allowed only with the written permission of the publisher.

We take no responsibility for the contents of advertising materials.

Printed in «Publisher Ladoga», St. Petersburg, 13/15, Pestel Street., B, rm. 6H

## СОДЕРЖАНИЕ

## CONTENTS

### Обзоры

*Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Беляев А.М.*  
Мезенхимальные стволовые клетки в лечении онкологических пациентов с пневмонией COVID-19

7

*Ашхатава Т.И., Татарина М.Ю., Когония Л.М., Насхлеташвили Д.Р., Жуков В.Ю.*  
Современные подходы молекулярно-генетической диагностики глиобластом с точки зрения клинициста

13

*Чернов А.Н., Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Галимова Э.С., Алавердиан Д.А., Шамова О.В.*  
Молекулярные механизмы множественной лекарственной устойчивости глиобластом человека

20

*Янус Г.А., Лайдус Т.А., Загороднев К.А., Мартянов А.С., Соколова Т.Н., Алексахина С.Н., Кулигина Е.Ш., Имянитов Е.Н.*  
Перспективы анализа циркулирующей опухолевой ДНК для нужд практической онкологии: достижения и нерешённые проблемы

29

*Ионов С.В., Орлова В.С., Кульбачевская Н.Ю.*  
Влияние метформина на доксорубицин-индуцированную кардиотоксичность в эксперименте

35

*Карачун А.М., Самсонов Д.В.*  
Хирургическая тактика при «почти полном» ответе рака прямой кишки на неoadьювантную терапию: тотальная мезоректумэктомия или локальное иссечение?

40

### Статистика

*Мерабишвили В.М.*  
Аналитические показатели. Погодичная летальность больных злокачественными новообразованиями на каждом году наблюдения

44

*Егорова А.Г., Орлов А.Е., Суслин С.А.*  
Обоснование региональных программ контроля и профилактики злокачественных новообразований органов пищеварения на основе международного сравнения показателей заболеваемости, смертности и выживаемости (исследование по материалам CI5 и Concord 3)

51

### Оригинальные статьи

#### А. Клинические исследования

*Левченко Е.В., Ергнян С.М., Шутов В.А., Кротов Н.Ф., Левченко Н.Е., Юрин Р.И., Муртазин А.И., Шабинская В.И.*  
Резекция и пластика верхней полой вены в хирургическом и комбинированном лечении рака легкого

59

*Вабалайте К.В., Романчишен А.Ф.*  
Эффективность интраоперационного мониторинга добавочных нервов при операциях на шее

64

### Reviews

*Baldueva I.A., Nekhaeva T.L., Belyaev A.M.*  
Mesenchymal stem cells in treatment of cancer patients with COVID-19 pneumonia

*Ashkhatcava T.I., Tatarinova M.Yu., Kogoniya L.M., Naskhletashvili D.R., Zhukov V.Yu.*  
Clinician's modern approaches to molecular genetic diagnosis of glioblastomas

*Chernov A.N., Baldueva I.A., Nekhaeva T.L., Galimova E.S., Alaverdian D.A., Shamova O.V.*  
The molecular mechanisms of multidrug resistance of human glioblastomas

*Yanus G.A., Laidus T.A., Zagorodnev K.A., Martianov A.S., Sokolova T.N., Aleksakhina S.N., Kuligina E.S., Imyanitov E.N.*  
Perspectives for the analysis of circulating tumor DNA in clinical oncology: achievements and unresolved issues

*Ionov S.V., Orlova V.S., Kulbachevskaya N.Yu.*  
Effect of metformin on doxorubicin-induced cardiotoxicity in experiment

*Karachun A.M., Samsonov D.V.*  
Surgical tactics for "near-complete" rectal cancer response to neoadjuvant therapy: total mesorectumectomy or local excision?

### Statistics

*Merabishvili V.M.*  
Analytical indicators of observation. The year-by-year lethality of patients at each year

*Egorova A.G., Orlov A.E., Suslin S.A.*  
Justification of regional programs for the control and prevention of malignant neoplasms of the digestive system based on an international comparison of morbidity, mortality and survival rates (research based on materials from CI5 and Concord 3)

### Original research

#### A. Clinical research

*Levchenko E.V., Ergnyan S.M., Shutov V.A., Krotov N.F., Levchenko N.E., Yurin R.I., Murtazin A.I., Shabinskaya V.I.*  
Superior vena cava resection and plastic repair as a part of surgical and combined treatment of lung cancer

*Vabalayte K.V., Romanchishen A.F.*  
Effectiveness of spinal accessory intraoperative nerve monitoring during neck dissections

<p>Князева М.С., Забегина Л.М., Сидина Е.И., Карицкий А.А., Цырлина Е.В., Артемьева А.С., Кузнецова И.В., Воробьев С.Л., Малек А.В. Особенности профиля экспрессии микроРНК ткани анапластического рака щитовидной железы</p>	70	<p>Knyazeva M.S., Zabegina L.M., Sidina E.I., Karizky A.A., Tsyrlina E.V., Atrem'eva A.S., Kuznetsova I.V., Vorobyev S.L., Malek A.V. Mirna expression profiling of anaplastic thyroid cancer</p>	
<p>Масляков В.В., Гребнев Д.Ю., Ким Л.М. Патофизиологическое обоснование применения фотодинамической терапии в начальной стадии плоскоклеточного рака кожи</p>	77	<p>Masljakov V.V., Grebnev D.Ju., Kim L.M. Pathophysiological justification of the use of photodynamic therapy in the initial stage of squamous cell skin cancer</p>	
<p>Чернышова А.Л., Антипов В.А., Коломиец Л.А., Чернов В.И., Гюнтер В.Э., Марченко Е.С., Чекалкин Т.Л. Опыт проведения радикальной трахелектомии с транспозицией матки в комбинированном органосохраняющем лечении инвазивного рака шейки матки IB-II стадий</p>	85	<p>Chernyshova A.L., Antipov V.A., Kolomiets L.A., Chernov V.I., Gyunter V.E., Marchenko E.S., Chekalkin T.L. Experience of performing radical trachelectomy with uterine transposition in organ-preserving treatment of stage IB-II invasive cervical cancer</p>	
<p>Хасанов Р.Ш., Файзуллина Е.В., Хисматулина И.М., Муртазин А.И. Кератиноцитарные опухоли кожи: структура клинических проявлений у дерматологических пациентов</p>	91	<p>Khasanov R.S., Faizullina E.V., Khismatulina I.M., Murtazin A.I. Structural composition and clinical features of dermatological patients with keratinocytic skin tumors</p>	
<p>Семенов А.А., Бузанаков Д.М., Черников Р.А., Слепцов И.В., Макарынь В.А., Успенская А.А., Тимофеева Н.И., Чинчук И.К., Карелина Ю.В., Новокшонов К.Ю., Федоров Е.А., Малиугов Ю.Н., Алексеева С.А., Саблин И.В., Золотуха А.В., Реброва Д.В., Валдина Е.А., Горская Н.А., Бубнов А.Н. Предоперационная оценка риска агрессивного течения медуллярной карциномы щитовидной железы</p>	97	<p>Semenov A.A., Buzanakov D.M., Chernikov R.A., Sleptsov I.V., Makarin V.A., Uspenskaya A.A., Timofeeva N.I., Chinchuk I.K., Karelina I.V., Novokshonov K.Y., Fedorov E.A., Maliugov I.N., Alekseeva S.A., Sablin I.V., Zolotukho A.V., Rebrova D.V., Valdina E.A., Gorskaya N.A., Bubnov A.N. Quantitative assessment of preoperative risk factors for aggressive course of medullary thyroid carcinoma</p>	
<p>Кишкина А.Ю., Юнусова Н.В., Коломиец Л.А., Колегова Е.С., Кондакова И.В. Значимость клинических и гормонально-метаболических параметров в дооперационном прогнозировании риска лимфогенного метастазирования у больных раком эндометрия I клинической стадии</p>	105	<p>Kishkina A.Yu., Yunusova N.V., Kolomiets L.A., Kolegova E.S., Kondakova I.V. The significance of clinical and hormonal-metabolic parameters in the preoperative prediction of the risk of lymphogenous metastasis in patients with stage I endometrial cancer</p>	
<p>Загороднев К.А., Романько А.А., Горгуль Ю., Иванцов А.О., Соколенко А.П., Бизин И.В., Кулигина Е.Ш. Поиск генетических детерминант наследственного риска рака молочной железы с помощью полноэкзомного секвенирования BRCA-негативных пациентов: новые кандидатные гены USP39, SLIT3, CREB3</p>	111	<p>Zagorodnev K.A., Romanko A.A., Gorgul U., Ivantsov A.O., Sokolenko A.P., Bizin I.V., Kuligina E.Sh. Searching for the missing genetic determinants of hereditary breast cancer risk by whole-exome sequencing of BRCA-negative patients: new candidate genes USP39, SLIT3, CREB3</p>	
<p>Спирина Л.В., Чижевская С.Ю., Кондакова И.В., Чойнзон Е.Л., Ковалева И.В. Экспрессия VHL при опухолевой патологии щитовидной железы: связь с распространенностью процесса, экспрессией транскрипционных, ростовых факторов и компонентов АКТ/m-TOR сигнального пути</p>	117	<p>Spirina L.V., Chizhevskaya S.Yu., Kondakova I.V., Choynzonov E.L., Kovaleva I.V. VHL expression in case of thyroid tumor pathology: connection with the prevalence of the disease, expression of transcription, growth factors and components of the AKT / m-TOR signaling pathway</p>	
<b>Клинический случай</b>		<b>Clinical practice</b>	
<p>Сметанина С.В., Ускова Е.Ю., Сметанина О.В. Диагностические параллели в цитологической диагностике плоскоклеточного рака молочной железы. Клиническое наблюдение</p>	123	<p>Smetanina S.V., Uskova E.Yu., Smetanina O.V. Diagnostic parallels in the cytological diagnosis of squamous breast cancer. Clinical case</p>	

<p align="center"><b>Оригинальные статьи</b> Б. Экспериментальные исследования</p>		<p align="center"><b>Original research</b> B. Experimental research</p>
<p><i>Гончарова А.С., Протасова Т.П., Лукбанова Е.А., Воловик В.Г., Миндарь М.В., Ходакова Д.В., Волкова А.В., Заикина Е.В., Чапек С.В., Карнаухов Н.С., Потемкин Д.С., Васильченко Н.Г., Максимов А.Ю.</i> Разработка метода получения ксеногенной опухолевой модели с использованием пористого металлического скелета</p>	127	<p><i>Goncharova A.S., Protasova T.P., Lukbanova E.A., Volovik V.G., Mindar M.V., Khodakova D.V., Volkova A.V., Zaikina E.V., Chapek S.V., Karnaukhov N.S., Potemkin D.S., Vasilchenko N.G., Maksimov A.Yu.</i> Development of method for creating tumor xenograft model with porous metal scaffold</p>
<p><i>Захаренко А.А., Беляев М.А., Багненко С.Ф., Вerveкин И.А., Юкина Г.Ю., Тамазян Н.В., Новикова А.Д., Палтышев И.А.</i> Сравнительный анализ региональных методов химиотерапии на экспериментальной модели крысы с карциноматозом брюшины</p>	134	<p><i>Zakharenko A.A., Beliaev M.A., Bagnenko S.F., Vervekin I.V., Iukina G.U., Tamazian N.V., Novikova A.D., Paltyshev I.A.</i> Comparative analysis of regional chemotherapy methods on an experimental rat model with peritoneal carcinomatosis</p>
<p><i>Костеников Н.А., Дубровская В.Ф., Кованько Е.Г., Миролубова О.Ю., Мухина М.С., Илющенко Ю.Р., Станжевский А.А., Майстренко Д.Н.</i> Динамика изменений структурных параметров периваскулярной инвазии глиомы С6 (экспериментальное исследование)</p>	144	<p><i>Kostenikov N.A., Dubrovskaya V.F., Kovan'ko E.G., Mirolyubova O.Yu., Mukhina M.S., Ilyushchenko Yu.R., Stanzhevsky A.A., Maistrenko D.N.</i> Glioma C6 perivascular changes of invasion structural parameters variation (research study)</p>
<p><i>Корытов О.В., Иванов С.Д., Корытова Л.И., Семенов А.Л., Тоцильников Г.В., Васильева И.Н., Беспалов В.Г., Ахтемзянов А.Р.</i> Экспериментальная терапия кроликов с лучевым циститом</p>	150	<p><i>Korytov O.V., Ivanov S.D., Korytova L.I., Semenov A.L., Tochilnikov G.V., Vasilyeva I.N., Bespalov V.G., Akhtemzyanov A.R.</i> Experimental therapy for rabbits with radiation cystitis</p>

И.А. Балдуева<sup>1</sup>, Т.Л. Нехаева<sup>1</sup>, А.М. Беляев<sup>1,2</sup>

## Мезенхимальные стволовые клетки в лечении онкологических пациентов с пневмонией COVID-19

<sup>1</sup>ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России», Санкт-Петербург,  
<sup>2</sup>ГБОУ ВПО «СЗГМУ им. И. И. Мечникова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург

В обзоре обсуждаются патогенетические механизмы развития респираторной инфекции COVID-19 и вопросы клинического использования клеточных технологий на основе мезенхимальных стволовых клеток (МСК). В связи с глобальной пандемией респираторной инфекции COVID-19/SARS-CoV-2, связанной с распространением вируса SARS-CoV-2, и сложностью в лечении тяжелых случаев инфекции, иммуномодулирующая активность МСК, обусловленная факторами воспалительного микроокружения может быть использована в комплексном лечении пневмонии COVID-19, в том числе и у онкологических пациентов.

**Ключевые слова:** обзор, мезенхимальные стволовые клетки, МСК, SARS-CoV-2, пневмония, COVID-19, воспаление, цитокины, клинические исследования

Глобальная пандемия респираторной инфекции COVID-19/SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus-2) с тотальным поражением легких, развитием острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), высокой летальностью, отсутствием специфического лечения вызвала острую необходимость в ускоренной разработке новых методов лечения. В этой связи клеточные технологии на основе МСК и создание хорошо охарактеризованного биомедицинского клеточного продукта (БМКП) представляются в высшей степени перспективными для лечения пневмонии COVID-19 и уже получили признание в пилотных клинических исследованиях. Вместе с тем, доклинические исследования респираторных заболеваний и немногочисленные клинические случаи использования МСК при инфекции COVID-19 свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения патогенетических механизмов МСК на экспериментальных моделях повреждения легких, вызванных SARS-CoV-2, и проведение надлежащим образом организованных клинических исследований для различных категорий онкологических пациентов с пневмонией COVID-19.

## Патогенетические механизмы развития респираторной инфекции COVID-19

SARS-CoV-2 — одноцепочечный РНК-содержащий вирус, относится к семейству Coronaviridae, генетическая последовательность которого сходна с SARS-CoV и вирусом ближневосточного респираторного синдрома на 79% и 50% соответственно. На основании моделирования гомологии было показано, что SARS-CoV-2 имеет 96,2% гомологии с BatCoV RaTG13, коронавирусом летучих мышей из *Rhinolophus affinis* (Китай) [35]. У SARS-CoV-2 объемный, довольно сложный геном и поэтому он достаточно быстро мутирует. Было показано, что случайные мутации и рекомбинация являются двумя основными источниками генетического разнообразия этого вируса. Мутации затрагивают нерегуляторную часть генома. Подобно другим РНК-вирусам, генетическое разнообразие SARS-CoV-2 имеет решающее значение для его приспособления, выживания и, вероятно, патогенеза [25, 31].

Патогенез SARS-CoV-2 еще недостаточно изучен. Предполагается два пути проникновения SARS-CoV-2 в клетку: через рецептор клеточной поверхности ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2) и через трансмембранный гликопротеин CD147. ACE2 рассматривается в качестве основного фактора прикрепления SARS-CoV-2 к клеткам человека [33]. Экспрессия ACE2 выражена в терминальных бронхиолах, а также в эпителиальных клетках легких I и II типов, что согласуется с первичной патологией COVID-19: потерей насыщения кислородом из-за плохого легочного газообмена (снижение SpO<sub>2</sub> < 88%) более чем у 30% заболевших. Кроме того, значительные уровни экспрессии ACE2 были зарегистрированы на энтероцитах тонкой кишки, артериальных и венозных эндотелиальных клетках, артериальных гладкомышечных клетках во многих органах, в том числе его экспрессия обнаружена на блуждающем нерве, иннервирующем легкие, сердце и пищеварительную систему, что выявляется разнообразием симптомов, связанных с COVID-19: anosmia,

усталость, миокардит, диарея, сепсис с развитием септического (инфекционно-токсического) шока, энцефалопатия (головные боли, спутанность сознания, инсульт подобные симптомы и судороги) [10, 30].

Важное значение для проникновения SARS-CoV-2 в клетку хозяина отводится мембранно-связанной сериновой протеазе 2 (TMPRSS2), которая инициирует расщепление S-белков вируса и способствует его слиянию с клеткой хозяина. Как только слияние мембран произошло, вирусная РНК высвобождается и запускает процесс репликации геномной РНК — создание множества более мелких РНК, называемых субгеномными. Экспериментальное подтверждение получило наличие в геноме SARS-CoV-2 девяти из десяти ранее известных субгеномных РНК (входящих в структуру вирусных частиц и транслирующихся в конкретные вирусные белки), а также были обнаружены десятки неизвестных белков, образующихся на разных этапах жизненного цикла вируса в результате слияния и расщепления. Кроме того, обнаружены многочисленные новые РНК и множественные неизвестные химические модификации вирусных РНК [16].

Структурные белки, образующие вирусную частицу (S-белок шипа, E-белок оболочки, M-белок мембраны и N — нуклеокапсидный белок), синтезируются в результате транскрипции субгеномной РНК. Белки шипа, оболочки и мембраны входят в эндоплазматический ретикулум клеток-хозяина, а белок нуклеокапсида объединяется с нитью геномной позитивной РНК, превращаясь в нуклеопротеиновый комплекс. Вирус собирается в полную вирусную частицу в аппарате Гольджи путём упаковки в везикулы. Везикулы сливаются с плазматической мембраной и выводятся во внеклеточное пространство — происходит выделение вируса. В отличие от других патогенных коронавирусов, вызывающих сезонное ОРВИ, SARS-CoV-2 может реплицироваться в верхних дыхательных путях без выраженной клинической картины [12]. Факторы, определяющие прогрессирование бессимптомной или легкой инфекции COVID-19 в тяжелый ОРДС и угрожающую жизни пневмонию, остаются малоизученными. Широко изучено развитие диффузного повреждения альвеол при вирусной инфекции гриппа.

Грипп — это «ограниченная» инфекция верхних дыхательных путей, которая вызывает острые и тяжелые системные симптомы. Распространение вируса гриппа в легких определяется ответом CD4+ Т-лимфоцитов при участии моноцитарных хемоаттрактантных белков (CCL2 и CXCL2), которые опосредуют инфильтрацию и воспалительную активацию макрофагов и нейтрофилов. Это приводит к массивной продукции

эффекторных молекул, включая фактор некроза опухоли, оксид азота, связанный с фактором некроза опухоли апоптоз-индуцирующий лиганд, которые активно вовлекаются в патогенез прогрессирующего повреждения тканей [12]. В то время как SARS-CoV-2 инфицирует клетки альвеолярного эпителия и макрофаги, и индуцирует очаги поражения легких даже у людей с бессимптомными формами инфекции.

Механизмы повреждения тканей при пневмонии, индуцированной SARS-CoV-2, имеют некоторые общие аспекты с инфекцией, вызванной вирусом гриппа, но отличие COVID-19, по-видимому, заключается в важной роли каскада воспалительных цитокинов наряду с CCL2 и нарушением передачи сигналов интерферона I типа. Это может быть связано с задержкой клиренса вируса и тяжестью болезни, но может быть и благоприятное течение коронавирусной инфекции: для SARS-CoV-2 описана защитная роль цитотоксических CD8+ Т-клеток-памяти, которые могут ограничивать распространение вируса в легких и предотвращать прогрессирование заболевания [2]. Кроме того, есть данные, что в альвеолярное интерстициальное воспаление вовлекаются Т-клеточные иммунные реакции и, как следствие, происходит повреждение эндотелиальных клеток, зараженных SARS-CoV-2. Образуется «сильная» память CD4+ и CD8+ Т-клеток, индуцированных SARS-CoV-2, которые зарегистрированы у выздоравливающих лиц после COVID-19 и лиц, у которых по генетическим причинам В-клетки вообще не образуются [23].

У здоровых лиц, ранее перенесших атипичную пневмонию, вызванную SARS-1, антиген-специфические Т-клетки памяти были обнаружены через 11 лет, когда специфических к вирусу антител в их организме уже не было. Но как развивается Т-клеточный ответ на вирус SARS-CoV-2 во времени, а также, какую роль он играет в кросс-реактивности (Т-клетки, специфичные к другим близким вирусам) еще недостаточно изучено.

Есть данные о секвенировании Т-клеточных рецепторов (ТКР) для изучения изменений в репертуаре Т-клеток к COVID-19. В исследовании А.А. Minervina et al. (2020) у двух доноров с легким течением COVID-19 после болезни были идентифицированы клоны CD4+ и CD8+ Т-клеток с транзиторной клональной экспансией. Антигенная специфичность последовательностей CD8+ ТКР к эпитопом SARS-CoV-2 была подтверждена как методом связывания тетрамер главного комплекса гистосовместимости HLA (HLA от англ. *Human Leukocyte Antigens*), так и присутствием некоторых эпитоп-специфичных ТКР к SARS-CoV-2 в международной базе дан-

ных. Показано, что у обоих доноров большинство инфекционно-реактивных клонов Т-клеток приобретают фенотипы Т-клеток памяти. Вместе с тем, определенные клоны Т-лимфоцитов были обнаружены во фракции Т-клеток памяти в период до инфекционного проявления заболевания, что свидетельствует об участии ранее существовавших кросс-реактивных Т-клеток памяти в иммунном ответе на SARS-CoV-2 [4, 22].

### Острый респираторный дистресс-синдром

Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) — тип дыхательной недостаточности (гипоксии), характеризующийся быстрым началом обширного диффузного воспалительного процесса в легких, приводящего к увеличению проницаемости альвеолярных капилляров, увеличению массы легких, потере аэрированной легочной ткани, диффузному поражению альвеол в острой фазе ОРДС. Клинические симптомы включают одышку, учащенное дыхание, тахикардию, цианоз на фоне постоянной лихорадки, непродуктивного кашля, миалгии, астении. В лабораторных анализах наблюдается гиперферритинемия, лейкопения и/или лимфопения, увеличение протромбинового времени, D-димеров, С-реактивного белка [8, 19].

Классический ОРДС впервые был описан более 50 лет назад как форма дыхательной недостаточности, которая очень напоминала респираторный дистресс-синдром у младенцев. Это опасное для жизни состояние может быть вызвано различными легочными (например, пневмония, аспирация) или внелегочными (сепсис, панкреатит, травма) нарушениями, приводящими к развитию отека легких вследствие нарушения эндотелиального и эпителиального барьеров легких, альвеолярно-капиллярной мембраны.

Альвеолярно-капиллярная мембрана состоит из микрососудистого эндотелия, интерстиция и альвеолярного эпителия. Морфологические характеристики острого альвеолярного повреждения включают потерю целостности альвеолярно-капиллярной мембраны, чрезмерную трансэпителиальную миграцию нейтрофилов и высвобождение провоспалительных цитотоксических медиаторов. Биомаркеры, обнаруженные на эпителии и эндотелии, участвуют в воспалительном и коагуляционном каскадах, являются предикторами развития ОРДС и риска летального исхода [20].

В случае развития COVID-19 пневмонии при попадании в легкие SARS-CoV-2 запускает иммунный ответ, привлекая клетки иммунной системы в область, зараженную вирусом, и приводит к локальному воспалению. Тяжесть течения COVID-19 может определяться высвобождением

избыточного или неконтролируемого уровня цитокинов, которые могут привести к летальному исходу из-за чрезмерной реакции иммунной системы, которая называется цитокиновым штормом. В цитокиновом шторме ведущая роль отводится медиаторам воспаления, включая провоспалительные цитокины и хемокины, такие как интерлейкин (IL) IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, фактор некроза опухоли (TNF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (MCP1, также известный как CCL2), макрофагальный воспалительный белок 1 альфа (MIP1a, известный как CCL3), СХС-хемокиновый лиганд 10 (CXCL10), С-реактивный белок, ферритин, D-димеры. Установлено, что в патогенетических механизмах COVID-19 пневмонии и ОРДС потенциально важную роль играет IL-6-сигнальный путь и активатор транскрипции в системе внутриклеточной сигнализации 3 (STAT3). Сывороточные уровни IL-6, IL-2, IL-15, моноцитарного хемокина CCL2, а также TRAIL были достоверно выше в симптоматических, чем в бессимптомных случаях, что указывает на возможно важную роль этих цитокинов и хемокинов в патогенезе заболевания.

При COVID-19 пневмонии ОРДС развивается у 3-4% пациентов и может приводить к летальному исходу. Для тех, кто выживает, снижение качества жизни является распространенным явлением [35, 36]. Вместе с тем, реакция на инфекцию COVID-19 может быть бессимптомной или легкой, что наблюдается у многих заболевших.

При компьютерной томография (КТ) органов грудной клетки у 29,7% бессимптомных пациентов в легких были выявлены небольшие очаги «матового стекла». Аналогичные результаты КТ легких были получены у 54% РТ-ПЦР-положительных бессимптомных пассажиров с круизного судна, пришвартованного в бухте Йокогама, Япония, что указывает на наличие поражений легких даже в отсутствие клинических проявлений коронавирусной инфекции [15].

Летальность от SARS-CoV-2 высока из-за недостаточных знаний о патогенезе COVID-19 и отсутствия специфического лечения [14]. Следует отметить, что среди повышенных медиаторов воспаления уровень IL-6 в крови высоко коррелирует со смертностью от заболевания по сравнению с выжившими и не выжившими с инфекцией COVID-19. В этой связи можно ожидать, что использование двух клинически одобренных антагонистов IL-6R (тоцилизумаб и сарилумаб), которые в настоящее время используются для лечения ревматоидного артрита, сыграет решающую роль в лечении тяжелобольных пациентов с COVID-19.

В настоящее время доступные способы лечения COVID-19 включают неспецифические

противовирусные препараты, антибиотики, используемые для лечения вторичных бактериальных инфекций, сепсиса и уменьшения воспаления. Противовоспалительные препараты, в том числе нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), глюкокортикостероиды, иммуноглобулины, хлорохин/гидроксихлорохин, антагонисты воспалительных цитокинов (антагонисты к рецептору IL-6R, ингибиторы TNF $\alpha$ , антагонисты IL-1, киназный ингибитор JAK) [13, 25].

Важным становится и то, насколько высока вероятность, что пациент восстановится после пневмонии COVID-19 и восстановится функция его легких. Во-первых, пациенту надо преодолеть тяжесть самой коронавирусной инфекции, независимо от клинических проявлений; более легкие случаи с меньшей вероятностью вызывают длительные фиброзные рубцы в легочной ткани. Во-вторых, существуют ли серьезные проблемы со здоровьем, такие как хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) или болезни сердца, онкологическая патология, которые могут повысить риск развития ОРДС. Легочная ткань у этой категории больных может быть менее эластичной, и они могут иметь ослабленный иммунитет из-за преклонного возраста. Выздоровление пациента и восстановление легких будет зависеть от того, каким лечением и уходом он будет обеспечен, и как быстро. Своевременное комплексное лечение тяжелобольных онкологических пациентов с пневмонией COVID-19 в специализированной клинике может свести к минимуму повреждения легких [3, 9, 25].

В тяжелых случаях ОРДС лечение цитокинового шторма, вызванного SARS-CoV-2, является сложной задачей и должно осуществляться в специализированных отделениях реанимации с использованием искусственной вентиляции легких и экстракорпоральной мембранной оксигенацией. Недавние публикации свидетельствуют о том, что экспериментальной адьювантной терапией «блокады» цитокинового шторма в комплексном лечении пневмонии COVID-19 и ОРДС может быть терапия на основе мезенхимальных стволовых клеток, в том числе и у онкологических пациентов.

### **Иммуномодулирующая активность мезенхимальных стволовых клеток**

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК), их еще называют мезенхимальными стромальными клетками — это гетерогенная популяция мультипотентных стромальных элементов. МСК способны дифференцироваться в различные клетки: остеобласты, хондробласты, адипоциты, клетки легкого, мышечные клетки, эпителий кишечника, нейроны, эпителий. МСК присутству-

ют в тканях эмбриона и во взрослом организме: в костном мозге, плаценте, пуповине, жировой ткани, мышечной ткани, дентальной пульпе, ткани миндалин, стенках сосудов и др. Они являются одним из наиболее часто используемых типов клеток в регенеративной медицине. Наряду с этим все возрастающее количество публикаций свидетельствует об эффективности МСК в лечении различных заболеваний, включая неврологические расстройства, ишемическую болезнь сердца, диабет, заболевания костей, хрящей и др. Зарегистрировано более 900 клинических исследований и пролечено более 10 000 пациентов (дата обращения 24 апреля 2020 г. [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)) с использованием аутологичных и аллогенных МСК, терапевтический потенциал которых обусловлен сложными клеточными и молекулярными механизмами, включающими дифференцировку в различные клеточные линии и регуляцию иммунных функций с помощью воздействия на компоненты врожденного и адаптивного иммунитета [8, 34].

В соответствии с критериями Международного общества клеточной терапии (ISCT) на МСК, впервые выделенных из костного мозга, были обнаружены дифференцировочные антигены CD90, CD105 и CD73 (CD от англ. Cluster Differentiation) и не определялись маркеры гемопоэза CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, HLA-DR [6]. В тоже время на МСК, полученных из разных тканей, выявлена экспрессия других маркеров, определяемых различными факторами их микроокружения. Например, МСК, выделенные из легкого, отличаются от МСК, полученных из костного мозга, экспрессией CD146 и др. [29]. На МСК жировой ткани, наряду с обязательными общими дифференцировочными антигенами определяется белок CD49d и др. [11]. В настоящее время МСК обнаружены во всех тканях и антигенный состав для их идентификации находится на стадии изучения.

Важным становится изучение цитокинового профиля МСК и его влияние на иммунную систему. В большом количестве работ показано, что МСК продуцируют биологически активные растворимые факторы для обеспечения иммуномодулирующего, ангиогенного, антиапоптозного и антиоксидантного эффектов [5, 27]. Они регулируют пролиферацию и функцию Т-лимфоцитов, уравнивают активность субпопуляций Т-хелперов, стимулируют генерацию Т-регуляторных лимфоцитов (Tregs), В-регуляторных лимфоцитов, M2 макрофагов, подавляют активность естественных киллеров (NK-клетки), В-лимфоцитов, созревание и активацию дендритных клеток, стимулируют пролиферацию и секрецию цитокинов семейством врожденных лимфоидных клеток (ILCs) [24, 28].

МСК способны изменять поведение клеток в опухоли и опухолевом микроокружении. Например, они могут индуцировать иммуноопосредованный противовоспалительный эффект в опухолевом очаге, ингибировать опухолевый ангиогенез, предотвращать метастазирование, индуцировать апоптоз и подавлять пролиферацию опухолевых клеток [3]. Иммуномодулирующая активность МСК в значительной степени обусловлена факторами воспалительного микроокружения. Доклинические и клинические исследования свидетельствуют о том, что после попадания в организм человека через внутривенную или внутриартериальную инфузию часть МСК накапливается в легких, активируется в провоспалительной среде легких, высвобождая противовоспалительные факторы, снижающие секрецию провоспалительных цитокинов, одновременно они модулируют регуляторные Т-клетки и макрофаги, защищают альвеолярные эпителиальные клетки, способствуют разрешению воспаления, предотвращают легочный фиброз [17, 18]. Таким образом, МСК обладают потенциалом, способствующим увеличению выживаемости пациентов при лечении ОРДС, индуцированного COVID-19, пластичность МСК становится решающим фактором в развитии различных иммунных эффектов в зависимости от патогенеза COVID-19.

В настоящее время изучение пластичности МСК у пациентов с COVID-19 осуществляется в более 270 клинических исследованиях, которые зарегистрированы в официальном международном реестре клинических исследований. Это МСК, выделенные из пуповины, плаценты, дентальной пульпы, костного мозга, периферической крови, жировой ткани, обонятельных луковиц и экзосомы МСК. Из них 5 исследований выделены по запросу MSC I SARS-Cov-2 (COVID-19) Related Acute Respiratory Distress Syndrome (дата обращения 4 января 2021 г. [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Из России зарегистрированы 2 исследования: 1. «Безопасность и эффективность метода ингаляции экзосом при пневмонии, ассоциированной с COVID-19». 2. «Оценка безопасности и эффективности метода ингаляции экзосом при пневмонии, ассоциированной с SARS-CoV-2». Это пилотные клинические исследования ингаляции экзосом, выделенных из МСК для лечения тяжелой коронавирусной пневмонии (Медицинский центр Династа, Самара, Российская Федерация).

Клиническая эффективность МСК, выделенных из жировой ткани, в адьювантном режиме зарегистрирована в рандомизированном исследовании 1 фазы у пациентов с COVID-19 в критическом состоянии цитокинового шторма, дыхательной и полиорганной недостаточности.

В этом исследовании клиническое улучшение оцениваются по дням: 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25 с учетом измерения температуры тела и других жизненно важных показателей, степень насыщения артериальной крови кислородом, биохимических показателей крови (включая функциональные тесты печени), креатининфосфокиназы, С-реактивного белка, иммунного статуса (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD19+ и CD56+ лимфоцитов), провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , ITN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10), иммуноглобулинов (IgA, IgG, IgM и IgE), HLA-генотипа и отключение от вентиляции легких [1].

В Китае проводится двойное слепое, плацебо-контролируемое многоцентровое исследование безопасности и эффективности терапии МСК у пациентов с осложнениями COVID-19 (лихорадка, ОРДС) и у здоровых медицинских работников, находящихся в тесном контакте с этой категорией пациентов с целью профилактики COVID-19. Основой исследования послужили результаты пилотного исследования внутривенного введения МСК пуповинной крови, которые привели к полному выздоровлению инфицированных COVID-19 пожилых пациентов с дыхательной недостаточностью [21].

Таким образом, доклинические и клинические исследования использования МСК при инфекции COVID-19 свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения патогенетических механизмов МСК на экспериментальных моделях повреждения легких, вызванных SARS-CoV-2, и проведение надлежащим образом организованных клинических исследований для различных категорий онкологических пациентов с пневмонией COVID-19 и ОРДС.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Adjuvant therapy with mesenchymal stem cells in patients diagnosed with COVID-19 in critical condition. [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov).
2. Altenburg A.F., Rimmelzwaan G.F., de Vries R.D. Virus-specific T cells as correlate of (cross-) protective immunity against influenza. *Vaccine*. 2015; 33: 500-506.
3. Babajani A., Soltani P., Jamshidi E. et al. Mesenchymal stem cells with anti-neoplastic agents for targeted treatment of cancer. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020;8: 748.
4. Behrmann O., Spiegel M. COVID-19: from rapid genome sequencing to fast decisions. *The Lancet Infect. Dis.* 2020; 20: 1218.
5. Daniëlle G. Leuning, Nick R. M. et al. The cytokine secretion profile of mesenchymal stromal cells is determined by surface structure of the microenvironment. *Scientific Reports*. 2018;8, Article number: 7716: 9.
6. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Int. Soc. Cell Ther. position statement. Cytotherapy*. 2006;8: 315-317.
7. Fan E., Brode D., Slutsky A.S. Acute Respiratory distress syndrome: advances in diagnosis and treatment. *JAMA*. 2018; 319: 698-710.

8. Fan X-L, Zhang Y, Li X., Fu Q-L. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cell. Mol. Life Sci.* 2020;77: 2771-2794.
9. Galiatsatos P. What coronavirus does to the lung? Galiatsatos P. is an expert on lung disease at Johns Hopkins Bayview Medical Center.
10. Hamming I., Timens W., Bulthuis M.L.C. et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *Pathol.* 2004; 203: 631-637.
11. Helmy M.A., Mohamed A.F., Rasheed H.M. et al. A protocol for primary isolation and culture of adipose-derived stem cells and their phenotypic profile. *Alexandria J. Med.* 2020; 56: 42-50.
12. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Svhoeder S. et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell.* 2020; 181: 271-280.
13. Huang C., Wang Y, Li X. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet (London, England).* 2020; 395: 497-506.
14. Iacob S., Iacob D.G. SARS-CoV-2 Treatment Approaches: Numerous Options, No Certainty for a Versatile Virus. *Front. Pharmacol.* 2020; 11, Art. 1224.
15. Inui S., Fujikawa A., Jitsu M. et al. Chest CT findings in cases from the cruise ship "Diamond Princess" with coronavirus disease 2019 (COVID-19) Cardiothoracic Imaging. *Radiology: Cardiothoracic Imaging.* 2020.
16. Kim D., Lee J-Y, Yang J-S. et al. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome. *Cell.* 2020;181: 914-921.
17. Leng Z., Zhu R., Hou W. et al. Transplantation of ACE2-mesenchymal stem cells improves the outcome of patients with COVID-19 pneumonia. *Aging and Disease.* 2020; 11: 216-228.
18. Lian Q., Zhang Y., Gao F. et al. Direct differentiation of human-induced pluripotent stem cells to mesenchymal stem cells. *Methods Mol. Biol.* 2016; 1416: 289-298.
19. Matthay M.A., Zemans R.L., Zimmerman G.A. et al. Acute respiratory distress syndrome. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2019; 5: 18.
20. Matthay M.A., Zimmerman G.A. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. *Am. J. Respir Cell Mol. Biol.* 2005; 33: 391-327.
21. Mesenchymal stem cells for the treatment of COVID-19. [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov).
22. Minervina A.A., Komech E.A., Titov A. et al. Longitudinal high-throughput TCR repertoire profiling reveals the dynamics of T cell memory formation after mild COVID-19 infection. *BioRxiv.* 2020.
23. Miyazawa M. Immunopathogenesis of SARS-CoV-2-induced pneumonia: lessons from influenza virus infection. *Inflamm. Regen.* 2020; 40: 39.
24. Negi N., Griffin M.D. Effects of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells: Current understanding and clinical relevance. *Stem cells.* 2020; 38: 596-605.
25. Nitulescu G.M., Paunescu H., Moschos S.A. et al. Comprehensive analysis of drugs. *Int. J. Mol. Med.* 2020;46: 467-488.
26. Rahimi A., Mirzazadeh A., Tavakolpour S. et al. Genetics and genomics of SARS-CoV: A review of the literature with the special focus on genetic diversity and SARS-CoV genome detection. *Genomics.* 2020.
27. Rolandsson E.S., Åhrman E., Palani A. et al. Quantitative proteomic characterization of lung-MSC and bone marrow-MSC using DIA-mass spectrometry. *Sci Rep.* 2017; 7: 9316.
28. Sharma K., Husain S.Y., Das P. et al. Regenerative potential of mesenchymal stem cells: therapeutic applications in lung disorders. In: Pharm PV (ed) *Liver, lung and heart regeneration.* Springer International Publishing, Cham. 2020; 77-117.
29. Sveiven S.N., Nordgren T.M. Lung-resident mesenchymal stromal cells are tissue-specific regulators of lung homeostasis. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2020; 319: L197-L210.
30. To K.F., Lo A.W.I. Exploring the pathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS): The tissue distribution of the coronavirus (SARS-CoV) and its putative receptor, angiotensin-converting enzyme 2 (ACE). *Pathol.* 2004; 203: 740-743.
31. Wen F., Yu H., Guo J. et al. Identification of the hyper-variable genomic hotspot for the novel coronavirus SARS-CoV-2. *J. Infect.* 2020; 80: 671-693.
32. Wilkinson T.M., Li C.K.F., Chui C.S.C. et al. Preexisting influenza-specific CD4+ T cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans. *Nat. Med.* 2012;18: 274-280.
33. Wrapp D., Wang N., Corbett K.S. et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 2020;367: 1260-1263.
34. Wu X., Jiang J., Gu Z. et al. Mesenchymal stromal cell therapies: immunomodulatory properties and clinical progress. *Stem cell Res. Ther.* 2020;11: 345.
35. Zhou P., Yang X.G., Wang B. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579: 270-273.
36. Zhu N., Zhang D., Wang W. et al. China novel coronavirus investigating and research team. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 2020;382: 727-733.

Поступила в редакцию 11.01.2021 г.

*I.A. Baldueva<sup>1</sup>, T.L. Nekhaeva<sup>1</sup>, A.M. Belyaev<sup>1,2</sup>*

**Mesenchymal stem cells in treatment of cancer patients with COVID-19 pneumonia**

<sup>1</sup>N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Saint-Petersburg,

<sup>2</sup>I.I. Mechnikov North-Western State Medical University Ministry of Health of Russia, Saint Petersburg

The review discusses the pathogenetic mechanisms of the development of respiratory infection COVID-19 and the clinical use of cell technologies based on mesenchymal stem cells (MSCs). Due to the global pandemic of COVID-19/SARS-CoV-2 respiratory infection associated with the spread of the SARS-CoV-2 virus, and the difficulty in treating severe cases of infection, the immunomodulatory activity of MSCs due to inflammatory microenvironment factors can be used in the complex treatment of COVID-19 pneumonia, including in cancer patients.

Key words: review, mesenchymal stem cells, MSC, SARS-CoV-2, pneumonia, COVID-19, inflammation, cytokines, clinical trials

Т.И. Аишацава<sup>1</sup>, М.Ю. Татарина<sup>1</sup>, Л.М. Когония<sup>2</sup>, Д.Р. Насхлеташвили<sup>3</sup>, В.Ю. Жуков<sup>4</sup>

## Современные подходы молекулярно-генетической диагностики глиобластом с точки зрения клинициста

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО «РНМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва,  
<sup>2</sup>ГБУЗ МО «МОНИКИ» им. М.Ф. Владимирского, Москва,  
<sup>3</sup>ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва,  
<sup>4</sup>НМИЦ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко, Москва

Статья посвящена вопросу молекулярно-генетической диагностики глиобластом головного мозга. Несмотря на значительные успехи нейроонкологии, был достигнут небольшой прогресс в продлении жизни пациентов с глиобластомой головного мозга, причем значительная часть эффективности лечения зависит от распознавания двух прогностических биомаркеров: мутации промотора изоцитратдегидрогеназы (IDH) и метилирования промотора Об-метилгуанин-метилтрансферазы (MGMT). В статье обобщены данные мировых и отечественных клинических исследований, позволяющих дополнить гистологическую характеристику первичных глиобластом генетическими маркерами: наличием мутации TERT, EGFR-амплификацией, потерей функции PTEN, LOH 10q, наличием мутации BRAF.

Следует отметить то, что амплификация EGFR, обуславливая устойчивость к апоптотическим стимулам и алкилирующей химиотерапии Темозоломидом, привлекает большое внимание в качестве терапевтической мишени. Частота встречаемости мутации TERT составляет 90% всех опухолей различного генеза, наиболее часто мутация TERT обнаруживается в олигодендроглиоме или первичной глиобластоме. Потеря гетерозиготности в области локализации гена PTEN наблюдается во многих типах спорадических опухолей, в том числе более чем в 40% глиобластом. Мутации в этом гене обнаруживаются в опухолях головного мозга, эндометрия, простаты, почек и молочной железы. Наличие мутации PTEN является плохим прогностическим фактором.

LOH 22q значительно чаще встречается при вторичных глиобластомах (82%), чем при первичных глиобластомах (41%). Среди опухолей головного мозга мутация BRAF наиболее часто встречается при плеоморфной ксанстроцитоме (60-70%). Мутация BRAF V600E была обнаружена в эпителиоидной глиобластоме, являющейся редким и агрес-

сивным видом глиобластомы, характеризующийся неблагоприятным прогнозом (около 6 мес.) и частым лептоменингеальным распространением.

Таким образом, знания молекулярных механизмов канцерогенеза даст возможность персонализированного подхода к лечению глиобластом головного мозга.

**Ключевые слова:** обзор, IDH, MGMT, EGFR, TERT, PTEN, TP53, LOH, BRAF, глиобластома

### Актуальность проблемы

Глиобластома — наиболее частая и высокозлокачественная первичная опухоль головного мозга. По данным CBTRUS (Central brain tumor registry of the United States) за 2011-2015 гг. наиболее распространенными гистологическими видами первичных опухолей головного мозга являются менингиома (37,1%), опухоль гипофиза (16,5%) и глиобластома (14,7%). Важно отметить, что глиобластома занимает первое место по заболеваемости среди злокачественных новообразований головного мозга (47,7%). Пик заболеваемости приходится на 75-85 лет, при этом у мужского населения глиобластома встречается в 1,58 раз чаще, чем у женского. Общая пятилетняя выживаемость в обеих гендерных группах в среднем составила 5,6%.

Следует подчеркнуть, что глиобластома является одной из наиболее агрессивных опухолей человека, поскольку лишь 5% больных живут более 5 лет, медиана общей выживаемости варьирует от 3 до 12 мес. [1].

В Российской Федерации заболеваемость опухолями головного мозга и другими отделами ЦНС составила 6,02 на 100 000 населения. Необходимо подчеркнуть, что в настоящее время в Российской Федерации в официальной статистике отсутствует выделение группы «злокачественных глиом», но рассматривается общая группа опухолей ЦНС. [2]

В эпидемиологическом исследовании А.В. Смолина и др. [3] представлен анализ данных

по заболеваемости глиобластом на базе 32 лечебных учреждений онкологического и нейроонкологического профиля за период времени с 2012 по 2013 гг. В исследовании было показано, что из 471 случая глиальных опухолей у 325 пациентов установлен диагноз «глиобластома». Кроме того, характерно преобладание мужчин (55%) в структуре заболеваемости глиобластом, медиана возраста составила 51,9 года.

Успехи технологий молекулярного анализа в последние годы позволяют глубже понимать процессы канцерогенеза глиом, что подчеркивает гетерогенность глиобластом как по гистологическому строению, так и по генетическому статусу, тем самым определяя различное течение, тактику лечения и прогноз заболевания. В данном обзоре дается обобщение современных генетических особенностей глиобластом, имеющих клиническое значение.

Таким образом, несмотря на значительные успехи нейроонкологии, был достигнут небольшой прогресс в продлении жизни пациентов с глиобластомой головного мозга, причем значительная часть эффективности зависит от распознавания двух прогностических биомаркеров: мутации промотора изоцитратдегидрогеназы (IDH) и метилирования промотора Об-метилгуанин-метилтрансферазы (MGMT). [4]

Глиобластома представляет собой высокозлокачественную опухоль преимущественно астроцитарной дифференцировки. Следует отметить, что выделяют первичную и вторичную глиобластомы. Первичная глиобластома возникает «de novo», тем временем как вторичная глиобластома развивается из диффузной (grade II) и анапластической (grade III) астроцитомы.

Переломным моментом в изучении глиобластом стало обнаружение мутаций IDH1/2, кодирующих изоцитрат-дегидрогеназу. [5]

Прежде всего следует отметить, что мутации генов IDH1/IDH2, были обнаружены в 2008 г. в глиомах низкой степени злокачественности и во вторичных глиобластомах. Однако мутации IDH1/2 также были выявлены и при других злокачественных новообразованиях: остром миелоидном лейкозе, плоскоклеточном раке полости рта, раке предстательной железы, немелкоклеточном раке легкого, энхондроме, холангиокарциноме и хроническом миелогенном лейкозе. Позднее исследователи обнаружили, что мутация IDH1 является маркером астроцитом, олигоастроцитом, олигодендроглиом и вторичных глиобластом, но крайне редко — первичных глиобластом (<5%) [6].

Ферменты IDH катализируют окислительное декарбоксилирование изоцитрата с образованием  $\alpha$ -кетоглутарата и одновременно продуцируют NADPH из NADP<sup>+</sup>.

IDH1/2 мутации являются миссенс-мутациями, которые приводят к аминокислотной замене остатка аргинина на гистидин в активном сайте (R132H). В дальнейшем мутация IDH1 приводит к восстановлению  $\alpha$ -кетоглутарата в R(-)-2-гидроглутарат, что подтверждается его высоким уровнем в глиомах с IDH1 мутацией. Образцы опухолей, содержащие мутации IDH1/2, демонстрируют в 100 раз выше уровни R(-)-2-гидроглутарата, чем опухоли с нормальными IDH1/2. В свою очередь, накопление R(-)-2-гидроглутарата в клетках вызывает гиперметилирование клеточного генома (гиперметилированный фенотип CIMP+). В большинстве случаев, данный фенотип связан с молодым возрастом и высокой общей выживаемостью пациентов. Кроме того, мутации IDH1 и IDH2 являются взаимоисключающими в глиомах [7].

В 2011 г. в Бельгии было проведено исследование влияния мутации IDH1 на течение и прогноз глиом (n=63). Наблюдение привело к следующему результату: мутация IDH1 была выявлена в 15,6% случаев глиобластом «de novo», 55,5% — вторичных глиобластом и 55,5% — глиом GII и GIII; возраст пациентов с мутацией IDH1 был значительно моложе в сравнении с пациентами без мутаций IDH1 (средний возраст составлял 39,4 и 53,1 года соответственно). Необходимо подчеркнуть, что во время исследования 59 пациентов погибли из-за прогрессирования глиобластом, при этом медиана общей выживаемости от первичной постановки диагноза составила 25,73 мес. и 4,93 мес. с момента начала лечения рецидива. Общая выживаемость пациентов с мутацией IDH1 от первичной постановки диагноза значительно выше, чем у пациентов без наличия мутации (56,5 против 21,3 мес.), однако, от времени появления рецидива данное соотношение меняется (5,57 против 4,83) [8].

В то же время помимо мутаций IDH1/2 прогностическое и клиническое значение имеет метилирование гена MGMT (Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза).

Речь идет о маркере, указывающем на чувствительность к алкилирующим препаратам.

К примеру, препарат Темозоломид метилирует пуриновые основания, в том числе сайты Об и N7 на гуанине и сайты N3 на аденине [9]. Считается, что индукция Об-метилгуанина является первичным цитотоксическим событием, приводящем к неспособности репликации ДНК, а в конечном итоге — к гибели клеток. В качестве фермента MGMT удаляет аддукты Об-метилгуанина, индуцированные химиотерапией — алкилирующими препаратами, тем самым устраняя цитотоксический эффект. Отсюда следует вывод о том, что высокий уровень MGMT приводит к устойчивости к темозоломиду.

Метилирование промотора MGMT приводит к пониженной экспрессии белка MGMT, что наблюдается в 40% всех глиобластом. Высокий уровень метилирования промотора MGMT предсказывает увеличение общей выживаемости при глиобластоме, особенно при лечении алкилирующими препаратами [10]. Данная гипотеза подтверждается в исследовании R. Stupp в публикации от 2009 г. журнала *The Lancet*. В работе было доказано преимущество комбинированной терапии (лучевой и химиотерапии Темозоломидом): 573 пациентам с диагнозом «глиобластома» были назначены лучевая терапия (n=286) и комбинированная терапия (n=287), из которых в течение 5 лет погибло 97% и 89% соответственно. Общая выживаемость пациентов, получавших комбинированное лечение, через 2 года составила 27,2%, 3 года — 16,0%, 4 года — 12,1% и 9,8% через 5 лет; однако для группы лучевой терапии общая выживаемость составила 10,9%, 4,4%, 3,0% и 1,9% соответственно. Кроме того, автор отмечает метилирование промотора MGMT как сильный фактор, определяющий исход и пользу от химиотерапии темозоломидом: для пациентов с наличием метилирования MGMT выживаемость составила 48,9% через 2 года, 27,6% через 3 года и 13,8% через 5 лет; в то же время для пациентов без метилирования MGMT выживаемость составила 14,8%, 11,1% и 8,3% соответственно [11]. Таким образом, наличие метилирования промотора MGMT полезно в качестве прогностического маркера, однако нельзя утверждать об его пользе в определении подтипа глиомы.

Следует обратить внимание на дополнительные генетические маркеры, дифференцирующие первичную и вторичную глиобластомы.

В частности, амплификация гена EGFR является характерной особенностью первичной глиобластомы. Амплификация генов — это процесс, который характеризуется увеличением числа копий ограниченного участка в плече хромосомы, связанный со сверхэкспрессией соответствующего амплифицированного гена. При этом амплифицированная ДНК может быть организована либо как внехромосомные элементы — повторяющиеся единицы в одном локусе, либо быть разбросанной по всему геному. В клетках с мутацией EGFR, происходит активация сигнального пути EGFR, контролирующего процессы пролиферации и апоптоза, что инициирует процессы злокачественной трансформации [12]. Ген рецептора эпидермального фактора роста является ключевым онкогеном, мутирующим во многих опухолях, включая аденокарциному легких и глиобластому. Амплификация гена EGFR обнаруживается примерно в 40% глиобластом. Необходимо отметить, что амплификация гена

EGFR сопровождается приобретением множества мутаций, которые включают внутригенные делеции и точечные мутации. Наиболее распространенной мутацией EGFR в глиобластомах головного мозга является делеция в кадре экзона 2-7 (EGFRvIII), встречающаяся в 50% всех случаев EGFR-амплифицированной глиобластоме.

Прогностическая роль амплификации EGFR и мутации EGFRvIII у пациентов с глиобластомой является спорной [13]. В Китае J.R. Chen et al. был проведен метаанализ восьми публикаций, которые не подтвердили значительного различия общей выживаемости пациентов с положительной амплификацией EGFR и отрицательной амплификацией EGFR, а также между общей выживаемости пациентов с EGFRvIII-положительными и EGFRvIII-отрицательными глиобластомами [14].

Следует отметить то, что амплификация EGFR, обуславливая устойчивость к апоптотическим стимулам и алкилирующей химиотерапии Темозоломидом, привлекает большое внимание в качестве терапевтической мишени.

В настоящее время изучено несколько путей блокирования EGFR глиобластом:

1. Прерывание тирозинкиназного фосфорилирования низкомолекулярными ингибиторами тирозинкиназы (Эрлотиниб, Гефитиниб).
2. Предотвращение связывания лигандов EGFR с рецептором посредством моноклональных антител (Цетуксимаб, Нимотизумаб, Панитизумаб) [15].

Важно отметить, что EGFR-блокирующая активность Эрлотиниба и Гефитиниба зависит от количества мутаций в экзонах 19 и 21 домена тирозинкиназы, которые обнаруживаются при немелкоклеточном раке легкого. Однако данные «сенсibiliзирующие» мутации практически отсутствуют при глиобластомах, чем можно объяснить недостаточную активность ингибиторов тирозинкиназы. В свою очередь, наличие гематоэнцефалического барьера, препятствующего проникновению антител во все части опухоли также ограничивает активность моноклональных антител [16]. Таким образом, в настоящее время не найдена точка приложения для влияния на биологические эффекты EGFR у пациентов с глиобластомой.

Следующим генетическим маркером первичной глиобластомы является мутация промотора обратной транскриптазы теломеразы — TERT (Telomerase Reverse Transcriptase), являющаяся ключевым механизмом поддержания длины теломер в злокачественных новообразованиях.

В 2009 г. Элизабет Блэкберн, Кэрол Грейдер и Джеку Шостаку была присуждена Нобелевская премия в области медицины и физиологии «за открытие того, как теломеры и фермент теломеразы поддерживают длину хромосом».

раза защищают хромосомы». А именно, закон, декларирующий об укорочении теломераз каждого клеточного деления, приводящий к репликационному старению [17]. Следует учесть, что активация теломеразы приводит к нарушению данного закона. Теломераза состоит из каталитического центра (теломеразной РНК, TERC) и теломеразной обратной транскриптазы (TERT), которая присоединяясь к концу хромосомы синтезирует нуклеотидную последовательность TTAGGG. Мутация TERT приводит к активации данного фермента.

Частота встречаемости мутации TERT составляет 90% всех опухолей различного генеза. Важно отметить, что мутация TERT обнаруживается в олигодендроглиоме или первичной глиобластоме [18].

В крупном исследовании, включающем 1083 пациента с глиомой, из которых 472 пациента с глиобластомой, 1% составили глиобластомы, содержащие мутации IDH, TERT и ко-делецию 1p/19q; 2% — мутации IDH и TERT; 7% — мутацию IDH; 17% — не содержит данных мутаций; 74% — мутацию TERT. При этом ОВ у пациентов с TERT-положительной глиобластомой составила в течение первого года около 70%, второго года — около 20%, четырех лет — менее 10% [19].

Интересно отметить, что в 2018 г. группой ученых из Германии было проведено исследование, которое предположило возможность обнаружения мутантной TERT в опухолевой ДНК из спинномозговой жидкости у пациентов с глиобластомой (n=60).

Соответствующая мутация TERT в ДНК из спинномозговой жидкости была успешно обнаружена со 100% специфичностью и 92,1% чувствительностью.

Ученые пришли к выводу о том, что мутация TERT является предиктором плохой выживаемости у пациентов с глиобластомой [20].

Важным генетическим маркером первичной глиобластомы является мутация PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog).

Впервые мутация PTEN была описана в синдроме Каудена, представляющим собой аутосомно-доминантное заболевание с мутацией PTEN, проявляющееся множественными гамартомами всех трех зародышевых листков и повышенным риском злокачественных новообразований. Кумулятивная вероятность развития рака различной локализации при длительности жизни 70 лет у больных с данным синдромом достигает 89%. Синдром был впервые описан Costello в 1940 г., однако свое название получил позже в 1963 г. по фамилии 20-летней больной Rachel Cowden с полным симптомокомплексом заболевания [21].

Антионкоген PTEN кодирует липофосфатазу в хромосоме 10q/23, которая преобразует туморогенный липидный сигнал, катализируя отщепление фосфатной группы кольца фосфатидилинозитол-3,5-фосфатов, превращая его в фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат. Тем самым тормозя передачу сигнала P13K/AKT/mTOR-сигнального пути, регулирующего процессы инвазии и метастазирования.

Потеря гетерозиготности в области локализации гена PTEN наблюдается во многих типах спорадических опухолей, в том числе более чем в 40% глиобластом. Мутации в этом гене обнаруживаются в опухолях мозга, эндометрия, простаты, почек и молочной железы. Потеря функции PTEN в клетках стромы приводит к аномальному функционированию белков внеклеточного матрикса, поверхностных клеточных маркеров, молекул адгезии и факторов роста, что и способствует процессам злокачественной трансформации [22].

В исследовании Y. Yang et al. обнаружена корреляция между мутацией PTEN и низкой общей выживаемостью пациентов с глиобластомой [23].

Следует отметить, что в Китае Feng Han et al. на базе PubMed, Web of Science и EMBASE был проведен метаанализ исследований, касающихся взаимосвязи мутации PTEN и выживаемости пациентов с глиомой: авторами были рассмотрены 9 когортных исследований с участием 1173 пациентов, включенных в этот метаанализ. Объединенные результаты показали, что у пациентов с генетической мутацией PTEN общая выживаемость была значительно ниже, чем у пациентов без генетической мутации PTEN (отношение рисков [HR] = 2,23, 95% доверительный интервал [CI]: 1,35, 3,67; P = 0,002). Кроме того, анализ подгрупп показал, что эта связь наблюдалась только у американских пациентов (ЧСС = 2,19, 95% ДИ: 1,23, 3,89; P = 0,008), но не у китайских пациентов (ЧСС = 1,44, 95% ДИ: 0,29, 7,26; P = 0,657). Гистопатологическая оценка (HR = 1,42, 95% ДИ: 0,07, 28,41; P = 0,818), возраст (HR = 0,94, 95% CI: 0,43, 2,04; P = 0,877) и пол (HR = 1,28, 95% CI: 0,55, 2,98; P = 0,564) не были значимыми прогностическими факторами для выживания пациентов с глиомой [24].

Таким образом, наличие мутации PTEN является плохим прогностическим фактором.

Следующим антионкогеном является ген TP53, расположенный на хромосоме 17p/13, регулирующий активность белка p53. В первую очередь следует отметить, что белок p53 по праву называется «Страж генома», поскольку он играет важную роль в профилактике опухолей, организуя широкий спектр клеточных реакций, включая апоптоз поврежденных клеток, поддер-

жание стабильности генома, ингибирование ангиогенеза, регуляцию клеточного метаболизма и микроокружения опухоли.

Белок p53 при отсутствии повреждения генетического аппарата находится в неактивном состоянии. При повреждении ДНК p53 останавливает митоз, блокируя переход G1-фазу в S-фазу, предоставляя время на устранение повреждений, если восстановления не происходит, то p53 включает программу апоптоза. Согласно Атласу ракового генома, TP53 дерегулируется в 22% глиобластом.

Несмотря на нерешенные вопросы о механизмах, лежащих в основе инициации глиобластом, моделирование посредством манипулирования генетикой мышей предполагает, что могут быть задействованы пути, вовлеченные в индуцированную фактором роста трансдукцию сигнала и процессы, которые контролируют прогрессирование клеточного цикла. Путь ARF-MDM2-p53 является одним из таких путей и дерегулируется в 237/281 (84%) глиобластом согласно Атласу ракового генома и в 94,1% клеточных линий глиобластом.

Мутации TP53 локализованы в домене, ответственного за взаимодействие с ДНК.

Важно отметить, что в мутации TP53 имеются наиболее часто встречающиеся точечные мутации, инактивирующие его или превращающие в онкоген [25].

Данное положение может быть показано на примере синдрома Ли-Фраумени.

Синдром Ли-Фраумени является с аутосомно-доминантным наследственным заболеванием, характеризующимся возникновением и накоплением в семье мягкотканых и остеогенных сарком, рака молочной железы у женщин в пременопаузе, опухолей головного мозга, адренокортикального рака и гемобластозов (главным образом острых лейкозов). При этом в основе 70-80% всех случаев данного синдрома лежит генетический дефект в гене TP53. Существенно наличие миссенс-мутации R248Q (замена аргинина на глутамин в положении 248) для ухудшения тяжести течения заболевания, относительно обычной интактности гена. По данным ESMO (European Society for Medical Oncology) мутация TP53 на данном этапе изучения не имеет корреляции с общей выживаемостью пациентов с глиобластомой [26].

Следует обратить внимание на LOH (Loss of heterozygosity), являющейся перекрестным хромосомным событием, которое приводит к потере всего гена и окружающей хромосомы.

LOH 10q является наиболее частым генетическим изменением, встречающимся как в первичной, так и во вторичной глиобластомах с одинаковыми частотами (от 60 до 80%), с об-

щей делецией в 10q25. Напротив, LOH 10p в основном присутствует исключительно в первичных глиобластомах, и полная потеря всей хромосомы 10 типична для первичных глиобластом. В нескольких исследованиях LOH были идентифицированы по крайней мере три обычно удаленных локуса, а именно: 10p14-15, 10q23-24 (PTEN) и 10q25, что свидетельствует о наличии нескольких генов-супрессоров опухолей, которые могут играть существенную роль в патогенезе глиобластом. Поскольку LOH 10q25 связан с гистологически распознаваемым переходом от глиом низкой степени злокачественности к фенотипам глиобластом и обычно исчезает при первичной и вторичной глиобластомах, следовательно, LOH10p25q участвует в патогенезе обоих подтипов глиобластом.

LOH 22q значительно чаще встречается при вторичных глиобластомах (82%), чем при первичных глиобластомах (41%) [27].

В исследовании Vaishali Suri et al. были проанализированы опухолевые ДНК на наличие LOH у 25 пациентов с глиобластомой, диагностированных в течение двухлетнего периода. Анализ LOH 10q проводили на крови и опухолевой ДНК методом на основе ПЦР с использованием четырех микросателлитных маркеров.

В результате LOH 10q был выявлен в 17 из 25 случаев (68%), чаще обнаруживался у пациентов старше 40 лет (16/19, 84,2%). Важно отметить, что показатели выживаемости для пациентов с LOH были ниже, чем для пациентов с сохраненной гетерозиготностью. Таким образом, единственным лучшим маркером для определения состояния LOH 10q является D10S1765 в области PTEN [28].

Следующей мутацией глиобластом является мутация BRAF. BRAF представляет собой онкоген, отвечающий за кодировку серин-треониновой протеинкиназы B-Raf сигнального пути Ras-Raf-MEK-MARK. В норме данный путь регулирует пролиферацию клеток под контролем фактора роста. Наличие мутации BRAF приводит к избыточной пролиферации и устойчивости к апоптозу. Впервые данная мутация была обнаружена в 2002 г. в меланомах и в широком спектре других видов рака, включая колоректальный рак. Наиболее распространенным типом мутации BRAF является мутация BRAFV600, располагающаяся в позиции 15 экзона с заменой нуклеотида, кодирующего Валин на другую аминокислоту (чаще на нуклеотид, кодирующий глутаминовую кислоту V600E) [29]. Среди опухолей головного мозга мутация BRAF наиболее часто встречается при плеоморфной ксанстроцитоме (60-70%) [30]. Мутация BRAF V600E была обнаружена в эпителиоидной глиобластоме, являющейся редким и агрессивным видом

глиобластом, характеризующийся неблагоприятным прогнозом (около 6 мес.) и частым лептоменингеальным распространением [30]. Около 50% эпителиоидных глиобластом обладают комплектом генетических особенностей: мутацией BRAFV600E, мутацией промотора TERT и гомозиготной делецией CDKN2A/2B [31].

В заключении следует сказать, что гистологическая характеристика первичных глиобластом может быть дополнена генетическими маркерами: нормальным статусом IDH, наличием метилирования промотора MGMT, мутации TERT, EGFR-амплификации, LOH 10q и мутации BRAF, а также потерей функции PTEN.

Таким образом, знания молекулярных механизмов канцерогенеза даст возможность персонализированного подхода к лечению глиобластом головного мозга.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Ostrom Q.T., Gittleman H., Truitt G. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro-Oncology*. 2018; 20(4):1–86. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy131>.
- Каприн А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность) / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. — М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2018 [Kaprin A.D. Malignant neoplasms in Russia in 2017 (morbidity and mortality) / A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. — M.: Moscow National Research Oncology Institute named after P.A. Herzen — branch FGBU «NMITS radiology» of the Ministry of Health of Russia, 2018 (In Russ.)].
- Смолин А.В., Бекяшев А.Х., Кобяков Г.Л. и др. Первые результаты Российского многоцентрового исследования по эпидемиологии злокачественных глиом. *Современная онкология*. 2014;2:50-55 [Smolin A.V., Bekiashev A.K., Kobayakov G.L. et al. First results of the Russian multicenter epidemiology project on the malignant gliomas. *Modern oncology*. 2014;2:50-55 (In Russ.)].
- Лобанова Н.В., Шишкина Л.В., Рыжова М.В. и др. Клинические, иммуногистохимические и молекулярно-генетические факторы прогноза у больных с глиобластомой. *Архив патологии*. 2016;4:10-19. <https://doi.org/10.17116/patol201678410-19> [Lobanova N.V., Shishkina L.V., Ryzhova M.V. et al. Clinical, immunohistochemical, and molecular genetic prognostic factors in adult patients with glioblastoma. *Archive of Pathology*. 2016;4:10-19. <https://doi.org/10.17116/patol201678410-19> (In Russ.)].
- Карташев А.В., Якубович Е.И. Генетические маркеры злокачественных глиом. *Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова*. 2016;8(3):107-114 [Kartashev A.V., Yakubovich E.I. Genetic markers of malignant gliomas. *Herald of North-Western state Medical University named after I.I. Mechnikov*. 2016;8(3):107-114 (In Russ.)].
- Verena Staedtke, Omar Dildar a Dzaye, Matthias Holdhoff. Actionable molecular biomarkers in primary brain tumors. *Trends Cancer*. 2016; 2(7): 338–349. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.06.003>.
- Chunzhi Zhang, Lynette M. Moore, Xia Li et al. IDH1/2 mutations target a key hallmark of cancer by deregulating cellular metabolism in glioma. *Neuro-Oncology*. 2013;15(9):1114-1126. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not087>.
- Sasha L.V., Erik Teugels, Jan Sadones et al. Correlation between IDH1 Gene Mutation Status and Survival of Patients Treated for Recurrent Glioma. *Anticancer Research*. 2011;31:4457-4464.
- Табаков Д.В., Катаргин А.Н., Строганова А.М. и др. Мутации изоцитратдегидрогеназ 1 и 2 и метилирование гена MGMT в глиомах. *Успехи молекулярной онкологии*. 2017;4: 53-59. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2017-4-1-53-59> [Tabakov D.V., Katargin A.N., Stroganova A.M. et al. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 genes mutations and MGMT methylation in gliomas. *Advances in molecular oncology*. 2017;4(1):53-59. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2017-4-1-53-59> (In Russ.)].
- Ricky Chen, Matthew Smith-Cohn, Adam L. Cohen et al. Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. *Neurotherapeutics*. 2017;14:284-297. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0519-x>.
- Dr Roger Stupp, Monika E Hegi, Warren P Mason et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet*. 2009;10(5):459-466. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70025-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7).
- Когония Л.М., Маркарова Е.В., Сташук Г.А. и др. Клинический опыт эффективного использования паллиативной таргетной терапии у пациентки с EGFR-отрицательной аденокарциномой легкого. *Медицинский совет*. 2019;10:142-145. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-10-142-145> [Kogonia L.M., Markarova E.V., Stashuk G.A. et al. Clinical experience of effective use of palliative targeted therapy in a patient with EGFR-negative lung adenocarcinoma. *Medical Council*. 2019;10:142-145. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-10-142-145> (In Russ.)].
- Gomez G.G., Wykosky J, Furnari F.B., Cavenee W.K. Therapeutic resistance in cancer: microRNA regulation of EGFR signaling networks. *Cancer Biol Med*. 2013;10(4):192-205. <https://doi.org/10.7497%2Fj.issn.2095-3941.2013.04.003>.
- Chen J.R., Xu H.Z., Yao Y., Qin Z.Y. Prognostic value of epidermal growth factor receptor amplification and EGFRvIII in glioblastoma: meta-analysis. *Acta Neurol Scand*. 2015;132(5):310-22. <https://doi.org/10.1111/ane.12401>.
- Тюляндин С.А., Носов Д.А. Ингибиторы тирозинкиназы рецептора эпидермального фактора роста у больных немелкоклеточным раком легкого: 10 лет спустя. *Злокачественные опухоли*. 2012;1(2):5-13. <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2012-2-5-13> [Tjulandin S., Nosov D. Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer: Ten years later. *Malignant Tumours*. 2011;1:41-48. <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2012-2-5-13> (In Russ.)].
- Manfred Westphal, Cecile L. Maire, Katrin Lamszus. EGFR as a Target for Glioblastoma Treatment: An Unfulfilled Promise. *CNS Drugs*. 2017;31(9):723-735. <https://doi.org/10.1007/s40263-017-0456-6>.
- Зверева М., Рубцова М. Нобелевская премия по физиологии и медицине 2009 года. Счётчик клеточного

- времени. Наука и жизнь. 2010;1:2-5 [Zvereva M., Rubtsova M. Nobel Prize in Physiology or Medicine in 2009. Cell Time Counter. Science and life. 2010; 1:2-5 (In Russ.)].
18. Yang Yuana, Chen Qib, Gou Malingd et al. TERT mutation in glioma: Frequency, prognosis and risk. Journal of Clinical neuroscience. 2016;26:57-62. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2015.05.066>.
  19. Jeanette E. Eckel-Passow, Daniel H. Lachance, Annette M. Molinaro et al. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. N Engl J Med. 2015;372(26):2499-2508. <https://dx.doi.org/10.1056%2FNEJMoa1407279>.
  20. A. Juratli, Rachel Thowe, Silke Hennig et al. TERT Promoter Mutation Detection in Cell-Free Tumor-Derived DNA in Patients with IDH Wild-Type Glioblastomas: A Pilot Prospective Study. Clin Cancer Res. 2018 1;24(21):5282-5291. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3717>.
  21. Mirinae Seo, Nariya Cho, Hye Shin Ahn, Hyeong-Gon Moon. Cowden Syndrome Presenting as Breast Cancer: Imaging and Clinical Features. Korean Journal of Radiology. 2014;15(5):586. <http://dx.doi.org/10.3348/kjr.2014.15.5.586>.
  22. Berrin Tunca, Ahmet Bekar, Gulsah Cecener et al. Impact of novel PTEN mutations in Turkish patients with glioblastoma multiforme. J Neurooncol. 2007;82:263-269. <https://doi.org/10.1007/s11060-006-9293-z>.
  23. Yang J.M., Schiapparelli P., Nguyen H.N. et al. Characterization of PTEN mutations in brain cancer reveals that pten mono-ubiquitination promotes protein stability and nuclear localization. Oncogene. 2017;36(26):3673-3685. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.493>.
  24. Han F., Hu R., Yang H. et al. PTEN gene mutations correlate to poor prognosis in glioma patients: a meta-analysis. Onco Targets Ther. 2016;9:3485-92. <https://doi.org/10.2147/OTT>.
  25. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010;2(1):a001008. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001008>.
  26. Любченко Л.Н., Семьянихина А.В., Фу Р.Г. и др. Синдром Ли—Фраумени: tp53-ассоциированные первично-множественные злокачественные опухоли. Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. 2012;23(2):52-58 [Lyubchenko L.N., Semyanykhina A.V., Fu R.G. et al. Lee — Fraumeni Syndrome: TP53-associated primary multiple malignant tumors. Blokhin Russian Cancer Research. 2012;23(2):52-58 (In Russ.)].
  27. Kakkar A, Suri V, Jha P et al. Loss of heterozygosity on chromosome 10q in glioblastomas, and its association with their genetic alterations and survival in Indian patients. Neurology India. 2011;59(2):254-61. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.79139>.
  28. Sebastian Brandner, Zane Jaunmuktane. Neurological update: gliomas and other primary brain tumours in adults. Journal of Neurology. 2018;265(3):717-727. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8652-3>.
  29. Насхлеташвили Д.Р. BRAF как мишень для таргетной терапии первичных опухолей ЦНС. Материалы IV Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2018». 2018:291 [Naskhletashvili D.R. BRAF as a target for targeted therapy of primary CNS tumors. Materials of the IV St. Petersburg International Cancer Forum «White Nights 2018». 2018:291 (In Russ.)].
  30. Kazutaka Sugimoto, Makoto Ideguchi, Tokuhiko Kimura et al. Epithelioid/rhabdoid glioblastoma: a highly aggressive subtype of glioblastoma. Brain Tumor Pathology. 2016; 33(2):137-146. <https://doi.org/10.1007/s10014-015-0243-3>.
  31. Yu Kanemaru, Manabu Natsumeda, Masayasu Okada et al. Dramatic response of BRA F V600E-mutant epithelioid glioblastoma to combination therapy with BRAF and MEK inhibitor: establishment and xenograft of a cell line to predict clinical efficacy. Kanemaru et al. Acta Neuropathologica Communications. 2019;7:119. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0774-7>.

Поступила в редакцию 26.02.2020 г.

*T.I. Ashkhatcava<sup>1</sup>, M.Yu. Tatarinova<sup>1</sup>, L.M. Kogoniya<sup>2</sup>, D.R. Naskhletashvili<sup>3</sup>, V.Yu. Zhukov<sup>4</sup>*

### **Clinician's modern approaches to molecular genetic diagnosis of glioblastomas**

<sup>1</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow,

<sup>2</sup>Moscow regional Research Clinical Institute named after M.F. Vladimirsky, Moscow,

<sup>3</sup>N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow,

<sup>4</sup>Federal State Autonomous Institution «N. N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

The article is devoted to the issue of molecular genetic diagnosis of cerebral glioblastomas. Despite significant advances in neurooncology, little progress has been made in prolonging the life of patients with cerebral glioblastoma, and a significant part of the effectiveness of treatment depends on the recognition of two prognostic biomarkers: mutations of the isocitrate dehydrogenase (IDH) promoter and the methylation of the O6-methylguanine methyl transferase (MGMT) promoter. The article summarizes the data of world and domestic clinical studies, allowing to supplement the histological characteristics of primary glioblastomas with genetic markers: the presence of the TERT mutation, EGFR amplification, loss of PTEN function, LOH 10q, and the presence of the BRAF mutation.

It should be noted that the amplification of EGFR, causing resistance to apoptotic stimuli and alkylating chemotherapy with Temozolomide, attracts much attention as a therapeutic target. The frequency of occurrence of the TERT mutation is 90% of all tumors of various genesis, most often the TERT mutation is found in oligodendroglioma or primary glioblastoma. Loss of heterozygosity in the region of localization of the PTEN gene is observed in many types of sporadic tumors, including more than 40% of glioblastomas. Mutations in this gene are found in tumors of the brain, endometrium, prostate, kidney, and mammary gland. The presence of a PTEN mutation is a poor prognostic factor.

LOH 22q is much more common in secondary glioblastomas (82%) than in primary glioblastomas (41%).

Among brain tumors, the BRAF mutation is most common with pleomorphic xanastrocytoma (60-70%). The BRAF V600E mutation was found in epithelioid glioblastoma, which is a rare and aggressive type of glioblastoma, characterized by an unfavorable prognosis (about 6 months) and frequent leptomeningeal spread.

Thus, knowledge of the molecular mechanisms of carcinogenesis will enable a personalized approach to treatment with glioblastomas of the brain.

Key words: review, IDH, MGMT, EGFR, TERT, PTEN, TP53, LOH, BRAF, glioblastoma

*А.Н. Чернов<sup>1,4</sup>, И.А. Балдуева<sup>2</sup>, Т.Л. Нехаева<sup>2</sup>, Э.С. Галимова<sup>3,6</sup>,  
Д.А. Алавердиан<sup>5</sup>, О.В. Шамова<sup>1</sup>*

## Молекулярные механизмы множественной лекарственной устойчивости глиобластом человека

<sup>1</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург,

<sup>2</sup>ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург,

<sup>3</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург,

<sup>4</sup>СПб ГБУЗ «Городская больница №40 Курортного административного района», Санкт-Петербург, г. Сестрорецк,

<sup>5</sup>Медицинская генетика, кафедра медицинских биотехнологий, Университета Сиены, Сиена, Италия,

<sup>6</sup>«Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук», Санкт-Петербург

**В обзоре обсуждается феномен множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) глиобластом (ГБ) в контексте экспрессии белков-переносчиков семейства ABC и процессов пролиферации, ангиогенеза, рецидивирования и гибели. Акцент делается на выявлении молекулярных мишеней среди факторов роста, рецепторов, белков сигнальной трансдукции, микроРНК, факторов транскрипции, протоонкогенов, генов-супрессоров опухолей и их полиморфных вариантов (SNP) для разработки и создания целевых противоопухолевых препаратов.**

**Ключевые слова:** обзор, глиобластома, множественная лекарственная устойчивость, химиотерапия, факторы роста, микроРНК, онкогены

Глиобластома (ГБ) — самая распространённая, химио-, радиоустойчивая и агрессивная первичная опухоль головного мозга у людей во взрослом возрасте. В настоящее время стандарты лечения ГБ включают хирургическую резекцию с последующей адъювантной лучевой и химиотерапией, при этом объем резекции является независимым фактором риска при выживании пациента [1]. В течение десятилетий ключевым подходом в лечении ГБ являлась лучевая терапия, при этом применение такого цитостатического алкилирующего агента как темозоломид (ТД) одновременно или после лучевой терапии значительно увеличивает общую выживаемость пациентов [2]. Уже на пути обширного внедрения в клиническую практику ГБ таргетная терапия, например, бевацизумабом — рекомбинантными гиперхимерными моноклональными антителами к фактору роста эндотелия сосудов (VEGF) [3]. Однако, по-прежнему прогноз пациентов с ГБ неутешительный. Одногодичная общая выживаемость пациентов с ГБ составляет

только 40% [4], а продолжительность их жизни, в среднем — 22,3 мес., при этом у 100% наблюдаются рецидивы. Метастазы ГБ встречаются более чем у 40% пациентов [5].

Причина невысокой эффективности терапии ГБ кроется в развитии радио- и химиорезистентности её клеток в результате множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) — основного механизма развития резистентности к терапевтическим процедурам при лечении онкологических заболеваний и фактора неудачи многих форм терапии. Злокачественные опухоли, к которым относятся и ГБ, содержат различные по чувствительности к препаратам популяции клеток, подвергающиеся клональной селекции в направлении повышения радио- и химиорезистентности в результате применения терапевтических воздействий. При реализации такого сценария происходит рецидив опухоли, содержащей радио- и химиорезистентные клетки. Общие молекулярные механизмы МЛУ ГБ включают дерегуляцию физиологических, биохимических процессов и генетические изменения, в которых участвуют ростовые факторы, тирозинкиназные рецепторы, цитокины, сигнальные молекулы, микроРНК, регулирующие экспрессию генов-мишеней — супрессоров опухолей и протоонкогенов. С другой стороны, возникающие мутации и однонуклеотидные замены в полиморфных вариантах (single nucleotide polymorphism — SNP) генов способствуют образованию аллельных белков с проонкогенными свойствами в клетках ГБ. Эти события инициируют активацию каскадов митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК), фосфоинозитол-3-киназы (PI3K), ингибирование апоптоза, регулируемого посредством белка p53, дерегуляцию клеточного цикла, стимуляцию ангиогенеза через VEGF-сигналинг и инвазию. Однако в дополнение к этим общим

изменениям в сигнальных путях также идентифицированы типы изменений, ряд из которых имеет непосредственные терапевтические применения. К ним, например, относится активирующие мутации или слияние в гене *BRAF*, наблюдаемые в пилоцитарных астроцитомах и ганглиogliомах [6].

В силу того, что механизмы возникновения резистентности клеток носят множественный характер, в данном обзоре рассматриваются на современном уровне основные аспекты этого явления на уровне сигнальных путей и мутаций, SNP в онкогенах, генах-супрессорах опухолей.

### Множественная лекарственная резистентность и белки-транспортёры ABC семейства

В развитии МЛУ ключевую роль играют белки-транспортёры лекарственных препаратов ABC семейства. У человека идентифицировано 49 генов, кодирующих белки АТФ-связывающих транспортёров, которые разделены на 7 подсемейств: ABC1 (ABCA), MDR/TAP (ABCB), MRP (ABCC), ALD (ABCD), OABP (ABCE), GCN20 (ABCF) и White (ABCG) [7]. Большинство генов и белков, участвующих в МЛУ ГБ относятся к ABCB, ABCC и ABCG подсемействам [8].

#### ABCB

Из ABCB семейства наиболее изучен ABCB1 белок (ATP binding cassette subfamily B member 1, P-гликопротеин, P-gp), который экспрессируется на апикальной мембране эндотелиальных клеток капилляров гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и стволовых клетках глиомы [9]. Белок ABCB1 участвует в плазматическом, ликворном выведении противоопухолевых препаратов, органических катионов, углеводов, олигосахаридов, липидов, стероидов, билирубина, аминокислот и антибиотиков [9]. Разнообразие субстратов указывает на участие ABCB1 белка в защите опухолевых стволовых клеток от токсинов [10].

Регуляция активности ABCB1 осуществляется на уровне белка P-gp и гена. Исследования показали, что MAPK/ERK<sup>1/2</sup> киназный каскад, участвующий в выживании, пролиферации и подвижности клеток, активирует P-gp, тогда как p38MAPK каскад, активирующий дифференцировку, апоптоз и аутофагию клеток — супрессирует P-gp. В свою очередь, JNK(c-Jun N-терминальная киназа)/c-JUN сигналинг участвует в воспалительных реакциях и стимулирует дифференцировку, апоптоз клеток, может оказывать как положительную, так и отрицательную регуляцию экспрессии ABCB1 [11, 12]. Известно, что PI3K (фосфоинозитол-3-фосфаткиназа)/AKT (протеинкиназа-B) /NFκB (ядерный

фактор-κB) каскад способствует выживанию, пролиферации, миграции, уходу из-под апоптоза клеток, он также может через NFκB активировать промотор *ABCB1* и экспрессию Обметилгуанин-ДНК метилтрансферазы *MGMT*, а, следовательно, участвовать в формировании резистентности ГБ к ТД. Возможно, что в регуляции *ABCB1* может участвовать транскрипционный фактор, содержащий «вилочный» домен ОЗА FOXO3a, поскольку он активируется AKT/PKB, BCL2-подобным белком-11 — BIM и PLK1 (polo-подобной киназой) [13].

В опухолевых, стволовых и клетках ГЭБ наблюдается сверхэкспрессия *ABCG2* и белка устойчивости рака молочной железы BCRP, усиливающая резистентность ГБ к химиопрепаратам: митоксантону, винбластину, винкристину, ТД, топотекану, иринотекану, эпирубицину, камптотецину даунорубицину, доксорубицину и антрациклинам [14]. В клетках ГБ и ГЭБ наблюдается коэкспрессия P-gp и BCRP, что связано с их совместным функционированием в качестве транспортёров препаратов [15]. При этом экспрессия *ABCG2* ингибируется через супрессию экспрессии рецептора фактора роста эпидермиса EGFR, запускающего репликацию ДНК и пролиферацию, миграцию клеток. Супрессия экспрессии *ABCG2* также наблюдается при активации иницирующего трансляцию фактора-2α PERK/ фактора-4, активирующего транскрипцию (ATF4)/транскрипт-3, индуцируемый повреждением ДНК (DDIT3) каскада, участвующего в репрессии синтеза белка в эндоплазматическом ретикулуме при воздействии sFRP4, LRIG1 [16,17].

#### МикроРНК

Микро-РНК (miRNA) регулируют транскрипцию *ABCB1* и трансляцию белка [18]. Например, miR-200c ингибирует экспрессию P-gp через JNK сигнальный путь [19]. Есть предположение, что miR-130a активирует экспрессию *ABCB1* через PI3K/AKT/NF-κB/фосфатаза и гомолог тензина (PTEN) / механистическая мишень рапамицинкиназы (mTOR) и Wnt/β-катенин сигнальные пути, способствующие клеточной пролиферации [18, 20]. Экспрессию *ABCG2* активируют miR-328 и транскрипционный фактор EZH2 через стимуляцию генов-мишеней NF-κB [21, 22].

#### Гены *ABCB1*, *ABCG2*

Немецкие ученые изучили влияние трех SNP (C1236T, G2677T, C3435T) *ABCB1* на исход у пациентов с ГБ при лечении ТД. Многофакторный анализ показал, что CC генотип rs1128503 (T>C с. 1236) является прогностическим фактором выживаемости пациентов, получавших ТД. Пациенты-носители СТ и ТТ генотипов имели 8%-ную и 10%-ную 2-летнюю общую выживаемость по сравнению с 37%-ной выживаемостью

у пациентов с СС генотипом (P=0,02) [23]. Эти данные могут указывать на участие rs1128503 *ABCB1* в развитии резистентности клеток ГБ к ТД. В другом исследовании изучено влияние SNP *ABCG2* на показатели безсобытийной (DFS) и общей выживаемости у пациентов (n=580) с колоректальным раком, получавшим терапию оксоплатином. Установлено, что пациенты-носители СС-генотипа rs2231142 (G>T, с. 421C>A,G, p.Gln141Lys, p.Gln141Glu) *ABCG2* имели более низкую (OR=0,682, 95%CI 0,540–0,861, P=0,001) безсобытийную (DFS) и общую выживаемость (OR=0,666, 95%CI 0,527–0,843 P=0,001) по сравнению с носителями СА, АА — генотипов этого полиморфизма [24]. Поскольку белок BCRP участвует в клеточной резистентности к ТД, то возможно, что rs2231142 *ABCG2* также будет ассоциирован с ответом на терапию ТД у пациентов с ГБ.

### Участие процессов клеточной пролиферации в развитии множественной лекарственной резистентности

Пролиферацию в клетках ГБ индуцирует абберантная активация рецепторов-1,-2 эпидермального фактора роста (EGFR, ErbB2), фактора роста тромбоцитов и его рецепторов PDGF/PDGFRA, -B, PI3K/АКТ/NF-κB сигнальных каскадов, которые также способствуют развитию МЛУ [25]. Например, PI3K/АКТ каскад активирует транскрипцию гена каталитической субъединицы альфа фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3-киназы *PIK3CA* через связывание транскрипционного фактора-1α TIF1α с его промотором, что запускает сверхэкспрессию фермента ДНК репарации MGMT, участвующего в устойчивости ГБ к ТД [26]. Активация MGMT и устойчивость клеток U87MG и U251MG ГБ к

Таблица 1. Полиморфные варианты генов, ассоциированные с риском развития ГБ

Ген	Локализация	Полиморфизм	Аллель, генотип, модель,	Белок	Литературный источник
EGF	4q25	rs4444903 (A>G, с.-382A>G, с.61)	A vs GG (OR=1,30, 95CI 0,91–1,87, AA vs GG (OR=1,76, 95%CI 0,82–3,77)	Эпидермальный фактор роста	30, da Silveira Fd CA et al., 2012
GSTP1, (GSTP)	11q13	rs1695 (A>G, с 313, p.Ile105Val)	AA; AG + GG, (HR=0,390 (0,196–0,775)	Глутатион-S-трансфераза пи-1	29, Pasqualetti F et al., 2018
EGFR (ERBB, ERBB1, HER1)	7p11.2	rs730437 (A>C, g.55147325A>C, C)33 rs1468727 (C>T, g.55162412C>T)33 rs4947986 (G>A, g.55153962G>A)34 rs723527 (A>C,G,T, g.55067179A>C)48;	CC,C (OR=1,32; 95%CI 1,05-1,66)33 CC,C (OR=1,31, 95% CI 1,04-1,65 )33 AA (OR=1,42, 95%CI: 1,06-1,91)34	Рецептор эпидермального фактора роста	32, Hou W.G. et al., 2012; 33 Andersson U et al., 2010; 49, Melin B.S. et al., 2017
MGMT	10q26.3	rs1625649 (A>C, g.129466667A>C)	AA vs CC, CA (HR=2,876 HR=5,835)	О-6-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза	34, Hsu C.Y. et al., 2017
ERCC1 (COFS4, RAD10, UV20)	19q13.32	rs3212986 (C>A,G,T, c.1516C>A,G,T, c.1510C>A,G,T, Gln506Lys,Glu,Ter, Gln504Lys,Glu,Ter) rs11615 (A>G, c.354, c.118C>T)	AA (OR=1,41, 95%CI 1,07–1,87)	ERCC excision repair-1, endonuclease non-catalytic subunit	41, Yuan G. et al., 2014
IDH1 (IDH; IDP)	2q34	rs11554137 (C> T, c.315C>T)47,48	GGC/GGT (HR=1,65, 95%CI 1,2–2,3)47	Изоцитратдегидрогеназа (NADP(+)-1	37, Wang XW et al., 2013; 38, Mistry AM et al., 2018
TERT	5p15.33	rs10069690 (C>T, g.1279675C>T)48		Теломераза	49, Melin B.S. et al., 2017
AKT3	1q44	rs12076373 (G>C, g.243688645G>C)50		Протеинкиназа В	50, Kinnersley B. et al., 2018
PTEN	10q23.31	rs701848 (T>A,C, с.*1516T>A,C)54;	CC vs. CT+TT OR=1.169, 95% CI 1.061-1.288;53	Гомолог фосфатазы и тензина	54,Song D-D et al., 2017
VEGFA (MVCD1, VEGF, VPF)	6p21-p12, 6p21.1	rs699947 (A>C,T, с.-2578C>A) rs1570360 (A>G, с.-1154 G>A)	CC+CA OR=2,56 (1,36–4,80) С аллель OR=1,53 (1,14–2,03) GG OR=1,53 (1,03–2,29), G аллель OR=1,39 (1,01–1,91)	Фактор роста эндотелия сосудов А	60, Vasconcelos VCA et al., 2019
MTOR	1p36.22	rs143119651 (T>C, с.7496A>G, с.6248A>G, с.6815A>G, Gln2499Arg, Gln2083Arg, Gln2272Arg)		Механистическая мишень киназы рапамицина	61,Grabiner BC et al., 2014; 62,Georgescu M-M. et al., 2019
GFAP (ALXDRD)	17q21.31	rs11558961 (G>C,T, с.*28C>G, с.*28C>A)	G-аллель (OR=0,77, 95%CI 0,61-0,97 CG (OR=0,68, 95%CI 0,49-0,95)	Глиальный фибриллярный кислый белок	72, Wang J. et al., 2018

ТД наблюдаются также при формировании комплекса β-катенина с киназой гликоген-синтазы-3β (GSK-3β) в результате снижения уровня β-катенина в ядре при стимуляции транскрипционного фактора FOXO3a [27].

*Гены EGF, MGMT, GSTP1 и IDH1/2*

Каскады сигнальной трансдукции индуцируют сверхэкспрессию генов *MGMT*, *EGFR*, глутатион S-трансферазы π1 (*GSTP1*), которые, в свою очередь, запускают пролиферацию и развитие МЛУ [28]. Участие этих генов в прогрессии ГБ подтверждается клинико-генетическими исследованиями, в которых PFS и OS у пациентов с АА генотипом rs1695 *GSTP1*, получавших ТД, составляла 10,5 мес. и 14,3 мес. соответственно [29] (табл. 1). С прогрессированием ГБ также ассоциировано присутствие аллеля А (p=0,037) и генотипа АА (p=0,037) rs4444903 (с.61A>G) гена эпидермального фактора роста *EGF* по сравнению с генотипом GG. Пациенты-носители генотипов АА (p=0,042), АG (p=0,006) и АА + АG (p=0,008) по сравнению с GG имеют более высокий уровень EGF [30] (табл. 1).

В свою очередь, амплификация *EGFR* у пациентов с ГБ, получавших бевацизумаб (p=0,007), коррелирует с повышенным риском развития опухоли и более короткой OS (p=0,011), чем у пациентов без амплификации [31]. Носительство CC rs730437, rs1468727 и АА-генотипов rs4947986 *EGFR* ассоциировано с более высоким риском прогрессирования ГБ [32, 33] (табл. 1). Пациенты с генотипом АА rs1625649 гена *MGMT*, получавшие ТД, имели более высокий уровень метилирования промотора гена и более низкую экспрессию белка MGMT, что было ассоциировано с увеличением PFS (p=0,007), чем у пациентов с гетерозиготным (СА) или генотипом дикого типа (СС) rs1625649 [34] (табл. 1). Поэтому MGMT может служить прогностическим маркером у пожилых пациентов с ГБ, получавших монотерапию ТД [35].

Можно предполагать участие других генов в МЛУ ГБ. Например, роль изоцитратдегидрогеназы-1 (*IDH1*) в развитии ГБ подтверждается клиническими исследованиями. В 65% первичных ГБ была выявлена сверхэкспрессия гена *IDH1* дикого типа [36]. Носители GGC/GGT генотипа rs11554137 в *IDH1* гене имеют более короткую OS (10,7 мес. против 15,5 мес.; p=0,001) и PFS (6,3 мес. против 8,7 мес.; p=0,006), чем с гомозиготным GGC/GGC генотипом. Присутствие rs11554137 ассоциировано с повышенным риском (p=0,004) развития ГБ [37] (табл. 1). При этом пациенты с rs11554137 имели гораздо меньшую OS (400 сут) и PFS (207 сут), чем носители мутации R132C (451 и >860 сут соответственно) [38]. С другой стороны, мутационный статус генов *IDH1/2* ассоциирован с улучшенной

выживаемостью пациентов с олигодендроглиомами, получавших комбинированную химиорадиационную терапию [35].

Абберантную активацию пролиферации и МЛУ ГБ индуцируют мутации в генах-супрессорах опухолей. Например, в 39,5% глиом наблюдается гиперметилирование промотора гена-супрессора опухоли, кодирующего белок-3 мембраны эпителиоцитов *EMP3*, экспрессия которого коррелирует с мутациями в генах *IDH1/IDH2* и обратно коррелирует с амплификацией *EGFR* [39]. Эти взаимодействия указывают на ингибирование экспрессии *EMP3* при МЛУ. Напротив, делеция (≥150 kb) в гене-супрессоре опухоли, кодирующего белок 1B, связанный с рецептором липопротеинов низкой плотности *LRP1B* достоверно ассоциирована с сокращением PFS (OR=2,26, 95% CI 1,32–3,86, p=0,003) и OS (HR=2,61, 95% CI: 1,47–4,62, p=0,001) у пациентов с ГБ [40]. Эти данные свидетельствуют о том, что мутации в генах-супрессорах могут быть ассоциированы с прогрессированием опухоли. Мутации в *IDH1/2*, делеции 1p/19q и метилирование промотора *MGMT* могут использоваться в качестве клинически значимых прогностических маркеров при диффузных глиомах [35].

#### **Участие рецидивирования в развитии множественной лекарственной резистентности**

При рецидивировании глиом наблюдается сверхэкспрессия *EGFR* и сфингозинкиназ-1-5 SphK1-2, S1P1-3, S1P5 по сравнению с нормальной тканью мозга [42]. Сфингозинкиназы катализируют образование из сфинголипида — сфингозина сфингозин-1-фосфата (S1P), который вместе с церамидом и сфингозином является вторичными мессенджерами, участвующими в пролиферации, выживании клеток и синтезе провоспалительных медиаторов [43]. Конститутивная активация *EGFR* или *EGFRvIII* стимулирует гиперактивацию Janus киназы-2 (*JAK2*)/сигнальный белок и активатор транскрипции-3 (*STAT3*) и β-катенин/ фактора транскрипции-4 (*TCF4*) сигнальных каскадов, что ассоциируется с агрессивностью, скоростью пролиферации клеток глиомы и активацией обратной транскриптазы теломеразы (*TERT*) [44, 45]. Эта корреляция подтверждается комбинированным применением антагониста *EGFR* — ирессы с ингибитором *JAK2/STAT3* — JSI-124, которое вызывает гибель клеток ГБ, экспрессирующих *EGFR* или *EGFRvIII* [44]. Эта корреляция подтверждается комбинированным применением антагониста *EGFR* — ирессы с ингибитором *JAK2/STAT3* — JSI-124, которое вызывает гибель клеток ГБ, экспрессирующих *EGFR* или *EGFRvIII* [44]. В озлокачествлении глиом также принимают участие *EGFR/PTEN/АКТ* и транс-

формирующего фактора роста- $\beta_2$  (TGF- $\beta_2$ ) каскады [46, 47]. Например, повышение в плазме уровней TGF- $\beta_2$  у пациентов с ГБ ассоциировано с иммуносупрессией, потерей иммунного контроля над развитием опухоли, ее прогрессией и плохим прогнозом [46].

#### МикроРНК

Экспрессия miR-9 стимулирует EGFR/PTEN/АКТ каскад, который запускает прогрессию глиом [47]. Однако, другие микроРНК ингибируют экспрессию онкогенов. Например, экспрессия miR-205 снижена ( $p < 0,001$ ) у пациентов с глиомами по сравнению со здоровыми добровольцами. При этом продолжительность OS у пациентов с глиомами (Gr III-IV,  $n=48$ ) и высоким уровнем miR-205 были выше (30 мес.,  $p < 0,01$ ), чем у пациентов с низким уровнем (20 мес.) [48].

#### Гены EGFR, TGFBI, AKT3 и PTEN

Международным коллективом авторов из США, Канады, Германии, Великобритании и Израиля при проведении полногеномных ассоциативных исследований с участием 12496 ГБ и 18190 контролей установлено наличие ассоциаций rs723527 (A>C,G,T, g.55067179A>C) EGFR, rs10069690 (C>T, g.1279675C>T) TERT с прогрессированием глиом до ГБ [49] (табл. 1). Также полиморфизм rs12076373 (G>C, g.243688645G>C) AKT3 был ассоциирован с прогрессированием ГБ [50]. Ген AKT3 экспрессируется на высоком уровне в глиомах и участвует в их жизнеспособности, активируя репарацию ДНК [51].

Однако не было установлено ассоциаций полиморфизмов rs1800470 (T>C, с.869) и rs1800469 (C>T, с.-509) TGFBI с риском развития ГБ [52]. PTEN снижает уровни фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата (PIP3), который ингибирует mTOR/АКТ сигнальный путь и рост, прогрессирование раковых клеток [53]. Однако по данным метаанализа rs701848 (T>A,C, с.\*1516T>A,C) PTEN был в рецессивной модели CC vs. CT+TT ассоциирован с развитием глиомы, рака желудка, молочной железы, эндометрия в азиатских популяциях [54].

### Участие ангиогенеза в развитии множественной лекарственной резистентности

Строма и опухолевые клетки обмениваются секреторными молекулами при формировании кровеносных и лимфатических сосудов. При этом на клетках ГБ наблюдается сильная экспрессия рецепторов 1-3 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR1) и слабая экспрессия VEGFR2, VEGFR3. Коэкспрессия рецептора VEGFR1 с MGMT активирует PI3K/АКТ/mTOR каскад, который стимулирует инвазию,

пролиферацию, миграцию и МЛУ клеток ГБ [55]. Экспрессия VEGFR2 и VEGFR3 активирует MET киназу, STAT3 каскад и экспрессию CD34, Ki67 маркеров, которые подавляют VEGF/VEGFR1 каскад и усиливают МЛУ клеток ГБ. Этот механизм подтверждается использованием сильного STAT3-ингибитора SI-124, который супрессирует активность VEGFR2 и экспрессию белков CD34, антигена Ki67 и фосфорилированного STAT3 (p-STAT3) в клетках ГБ, а также их ангиогенез, пролиферацию, инвазию и миграцию [56]. В другом исследовании показано, что стимуляция VEGF/VEGFR, PI3K/АКТ/mTOR и PDGFR каскадов в клетках GB9B запускает ингибирование процесса активации каспаз-3, -9, -8 и апоптоза. Данный механизм подтверждается применением селективных ингибиторов SU1498 для VEGF/VEGFR, BEZ235 для PI3K/АКТ/mTOR и AG1433 для PDGFR, которые усиливают активацию каспаз [57]. В свою очередь в клетках ГБ фактор роста тромбоцитов-C (PDGF-C) коэкспрессируется с с-MET киназой, последняя из которых запускает фактор роста гепатоцитов (HGF)/с-MET/АКТ каскад и усиливает МЛУ [58]. При ангиогенезе также повышаются уровни экспрессии HIF-2 $\alpha$ , белка микротрубочек тубулина-3 (TUBB3) и белков промежуточных микрофиламентов — талина-1 (TLN1), тензина-1 (TNS1), актинина-1 $\alpha$  (ACTN1), винкулина (VCL), паксиллина (PXN), связывающих интегрины наружной мембраны с актиновыми микрофиламентами цитоскелета [59]. Формирование такой сети вместе с экспрессией интегринов способствует миграции клеток ГБ, их адгезии к стенкам сосудов.

#### Гены VEGFA, MTOR

Полиморфизмы rs699947 и rs1570360 фактора роста эндотелия сосудов-A VEGFA ассоциированы с повышенным риском развития ГБ (С-аллель,  $p=0,004$ ) и G-аллель ( $p=0,04$ ), GG-генотип ( $p=0,03$ ) соответственно [60] (табл. 1). В свою очередь, в ГБ может присутствовать патогенный SNP rs143119651 (T>C, с.7496A>G, Q2499R) в MTOR, который уменьшает связывание белка mTOR с его ингибитором Deptor, тем самым увеличивает устойчивость ГБ к средней депривации [61, 62] (табл. 1). Поскольку при ангиогенезе PI3K/АКТ/mTOR каскад активируется рецептором VEGFR1, то при наличии rs143119651 в MTOR клетки ГБ могут приобретать лекарственную устойчивость.

### Участие апоптоза в развитии множественной лекарственной резистентности

Феномен МЛУ ГБ ассоциирован со сверхэкспрессией фактора роста соединительной ткани

(CTGF), ингибированием апоптоза и нарушением регуляции генов *c-JUN*, *c-FOS* [63].

Известно, что апоптоз может запускать активация белка p53 и каскада каспаз. Однако, активность каспаз-9 и -3 ингибируется в результате экспрессии 27 и 72 кДа-белков теплового шока (HSP27, HSP72) через p38МАРК/митоген-активированной протеинкиназы-активированной протеинкиназы-2 (МАРКАРК2) каскад в CD133<sup>+</sup>-клетках ГБ [64]. Этот механизм свидетельствует об участии HSP27, HSP72, p38МАРК, МАРКАРК2 в развитии МЛЮ. В свою очередь, экспрессия белка p53 обратно коррелирует с MGMT в клетках ГБ. Этот механизм указывает на участие p53 в чувствительности опухоли к ТД, подтверждающийся стимулирующим действием карнозола на p53 в результате которого диссоциирует комплекс белка p53 с мышинным двойным гомологом (MDM2) и повышается содержание белка p53, что усиливает действие ТД на клетки ГБ [65]. Повышенная резистентность к цитотоксическим препаратам коррелирует со сборкой цитоскелета из промежуточных микрофиламентов и глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в ГБ [66].

#### микроРНК

Установлено, что микро-РНК регулируют транскрипцию апоптотических генов. В стволовых клетках ГБ наблюдается сверхэкспрессия miR-4284 и активация кластера микроРНК miR-183/96/182. Ингибирование этого кластера микроРНК индуцирует апоптоз, зависимый от активных форм кислорода (ROS) через p53 путь [67, 68]. МикроРНК: miR-125b, miR-34a, miR-504, miR-380-5P, miR-885-5P, miR-145, miR-34a и miR-21 регулируют экспрессию белка p53. Кроме того, miR-21 регулирует другие апоптотические белки семейства BCL-2 и каспазу-9, в то время как экспрессия BAX модулируется miR-222 и miR-34a [69].

#### Гены TP53, GFAP

Мутации в генах TP53 и ингибитора циклин-зависимой киназы-2A (CDKN2A), активация BCL-2 и ингибирование ингибитора роста-2 (ING2) подавляют активность апоптотических белков — каспазы-3 и белка, содержащего Fas-ассоциированный домен смерти (FADD), усиливая резистентность опухолевых клеток к цисплатину [70]. Также делеция нуклеотидов AAG в положении 595-597 гена TP53, приводящая к делеции Glu199 в белке p53, ассоциирована с усилением прогрессии опухоли [71]. Однако, G аллель (p=0,042) и CG-, GG-генотипы rs11558961 гена GFAP (p=0,022) ассоциированы усилением апоптоза и снижением химиорезистентности ГБ к иматинибу (10 и 50 мк/мл) [72] (табл. 1).

## Заключение

Множественная лекарственная устойчивость ГБ ассоциирована с aberrантной активацией ростовых факторов, цитокинов, гормонов, дегуляцией экспрессии их рецепторов, сигнальных каскадов, мутациями в онкогенах, генах-супрессорах опухолей, которые также участвуют в пролиферации, ангиогенезе, репарации, рецидивировании, метастазировании, дифференцировке, апоптозе клеток ГБ. Экспрессия ABC-транспортеров в ГБ регулируется микроРНК: miR-130a, miR-200c, miR-328, транскрипционными факторами: FOXO3a, NF-κB, ATF4, фосфатазами и киназами: PI3K, AKT, PTEN, PERK, EGFR. Наличие полиморфизмов rs1128503 *ABCBI* и rs2231142 *ABCG2* может способствовать развитию химиорезистентности клеток ГБ.

При МЛЮ и пролиферации клеток ГБ наблюдается активация сигнальных каскадов: EGF/EGFR, PDGF/PDGFRA,-B, β-катенин/GSK-3β, PI3K/AKT/NF-κB. Наличие полиморфизмов rs1695 *GSTP1*, rs4444903 *EGF*, rs730437, rs1468727, rs4947986, rs723527 *EGFR*, rs3212986, rs11615 *ERCC1*, rs11554137 *IDH1*, rs1625649 *MGMT*, rs10069690 *TERT*, rs12076373 *AKT3*, rs701848 *PTEN* ассоциировано с активацией пролиферации клеток и рецидивированием ГБ. Амплификация *EGFR*, сверхэкспрессия *IDH1* и *MGMT* наблюдаются при прогрессировании ГБ.

При ангиогенезе и МЛЮ одновременно активируются сигнальные каскады: VEGF/VEGFR1-3, PI3K/AKT/mTOR; HGF-c/MET/AKT; транскрипционные факторы: STAT3. Также с ангиогенезом и МЛЮ в клетках ГБ ассоциированы полиморфизмы rs699947, rs1570360 *VEGFA*, rs143119651 *MTOR*.

В МЛЮ и апоптозе ГБ участвуют CTGF, p38МАРК/МАРКАРК2 сигнальные пути, белки: p53, BCL-2, Casp9, Casp3, GFAP и гены *c-FOS*, *c-JUN*. Ингибирование и активация апоптоза ассоциированы соответственно с делецией AAG в положении 595-597 TP53 и rs11558961 GFAP. Указанные факторы могут рассматриваться в качестве мишеней при разработке новых таргетных противоопухолевых химиопрепаратов.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Laws E.R., Parney I.F., Huang W. et al. Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. *J. Neurosurg.* 2003; 99: 467–73.
2. Scoccianti S., Krengli M., Marrazzo L. et al. Hypofractionated radiotherapy with simultaneous integrated boost (SiB) plus temozolomide in good prognosis patients with

- glioblastoma: a multicenter phase II study by the Brain Study Group of the Italian Association of Radiation Oncology (AIRO). *Radiol. Med.* 2018;123(1): 48-62.
3. Kaka N., Hafazalla K., Samawi H. et al. Progression-Free but No Overall Survival Benefit for Adult Patients with Bevacizumab Therapy for the Treatment of Newly Diagnosed Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*. 2019; 11(11):1723.
  4. deSouza R.M., Shaweis H., Han C. et al. Has the survival of patients with glioblastoma changed over the years? *Br. J. Cancer*. 2016; 114(2):146-150.
  5. Cunha M.L.V.D., Maldaun M.V.C. Metastasis from glioblastoma multiforme: a meta-analysis. *Rev Assoc. Med. Bras.* 2019; 65(3):424-433.
  6. Maraka S., Janku F. BRAF alterations in primary brain tumors. *Discov Med.* 2018;26(141):51-60.
  7. George A.M. ABC Transporters — 40 Years on. Springer, 2015: 376.
  8. Zhou S.-F. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica*. 2008; 38(7-8):802-832.
  9. Wang D., Wang C., Wang L. et al. A comprehensive review in improving delivery of small-molecule chemotherapeutic agents overcoming the blood-brain/brain tumor barriers for glioblastoma treatment. *Drug Deliv.* 2019; 26(1):551-565.
  10. Coyle B., Kessler M., Sabnis D.H., Kerr I.D. ABCB1 in children's brain tumours. *Biochem Soc. Trans.* 2015; 43(5):1018-22.
  11. Yang J.M., Vassil A.D., Hait W.N. Activation of phospholipase C induces the expression of the multidrug resistance (MDR1) gene through the Raf-MAPK pathway. *Mol. Pharmacol.* 2001; 60(4):674-680.
  12. Bark H., Choi C.H. PSC833, cyclosporine analogue, downregulates MDR1 expression by activating JNK/c-Jun/AP-1 and suppressing NF-kappaB. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2010; 65(6):1131-1136.
  13. Hui R.C., Francis R.E., Guest S.K. et al. Doxorubicin activates FOXO3a to induce the expression of multidrug resistance gene *ABCB1* (MDR1) in K562 leukemic cells. *Mol. Cancer Ther.* 2008; 7(3):670-678.
  14. Iorio A.L., da Ros M., Fantappi O. et al. Blood-brain barrier and breast cancer resistance protein: A limit to the therapy of CNS tumors and neurodegenerative diseases. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2016; 16(7):810-815.
  15. de Gooijer M.C., Zhang P., Weijer R., Buil LCM., Beijnen J.H., van Tellingen. The impact of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein on the brain pharmacokinetics and pharmacodynamics of a panel of MEK inhibitors. *Int. J. Cancer*. 2018; 142(2):381-391.
  16. Bhuvanlakshmi G., Arfuso F., Millward M., Dharmarajan A., Warriar S. Secreted frizzled-related protein 4 inhibits glioma stem-like cells by reversing epithelial to mesenchymal transition, inducing apoptosis and decreasing cancer stem cell properties. *PLoS One*. 2015; 10(6): e0127517.
  17. Harding H.P., Zhang Y., Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 1999; 397: 271-274.
  18. Zhang H.D., Jiang L.H., Sun D.W. et al. The role of miR-130a in cancer. *Breast Cancer*. 2017; 24(4): 521-527.
  19. Sui H., Cai G.X., Pan S.F. et al. miR200c attenuates P-gp-mediated MDR and metastasis by targeting JNK2/c-Jun signaling pathway in colorectal cancer. *Mol. Cancer Ther.* 2014; 13(12):3137-3151.
  20. Niehrs C., Acebron S.P. Mitotic and mitogenic Wnt signaling. *The EMBO J.* 2012;31(12):2705-2713.
  21. Fan T.Y., Wang H., Xiang P. et al. Inhibition of EZH2 reverses chemotherapeutic drug TMZ chemosensitivity in glioblastoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2014; 7(10):6662-6670.
  22. Tan J.Z., Yan Y., Wang X.X., Jiang Y., Xu H.E. EZH2: biology, disease, and structure-based drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* 2014;35(2):161-174.
  23. Schaich M., Kestel L., Pfirrmann M. et al. A MDR1 (ABCB1) gene single nucleotide polymorphism predicts outcome of temozolomide treatment in glioblastoma patients. *Ann Oncol.* 2009; 20(1):175-181.
  24. Hu X., Qin W., Li S. et al. Polymorphisms in DNA repair pathway genes and ABCG2 gene in advanced colorectal cancer: correlation with tumor characteristics and clinical outcome in oxaliplatin-based chemotherapy. *Cancer Manag Res.* 2019; 11: 285-297.
  25. Cenciarelli C., Marei H.E.S., Zonfrillo M. et al. PDGF receptor alpha inhibition induces apoptosis in glioblastoma cancer stem cells refractory to anti-Notch and anti-EGFR treatment. *Mol. Cancer*. 2014; 13(1):247.
  26. Zhang L.-H., Yin A.-A., Cheng, J.-X. et al. TRIM24 promotes glioma progression and enhances chemoresistance through activation of the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncogene*. 2015; 34(5):600-610.
  27. Xu K., Zhang Z., Pei H. et al. FoxO3a induces temozolomide resistance in glioblastoma cells via the regulation of  $\beta$ -catenin nuclear accumulation. *Oncol. Rep.* 2017;37(4):2391-2397.
  28. Gömöri É, Pál J, Kovács B, Dóczi T. Concurrent hypermethylation of DNMT1, MGMT and EGFR genes in progression of gliomas. *Diagn Pathol.* 2012; 7: 8.
  29. Pasqualetti F, Gonnelli A, Cantarella M. et al. Association of Glutathione S-Transferase P-1 (GSTP-1) rs1695 polymorphism with overall survival in glioblastoma patients treated with combined radio-chemotherapy. *Invest New Drugs*. 2018; 36(2):340-345.
  30. da Silveira Fd CA, Lopes Bde A, da Fonseca CO. et al. Analysis of EGF+61A>G polymorphism and EGF serum levels in Brazilian glioma patients treated with perillyl alcohol-based therapy. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2012; 138(8):1347-1354.
  31. Hovinga K.E., McCrea H.J., Brennan C. et al. EGFR amplification and classical subtype are associated with a poor response to bevacizumab in recurrent glioblastoma. *J. Neurooncol.* 2019; 142(2): 337-345.
  32. Hou W.G., Ai W.B., Bai X.G. et al. Genetic variation in the EGFR gene and the risk of glioma in a Chinese Han population. *PLoS One*. 2012;7(5): e37531.
  33. Andersson U, Schwartzbaum J, Wiklund F. et al. A comprehensive study of the association between the EGFR and ERBB2 genes and glioma risk. *Acta Oncol.* 2010; 49(6):767-775.
  34. Hsu C.Y., Ho H.L., Lin S.C. et al. The MGMT promoter single-nucleotide polymorphism rs1625649 had prognostic impact on patients with MGMT methylated glioblastoma. *PLoS One*. 2017;12(10): e0186430.
  35. Кит О.И., Водолажский Д.И., Росторгуев Э.Е. и др. Молекулярно-генетические маркеры глиом. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2017;35(4):132-140.
  36. Calvert A.E., Chalastanis A., Wu Y. et al. Cancer-associated IDH1 promotes growth and resistance to tar-

- geted therapies in the absence of mutation. *Cell Rep.* 2017;19(9):1858-1873.
37. Wang X.W., Boisselier B., Rossetto M. et al. Prognostic impact of the isocitrate dehydrogenase 1 single-nucleotide polymorphism rs11554137 in malignant gliomas. *Cancer.* 2013;119(4):806-813.
  38. Mistry A.M., Vnencak-Jones C.L., Mobley B.C. Clinical prognostic value of the isocitrate dehydrogenase 1 single-nucleotide polymorphism rs11554137 in glioblastoma. *J. Neurooncol.* 2018;138(2): 307-313.
  39. Shu C., Wang Q., Yan X. et al. Whole-Genome Expression Microarray Combined with Machine Learning to Identify Prognostic Biomarkers for High-Grade Glioma. *J. Mol Neurosci.* 2018;64 (4):491-500.
  40. Tabouret E., Labussière M., Alentorn A. et al. LRP1B deletion is associated with poor outcome for glioblastoma patients. *J. Neurol. Sci.* 2015;358(1-2):440-443.
  41. Yuan G., Gao D., Ding S. et al. DNA repair gene ERCC1 polymorphisms may contribute to the risk of glioma. *Tumour Biol.* 2014;35(5):4267-4275.
  42. Bien-Miller S., Lange S., Holm T. et al. Expression of S1P metabolizing enzymes and receptors correlate with survival time and regulate cell migration in glioblastoma multiforme. *Oncotarget.* 2016;7(11):3031-3046.
  43. Olivera A, Spiegel S. Sphingosine kinase: a mediator of vital cellular functions. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2001;64(1-4):123-34.
  44. Lo H.-W., Cao X., Zhu H. et al. Constitutively activated STAT3 frequently coexpresses with epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas and targeting STAT3 sensitizes them to irressa and alkylators. *Clin. Cancer Res.* 2008;14(19):6042-6054.
  45. Zhang J.-X., Zhang J., Yan W. et al. Unique genome-wide map of TCF4 and STAT3 targets using ChIP-seq reveals their association with new molecular subtypes of glioblastoma. *Neurooncol.* 2013;15(3):279-289.
  46. Hau P., Jachimczak P., Schlaier J. et al. TGF- $\beta$ 2 signaling in high-grade gliomas. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2011;12(12):2150-2157.
  47. Wu Z., Wang L., Li G. et al. Increased expression of microRNA-9 predicts an unfavorable prognosis in human glioma. *Mol. Cellular Biochem.* 2013; 384(1-2):263-268.
  48. Yue X., Lan F., Hu M. et al. Downregulation of serum microRNA-205 as a potential diagnostic and prognostic biomarker for human glioma. *J. Neurosurg.* 2016;124(1):122-128.
  49. Melin B.S., Barnholtz-Sloan J.S., Wrensch M.R. et al. Genome-wide association study of glioma subtypes identifies specific differences in genetic susceptibility to glioblastoma and non-glioblastoma tumors. *Nat Genet.* 2017; 49(5):789-794.
  50. Kinnersley B., Houlston R S., Bondy M.L. Genome-Wide Association Studies in Glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2018;27(4):418-428.
  51. Turner K.M., Sun Y., Ji P. et al. Genomically amplified Akt3 activates DNA repair pathway and promotes glioma progression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112(11):3421-3426.
  52. de Castro J.V., Gon alves C.S., Costa S et al. Impact of TGF-1 -509C/T and 869T/C polymorphisms on glioma risk and patient prognosis. *Tumour Biol.* 2015;36(8):6525-6532.
  53. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol.* 2009;4: 127-150.
  54. Song D-D, Zhang Q, Li J-H et al. Single nucleotide polymorphisms rs701848 and rs2735343 in PTEN increases cancer risks in an Asian population. *Oncotarget.* 2017; 8(56):96290-96300.
  55. Tamura R., Morimoto Y., Kosugi K. et al. Clinical and histopathological analyses of VEGF receptors peptide vaccine in patients with primary glioblastoma — a case series. *BMC Cancer.* 2020;20(1):196.
  56. Yuan G., Yan S., Xue H. et al. JSI-124 suppresses invasion and angiogenesis of glioblastoma cells *in vitro*. *PLoS One.* 2015;10(3): e0118894.
  57. Popescu A.M., Alexandru O., Brindusa C. et al. Targeting the VEGF and PDGF signaling pathway in glioblastoma treatment. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015;8(7):7825-7837.
  58. Hochart A., Leblond P., Le Bourhis X. et al. MET receptor inhibition: Hope against resistance to targeted therapies? *Bull. Cancer.* 2017;104(2):157-166.
  59. Kang W., Kim S.H., Cho H.J. et al. Talin1 targeting potentiates anti-angiogenic therapy by attenuating invasion and stem-like features of glioblastoma multiforme. *Oncotarget.* 2015;6(29):27239-27251.
  60. Vasconcelos VCA, Lourenço GJ, Brito ABC et al. Associations of VEGFA and KDR single-nucleotide polymorphisms and increased risk and aggressiveness of high-grade gliomas. *Tumour Biol.* 2019;41(9): 1010428319872092.
  61. Grabiner BC, Nardi V, Birsoy K. et al. A diverse array of cancer-associated MTOR mutations are hyperactivating and can predict rapamycin sensitivity. *Cancer Discov.* 2014;4(5): 554-63.
  62. Georgescu M-M, Li Y, Islam MZ et al. Mutations of the MAPK/TSC/mTOR pathway characterize periventricular glioblastoma with epithelioid SEGA-like morphology-morphological and therapeutic implications. *Oncotarget.* 2019;10(40):4038-4052.
  63. Zeng H., Yang Z., Xu N. et al. Connective tissue growth factor promotes temozolomide resistance in glioblastoma through TGF- $\beta$ 1-dependent activation of Smad/ERK signaling. *Cell Death Dis.* 2017;(6): e2885.
  64. Lin S.-P., Lee Y.-T., Wang J.-Y. et al. Survival of cancer stem cells under hypoxia and serum depletion via decrease in PP2A activity and activation of p38-MAPKAPK2-Hsp27. *PLoS One.* 2012;7(11): e49605.
  65. Giacomelli C., Natali L., Trincavelli M.L. et al. New insights into the anticancer activity of carnosol: p53 reactivation in the U87MG human glioblastoma cell line. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2016;74: 95-108.
  66. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* 2000;25(9-10): 1439-51.
  67. Lan J., Xue Y., Chen H. et al. Hypoxia-induced miR-497 decreases glioma cell sensitivity to TMZ by inhibiting apoptosis. *FEBS Lett.* 2014;588(8):3333-3339.
  68. Tang H., Biana Y., Tu C. et al. The miR-183/96/182 cluster regulates oxidative apoptosis and sensitizes cells to chemotherapy in gliomas. *Curr. Cancer Drug Targets.* 2013;13(2):221-231.
  69. Tanaka T., Sasaki A., Tanioka D. et al. Analysis of p53 and miRNA expressions after irradiation in glioblastoma cell lines. *J. Showa Med. Assoc.* 2012;72(2): 238-244.
  70. Zhang Y, Dube C, Gibert M Jr. et al. The p53 Pathway in Glioblastoma. *Cancers (Basel).* 2018;10(9): pii E297.
  71. Anselmo NP, Rey JA, Almeida LO et al. Concurrent sequence variation of TP53 and TP73 genes in anaplastic astrocytoma. *Genet Mol. Res.* 2009;8(4):1257-1263.

72. Wang J., Wang M.L., Wang C.H. et al. A novel functional polymorphism of GFAP decrease glioblastoma susceptibility through inhibiting the binding of miR-139. *Aging* (Albany NY). 2018;10(5): 988-999.

Поступила в редакцию 07.09.2020 г.

*A.N. Chernov<sup>1,4</sup>, I.A. Baldueva<sup>2</sup>, T.L. Nekhaeva<sup>2</sup>,  
E.S. Galimova<sup>3,6</sup>, D.A. Alaverdian<sup>5</sup>, O.V. Shamova<sup>1</sup>*

**The molecular mechanisms of multidrug resistance of human glioblastomas**

<sup>1</sup>Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg,  
<sup>2</sup>N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Saint-Petersburg,

<sup>3</sup>Almazov National Medical Research Center, Saint-Petersburg,

<sup>4</sup>Department of Clinics and Genetics investigations, Saint-Petersburg City Hospital №40 of Resort District, Saint-Petersburg,

<sup>5</sup>Medical Genetics, Department of Medical Biotechnologies, University of Siena, Siena, Italy,

<sup>6</sup>Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg

In review discusses the phenomenon of drug resistance of GB in the context of the expression of ABC family transporter proteins and the processes of proliferation, angiogenesis, recurrence and death. The emphasis is on the identifying for molecular targets among growth factors, receptors, signal transduction proteins, microRNAs, transcription factors, proto-oncogenes, tumor suppressor genes and their polymorphic variants (SNPs) for the development and creation of targeted anticancer drugs.

Key words: review, glioblastoma, multidrug resistance, chemotherapy, growth factors, microRNAs, oncogenes

Г.А. Янус<sup>1,2</sup>, Т.А. Лайдус<sup>1</sup>, К.А. Загороднев<sup>2</sup>, А.С. Мартьянов<sup>2</sup>, Т.Н. Соколова<sup>1,3</sup>,  
С.Н. Алексахина<sup>1,2</sup>, Е.Ш. Кулигина<sup>1,2</sup>, Е.Н. Имянитов<sup>1,2</sup>

## Перспективы анализа циркулирующей опухолевой ДНК для нужд практической онкологии: достижения и нерешённые проблемы

<sup>1</sup>ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург,

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, Санкт-Петербург,

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург

Попытки выявить в крови и иных биологических жидкостях изменения, сопутствующие ходу опухолевого процесса, имеют очень давнюю историю. Однако, реальная возможность мониторировать поведение опухоли в режиме «реального времени» появилась лишь с возникновением высокоточных методов ДНК-анализа. Следует разделить два направления в рамках этого раздела современной онкологии: 1) попытки раннего выявления опухолей среди условно здоровых лиц, а также 2) применение «жидкостной биопсии» у пациентов с уже выявленным онкологическим заболеванием для широкого круга задач: диагностики рецидивов, контроля эффективности лечения и т.д.

Можно констатировать, что первое направление пока не дало результатов, пригодных для массового внедрения в практику. Тем не менее, ошеломляют технологические достижения в совершенствовании аналитических показателей применяемых модификаций высокопроизводительного секвенирования. Вызывают интерес нестандартные подходы, основанные на использовании недавно открытых особенностей фрагментации циркулирующей опухолевой ДНК плазмы, комбинирование различных методов. Второе, менее амбициозное направление «жидкостной биопсии», оказывается значительно ближе к использованию в клинике. Этот подход уже широко применяется для такой актуальной задачи, как неинвазивное выявление мутаций T790M в гене EGFR у больных метастатическим раком легкого, получающих ингибиторы EGFR. Помимо практических достижений, в рамках изучения различных аспектов «жидкостной биопсии» удается получить ценные фундаментальные сведения, например, касательно паттернов (моделей или путей) возникновения резистентности к противоопухолевому лечению и динамики ее обратного развития после смены линии терапии.

**Ключевые слова:** жидкостная биопсия; онкомаркеры; циркулирующая опухолевая ДНК

### Введение

«Жидкостная биопсия» является малоинвазивным инструментом детекции в биологических жидкостях организма различных онкомаркеров — белковых молекул, циркулирующих раковых клеток, фрагментов бесклеточной опухолевой ДНК и РНК, экзосом и везикул, нуклеопротеиновых комплексов и др. [1, 2]. Белковые маркеры, в определенной мере специфичные для опухолей (такие как раковый эмбриональный антиген (СЕА), ПСА при раке простаты, альфа-фетопроtein при карциноме печени, СА15-3 при раке молочной железы и др.), а также сам факт циркуляции клеток опухоли в кровяном русле у пациентов с распространенными формами новообразований известны уже на протяжении десятков лет [3, 4, 5]. Подробно описаны и многочисленные недостатки подобных маркеров, ограничивающие их использование в диагностических тестах. Например, уровень белковых молекул зачастую колеблется из-за различных физиологических изменений в организме вне зависимости от прогрессии опухоли, а циркулирующие опухолевые клетки трудно дифференцировать от других клеточных элементов крови.

Гораздо более пригодным объектом для молекулярно-генетического и количественного анализа оказались фрагменты свободно циркулирующих в крови фрагментов ДНК опухолевых клеток (цоДНК). Лимитирующим фактором для развития этого направления «жидкостной биопсии» являются методические затруднения, вызванные крайне низкой концентрацией опухоль-специфических фрагментов в плазме крови. Техническая возможность сколько-нибудь надежного выявления опухоль-специфических мутаций или иных aberrаций нуклеиновых кислот среди пула циркулирующих в плазме крови

ДНК и РНК появилась относительно недавно. Это связано с возникновением новых методов генетического анализа, в частности, капельной цифровой ПЦР (droplet digital PCR) и сверхточных разновидностей высокопроизводительного секвенирования ДНК (NGS). В данной работе систематизированы сведения о перспективах использования анализа цоДНК в клинической онкологии.

### Происхождение, состав и динамика цоДНК в периферической крови онкологических пациентов

В плазме крови онкологических больных, наряду с бесклеточной ДНК опухолевого происхождения, циркулируют фрагменты генома разнообразных «здоровых» клеток. В норме львиная доля циркулирующей ДНК несет признаки гемопоэтического происхождения. Суммарная концентрация свободных плазменных ДНК варьирует от 0-5 до >1000 нг/мл у больных раком и 0 — 100 нг/мл у здоровых индивидуумов [6]. Как полагают, циркулирующая бесклеточная ДНК, в основном, высвобождается в кровоток из клеток, подвергшихся апоптозу [6, 7]. Как правило, размер молекул свободной ДНК, получившихся в результате каспаза-зависимой фрагментации, составляет 167 п.о. [8, 9]. Предполагается, что такие фрагменты ДНК, попавшие в плазму, защищены от действия ферментов нуклеосомами. Обнаружилось, что фракция циркулирующей бесклеточной ДНК опухолевого происхождения неоднородна по составу и отличается от «нормальной». Основная ее масса состоит из укороченных фрагментов (<145 п.о.) [10], причем фрагменты, несущие опухоль-специфические мутации, имеют меньший размер, чем фрагменты с аллелями «дикого типа» [11, 12].

Кроме продуктов апоптотического распада клеток, в плазме циркулируют также необычно длинные фрагменты 250-320 п.о. [9]. В основе высвобождения в кровь таких крупных обломков опухолевого генома лежат, по-видимому, альтернативные механизмы — некроз, фагоцитоз, экзоцитоз и/или активный выброс [6].

Время полужизни циркулирующих бесклеточных ДНК в периферическом русле варьирует от 16 мин до 2,5 часов [13, 14]. Механизмы элиминации цоДНК понятны не вполне, но есть основания полагать, что ключевую роль в этом процессе выполняет фермент DNase I [15, 16]. Скорость деградации зависит также от ассоциации циркулирующих фрагментов с плазменными белками и везикулами [6], что, в свою очередь, связано с физиологическими параметрами крови — температурой, рН и др. [17]. Кроме того,

есть сведения, что цоДНК могут взаимодействовать с поверхностными клеточными рецепторами, подвергаться обратному захвату и транспортироваться в ядро [18, 19].

Доля мутированных фрагментов цоДНК в общем пуле бесклеточных нуклеиновых кислот сильно варьирует от случая к случаю — от 0.003% до 95% [20] — и зависит, прежде всего, от размеров и патофизиологических особенностей опухоли. Итоговая концентрация цоДНК в плазме крови является результатом баланса между интенсивностью высвобождения и скоростью деградации: очевидно, ее уровень связан и с физиологическими параметрами организма.

Раннее выявление злокачественных новообразований при помощи «жидкостной биопсии».

Наиболее амбициозная задача, стоящая перед «жидкостной биопсией», состоит в ранней неинвазивной диагностике опухолей [21, 22, 23]. Очевидно, что единого ДНК-маркера для различных новообразований не существует, поэтому обычно для этой цели применяются методы широкоформатного генетического анализа на базе секвенирования нового поколения (NGS, next generation sequencing). Кроме того, данное приложение «жидкостной биопсии» максимально требовательно в отношении чувствительности методов детекции. Прогресс в области технологий NGS и последующей биоинформатической обработки его результатов позволил достичь выявления < 0,01% копий опухолевого генома в общем пуле циркулирующей неопухоловой ДНК (методы CAPP-seq, TЕС-seq и т.д.) [22, 24, 25]. Любопытно, что исключительно высокими оказались аналитические показатели детекции аномалий метилирования ДНК, требующие, однако, достаточно нестандартных и технически сложных методов пробоподготовки [26, 27]. Тем не менее, несмотря на высокую аналитическую чувствительность методов анализа ДНК, задача раннего выявления опухолей наталкивается на затруднения. Так, при использовании метода TЕС-Seq удалось достигнуть выявления мутаций в цоДНК лишь в 59-71% случаев опухолевых заболеваний I-II стадии [22, 28, 29].

Следует отметить, что различные виды опухолей сильно отличаются друг от друга количеством ДНК, высвобождаемым ими в кровяное русло. Например, в отношении рака печени I стадии «жидкостная биопсия» намного более чувствительна, чем в отношении рака пищевода (~100% против 20%) [30]. Данное исследование является примером успеха комбинированного подхода к жидкостной биопсии: для детекции использовались не только ДНК, но и белковые онкомаркеры, что позволило увеличить чувствительность метода без существенного снижения специфичности.

Помимо применения комбинаций маркеров различной природы, несколько улучшить результаты помогает использование знаний об молекулярных особенностях пула циркулирующей ДНК в норме и при онкологических заболеваниях. Так, хорошие результаты дает обогащение анализируемой циркулирующей ДНК фракцией коротких фрагментов нуклеиновых кислот [9]. Более того, известно, что на спектр фрагментов цоДНК оказывают влияние гистоновые белки и факторы транскрипции, защищающие ДНК от разрезания нуклеазами. Паттерн взаимодействия подобных белков с ДНК тканеспецифичен, поэтому по представленности сайтов связывания различных факторов транскрипции среди границ фрагментов циркулирующей ДНК можно судить о тканевом происхождении этих фрагментов [31]. Оказалось, что на основе уже одного лишь этого показателя, даже не прибегая к выявлению опухоль-специфичных мутаций, можно выявить аденокарциномы толстой кишки I стадии с чувствительностью 71% и специфичностью 72% [32].

Интересно недавнее сообщение о новом методе детекции анеуплоидии, основанном на высокопроизводительном секвенировании нескольких сотен тысяч коротких продуктов амплификации (120-145 п.о.), получаемых при помощи одной пары специальных низкоспецифичных праймеров (RealSeqS). При таком дизайне амплифицированные участки оказываются сравнительно равномерно распределены по всему геному; таким образом, представляется возможным оценить уровень анеуплоидии (хромосомной нестабильности) — ключевого признака злокачественных заболеваний. Признаки множественных хромосомных aberrаций были обнаружены в 49% образцов «жидкостной биопсии» от больных нематастатическим раком прямой кишки, пищевода, печени, легких, яичника, желудка, молочной и поджелудочной железы. В итоге, дополнение поиска «циркулирующих» мутаций и белковых онкомаркеров анализом анеуплоидии обеспечило увеличение до 80% чувствительности выявления онкологической патологии [33].

Специфичность молекулярного анализа в ситуации, требующей сверхчувствительных подходов, также субоптимальна. Для устранения технических артефактов широко применяются подходы, основанные на т.н. «молекулярном баркодировании» [22, 25]. Маркируя изначально присутствующие в образце молекулы ДНК при помощи уникальных адаптеров-идентификаторов, удается свести к минимуму влияние артефактов, возникающих в ходе дальнейших этапов анализа. Кроме того, для устранения ошибок, связанных с появлением в циркулирующей ДНК химически модифицированных нуклеотидов,

иногда применяют предварительную обработку выделенной ДНК ферментами репарации [25].

Наконец, помимо технических артефактов, можно столкнуться с выявлением реально существующего генетического мозаицизма, в том числе и применительно к «раковым генам», возникших в результате мутаций не в опухолевых клетках крови за счет феномена клонального гемопоэза [34]. Поэтому, чтобы обеспечить отбор лишь клинически значимых мутаций, желательно дополнять анализ цоДНК анализом генома лейкоцитов крови.

### **Применение «жидкостной биопсии» у пациентов с онкологическими заболеваниями**

Высокая чувствительность требуется от «жидкостной биопсии» и в ситуации, когда она применяется после радикального хирургического вмешательства, для выявления минимальной остаточной болезни, раннего выявления рецидива и оценки его риска, мониторинга ответа опухоли на терапию. В данном случае задача несколько упрощается за счет возможности предварительного анализа опухолевой ткани стандартными методами. Далее, для «визуализации» цоДНК в плазме будет достаточно применять высокочувствительный персонализированный тест на одну или несколько мутаций, присущих именно данному новообразованию. В техническом отношении наиболее проста для «жидкостной биопсии» ситуация, когда опухолевая масса велика: у больного наблюдается крупная распространенная опухоль. В таких случаях цоДНК избилует в плазме крови и зачастую каких-либо особенных методических ухищрений для её детекции не требуется [35, 36]. В противном случае, с этой целью могут применяться такие сверхточные методики генетического анализа как цифровая капельная ПЦР (digital droplet PCR, ddPCR) [37], метод BEAMing (beads, emulsions, amplification, and magnetics) [38], а также различные модификации таргетного секвенирования панелей ампликонов, содержащих «целевые» мутации [39, 40]. Хотя аналитические показатели данных методов схожи в отношении отдельных мутаций, ddPCR обладает наименьшей себестоимостью и наибольшей технической простотой. В то же время, возможность выявлять сразу целый ряд мутаций, свойственная таргетному секвенированию, увеличивает вероятность выявления хоть какой-либо из них и повышает общую чувствительность теста.

Существует множество свидетельств того, что обнаружение цоДНК после радикального хирургического вмешательства является неблагоприятным прогностическим признаком [37, 40, 41].

Важно, что персистенция цоДНК в плазме после окончания всех использованных вариантов лечения еще в большей степени ассоциирована с ранним рецидивом [41, 42]. Эти данные служат лишь косвенным свидетельством клинической значимости выявления цоДНК: действительно, пока еще неочевидно, принесет ли превентивное лечение пользу пациентам, у которых единственным признаком угрозы рецидива служит появление в плазме цоДНК. Крайне интересно недавнее исследование, в котором удалось показать, что возобновление выявления цоДНК на месяцы предшествует всем иным признакам рецидива рака молочной железы, включая повышение уровня СА 15-3 (в тех случаях, когда этот маркер оказался информативен) [39].

Существуют ситуации, в которых требуется молекулярно-генетический анализ предикторов эффективности таргетной терапии, но взятие «традиционной» биопсии почему-либо затруднено, либо требуется многократная «серийная» биопсия: в этих случаях целесообразно применение «жидкостной биопсии» [43, 44]. Так, в одном из ранних исследований применение «традиционной» аллель-специфической ПЦР продемонстрировало 100%-ую диагностическую чувствительность и специфичность в отношении мутаций V600E в гене *BRAF* и 90%-ую точность при выявлении семи частых мутаций в гене *KRAS* в плазме больных метастатическим колоректальным раком [45].

### Заключение

Несмотря на ошеломляющие достижения последних лет в разработке сверхточных методов генетического анализа, нет сомнений, что наступит такой момент, когда дальнейшее наращивание мощности методов само по себе не найдет практического применения. Действительно, по некоторым оценкам, маленькая опухоль диаметром менее сантиметра высвобождает в кровь столь малые количества ДНК, что в 10 миллилитрах крови, взятых для анализа, не найдется и одного полного генома опухоли [46]. Поиск методов, дополняющих анализ опухоль-специфических мутаций (изучение характеристик фрагментов циркулирующей ДНК, метилирования, экспрессии микроРНК, белковых маркеров, иммунологических реакций на опухоль), в какой-то мере способен увеличить эффективность использования плазмы для диагностики новообразований. В настоящее время не полностью исчерпан потенциал усовершенствования преаналитических этапов «жидкостной биопсии». Действительно, вызывает удивление тот факт, что влияние простых переменных в процедурных особенностях

сбора и процессинга материала (время забора крови, физическая нагрузка, режимы сегрегации плазмы и др.) изучено значительно хуже, чем тончайшие и сложнейшие аспекты методов высокопроизводительного секвенирования. Так или иначе, но на данный момент остается констатировать, что применение целого арсенала самых современных методов ДНК-диагностики не обеспечивает показателей, позволяющих использовать анализ плазмы крови для рутинного общепопуляционного скрининга в отношении ранней диагностики рака. Кроме того, стоимость комплекса анализов, необходимых даже для субоптимального, лишь приближенного к реальным нуждам решения такой задачи, оказывается непомерно высока. И все же данное направление определяет технологический прогресс всей данной области и способствует развитию более близких к практике приложений, в частности мониторинга динамики роста и гетерогенности опухоли на фоне терапии, молекулярно-генетический анализ труднодоступных очагов, детекции резидуальной опухоли после операции.

#### *Конфликт интересов*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

#### *Финансирование*

*Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 075-15-2019-1721, RFMEFI60419X0216).*

### ЛИТЕРАТУРА

- Perakis S., Speicher M.R. Emerging concepts in liquid biopsies. *BMC Med.* 2017; 15(1): 75.
- Junqueira-Neto S., Batista I.A., Costa J.L. et al. Liquid Biopsy beyond Circulating Tumor Cells and Cell-Free DNA. *Acta Cytol.* 2019; 63(6):479-488.
- Booth S.N., King J.P., Leonard J.C. et al. Serum carcinoembryonic antigen in clinical disorders. *Gut.* 1973; 14(10):794-799.
- Buamah P.K., Bent D.J., Bodger W.A. et al. A profile of serum CA 15-3, carcinoembryonic antigen, alkaline phosphatase, and gamma-glutamyl transferase levels in patients with breast cancer. *J Surg Oncol.* 1993; 53:84-87.
- Kim M.Y., Oskarsson T., Acharyya S. et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell.* 2009; 139(7):1315-1326.
- Thierry A.R., El Messaoudi S., Gahan P.B. et al. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev.* 2016; 35: 347-376.
- Diehl F., Li M., Dressman D. et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(45):16368-16373.
- Jiang P., Lo Y.M.D. The Long and Short of Circulating Cell-Free DNA and the Ins and Outs of Molecular Diagnostics. *Trends Genet.* 2016; 32: 360-371.

9. Mouliere F, Chandrananda D., Piskorz A.M. et al. Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. *Sci Transl Med.* 2018;10(466): pii: eaat4921.
10. Snyder M.W., Kircher M., Hill A.J. et al. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell.* 2016; 164: 57-68.
11. Hellwig S., Nix D.A., Gligorich K.M. et al. Automated size selection for short cell-free DNA fragments enriches for circulating tumor DNA and improves error correction during next generation sequencing. *PLoS One.* 2018; 13(7).
12. Liu X., Lang J., Li S. et al. Fragment Enrichment of Circulating Tumor DNA With Low-Frequency Mutations. *Front Genet.* 2020;11: 147.
13. Yao W., Mei C., Nan X. et al. Evaluation and comparison of in vitro degradation kinetics of DNA in serum, urine and saliva: A qualitative study. *Gene.* 2016; 590(1):142-148.
14. Diehl F., Schmidt K., Choti M.A. et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* 2008;14:985-90.
15. Alekseeva L.A., Mironova N.L., Brenner E.V. et al. Alteration of the exDNA profile in blood serum of LLC-bearing mice under the decrease of tumour invasion potential by bovine pancreatic DNase I treatment. *PLoS One.* 2017; 12(2): e0171988.
16. Bronkhorst A.J., Ungerer V., Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif.* 2019; 17: 100087.
17. Chelobanov B.P., Laktionov P.P., Vlasov V.V. Proteins involved in binding and cellular uptake of nucleic acids. *Biochemistry (Mosc).* 2006; 71: 583-96.
18. Vlassov V.V., Laktionov P.P., Rykova E.Y. Extracellular nucleic acids. *Bioessays.* 2007; 29(7):654-667.
19. Khier S., Lohan L. Kinetics of circulating cell-free DNA for biomedical applications: critical appraisal of the literature. *Future Sci OA.* 2018; 23(4): FSO295.
20. Mouliere F., El Messaoudi S., Gongora C. et al. Circulating Cell-Free DNA from Colorectal Cancer Patients May Reveal High KRAS or BRAF Mutation Load. *Transl Oncol.* 2013; 6(3):19-28.
21. Aravanis A.M., Lee M., Klausner R.D. Next-Generation Sequencing of Circulating Tumor DNA for Early Cancer Detection. *Cell.* 2017; 168(4):571-574.
22. Phallen J., Sausen M., Adleff V. et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med.* 2017; 9: pii: eaan2415.
23. Wu X., Li J., Gassa A. et al. Circulating tumor DNA as an emerging liquid biopsy biomarker for early diagnosis and therapeutic monitoring in hepatocellular carcinoma. *Int J Biol Sci.* 2020; 16(9):1551-1562.
24. Newman A.M., Bratman S.V., To J. et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med.* 2014; 20(5):548-554.
25. Newman A.M., Lovejoy A.F., Klass D.M. et al. Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA. *Nat Biotechnol.* 2016; 34: 547-555.
26. Shen S.Y., Singhania R., Fehring G. et al. Sensitive tumour detection and classification using plasma cell-free DNA methylomes. *Nature.* 2018; 563(7732):579-583.
27. Locke W.J., Guanzon D., Ma C. et al. DNA Methylation Cancer Biomarkers: Translation to the Clinic. *Front Genet.* 2019;10: 1150.
28. Kaiser J. 'Liquid biopsy' for cancer promises early detection. *Science.* 2018;359(6373):259.
29. Lam W.K.J., Chan K.C.A. Plasma DNA for early cancer detection — opportunities and challenges. *Expert Rev Mol Diagn.* 2019; 19: 5-7.
30. Cohen J.D., Li L., Wang Y. et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science.* 2018; 359: 926-930.
31. Cristiano S., Leal A., Phallen J. et al. Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. *Nature.* 2019; 570(7761):385-389.
32. Ulz P., Perakis S., Zhou Q. et al. Inference of transcription factor binding from cell-free DNA enables tumor subtype prediction and early detection. *Nat Commun.* 2019; 10(1):4666.
33. Douville C., Cohen J.D., Ptak J. et al. Assessing aneuploidy with repetitive element sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020; 117(9):4858-4863.
34. Razavi P., Li B.T., Brown D.N. et al. High-intensity sequencing reveals the sources of plasma circulating cell-free DNA variants. *Nat Med.* 2019; 25: 1928-1937.
35. Bettegowda C., Sausen M., Leary R.J. et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014; 6: 224ra224.
36. Lebofsky R., Decraene C., Bernard V. et al. Circulating tumor DNA as a non-invasive substitute to metastasis biopsy for tumor genotyping and personalized medicine in a prospective trial across all tumor types. *Mol Oncol.* 2015; 9(4):783-790.
37. Garcia-Murillas I., Chopra N., Comino-Mendez I. et al. Assessment of Molecular Relapse Detection in Early-Stage Breast Cancer. *JAMA Oncol.* 2019.
38. O'Leary B., Hrebien S., Beaney M. et al. Comparison of BEAMing and Droplet Digital PCR for Circulating Tumor DNA Analysis. *Clin Chem.* 2019; 65(11):1405-1413.
39. Coombes R.C., Page K., Salari R. et al. Personalized Detection of Circulating Tumor DNA Antedates Breast Cancer Metastatic Recurrence. *Clin Cancer Res.* 2019; 25(14):4255-4263.
40. Parsons H.A., Rhoades J., Reed S.C. et al. Sensitive Detection of Minimal Residual Disease in Patients Treated for Early-Stage Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2020.
41. Tie J., Cohen J.D., Wang Y. et al. Serial circulating tumour DNA analysis during multimodality treatment of locally advanced rectal cancer: a prospective biomarker study. *Gut.* 2019;8(4):663-671.
42. Reinert T., Henriksen T.V., Christensen E. et al. Analysis of Plasma Cell-Free DNA by Ultradeep Sequencing in Patients With Stages I to III Colorectal Cancer. *JAMA Oncol.* 2019.
43. Ou S.I., Nagasaka M., Zhu V.W. Liquid Biopsy to Identify Actionable Genomic Alterations. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2018; 38: 978-997.
44. Galot R., van Marcke C., Helaers R. et al. Liquid biopsy for mutational profiling of locoregional recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2020;104: 104631.
45. Thierry A.R., Mouliere F., El Messaoudi S. et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med.* 2014; 20(4): 430-435.
46. Fiala C., Diamandis E.P. Utility of circulating tumor DNA in cancer diagnostics with emphasis on early detection. *BMC Med.* 2018; 16: 166.

Поступила в редакцию 28.08.2020 г.

*G.A. Yanus<sup>1,2</sup>, T.A. Laidus<sup>1</sup>, K.A. Zagorodnev<sup>2</sup>,  
A.S. Martianov<sup>2</sup>, T.N. Sokolova<sup>1,3</sup>, S.N. Aleksakhina<sup>1,2</sup>,  
E.S. Kuligina<sup>1,2</sup>, E.N. Imyanitov<sup>1,2</sup>*

**Perspectives for the analysis of circulating tumor DNA in clinical oncology: achievements and unresolved issues**

<sup>1</sup>N.N. Petrov Institute of Oncology, St. Petersburg,

<sup>2</sup>St. Petersburg Pediatric Medical University,  
St. Petersburg,

<sup>3</sup>Peter the Great St.Petersburg Polytechnic University,  
St. Petersburg

The efforts to detect specific tumor-associated changes in blood and other biological fluids are by no means new. However, only the development of the most precise modifications of DNA analysis provided real opportunity to monitor tumor behavior in “real time” manner. Two directions should be distinguished within this field of modern oncology: 1) the early detection of cancer in apparently healthy individuals; 2) the use of liquid biopsy in patients with confirmed cancer diagnosis for a broad range of applications, such as the early diagnosis of recurrence or monitoring the treatment efficacy.

It should be stated, that the first direction of the research has not yet led to the results suitable for implementation in real world practice. Nevertheless, there are staggering technological advances in the analytical performance of NGS-based methods, which are applied to this task. The emerging non-standard approaches, involving the use of recently discovered peculiarities of the ctDNA fragmentation in plasma, or the complex approaches, utilizing a number of diverse methods simultaneously, are of great interest. The second, less ambitious direction of liquid biopsy studies is much closer to clinical use. This approach has already been widely used for such an actual issue, as the early non-invasive T790M detection in plasma of metastatic lung cancer patients, undergoing anti-EGFR therapy. Aside from the practical advances, the studies of various aspects of liquid biopsy provide all sorts of invaluable scientific information, for example regarding the precise timing patterns of the emergence of the resistance to anticancer drugs and the dynamics of its regression after changing of therapy regimen.

Key words: liquid biopsy; tumor markers; circulating tumor DNA

С.В. Ионов<sup>1</sup>, В.С. Орлова<sup>1</sup>, Н.Ю. Кульбачевская<sup>2</sup>

## Влияние метформина на доксорубицин-индуцированную кардиотоксичность в эксперименте. Систематический обзор

<sup>1</sup>Российский университет дружбы народов, Москва<sup>2</sup>ФГБУ Национальный Медицинский Исследовательский Центр Онкологии им. Н.Н.Блохина, Москва

В статье представлен обзор известных на сегодняшний день описаний механизмов действия и токсических эффектов двух препаратов: доксорубицина, препарата первой линии для лечения онкологических заболеваний, и метформина-препарата, широко применяемого для лечения сахарного диабета 2-го типа. С использованием систем NCBI, PubMed и OxfordAcademic представлен анализ опубликованных данных по протективному эффекту метформина при его сочетанном применении с доксорубицином в эксперименте при попытке снизить проявления доксорубицин-индуцированной кардиотоксичности.

**Ключевые слова:** доксорубицин, метформин, кардиотоксичность, окислительный стресс, активные формы кислорода

### ДОКСорубицин: свойства, механизм действия и побочные эффекты

Доксорубицин (ДОКС) является широко и высокоэффективно используемым неселективным антрациклиновым антибиотиком, относится к препаратам первой линии в лечении опухолевых заболеваний [1]. На данный момент предложено 2 механизма, с помощью которых ДОКС оказывает влияние на опухолевые клетки: интеркаляция в ДНК и нарушение репарации топоизомеразы-II-опосредованной ДНК с образованием свободных радикалов и повреждением ими клеточных мембран, ДНК и белков [2]. В качестве альтернативы был предложен путь проникновения ДОКС в ядро с последующим повреждением топоизомеразы-II, приводящий к повреждению ДНК и гибели клеток.

Клиническое применение ДОКС ограничено из-за вызываемой им токсичности, а в особенности его кардиотоксичности [3]. Было проведено множество исследований молекулярных механизмов ДОКС-индуцированной кардиомиопатии, результаты которых показали, что в ее патогенез вовлечен ряд молекулярных элементов, таких как повреждение ДНК [4], накопление митохондриального железа [5], повреждение митохондрий [6] и накопление

активных форм кислорода (АФК) [7]. Однако единая модель патогенеза до сих пор не разработана.

В 90-е годы 20-го века рядом авторов была выдвинута гипотеза о том, что ДОКС-индуцированная кардиомиопатия может быть частично вызвана увеличением продукции окисляющих веществ в сердце, а именно АФК, в подтверждение чего существует множество исследований [7, 8]. ДОКС проникает в кардиомиоциты путем пассивной диффузии и стимулирует образование свободных радикалов, вызывая повреждение клеток. В то же время ДОКС прямо или косвенно ингибирует транскрипцию генов, функцию митохондрий и выработку энергии [9]. ДОКС может повышать внутриклеточные уровни  $Fe^{2+}$  и  $H_2O_2$  и высвобождать железо из транспротеиновых каналов ферритина [10] и других железосвязывающих белков, а свободное железо обладает окислительно-восстановительным потенциалом и может вызывать окислительный стресс. Существует предположение, что основным фактором является нарушение баланса между свободными радикалами и антиоксидантными системами [11].

ДОКС является эффективным противоопухолевым агентом, поэтому его использование будет продолжаться, но необходимо разрабатывать стратегии лечения для предотвращения вызванной ДОКС кардиотоксичности без ослабления его противоопухолевой активности. Одним из таких способов может являться сочетанное применение ДОКС с метформином.

### Метформин: свойства и механизм действия, применение

Метформин (МФ), производное бигуанида, длительно используется для лечения пациентов с сахарным диабетом 2-го типа, но несмотря на его клиническое использование в течение 60 лет, его молекулярные механизмы действия до конца не изучены [12].

Считается, что использование МФ снижает смертность от сердечно-сосудистых нарушений, вызванных сахарным диабетом 2 типа и оказывает протективное воздействие на сердечно-

сосудистую систему [13]. МФ также обладает некоторыми противоопухолевыми свойствами, используется в качестве защитного средства от сердечно-сосудистых заболеваний, нейропротекторного средства или дополнительного препарата для лечения синдрома поликистозных яичников [14]. Препарат входит в список важнейших лекарственных препаратов Всемирной организации здравоохранения [15]. МФ уменьшает всасывание глюкозы в кишечнике, понижает концентрацию глюкозы в крови, активируя АМФК (АМФ-активируемая протеинкиназа), что вызывает увеличение экспрессии SHP (малый гетеродимерный партнер), который подавляет экспрессию фосфоенолпирувата, карбоксикиназы и глюкозо-6-фосфатазы, тем самым ингибируя процесс глюконеогенеза в печени [16]. Ингибирование митохондриальной функции также может объясняться способностью МФ активировать АМФК с последующим увеличением АМФ/АТФ и АДФ/АТФ, что свидетельствует о нарушении клеточного энергетического баланса. МФ может не только влиять на взаимодействие инсулина и IGF-1R (рецептор инсулиноподобного фактора роста 1) [17], но также ингибировать эндогенную продукцию АФК [18], активной АМФК [19], ингибировать mTOR [20], а также оказывать защитное воздействие при воспалении и аутофагии [21].

МФ улучшает липометаболизм путем активации АМФК [22], а также способствует снижению систолического артериального давления у пациентов, не страдающих диабетом [23]. Среди механизмов действия МФ отмечены: снижение концентрации внутриклеточного кальция [24], ослабление окислительного стресса и воспалительных процессов, а также улучшение функции эндотелиальных клеток [25].

Инсулин и IGF-1 (инсулиноподобный фактор роста 1) могут выступать в качестве потенциальных факторов роста, способных стимулировать выживание и митогенез клеток, защищая клетки от апоптоза, тем самым способствуя развитию и прогрессированию роста опухолей [26, 27, 28]. Кроме того было показано, что гиперинсулинемия увеличивает свободные или биоактивные уровни IGF-1 за счет подавления регуляции белка, связывающего IGF-1R, в результате чего происходит его активация [26]. МФ может снизить уровни инсулина и IGF-1, тем самым уменьшая рост клеток [27]. Также было обнаружено, что МФ активирует АМФК, а через сигнальный путь, ассоциированный с АМФК, он индуцирует аутофагию поврежденных клеток сердца и стимулирует работу сердечно-сосудистой системы. Было установлено, что кардиопротекторный эффект метформина опосредуется через регуляцию АМФК и его молекул-мишеней [28].

Одним из способов снижения кардиотоксического эффекта ДОКС без ослабления его противоопухолевой активности может являться сочетанное применение ДОКС с МФ, так как снижение количества миофибрилл, сопровождающееся образованием аномальных митохондрий в миокарде лабораторных животных, получавших ДОКС, было частично нормализовано введением метформина [29].

### **Сочетанное применение метформина как защитного агента при лечении доксорубицином**

Лечение с применением МФ снижало окислительный стресс и улучшало работу миокарда в эксперименте на лабораторных животных. Было показано, что ежедневное введение МФ значительно ослабило повышение уровней ферментов ЛДГ, СК-МВ и тропонина Т, вызванное воздействием ДОКС, в то время как введение только МФ не выявило каких-либо существенных изменений в уровнях ферментов сыворотки [30]. Гистологический анализ показал, что изменение размера кардиомиоцитов при лечении ДОКС прекращалось при использовании МФ, что подтверждает кардиопротективный эффект МФ на ДОКС-индуцированную кардиотоксичность. Сочетанное применение ДОКС и МФ значительно повысило уровень аутофагосомного протеина LC3B-Пу экспериментальных крыс по сравнению с лечением ДОКС, что позволяет предположить, что МФ нормализует аутофагический процесс [30]. Также было обнаружено, что МФ обладает выраженным протективным эффектом против ДОКС-индуцированной кардиотоксичности за счет активации АМФК [31]. Сигнальное взаимодействие между АМФК и ПК-А было описано в гипоталамической клеточной линии [32] и АМФК-опосредованном CREB, на нескольких клеточных линиях [32, 33] было описано сигнальное взаимодействие между АМФК и ПК-А нисходящем факторе транскрипции сигнального пути сАМФ/ПК-А. Утверждается, что активация АМФК имеет решающее значение в протективном эффекте МФ на ДОКС-индуцированную кардиотоксичность [34].

Вопрос, отвечает ли МФ-индуцированное изменение метаболизма за выживаемость кардиомиоцитов, остается открытым. ДОКС вызывал систолическую дисфункцию и увеличение полости левого желудочка у крыс. МФ в свою очередь оказал протективный эффект на дисфункцию левого желудочка, вызванную ДОКС [35].

Кроме того, ДОКС вызывал морфологические изменения в миокарде, а МФ защищал ткань сердца от этих изменений. Chen et al. [36] сообщили, что лечение крыс ДОКС приводило к

увеличению диаметра конечной диастолы левого желудочка и диаметра конечной систолы левого желудочка.

В опытах *in vitro* применение более низких концентраций (0,1 мкмоль) МФ оказывало защитный эффект от ДОКС-индуцированной токсичности на кардиомиоциты, тогда как более высокая концентрация (1,0 мкмоль) МФ не показала положительных результатов, несмотря на то, что его высокая концентрация приводила к повышению множества параметров, в том числе концентрации АМФК. Защитный эффект низкой дозы МФ отменяется антагонистом PDGFR. На данный момент можно утверждать только то, что сигнализация PDGFR играет важную роль в механизме МФ-опосредованной защиты от ДОКС-индуцированной токсичности. Кроме того, более высокие его концентрации показали похожее воздействие на АФК и уровень  $[Ca^{2+}]_i$  (повышения концентрации свободных ионов кальция) в кардиомиоцитах, подвергнувшихся воздействию ДОКС. Чрезмерная активность АМФК в клетках, обработанных 1,0 мкмоль концентрацией МФ, может подавлять экспрессию PDGFR. Ослабленный сигналинг PDGFR может быть фактором, полностью блокирующим протективный эффект МФ на АФК в клетках и уровень  $[Ca^{2+}]_i$ . В то же время повышенная активность PDGFR в клетках, обработанных более низкой концентрацией МФ, может преодолеть ДОКС-индуцированную кардиотоксичность и поддержать жизнеспособность клеток. Однако эта гипотеза все еще нуждается в доказательствах [31].

В исследованиях на мышах было показано, что ДОКС вызывает серьезные биохимические и молекулярные изменения, которые были полностью предотвращены терапией МФ. В этом же исследовании было показано, что уровень глутатиона в сердечной ткани значительно снижался при терапии ДОКС, что согласуется с результатами Aleisa et al. [37]. Примечательно, что снижение уровня глутатиона было полностью невелировано МФ.

ДОКС индуцирует экспрессию гена HO-1, фермента, лимитирующего скорость деградации гема и стресс-чувствительного белка, реагирующего на снижение уровня глутатиона в различных клетках и тканях [38]. МФ, самостоятельно или в сочетании с ДОКС, уменьшал экспрессию HO-1. Это может быть связано с тем, что сам МФ обладает высокой антиоксидантной активностью. Значительное повышение уровня глутатиона и экспрессии мРНК CAT и NQO-1 в сердечной ткани животных после терапии МФ подтверждает предположение, что МФ оказывает репаративный эффект на ДОКС-индуцированный оксидативный стресс

[39]. Эти результаты расширили сделанные ранее наблюдения, подтверждавшие существенное повышение уровня глутатиона у здоровых крыс и защиту от ДОКС-индуцированного снижения глутатиона [37]. Asensio-López et al. [30] проиллюстрировали, что МФ оказывает протективный эффект при ДОКС-индуцированной кардиотоксичности за счет вовлечения и восстановления активности антиоксидантных ферментов.

### Заключение

Обзор публикаций показал, что терапия доксорубицином приводит к возникновению у человека кардиотоксичности, сопровождающейся выделением высоких концентраций окислителей, таких как АФК и железо, приводящих к некрозу клеток с последующим за ним повреждающим воздействием не только на сердце и кровеносные сосуды, но и на соседние с очагами некроза клетки и ткани. Для больных, получавших лечение доксорубицином, также характерны нефропатия и анорексия, стоматиты и эзофагиты, что создает лишние трудности для корректной работы иммунной системы и тем самым повышает риск возникновения осложнений. Однако, доксорубин остается одним из наиболее сильнодействующих противоопухолевых препаратов, поэтому исключить его из химиотерапии не представляется возможным в силу отсутствия эффективной замены. Первостепенной задачей представляется нахождение способов максимально нейтрализовать кардиотоксическое действие доксорубина, главным препятствием которому является недостаток знаний о механизме действия препарата. Метформин представляется весьма эффективным кандидатом для подавления доксорубин индуцированной кардиотоксичности. Но недостаток знаний о механизме действия обоих препаратов, а также малое количество исследований на тему их сочетанного применения в химиотерапии онкобольных, в особенности, полное отсутствие таких исследований на территории России, подтверждает актуальность проблемы и необходимость проведения дальнейших исследований этой темы.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Ajzashokouhi A., Bostan H., Jomezadeh V. et al. A review on the cardioprotective mechanisms of metformin against doxorubicin. *Hum Exp Toxicol.* 2019;39(3). doi:10.1177/0960327119888277.
2. Gewirtz D. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology.* 1999 Apr;57(7):727-41. [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-2952\(98\)00307-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-2952(98)00307-4).

3. Lipshultz S.E., Colan S.D., Gelber R.D. et al. Late Cardiac Effects of Doxorubicin Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia in Childhood. *N. Eng. J. Med.* 1991 Mar 21;324(12):808–15. <http://dx.doi.org/10.1056/nejm199103213241205>.
4. Wang Y., Zhu S., Liu H. et al. Thyroxine Alleviates Energy Failure, Prevents Myocardial Cell Apoptosis, and Protects against Doxorubicin-Induced Cardiac Injury and Cardiac Dysfunction via the LKB1/AMPK/mTOR Axis in Mice. *Dis Markers.* 2019;2019:1–10. doi:10.1155/2019/7420196.
5. Ichikawa Y., Ghanefar M., Bayeva M. et al. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *J. Clin. Investig.* 2014 Jan 2;124(2):617–30. <http://dx.doi.org/10.1172/jci72931>.
6. Suliman H.B., Carraway M.S., Ali A.S. et al. The CO/HO system reverses inhibition of mitochondrial biogenesis and prevents murine doxorubicin cardiomyopathy. *J. Clin. Investig.* 2007; 117(12):3730–41. <http://dx.doi.org/10.1172/jci32967>.
7. Singal P.K., Iliksovic N. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *N. Eng. J. Med.* 1998 Sep 24;339(13):900–5. <http://dx.doi.org/10.1056/nejm199809243391307>.
8. Kang Y.J., Chen Y., Epstein P.N. Suppression of Doxorubicin Cardiotoxicity by Overexpression of Catalase in the Heart of Transgenic Mice. *J. Biol. Chem.* 1996 May 24;271(21):12610–6. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.21.12610>.
9. Harake D., Franco V.I., Henkel J.M. et al. Cardiotoxicity in childhood cancer survivors: strategies for prevention and management. *Future Cardiol.* 2012 Jul;8(4):647–70. <http://dx.doi.org/10.2217/fca.12.44>.
10. Zweier J.L., Gianni L., Muindi J. et al. Differences in O<sub>2</sub> reduction by the iron complexes of adriamycin and daunomycin: the importance of the sidechain hydroxyl group. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — General Subjects.* 1986 Nov;884(2):326–36. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4165\(86\)90181-9](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4165(86)90181-9).
11. Tocchetti C.G., Carpi A., Coppola C. et al. Ranolazine protects from doxorubicin-induced oxidative stress and cardiac dysfunction. *EJHF.* 2014 Jan 6;16(4):358–66. <http://dx.doi.org/10.1002/ejhf.50>.
12. Bailey C.J. Antidiabetic Drugs other than Insulin. *Encyclopedia of Molecular Pharmacology.* 2008; 116–25. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-38918-7\\_109](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-38918-7_109).
13. Кравчук Е.Н., Галагудза М.М. Применение метформина при сочетании ишемической болезни сердца и сахарного диабета 2 типа: механизмы действия и клиническая эффективность. *Сахарный диабет.* 2013 Март 15;16(1): 5–14 [Kravchuk E.N., Galagudza M.M. Metformin in patients with ischemic heart disease and type 2 diabetes mellitus: mechanism of action and clinical efficiency. *Diabetes mellitus.* 2013 Mar 15;16(1):5–14. <http://dx.doi.org/10.14341/2072-0351-3590> (In Russ.)].
14. Patel R., Shah G. Effect of metformin on clinical, metabolic and endocrine outcomes in women with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Current Medical Research and Opinion.* 2017 Feb 3;33(9):1545–57. <http://dx.doi.org/10.1080/03007995.2017.1279597>.
15. WHO releases new edition of Model List of Essential Medicines. *PharmacoEconomics & Outcomes News.* 2015 May;728(1):8–8. <http://dx.doi.org/10.1007/s40274-015-2128-4>.
16. Kim Y.D., Park K-G., Lee Y-S. et al. Metformin Inhibits Hepatic Gluconeogenesis Through AMP-Activated Protein Kinase-Dependent Regulation of the Orphan Nuclear Receptor SHP. *Diabetes.* 2007 Oct 1;57(2):306–14. <http://dx.doi.org/10.2337/db07-0381>.
17. Liu B., Fan Z., Edgerton S.M. et al. Potent anti-proliferative effects of metformin on trastuzumab-resistant breast cancer cells via inhibition of erbB2/IGF-1 receptor interactions. *Cell Cycle.* 2011 Sep;10(17):2959–66. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.10.17.16359>.
18. Bridges H.R., Jones A.J.Y., Pollak M.N. et al. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochemical Journal.* 2014 Aug 22;462(3):475–87. <http://dx.doi.org/10.1042/bj20140620>.
19. Duca F.A., Côté C.D., Rasmussen B.A. et al. Metformin activates a duodenal Ampk-dependent pathway to lower hepatic glucose production in rats. *Nature Medicine.* 2015 Apr 6;21(5):506–11. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3787>.
20. Pérez-Revuelta B.I., Hettich M.M., Ciociaro A. et al. Metformin lowers Ser-129 phosphorylated  $\alpha$ -synuclein levels via mTOR-dependent protein phosphatase 2A activation. *Cell Death & Disease.* 2014 May;5(5):e1209–e1209. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2014.175>.
21. Song Y.M., Lee Y., Kim J-W. et al. Metformin alleviates hepatosteatosis by restoring SIRT1-mediated autophagy induction via an AMP-activated protein kinase-independent pathway. *Autophagy.* 2014 Nov 14;11(1):46–59. <http://dx.doi.org/10.4161/15548627.2014.984271>.
22. Xu T., Brandmaier S., Messias A.C. et al. Effects of Metformin on Metabolite Profiles and LDL Cholesterol in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2015 Aug 5;38(10):1858–67. <http://dx.doi.org/10.2337/dc15-0658>.
23. Zhou L., Liu H., Wen X. et al. Effects of metformin on blood pressure in nondiabetic patients. *Journal of Hypertension.* 2017 Jan;35(1):18–26. <http://dx.doi.org/10.1097/hjh.0000000000001119>.
24. Thomopoulos C., Katsimaglis G., Makris T. Metformin and blood pressure lowering. *Journal of Hypertension.* 2017 Jan;35(1):27–8. <http://dx.doi.org/10.1097/hjh.0000000000001146>.
25. Wan X., Huo Y., Johns M. et al. 5'-AMP-Activated Protein Kinase-Activating Transcription Factor 1 Cascade Modulates Human Monocyte-Derived Macrophages to Atheroprotective Functions in Response to Heme or Metformin. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2013 Nov;33(11):2470–80. <http://dx.doi.org/10.1161/atvbaha.113.300986>.
26. Morales D.R., Morris A.D. Metformin in Cancer Treatment and Prevention. *Annual Review of Medicine.* 2015 Jan 14;66(1):17–29. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-med-062613-093128>.
27. Draznin B. Mechanism of the mitogenic influence of hyperinsulinemia. *Diabetology & Metabolic Syndrome.* 2011 Jun 13;3(1). <http://dx.doi.org/10.1186/1758-5996-3-10>.
28. Ding X-Z., Fehsenfeld D.M., Murphy L.O. et al. Physiological Concentrations of Insulin Augment Pancreatic Cancer Cell Proliferation and Glucose Utilization By Activating MAP Kinase, PI3 Kinase and Enhancing GLUT-1 Expression. *Pancreas.* 2000 Oct;21(3):310–20. <http://dx.doi.org/10.1097/00006676-200010000-00014>.
29. Kourelis T.V., Siegel R.D. Metformin and cancer: new applications for an old drug. *Medical Oncology.* 2011 Feb 8;29(2):1314–27. <http://dx.doi.org/10.1007/s12032-011-9846-7>.
30. Timm K., Tyler D. The Role of AMPK Activation for Cardioprotection in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Car-*

- diovasc Drugs Ther. 2020;34(2):255-269. doi:10.1007/s10557-020-06941-x.
31. Yousuf Y., Datu A., Barnes B. et al. Metformin alleviates muscle wasting post-thermal injury by increasing Pax7-positive muscle progenitor cells. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1). doi:10.1186/s13287-019-1480-x.
  32. Damm E., Buech T.R.H., Gudermann T. et al. Melanocortin-Induced PKA Activation Inhibits AMPK Activity Via ERK-1/2 and LKB-1 in Hypothalamic GT1-7 Cells. *Molecular Endocrinology.* 2012 Apr 1;26(4):643–54. <http://dx.doi.org/10.1210/me.2011-1218>.
  33. Pan Q.R., Li W.H., Wang H. et al. Glucose, Metformin, and AICAR Regulate the Expression of G Protein-coupled Receptor Members in INS-1  $\beta$  Cell. *Hormone and Metabolic Research.* 2009 Aug 11;41(11):799–804. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0029-1234043>.
  34. Yano N., Suzuki D., Endoh M. et al.  $\beta$ -Adrenergic Receptor Mediated Protection against Doxorubicin-Induced Apoptosis in Cardiomyocytes: The Impact of High Ambient Glucose. *Endocrinology.* 2008 Dec;149(12):6449–61. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2008-0292>.
  35. Tseng Y-T. Cardioprotective effect of metformin against doxorubicin cardiotoxicity in rats. *Anatol. J. Cardiol.* 2016. <http://dx.doi.org/10.14744/anatoljcardiol.2016.18505>.
  36. Chen X., Chen Y., Bi Y. et al. Preventive Cardioprotection of Erythropoietin Against Doxorubicin-induced Cardiomyopathy. *Cardiovascular Drugs and Therapy.* 2007 Oct 9;21(5):367–74. <http://dx.doi.org/10.1007/s10557-007-6052-0>.
  37. Aleisa A.M., Al-Rejaie S.S., Bakheet S.A. et al. Effect of metformin on clastogenic and biochemical changes induced by adriamycin in Swiss albino mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 2007 Dec;634(1-2):93–100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.06.005>.
  38. Ryter S.W., Tyrrell R.M. The Role of Heme Oxygenase-1 in the Mammalian Stress Response: Molecular Aspects of Regulation and Function. *Oxidative Stress and Signal Transduction.* 1997;343–86. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-5981-8\\_15](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-5981-8_15).
  39. Iida K., Itoh K., Kumagai Y. et al. 767: NRF2 is Essential for the Chemopreventive Efficacy of Oltipraz Against Urinary Bladder Carcinogenesis. *Journal of Urology.* 2005 Apr;173(4S):208–208. [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347\(18\)34936-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347(18)34936-x).

*S.V. Ionov<sup>1</sup>, V.S. Orlova<sup>1</sup>, N.Yu. Kulbachevskaya<sup>2</sup>*

### **Effect of metformin on doxorubicin-induced cardiotoxicity in experiment**

<sup>1</sup>Peoples' Friendship University of Russia, Moscow,  
<sup>2</sup>N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow

The article provides an overview of the currently known descriptions of the mechanisms and toxic effects of two drugs: doxorubicin, a first-line drug for the treatment of cancer, and the mechanisms of action of Metformin, a drug widely used for the treatment of diabetes mellitus 2. The review made with the usage of NCBI, PubMed and Oxford Academic presents the analysis of published data on the protective effect of Metformin in its combined use with doxorubicin in an experiment in an attempt to reduce the manifestations of doxorubicin-induced cardiotoxicity.

Key words: doxorubicin, metformin, cardiotoxicity, oxidative stress, reactive oxygen species

Поступила в редакцию 17.12.2019 г.

*А.М. Карачун<sup>1,2</sup>, Д.В. Самсонов<sup>1,3</sup>*

## Хирургическая тактика при «почти полном» ответе рака прямой кишки на неоадьювантную терапию: тотальная мезоректумэктомия или локальное иссечение?

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург,<sup>2</sup>ФГБОУВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург,<sup>3</sup>ФГБОУВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург

Успехи неоадьювантной терапии местнораспространенного рака прямой кишки, способной порой добиться значительного регресса опухоли, позволяют предполагать, что выполнение тотальной мезоректумэктомии у отдельных категорий таких пациентов может оказаться избыточным. Бурное развитие малоинвазивных хирургических технологий, призванных ограничить травматизм вмешательства, снизить риск послеоперационных осложнений, улучшить качество жизни и увеличить долю сфинктеросохраняющих операций, инициировало ряд исследований, изучающих результаты локального иссечения облученных опухолей рака прямой кишки. В настоящей обзорной статье рассмотрены опубликованные итоги подобных исследований, проблемы и перспективы данной хирургической стратегии. Поиск научной литературы осуществлялся по базе данных PubMed.

**Ключевые слова:** обзор; рак прямой кишки; комбинированное лечение; химиолучевая терапия; постлучевой регресс опухоли; хирургическое лечение; локальное иссечение

### Введение

Лечение больных раком прямой кишки (РПК) продолжает оставаться актуальной задачей для современной онкологии. В 2018 г. в структуре заболеваемости населения России злокачественными новообразованиями указанная локализация оставалась одной из ведущих, занимая седьмую позицию с удельным весом в 5,0%. За истекшие десять лет в нашей стране прирост заболеваемости данной нозологией достиг 22,72%, в структуре смертности от онкологических заболеваний доля РПК в 2018 г. составила 5,5% [1].

В последние два десятилетия комбинированная терапия местнораспространенного РПК получила широкое признание, приняв характер стандартной лечебной тактики для данной категории пациентов, и рекомендована руковод-

ствами ведущих онкологических организаций в разных странах. Стандартизованы предоперационные и патоморфологические методики оценки ответа опухоли на неоадьювантную терапию.

Успешное внедрение в практику концепции «наблюдения и ожидания» при полном клиническом ответе опухоли на облучение продемонстрировало возможность ограничения хирургической агрессии в отношении больных местнораспространенным РПК-.

### Обсуждение

Конечно, когда ответ на неоадьювантную терапию «почти полный», все возможные варианты лечебной стратегии не ограничивают локальным иссечением и тотальной мезоректумэктомией (ТМЭ). И немало специалистов в такой ситуации предложат «ещё немного подождать». Сколько — этот вопрос остаётся открытым, т.к. оптимальные сроки для оценки регресса РПК после проведённой терапии окончательно не определены. Так, в современных руководствах рекомендуемые сроки хирургического лечения после завершения курса предоперационного облучения колеблются в довольно широком диапазоне — от 4 до 12 недель (табл. 1).

**Таблица 1. Рекомендуемые сроки хирургического лечения после завершения химиолучевой терапии**

Организация, год представления рекомендаций	Предлагаемые сроки, недель
National Comprehensive Cancer Network (NCCN), 2020	5-12
European Society for Medical Oncology (ESMO), 2017	4-12
Chinese Society of Clinical Oncology (CSCO), 2018	5-12
Минздрав РФ, 2020	7-12

Надо также признать, что на предоперационном этапе порой довольно сложно дифференцировать полный и «почти полный» клинический регресс опухоли. Такая задача требует тесного взаимодействия мультидисциплинарной

Таблица 2. Результаты нерандомизированных проспективных исследований

	Количество пациентов	Категория пациентов	Вид облучения	Срок ожидания	Доля урТ0-1	Частота осложнений после локального иссечения	Средний срок наблюдения	Частота местного рецидива после локального иссечения
Bujko K. et al.	44	cT1-3N0	CRT либо SCRT	6 нед.	70,0%	30,2%	14 мес.	7%
CARTS	47	cT1-3N0	CRT	6-8 нед.	63,8%	27,7%	53 мес.	8,5%
Pucciarelli S. et al.	63	cT2-3N0-1	CRT	5 нед.	72,9%	26,9%	36 мес.	0%
Smart C. J. et al.	62	cT1-2N0	SCRT	8-10 нед.	69,4%	30,6%	13 мес.	6,5%
ACOSOG Z6041	72	cT2N0	CRT	4-8 нед.	68,1%	16,7%	56 мес.	4,2%

Примечание: CRT (chemoradiotherapy) — химиолучевая терапия; SCRT (short course radiation therapy) — краткосрочная крупнофракционная лучевая терапия

команды, включающей специалиста по МРТ-диагностике, эндоскописта и онколога.

Все же, когда допустимые сроки ожидания исчерпаны, а полный клинический ответ не достигнут, требуется хирургическое вмешательство. ТМЭ в настоящее время является стандартной процедурой в такой ситуации, и современные клинические рекомендации не предполагают иного варианта хирургического лечения после неoadьювантной терапии. Правда, руководство ESMO оговаривает возможность трансанальной эндоскопической микрохирургии (ТЭМ) при опухолях верхне- и среднеампулярного отделов прямой кишки cT1-T3bN0 в случаях, когда выполнение полостного вмешательства сопряжено с высокими рисками осложнений, обусловленных тяжёлой сопутствующей соматической патологией, после обсуждения этого вопроса с пациентом. Но неoadьювантная терапия в таких случаях не предусмотрена.

В современной онкологии после периода активного внедрения обширных расширенных и комбинированных вмешательств отмечается тенденция к интенсивному использованию малоинвазивных и органосохраняющих технологий, при условии их онкологической адекватности и безопасности [2, 3]. Большое значение придаётся оптимизации качества жизни пациентов после проведенного лечения, возможности избежать постоянной или временной стомы, урогенитальных нарушений, синдрома низкой передней резекции прямой резекции. Кроме того, менее травматичное воздействие призвано избежать серьёзных осложнений вмешательства, ускорить реабилитацию в послеоперационном периоде, что имеет важное медико-экономическое значение. И технологии трансанального эндоскопического удаления опухолей прямой кишки стали стандартом для больных ранним раком cT1N0 в отсутствие оговариваемых руководствами морфологических факторов неблагоприятного прогноза.

Расчет на то, что предоперационная лучевая/химиолучевая терапия может значительно снизить стадию заболевания при РПК, обеспечив

полный регресс предполагаемых метастатических изменений в регионарном лимфатическом аппарате органа, побудили ряд зарубежных специалистов инициировать исследования, целью которых является изучение возможности выполнения органосохраняющих операций у пациентов в ситуациях, когда полный клинический ответ не достигнут.

В 2012 г. итальянскими авторами [4] опубликованы результаты одноцентрового проспективного рандомизированного исследования NCT01609504. В группы ТЭМ и ТМЭ были включены по 50 больных раком прямой кишки cT2N0M0 с G1-2 дифференцировкой опухоли и её протяжённостью менее 3 см, прошедшие пролонгированный курс неoadьювантной химиолучевой терапии. В группе ТЭМ продолжительность вмешательства, интраоперационная кровопотеря и длительность госпитализации оказались значительно меньшими. Статистически значимых различий между группами в частоте лёгких и тяжёлых послеоперационных осложнений продемонстрировано не было, послеоперационная летальность не наблюдалась. При наличии опухоли урТ $\geq$ 2 после локального иссечения больным рекомендовалось выполнение ТМЭ. В ходе последующего наблюдения, средний срок которого достиг 9,6 лет, частота местного рецидива в группе ТЭМ составила 6%, в группе ТМЭ — 4%, что не являлось статистически значимым различием. Частота отдалённого метастазирования в обеих группах равнялась 4%. Достоверных различий в общей и безрецидивной выживаемости авторы не отметили.

Кроме того, были опубликованы результаты нескольких многоцентровых проспективных исследований (табл. 2). Последние характеризовались отсутствием групп сравнения, малым количеством включенных пациентов, отдельные работы — небольшими сроками наблюдения.

Так, в польском исследовании [5] облучению подвергались пациенты с опухолями прямой кишки протяжённостью менее 4 см, стадированные как cT1-3N0M0. Через 6 недель после

завершения лучевой терапии производилось локальное иссечение опухоли. В случаях рака урТ2-3 или положительного края резекции больные должны были быть подвергнуты ТМЭ, что, по сообщению авторов, оказалось показанным только 34% пациентов. Частота местного рецидива после локального иссечения при среднем сроке наблюдения в 14 мес. составила 7%.

Аналогичным оказался дизайн многоцентрового проспективного исследования CARTS (Нидерланды) [6, 7]. Доля пациентов урТ0-1 достигла 63,8%. Частота послеоперационных осложнений I-IIIb степеней после локального иссечения составила 27,7%. В течение среднего срока наблюдения в 53 мес. в подгруппе больных урТ0-1 частота местного рецидива не превысила 8,5%. Кроме того, местный рецидив развился у трёх из девяти пациентов урТ2, отказавшихся от последующей ТМЭ. Актуриальные 5-летние безрецидивная и общая выживаемость составили 81,6% и 82,8% соответственно.

В другом итальянском исследовании [8] опухоли сТ2-3ТN0-1 подверглись химиолучевой терапии с последующим локальным иссечением. В соответствии с дизайном исследования, опухоли урТ0-1 не требовали последующей ТМЭ (доля таких пациентов составила 72,9%). В указанной группе 3-летние общая выживаемость, безрецидивная выживаемость и выживаемость без местного рецидива составили 91,5%, 91,0% и 96,9% соответственно.

В многоцентровом британском исследовании [9] пациенты с опухолями сТ1-2N0 подвергались краткосрочной крупнофракционной лучевой терапии с последующим (через 8-10 недель) локальным иссечением. При этом выполнение ТМЭ пациентам урТ $\geq$ 2 протоколом исследования не предусматривалось. Частота послеоперационных осложнений достигла 30,6%. При среднем периоде наблюдения в 13 мес. частота местного рецидива составила 6,5% (отмечен лишь у пациентов категории урТ2).

Американское многоцентровое нерандомизированное исследование ACOSOG Z6041 [10] изучило отдалённые результаты локального иссечения опухолей прямой кишки сТ2N0, подвергшихся предоперационной химиолучевой терапии. 3-летняя безрецидивная выживаемость составила 86,9% и оказалась ниже, чем прогнозировали авторы, которые предложили рассматривать локальное иссечение после облучения лишь как альтернативу для категорий пациентов, имеющих противопоказания к ТМЭ или отказывающихся от неё.

Особое внимание привлекли к себе результаты французского проспективного рандомизированного многоцентрового исследования GRECCAR 2 [11, 12]. В исследование были включены 186

больных раком средне- и нижеампулярного отделов прямой кишки сТ2-3N0-1. Протяжённость опухоли не должна была превышать 4 см. Количество подозрительных на метастатическое поражение лимфатических узлов размерами  $\leq$  8 мм должно было быть менее трёх. Через 8 недель из 145 пациентов, имевших хороший ответ на неoadъювантную терапию (протяжённость опухоли уменьшилась до  $\leq$  2 см), 74 были рандомизированы для локального иссечения, 71 — для ТМЭ. После локального иссечения в течение 1-4 недель предусматривалось выполнение ТМЭ в случаях R1 иссечения и/или опухолей урТ2-3. Из подвергнувшихся локальному иссечению больных 35% в дальнейшем выполнена ТМЭ. В целом, после операции опухоли стадированы как урТ0-1 в 61% случаев. Из 28 больных, подвергшихся ТМЭ после локального иссечения, двое (7,1%) имели регионарные метастазы. Частота послеоперационных осложнений III-IV степеней (Clavien-Dindo) после локального иссечения составила 6%, после ТМЭ — 10%. Авторам не удалось продемонстрировать значимого превосходства локального иссечения над первично выполненной ТМЭ в отношении непосредственных результатов хирургического лечения, что они объяснили большой долей произведённых ТМЭ после локального иссечения, данное обстоятельство могло нивелировать достигнутые преимущества. 5-летнее наблюдение за больными не продемонстрировало значимых различий между группами локального иссечения и ТМЭ: частота местного рецидива составила 7% против 7%, соответственно, частота отдалённого метастазирования — 18% против 19%, общая выживаемость — 84% против 82%, безрецидивная выживаемость — 70% против 72%.

### Заключение

Таким образом, отказ от ТМЭ в пользу местного иссечения после неoadъювантной лучевой терапии требует тщательного отбора пациентов. Локальное иссечение небольших опухолей прямой кишки урТ0-1 демонстрирует удовлетворительные непосредственные и отдалённые результаты лечения, а описанную стратегию для данной категории пациентов можно признать вполне оправданной и безопасной.

Гипотезу о том, что такая же тактика допустима в отношении пациентов урТ2/N0, призвано проверить исследование GRECCAR 12 [13], которое также стремится оптимизировать неoadъювантную терапию применением индукционной или консолидирующей химиотерапии.

Дополнительной оценки требуют риски, связанные с такими неблагоприятными факторами прогноза, как низкая дифференцировка опухоли,

лимфоваскулярная инвазия, высокая степень инвазивного фронта опухоли (tumor-budding). Последующие исследования должны четко определить ту категорию больных РПК, в отношении которой локальное иссечение перенесшей неoadъювантную терапию опухоли окажется онкологически адекватным и безопасным вмешательством.

*Конфликт интересов.* Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

*Финансирование.* Исследование не имело спонсорской поддержки.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. — М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. 2019. [Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2018 godu (zabolevaemost i smertnost). Ed by Kaprin A.D., Starinskii V.V., Petrova G.V. Moscow: P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Center — branch of FSBI NMRRC of the Ministry of Health of Russia; 2019 (In Russ)].
2. Беляев А.М., Карачун А.М., Петров А.С., Самсонов Д.В. Современные тенденции развития хирургии опухолей желудочно-кишечного тракта. Вопросы онкологии. 2016; 62(2):187-195 [Belyaev A.M., Karachun A.M., Petrov A.S., Samsonov D.V. Modern trends in surgery of gastrointestinal tract tumors. Problems in oncology. 2016;62(2):187-195 (In Russ)]
3. Карачун А.М., Самсонов Д.В., Доманский А.А. и др. Малоинвазивная хирургия рака прямой кишки: проблемы и перспективы. Поволжский онкологический вестник. 2016;5 (27):76-82 [Karachun A.M., Samsonov D.V., Domanskiy A.A. et al. Minimally invasive surgery of rectal cancer: problems and prospects. Oncology bulletin of the Volga region. 2016;5(27):76-82 (In Russ)].
4. Lezoche E., Baldarelli M., Lezoche G. et al. Randomized clinical trial of endoluminal locoregional resection versus laparoscopic total mesorectal excision for T2 rectal cancer after neoadjuvant therapy. B J Surg. 2012;99(9):1211-1218. doi: 10.1002/bjs.8821.
5. Bujko K., Richter P., Smith F.M. et al. Preoperative radiotherapy and local excision of rectal cancer with immediateradical re-operation for poor responders: a prospective multicentre study. Radiother Oncol. 2009;92(2):195-201. doi: 10.1016/j.radonc.2012.12.005.
6. Verseveld M., de Graaf E.J.R., Verhoef C. et al. Chemoradiation therapy for rectal cancer in the distal rectum followed by organ-sparing transanal endoscopic microsurgery (CARTS study). B J Surg. 2015;102(7):853-860. doi: 10.1002/bjs.9809.
7. Stijns R.C.H., de Graaf E.J.R., Punt C. et al. Long-term oncological and functional outcomes of chemoradiotherapy followed by organ-sparing transanal endoscopic microsurgery for distal rectal cancer: the CARTS study. JAMA Surg. 2019;154(1):47-54. doi: 10.1001/jamasurg.2018.3752.
8. Pucciarelli S., De Paoli A., Guerrieri M. et al. Local Excision After Preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. Dis Colon Rectum. 2013;56(12):1349-1356. doi:10.1097/dcr.0b013e3182a2303e.
9. Smart C.J., Korsgen S., Hill J. et al. Multicentre study of short-course radiotherapy and transanal endoscopic microsurgery for early rectal cancer. B J Surg. 2016;103(8): 1069-1075. doi:10.1002/bjs.10171.
10. Garcia-Aguilar J, Renfro LA, Chow OS et al. Organ preservation for clinical T2N0 distal rectal cancer using neoadjuvant chemoradiotherapy and local excision (ACOSOG Z6041): results of an open-label, single-arm, multi-institutional, phase 2 trial. Lancet Oncol. 2015;16(15):1537-1546. doi:10.1016/s1470-2045(15)00215-6.
11. Rullier E., Rouanet P., Tuech J-J. et al. Organ preservation for rectal cancer (GRECCAR 2): a prospective, randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. Lancet. 2017;390(10093):469-479. doi:10.1016/s0140-6736(17)31056-5.
12. Rullier E., Vendrely V., Asselineau J. et al. Organ preservation with chemoradiotherapy plus local excision for rectal cancer: 5-year results of the GRECCAR 2 randomised trial. Lancet Gastroenterol Hepatol. 2020;5(5): 465-474. doi: 10.1016/S2468-1253(19)30410-8.
13. Smith J.J., Chow O.S., Gollub M.J. et al. Organ preservation in rectal adenocarcinoma: a phase II randomized controlled trial evaluating 3-year disease-free survival in patients with locally advanced rectal cancer treated with chemoradiation plus induction or consolidation chemotherapy, and total mesorectal excision or nonoperative management. BMC Cancer. 2015;15(1):767 doi:10.1186/s12885-015-1632-z.

Поступила в редакцию 18.11.2020 г.

*A.M. Karachun<sup>1,2</sup>, D.V. Samsonov<sup>1,3</sup>*

#### **Surgical tactics for «near-complete» rectal cancer response to neoadjuvant therapy: total mesorectumectomy or local excision?**

<sup>1</sup>N.N.Petrov National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg,

<sup>2</sup>I.I. Mechnikov North-Western State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg,

<sup>3</sup>S.M. Kirov Military Medical Academy of the Ministry of Defense of the Russian Federation, St. Petersburg

The successes of neoadjuvant therapy for locally advanced rectal cancer, which can sometimes achieve significant tumor regression, suggests that the performance of total mesorectumectomy in certain categories of such patients may be excessive. The rapid development of minimally invasive surgical technologies designed to limit the trauma due to the intervention, reduce the risk of postoperative complications, improve the quality of life and increase the proportion of sphincter-preserving operations, initiated several studies investigating the results of local excision of irradiated tumors of rectal cancer. This review article considers the published results of such studies, the problems, and prospects of this surgical strategy. The search of scientific literature was carried out using the PubMed database.

Key words: review; rectal cancer; combination therapy; chemoradiotherapy; post-radiation tumor regression; therapeutic pathomorphosis; surgical treatment; local excision

*В.М. Мерабишвили*

## Аналитические показатели. Погодичная летальность больных злокачественными новообразованиями на каждом году наблюдения

Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Погодичная летальность (ПЛ) — летальность контингентов больных злокачественными новообразованиями (ЗНО) на каждом году наблюдения, — показатель, определяющий особенности риска гибели заболевших, в зависимости от локализаций опухолей.

Летальность больных на первом году наблюдения включает посмертно учтенных больных ЗНО, и является критерием обратным к показателю однолетней наблюдаемой выживаемости. В последующие годы исчисления ПЛ исчисляется без посмертно учтенных больных. Важно отметить, что расчет показателей погодичной летальности осуществляется только к числу больных, умерших от ЗНО. Необходимо на каждом году наблюдения исключить больных, выбывших из-под наблюдения. Исчисление показателя ПЛ возможно только при наличии не менее 100 первично-учтенных больных.

В феврале 2019 г. нами сформирована база данных Популяционного ракового регистра (БД ПРР) Северо-Западного федерального округа Российской Федерации (СЗФО РФ), включающая более 1 млн больных (1211891 больных с учетом посмертно учтенных больных и 1 071 112 случаев без посмертно учтенных больных). В разработку были отобраны только надежные данные, число которых было практически на 10% меньше. В 2020 г. БД ПРР СЗФО РФ возросла на 73 054 случая ЗНО. Обновленную БД мы использовали в настоящем исследовании. Период наблюдения с 1994 по 2020 гг. Исследование ПЛ проведено в сумме по всем рубрикам МКБ-10 по классу новообразований С00-96.

Анализ БД показал, что в СЗФО РФ удельный вес посмертно учтенных больных снизился с 1995 по 2018 гг. оба пола) с 21,1 до 8,1%.

Для 1995–1999, 2000–2004 годов исчислена ПЛ на протяжении 10 лет наблюдения, период 2005–2009 охватил ПЛ в течение 7 лет наблюдения, 2005–2009 за 5 лет. Мы рассмотрели специфику ПЛ отдельно для мужчин и женщин, для лиц разных возрастных групп от 0–34, 35–59, 60 лет и старше.

Особое внимание нами уделено ПЛ для больных с локализованным (I и II стадия заболевания) и распространенным процессом (III и IV стадия, включая больных без указанной стадии заболевания, которую, как правило, по уровню выживаемости относятся к III и IV стадии заболевания).

**Ключевые слова:** злокачественные новообразования, погодичная летальность, пол, возраст, стадия заболевания

Показатель ПЛ раскрывает порядок гибели больных ЗНО на каждом году наблюдения. Далеко не во всех случаях его величина в последующие годы ниже предыдущей. Все зависит от локализации ЗНО и порядка распространения злокачественного процесса. Ранее эта методика нами использовалась при расчетах ПЛ на БД ПРР Санкт-Петербурга [1, 2].

В первом блоке диаграмм и сопровождающих их табличных материалов, рассмотрим специфику распределения ПЛ за 10 летний период с обобщением данных за 2000–2004 гг. Все материалы для разработки осуществлены на сводных материалах БД ПРР СЗФО РФ (С00-96) (рис. 1, табл. 1). Для проведения анализа ПЛ было отобрано 199 347 наблюдений, в том числе 89 390 больных ЗНО мужчин и 109 937 женщин. ПЛ на оба пола снизилась за 10 лет среди отобранной группы больных с 40,1 до 5,2%, среди мужского населения с 49,9 до 6,9%, среди женского с 32,0 до 4,5%.

В последующие периоды показатели ПЛ заметно снижались на всех периодах наблюдения. Летальность больных ЗНО на первом году наблюдения за период с 2015 — 2018 гг. снизилась на оба пола с 40,1%, среди мужского населения до 37,2%, среди женского до 23,8%, на оба пола летальность больных на первом году наблюдения составила 29,6%, что заметно больше данных официальной отчетности — 22,2% — 2018 г. [3].

Рассмотрим особенности ПЛ отдельно для мужского и женского населения по трем возрастным группам: до 35 лет, 35 — 59 и 60 лет и старше.

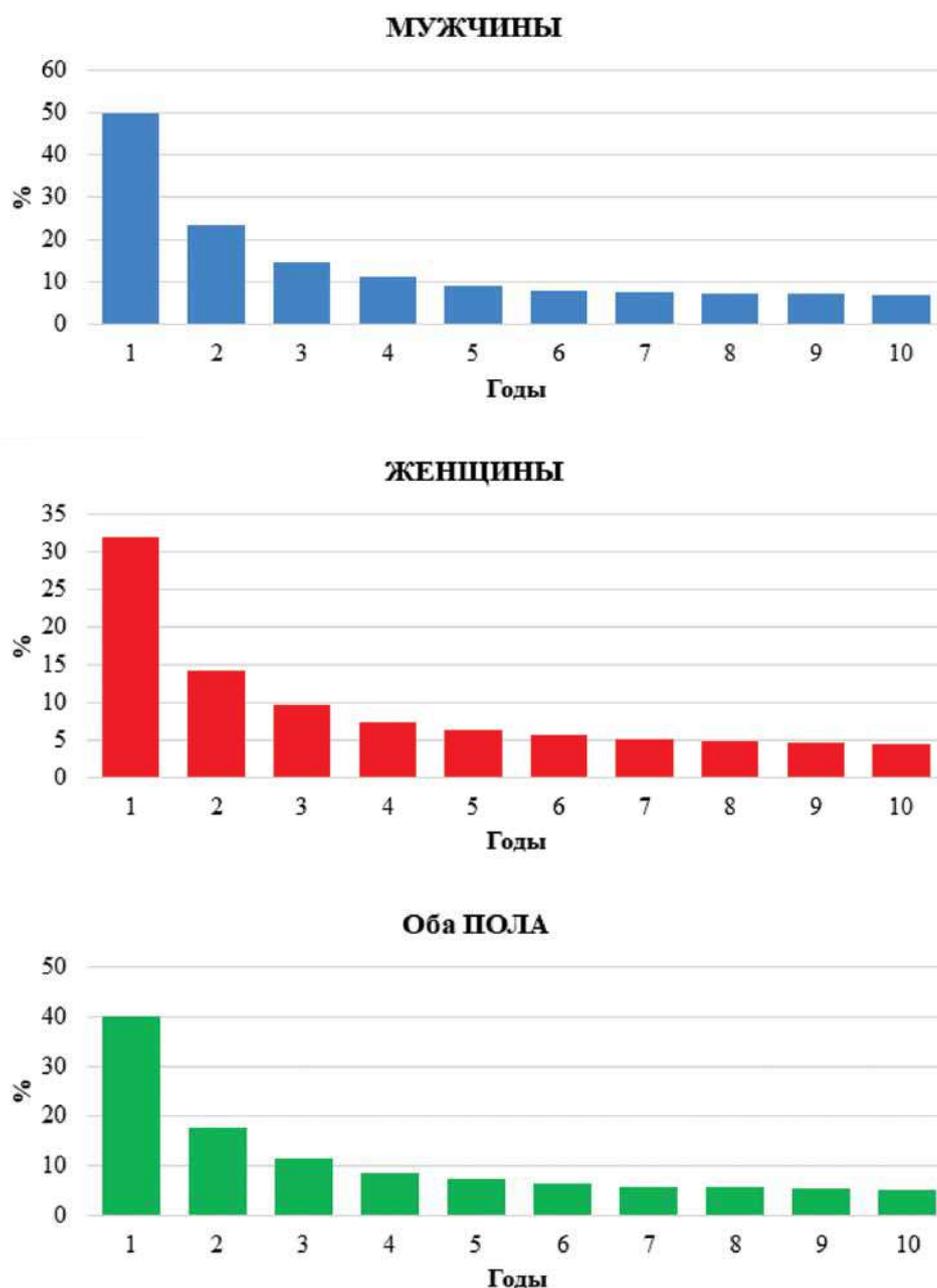


Рис. 1. Погодичная летальность больных ЗНО (С00–96) за 10 летний период в СЗФО РФ. БД ПРР СЗФО РФ (2000–2004 гг.)

**Таблица 1. Абсолютные числа и летальность больных ЗНО в СЗФО РФ на каждом году наблюдения (2000–2004). БД ПРР СЗФО РФ**

Период наблюдения	мужчины		женщины		оба пола	
	абс.число	летальность	абс.число	летальность	абс.число	летальность
1	89390	49,9	109957	32,0	199347	40,1
2	43007	23,6	71303	14,2	114310	17,7
3	32574	14,6	60805	9,7	93379	11,4
4	27607	11,3	54603	7,3	82210	8,7
5	24288	9,3	50292	6,2	74580	7,2
6	21723	8,0	46522	5,7	68245	6,4
7	18230	7,5	40076	5,1	58306	5,8
8	16593	7,3	37563	4,9	54156	5,6
9	15173	7,3	35286	4,7	50459	5,5
10	13897– 15,5%	6,9	33245– 30,2%	4,5	47142 — 23,6%	5,2

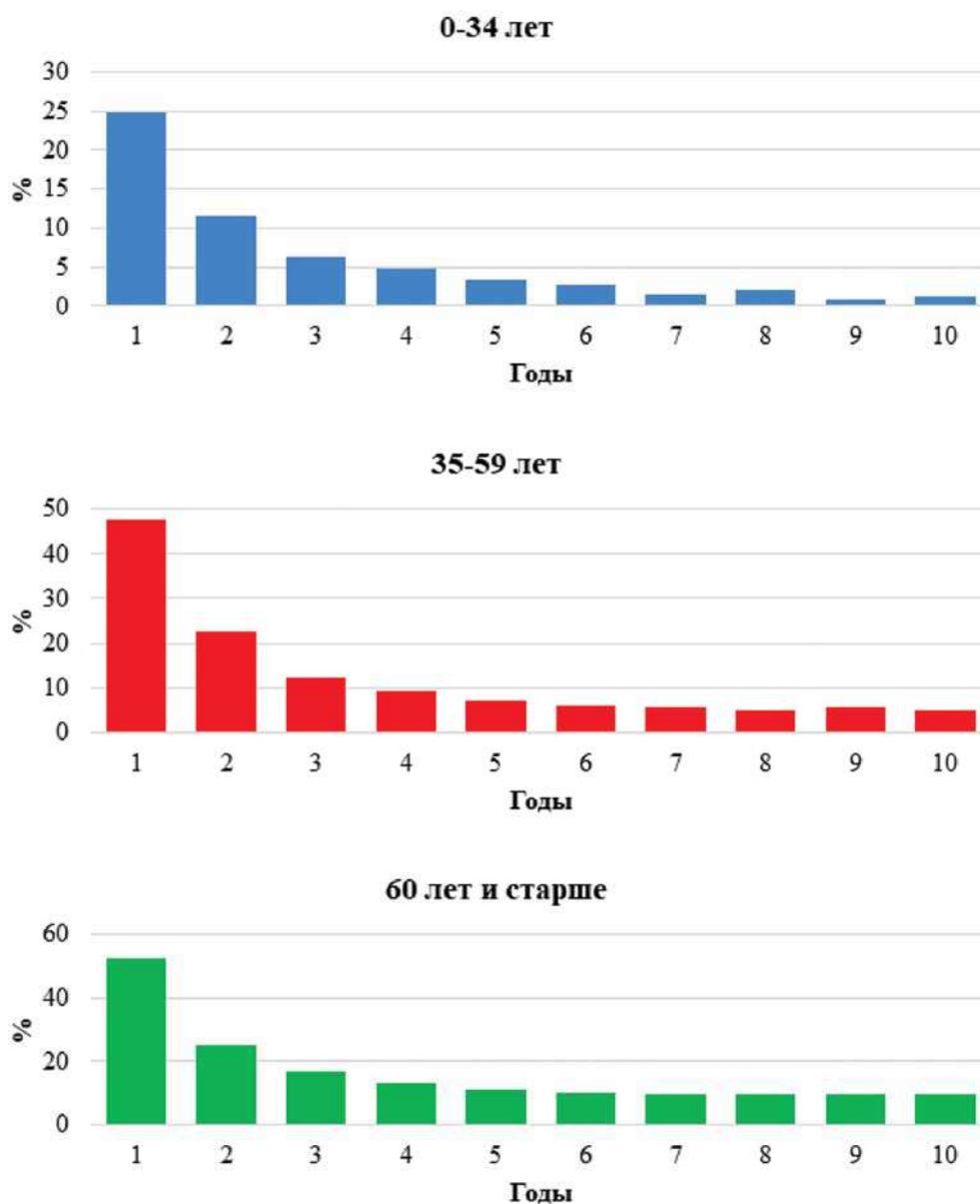


Рис. 2. Погодичная летальность больных ЗНО (С00 — 96) за 10летний период в СЗФО РФ среди мужского населения, различных повозрастных групп. БД ПРР СЗФО РФ (2000 — 2004 гг.)

Таблица 2. Абсолютные числа и летальность мужчин ЗНО в СЗФО РФ на каждом году наблюдения (2000–2004 гг.) с учетом возраста. БД ПРР СЗФО РФ

период наблюдения	0-34		35-59		60+	
	абс.число	летальность	абс.число	летальность	абс.число	летальность
1	2715	24,9	29618	47,5	57057	52,3
2	1921	11,5	14852	22,5	26234	25,1
3	1675	6,2	11399	12,2	19500	16,7
4	1557	4,9	9902	9,3	16148	13,2
5	1462	3,4	8907	7,2	13919	11,3
6	1401	2,8	8154	6,0	12168	10,0
7	1319	1,5	7068	5,6	9843	9,6
8	1287	2,0	6564	5,1	8742	9,7
9	1245	0,9	6143	5,5	7785	9,7
10	1209	1,2	5737	4,9	6951	9,5

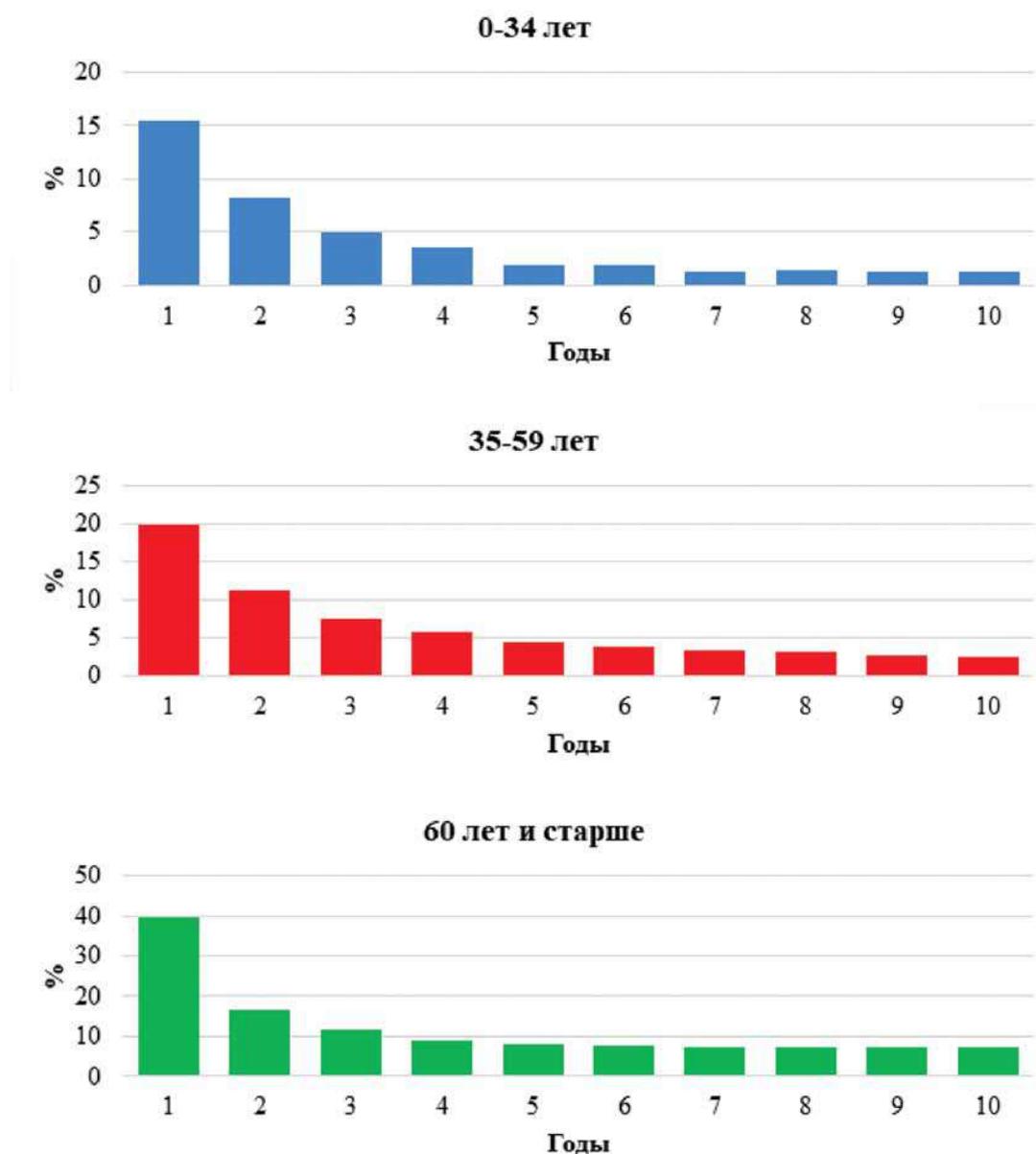


Рис. 3. Погодичная летальность больных ЗНО (C00 — 96) за 10-летний период наблюдения в СЗФО РФ среди женского населения, различных по возрастных групп. БД ПРР СЗФО РФ (2000 — 2004 гг.)

Таблица 3. Абсолютные числа и летальность женщин ЗНО в СЗФО РФ на каждом году наблюдения (2000–2004 гг.) с учетом возраста. БД ПРР СЗФО РФ

период наблюдения	0-34		35-59		60+	
	абс.число	летальность	абс.число	летальность	абс.число	летальность
1	3984	15,4	37738	20,0	68235	39,6
2	3147	8,2	28659	11,3	39497	16,8
3	2861	4,9	25262	7,6	32682	11,7
4	2697	3,6	23219	5,7	28687	8,9
5	2576	1,8	21755	4,5	25961	8,0
6	2498	1,9	20540	3,8	23484	7,8
7	2372	1,3	18667	3,4	19037	7,2
8	2320	1,4	17876	3,1	17367	7,3
9	2257	1,3	17139	2,8	15890	7,3
10	2206	1,2	16488	2,5	14551	7,2

В разных возрастных группах и у мужчин, и у женщин выявляются специфические особенности. Здесь все основные материалы мы рассмотрим на тех же данных за период 2000-2004 гг., по которым мы в состоянии проследить годовичную летальность на протяжении 10 лет наблюдения.

*Мужское население*

Было отобрано 2 715 мужчин в возрасте до 35 лет, что составило 3,0% от общего числа больных, 29 618 в возрасте 35-59 лет — 33,1% и 57 057 в возрасте 60 лет и старше — 65,9%. Это обычная структура онкологической заболеваемости мужчин.

Летальность больных ЗНО на первом году наблюдения в каждой возрастной группе существенно различалась от 24,9% (для больных в возрасте до 34 лет) до 52,3% (в возрасте 60 лет и старше) (табл. 2, рис. 2).

Во всех трех возрастных группах наблюдается всплеск величин ПЛ на 8–10 году наблюдения. В последующие годы вплоть до 2017 г. летальность больных на первом году наблюдения существенно снизилась, что безусловно приведет и к снижению ПЛ в дальнейшем (табл. 4). Однако расчеты ПЛ на 10 году наблюдения, заболевших в 2017 г. мы увидим не ранее 2030 г.

**Таблица 4. Летальность больных ЗНО в СЗФО на первом году наблюдения с учетом возрастных групп. БД ПРР СЗФО РФ**

Период наблюдения	мужчины		
	0–34	35–59	60 +
2000–2004	24,9	47,5	52,3
2005–2009	19,1	42,9	46,7
2010–2014	15,3	37,9	40,2
2015–2017	12,9	35,4	38,5
	женщины		
2000–2004	15,4	20,0	39,6
2005–2009	12,5	18,1	35,9
2010–2014	9,7	15,0	29,8
2015–2017	7,7	13,6	29,1

Рассмотрим особенности ПЛ больных ЗНО с учетом стадии заболевания отдельно для мужчин и женщин, что невозможно получить на основе государственной отчетности ф. № 7. За основу расчета 10-летней ПЛ возьмем тот же 2000–2004 гг. Исчисленный на основе БД ПРР СЗФО РФ удельный вес ранних стадий составил 36,5%, вместо привычных 50%, причем, летальность на первом году наблюдения при I–II стадии заболевания составила среди мужского населения 17,0 %, среди женского 7,2%.

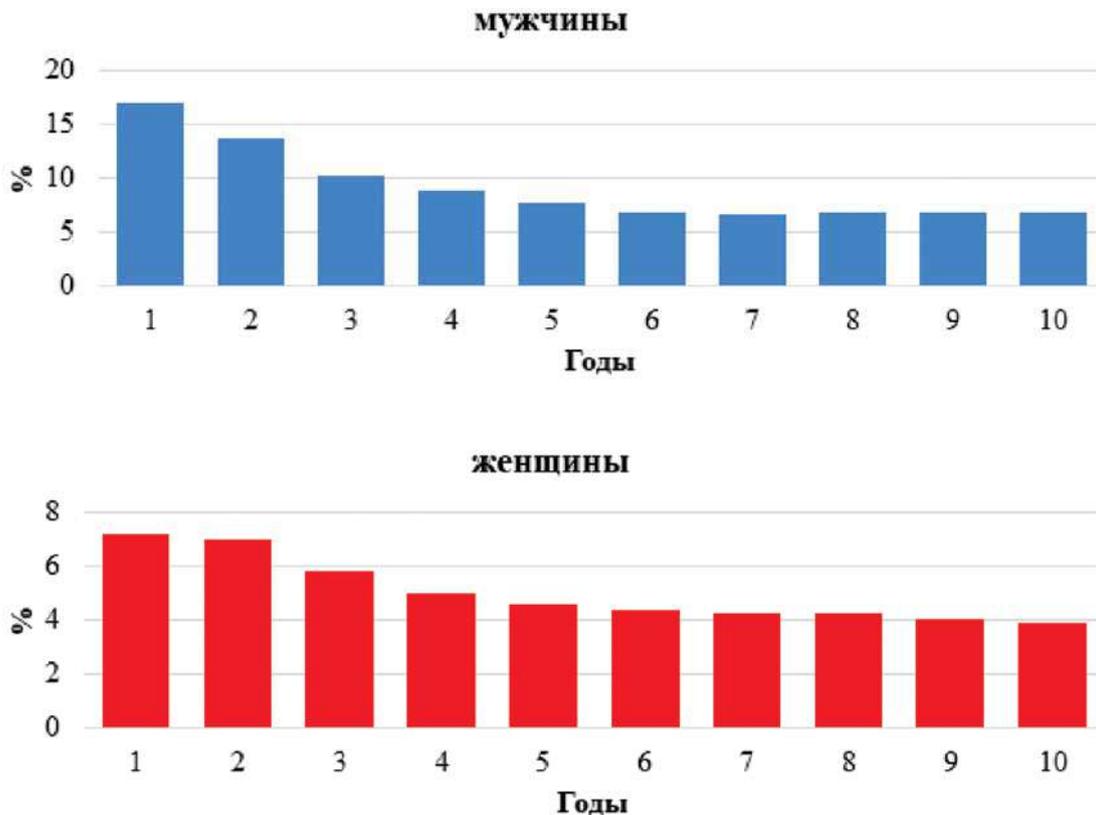


Рис. 4. Годовичная летальность больных ЗНО (С00-96) за 10-летний период наблюдения в СЗФО РФ среди больных с I и II стадией заболевания. БД ПРР СЗФО РФ, 2000 — 2004 гг.

Важно обратить внимание на то, что больные, отнесенные к I и II стадии заболевания во многом имели более распространенный процесс заболевания, так как за 10-летний период наблюдения 68,3% мужчин отнесенных к I и II стадии заболевания погибли, а среди женщин, выявленных в ранней стадии заболевания погибло более 50,0% (50,1%). Вряд ли это ошибка диагностики. Мы много лет говорим о стремлении чиновников на всех уровнях управления иметь хорошие цифры относительно больных, выявляемых в ранней стадии заболевания. Такое административное давление не позволяет врачам иметь

реальное представление о состоянии онкологической службы. Онкология — тяжелейшая патология. Необходимо прекратить заставлять главных врачей искажать реальное состояние проблемы, особенно в наше время, когда всем хочется знать реальное состояние не только по коронавирусу. В основу реального представления о состоянии онкологической службы необходимо поставить БД ПРР и осуществлять расчеты показателей выживаемости больных ЗНО по международным стандартам.

Из рис. 4 и табл. 5 видна неадекватность уровней ПЛ относительно заявленных ранних стадий.

**Таблица 5. Погодичная летальность больных ЗНО (С00-96) за 10-летний период наблюдения в СЗФО РФ среди больных с I и II стадией заболевания. БД ПРР СЗФО РФ, 2000 – 2004 гг.**

Период наблюдения	мужчины		женщины	
	Абс.число	Летальность	Абс.число	Летальность
1	24416	17,0	46891	7,2
2	19740	13,7	42289	7,0
3	16927	10,3	39161	5,8
4	15087	8,9	36714	5,0
5	13664	7,7	34698	4,6
6	12427	6,7	32600	4,4
7	10010	6,6	27618	4,2
8	9161	6,8	26075	4,2
9	8410	6,7	24646	4,0
10	7732	6,8	23390	3,9

**Таблица 6. Погодичная летальность больных ЗНО (С00-96) за 10-летний период наблюдения в III, IV стадией заболевания и без указания стадии в СЗФО РФ. БД ПРР СЗФО РФ**

Период наблюдения	мужчины		женщины	
	абс.число	летальность	абс.число	летальность
1	63023	63,1	60865	51,1
2	22024	32,9	27595	25,2
3	14623	19,8	20422	17,2
4	11624	14,6	16776	12,3
5	9820	11,5	14585	9,7
6	8580	10,1	12996	9,0
7	7557	8,7	11594	7,2
8	6824	8,0	10682	6,6
9	6195	8,1	9884	6,4
10	5643	7,3	9147	5,7

**Таблица 7. Летальность больных (оба пола) на первом году наблюдения с учетом стадии заболевания в СЗФО РФ (С00-96). БД ПРР СЗФО РФ**

Период наблюдения	мужчины		женщины	
	I–II стадия	III, IV, без стадии	I–II стадия	III, IV, без стадии
2000–2004	17,0	63,1	7,2	51,1
2005–2009	15,4	60,3	7,2	48,1
2010–2014	12,4	57,1	6,0	45,8
2015–2018	12,3	55,2	6,0	44,9

В табл. 6 представлена годовичная летальность больных ЗНО (C00-96) с распространенным процессом ЗНО. За 10-летний период погибло более 90% мужчин, 85% женщин. Необходимо иметь в виду, что реально погибло несколько больше, так как часть больных выбыла из-под наблюдения онкологического диспансера и об их судьбе ничего неизвестно. Всего в исследования было отобрано 63 023 мужчины и 60 865 женщины. В последующие годы ПЛ заметно уменьшилась (табл. 7).

Таким образом, проведенное исследование на материалах БД ПРР СЗФО РФ позволило выявить закономерности поэтапного выбытия больных ЗНО, состоящих под диспансерным наблюдением с учетом пола, возраста и распределения больных по стадиям заболевания. Предлагаемый для оценки деятельности онкологической службы комплекс показателей годовичной летальности может стать надежным критерием ее оценки и позволит раскрыть причины всплеска летальности больных в разные периоды наблюдения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Мерабишвили В.М. Выживаемость онкологических больных. — СПб.: ООО «Фирма КОСТА», 2006. — С. 393-415.
2. Мерабишвили В.М. Выживаемость онкологических больных. Выпуск второй. Часть II/ Под ред. Ю.А. Щербука. — СПб.: ООО «Издательско-полиграфическая компания «КОСТА», 2011.
3. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 г. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. — М.: МНИОИ им. П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. илл. — 236 с.

Поступила в редакцию 16.06.2020 г.

*V.M. Merabishvili*

### Analytical indicators of observation. The year-by-year lethality of patients at each year

Federal State Budget Institution «N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology» Ministry of Healthcare of Russian Federation

Year-by-year lethality — the lethality of patients with malignant tumors in each year of observation — an indicator that determines the risk of death of patients, depending on the localization of tumors.

Lethality of patients in the first year of follow-up includes posthumously registered patients with malignant tumors, and is the inverse criterion to the indicator of one-year observed survival. In subsequent years, the calculation of year-by-year lethality is carried out without posthumously registered patients. It is important to note that the calculation of partial mortality rates is carried out only for the number of patients who died from malignant tumors. It is necessary to exclude patients who have dropped out of observation at each year of observation. Calculation of the year-by-year lethality indicator is possible only if there are at least 100 primary registered patients.

In February 2019, we created the database of the Population cancer registry. The North-Western Federal district (NWFD) of the Russian Federation, which includes more than 1 million patients (1211891 patients with posthumously registered patients and 1071112 cases without posthumously registered patients). Only reliable data was selected for development, the number of which was almost 10% less. In 2020, the database of the Population cancer registry of the NWFD of the Russian Federation increased by 73054 cases. We used the updated database in this study. The observation period is from 1994 to 2020. The year-by-year lethality study was conducted in total for all ICD-10 categories for the C00-96 neoplasm class.

DB analysis showed that in the NWFD of the Russian Federation, the proportion of posthumously registered patients decreased from 1995 to 2018 (both sexes) from 21.1 to 8.1%.

For 1995 — 1999, 2000 — 2004, the year-by-year lethality was calculated for 10 years of observation, the period 2005-2009 covered the year-by-year lethality for 7 years of observation, 2005-2009 for 5 years. We have considered the specifics of year-by-year lethality separately for men and women, for people from 0-34, 35-59, 60 years and older.

We pay special attention to year-by-year lethality for patients with localized (stage I and II of the disease) and widespread process (stage III and IV, including patients without the specified stage of the disease, which, as a rule, by the level of survival belong to stage III and IV of the disease).

Key words: malignant tumors, year-by-year lethality, gender, age, stage of the disease

*А.Г. Егорова<sup>1</sup>, А.Е. Орлов<sup>1</sup>, С.А. Суслин<sup>2</sup>*

## **Обоснование региональных программ контроля и профилактики злокачественных новообразований органов пищеварения на основе международного сравнения показателей заболеваемости, смертности и выживаемости (исследование по материалам CI5 и Concord 3)**

<sup>1</sup>Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Самарский областной клинический онкологический диспансер»,

<sup>2</sup>Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

В Российской Федерации, по сравнению со среднеевропейскими показателями, смертность при злокачественных новообразованиях (ЗНО) органов пищеварения, даже на фоне низкой заболеваемости, остается высокой.

Для научного обоснования и детализации организационных мероприятий по совершенствованию программ контроля и профилактики ЗНО органов пищеварения, проводимых в настоящее время в рамках национального проекта «Борьба с онкологическими заболеваниями в 2019-2024 гг.», на примере одного из типичных регионов РФ — Самарской области, проведена международная оценка качества оказания медицинской помощи этой группе больных.

При этом были использованы данные о пациентах, включённые в базу данных Самарского популяционного ракового регистра в период 2003-2017 гг., данные об онкологических больных Самарской области периода 2008-2012 гг., включенные в Cancer Incidence in Five Continents Vol.XI, а также данные о больных со ЗНО, взятых на учет в Самарской области в период 2010-2014 гг., и включенных в исследование Concord 3. Оценка качества медицинской помощи выполнена при всех локализациях органов пищеварения на основе анализа тенденций показателей заболеваемости, смертности и относительной выживаемости.

Проведенное международное исследование показало, что в Самарской области, по сравнению со странами Европы, практические при всех злокачественных новообразованиях органов пищеварения, при невысокой заболеваемости отмечены высокая смертность и низкая выживаемость.

Основываясь на данных достоверного онкоэпидемиологического исследования, выполненного в соответствии с международными стандартами, установлено, что в регионах

РФ, при освоении финансовых, кадровых и организационных ресурсов национального проекта по борьбе со злокачественными новообразованиями, необходимо особое внимание уделять программам первичной профилактики рака толстой кишки, печени и желчного пузыря; организации комплексных программ скрининга колоректального рака; а также активному проведению программ ранней диагностики и эффективного лечения рака желудка, поджелудочной железы, печени, пищевода и желчного пузыря.

**Ключевые слова:** злокачественные новообразования органов пищеварения, показатели заболеваемости, смертности и относительной выживаемости

### **Введение**

По данным Globocan в 2012 г. в Российской Федерации (РФ) заболеваемость злокачественными новообразованиями (ЗНО) органов пищеварения составляла 53,7 на 100 тысяч населения, что достоверно ниже, чем в странах Европы (54,3±1,4;  $p=0,95, t=2$ ). В 2018 г. заболеваемость возросла на 3,5% и составила 55,6 на 100 тысяч населения [1]. Всего в 2018 г. в РФ было зарегистрировано 152 811 ЗНО органов пищеварения [2]. При этом, наиболее часто встречающейся опухолью был колоректальный рак (КРР) — 74 237 случаев (48,6%), на втором месте — ЗНО желудка (36 941 случаев — 24,2%), на третьем — рак поджелудочной железы (19 165 случаев — 12,5%), на четвертом — гепатоцеллюлярный рак (8 810 случаев — 5,8%), на пятом — ЗНО пищевода (8 266 случаев — 5,4%), на шестом — ЗНО желчного пузыря (3 713 случаев — 2,4%) и на седьмом — ЗНО толстой кишки (1 679 случаев — 1,1%) [2].

В РФ в 2012 г. достоверно выше, чем в среднем по Европейскому региону (9,3±0,7;  $p=0,95, t=2$ ), оказалась заболеваемость только

раком желудка — 16,8 на 100 тысяч населения [1]. Однако, в период с 2012-2017 гг. показатель снизился на 9,0% [3, 4, 5]. Заболеваемость КРР (24,5 на 100 тысяч населения), раком поджелудочной железы (6,0 на 100 тысяч населения), гепатоцеллюлярным раком (2,9 на 100 тысяч населения) и ЗНО желчного пузыря (3,1 на 100 тысяч населения) была достоверно ниже, чем в странах Европы —  $29,5 \pm 1,1$ ;  $p=0,95, t=2$ ;  $6,8 \pm 0,2$ ;  $p=0,95, t=2$ ;  $4,0 \pm 0,25$ ;  $p=0,95, t=2$ ;  $1,8 \pm 0,14$ ;  $p=0,95, t=2$  соответственно [1]. Однако, в период 2012-2017 гг. зарегистрирована тенденция роста вышеназванных показателей — на 10,1%, на 15,7%, на 28,7% и на 9,6% соответственно [3, 4, 5]. В показателе заболеваемости раком пищевода (3,1 на 100 тысяч населения) достоверных отличий от средневропейского значения ( $2,9 \pm 0,4$ ;  $p=0,95, t=2$ ) не зарегистрировано [1]. Но в период 2012-2017 гг. показатель возрос на 4,7% [3, 4, 5].

В 2012 г. в РФ достоверно выше, чем в среднем по Европе, оказалась смертность при колоректальном раке — 15,2 на 100 тысяч, против  $12,7 \pm 0,6$ ;  $p=0,95, t=2$ , и при ЗНО желудка — 13,1 на 100 тысяч, против  $6,8 \pm 0,6$ ;  $p=0,95, t=2$  соответственно. В показателях смертности от ЗНО поджелудочной железы (6,7 на 100 тысяч населения), печени (3,5 на 100 тысяч населения), пищевода (2,7 на 100 тысяч населения) и желчного пузыря (1,1 на 100 тысяч) достоверных отличий от средневропейских значений не зарегистрировано —  $6,6 \pm 0,2$ ;  $p=0,95, t=2$ ;  $4,0 \pm 0,27$ ;  $p=0,95, t=2$ ;  $2,4 \pm 0,2$ ;  $p=0,95, t=2$  и  $1,2 \pm 0,12$ ;  $p=0,95, t=2$  соответственно [1]. В период 2012-2017 гг. наметилась положительная тенденция снижения смертности при большинстве ЗНО органов пищеварения: на 6,1% при КРР, на 18,0% при раке желудка, на 0,4% при ЗНО пищевода, на 7,2% при ЗНО желчного пузыря. Однако показатели смертности от рака поджелудочной железы и печени возросли на 4,2% и 5,9% соответственно [3, 4, 5].

Таким образом, по сравнению со средневропейскими показателями, смертность при ЗНО органов пищеварения в РФ, даже на фоне низкой заболеваемости, остается высокой.

Во всем мире практическое использование различных методов противораковой борьбы осуществляется в соответствии с региональными программами контроля и профилактики рака. В основе их должны лежать результаты международных эпидемиологических исследований, поддержанных МАИР и содержащие достоверные сравнительные данные не только об уровнях и тенденциях показателей, но и о причинах распространения ЗНО различных локализаций.

С 2019 г. в РФ принята и поэтапно реализуется национальная программа «Борьба с онкологическими заболеваниями в 2019-2024 гг.».

Основной целью программы является организация и проведение мероприятий, направленных на снижение смертности от новообразований к 2024 г. до 185,0 случаев на 100 тысяч населения в соответствии с Указом Президента Российской Федерации от 07.05.2018 № 204 «О национальных целях и стратегических задачах развития Российской Федерации на период до 2024 года»<sup>1</sup>. Основными задачами проекта являются: проведение информационно-коммуникационной кампании, направленной на ранее выявление онкологических заболеваний и повышение приверженности к лечению; финансовое обеспечение оказания медицинской помощи больным с онкологическими заболеваниями в соответствии с клиническими рекомендациями и протоколами лечения; организация сети центров амбулаторной онкологической помощи; переоснащение сети региональных медицинских организаций оказывающих помощь больным онкологическими заболеваниями (диспансеров/больниц); совершенствование кадрового обеспечения онкологической службы [6]. Для достижения поставленной цели и вышеназванных задач в каждом субъекте РФ разработаны региональные программы, включающие план мероприятий и контрольные точки.

### Цель

Для научного обоснования и детализации организационных мероприятий по совершенствованию программ контроля и профилактики ЗНО органов пищеварения, проводимых в настоящее время в рамках национального проекта «Борьба с онкологическими заболеваниями в 2019-2024 гг.», проведена международная оценка качества оказания медицинской помощи этой группе больных.

### Материалы и методы

Оценка качества оказания медицинской помощи больным, страдающим ЗНО органов пищеварения проведена в одном из типичных регионов РФ — Самарской области. При этом были использованы данные о пациентах, включенные в базу данных Самарского популяционного ракового регистра в период с 2003 по 2017 гг., данные об онкологических больных Самарской области периода 2008-2012 гг., включенные в XI том монографии МАИР «Рак на 5 континентах», а также данные о больных со ЗНО, взятых на учет в Самарской области в период 2010-2014 гг., и включенных в исследование Concord 3.

Динамические ряды показателей заболеваемости, смертности и относительной выживаемости представлялись абсолютными, относительными и средними числами и показателями наглядности. Выравнивание динамических рядов проводилось по параболе первого порядка. Различия

<sup>1</sup> Указ Президента Российской Федерации от 07.05.2018 № 204 «О национальных целях и стратегических задачах развития Российской Федерации на период до 2024 года» [Decree of the President of the Russian Federation of 07.05.2018 №204. «O natsional'nykh tselyakh i strategicheskikh zadachakh razvitiya Rossiiskoi Federatsii na period do 2024 goda» (In Russ)] Доступно по: <http://www.kremlin.ru/acts/bank/43027>. Ссылка активна на 25.08.2020

в показателях заболеваемости и смертности, обусловленных возрастным составом населения, были устранены с помощью прямого метода стандартизации. Границы уровней показателей (достоверно высокий, достоверно низкий) определялись с помощью доверительного интервала с вероятностью безошибочного прогноза 95% ( $p=0,95, t=2$ ).

Для оценки компонент прироста заболеваемости, обусловленных, либо изменением возрастной структуры населения, либо повышением риска заболеть, была использована методика компонентного анализа [7].

При подготовке отчетов по выживаемости был использован динамический (актуриальный) метод расчета, основанный на построении таблиц дожития [8, 9].

### Результаты

По данным международного исследования в Самарской области за 2008-2012 гг. было зарегистрировано 16 768 ЗНО органов пищеварения, в том числе 28 743 — среди мужчин и 30 845 — среди женщин [10]. Доля этой группы больных заняла лидирующее первое место в структуре основных групп ЗНО и составила 28,2% [10, 11].

Первое место в структуре ЗНО органов пищеварения занимал колоректальный рак — 8 209

случаев (49,0%). Его удельный вес в структуре ЗНО органов пищеварения у мужчин составил 43,5%, а у женщин — 54,5% [10] (табл. 1). Уровень заболеваемости КРР среди мужчин составил 36,4 на 100 тысяч населения, что достоверно ниже средневропейского значения ( $39,3 \pm 1,4$ ;  $p=0,95, t=2$ ), а среди женщин — 26,0 на 100 тысяч населения, что соответствует среднему уровню данного показателя в странах Европейского региона ( $25,2 \pm 0,8$ ;  $p=0,95, t=2$ ) [10, 12].

Однако, в период с 2012 по 2017 гг. заболеваемость КРР в регионе среди мужчин возросла с 32,6 до 36,7 на 100 тысяч населения, или на 15,4%, а среди женщин — с 24,3 до 25,7 на 100 тысяч населения, или на 7,3% (табл. 2) [12, 13]. Выполненный компонентный анализ абсолютного прироста заболеваемости показал, что увеличение числа больных КРР связано преимущественно с усиливающимся воздействием на население факторов риска (ФР), так как среднеобластное значение компоненты прироста, связанной с ФР, в период 2003–2016 гг. составило 71,9%.

Таблица 1. Структура злокачественных новообразований органов пищеварения в Самарской области в 2008–2012 гг.

Ранг.место	Локализация	МКБ-10	Абс.ч.	%
<b>ОБА ПОЛА</b>				
*	Всего ЗНО	C15-C26	16768	100,0
1	Толстая кишка	C18-C21	8209	49,0
2	Желудок	C16	4634	27,6
3	Поджелуд.железа	C25	1874	11,2
4	Печень	C22	769	4,6
5	Пищевод	C15	754	4,5
6	Желчный пузырь	C23-24	394	2,3
7	Тощая кишка	C17	134	0,8
<b>Мужчины</b>				
*	Всего ЗНО	C15-C26	8444	100,0
1	Толстая кишка	C18-C21	3675	43,5
2	Желудок	C16	2581	30,6
3	Поджелуд.железа	C25	961	11,4
4	Пищевод	C15	608	7,2
5	Печень	C22	430	5,1
6	Желчный пузырь	C23-24	132	1,6
7	Small intestine	C17	57	0,7
<b>Женщины</b>				
*	Всего ЗНО	C15-C26	8324	100,0
1	Толстая кишка	C18-C21	4534	54,5
2	Желудок	C16	2053	24,7
3	Поджелуд.железа	C25	913	11,0
4	Печень	C22	339	4,1
5	Желчный пузырь	C23-24	262	3,1
6	Пищевод	C15	146	1,8
7	Тонкая кишка	C17	77	0,9

**Таблица 2. Заболеваемость злокачественными новообразованиями органов пищеварения в Самарской области в 2008-2017 гг. (на 100 тысяч населения)**

Локализация злокачественного новообразования	Пол	С15, том XI (2008-2012гг)		Самарский Популяционный Раковый Регистр (2012-2017 гг.)		
		Сам.обл	Европа(ср.з)	2012 г.	2017 г.	Тенденция
ЗНО органов пищеварения C15-C26	м	84,0 <sup>1</sup>	79,0±2,3	76,7	81,3	+7,0
	ж	47,1 <sup>1</sup>	44,0±1,1	42,9	43,7	+5,3
	оп	*	*	55,4	57,7	+6,1
Толстая кишка C18-C21	м	36,4 <sup>1</sup>	39,3±1,4	32,6	36,7	+15,4
	ж	26,4	25,2±0,8	24,3	25,7	+7,3
	оп	*	*	27,1	29,6	+11,3
Желудок C16	м	25,7 <sup>1</sup>	15,4±1,6	23,6	21,1	-6,9
	ж	11,7 <sup>1</sup>	7,0± 0,6	9,5	8,7	-8,8
	оп	*	*	14,8	13,4	-7,9
Поджелудочная железа C25	м	9,6	9,1±0,29	8,0	8,7	+5,9
	ж	4,9 <sup>1</sup>	5,9±0,19	4,3	4,8	+24,3
	оп	*	*	5,8	6,2	+12,8
Печень C22	м	4,4 <sup>1</sup>	6,0±0,47	3,5	6,5	+72,7
	ж	2,0	2,0±0,12	1,9	2,0	+13,0
	оп	*	*	2,5	3,7	+44,8
Пищевод C15	м	6,1	6,9±0,3	6,2	5,4	-8,7
	ж	0,7 <sup>1</sup>	1,2±0,2	0,7	0,6	-2,1
	оп	*	*	2,8	2,5	-7,8
Желчный пузырь C23-C24	м	1,3 <sup>1</sup>	2,1±0,14	1,2	1,4	+2,4
	ж	1,3 <sup>1</sup>	2,0±0,17	1,1	1,1	+23,2
	оп	*	*	1,1	1,2	+14,7
Тощая кишка C17	м	0,5 <sup>1</sup>	1,0±0,1	0,5	0,9	+82,6
	ж	0,5	0,67±0,05	0,5	0,7	+21,1
	оп	*	*	0,6	0,9	+41,4

Примечание: <sup>1</sup>имеется достоверное отличие уровня показателя от среднеевропейского значения

**Таблица 3. Смертность и относительная выживаемость**

Локализация злокачественного новообразования	Смертность (на 100 тысяч населения)				Относительная выживаемость (%)				
	Европа ср.знач. Globocan	Самарская область (Самарский Популяционный Раковый Регистр)			Concord (2010-2014 гг.)		Самарская область (Самарский Популяционный Раковый Регистр)		
		2012	2012	2017	Тенден	Сам.обл	Европа ср.знач.	2003	2012
Ободочная кишка	12,7±0,52	14,2 <sup>1</sup>	14,3	+2,5	46,1 <sup>1</sup>	57,9±1,4	36,0	47,8	+37,6
Прямая кишка					45,8 <sup>1</sup>	55,4±1,7			
Желудок	6,8±0,6	11,5 <sup>1</sup>	10,0	-13,3	20,0 <sup>1</sup>	25,9±1,0	19,0	23,8	+17,4
Поджел.железа	6,7±0,16	6,4	5,5	-5,4	3,2 <sup>1</sup>	7,5±0,58	7,3	4,0	-57,6
Печень	4,0±0,25	2,9 <sup>1</sup>	3,4	+14,9	5,7 <sup>1</sup>	11,3±1,0	5,3	5,6	+27,5
Пищевод	2,4±0,17	2,3	2,1	-4,3	10,0 <sup>1</sup>	12,7±1,1	10,5	7,4	-12,6
Желчный пузырь	1,8±0,13	1,1	0,9	+10,3	*	*	15,4	13,8	-39,1
Тощая кишка	*	0,5	0,4	-21,7	*	*	17,7	34,5	+76,1
Органы пищеварения	*	39,4	37,0	-3,3	*	*	23,6	31,1	+33,6

Примечание: <sup>1</sup>имеется достоверное отличие уровня показателя от среднеевропейского значения при злокачественных новообразованиях органов пищеварения в Самарской области

Смертность от КРР в Самарской области в 2012 г. составила 14,2 на 100 тысяч населения, что достоверно выше средневропейского значения [1, 12, 13]. Однако в период 2012-2017 гг. показатель возрос на 2,5% и в 2017 г. и составил — 14,3 на 100 тысяч населения [12, 13]. По данным международного исследования Concord-3, в период 2010-2014 гг. в Самарской области 5-летняя относительная выживаемость больных раком ободочной кишки и прямой кишки оказалась достоверно ниже средневропейского уровня — 46,1% против 57,9±1,4;  $p=0,95, t=2$  и 45,8% против 55,4±1,7;  $p=0,95, t=2$  соответственно [12, 14]. Но среди больных, взятых на учет в период 2003-2012 гг., отмечалась положительная тенденция роста этого показателя — с 36,0% до 47,8% или на 37,6% (табл. 3) [12, 15].

Второе место в структуре ЗНО органов пищеварения принадлежит раку желудка — 4 634 случая (27,6%). Его удельный вес в структуре ЗНО органов пищеварения у мужчин составил 30,6%, а у женщин — 24,7% [10] (табл. 1). Уровни заболеваемости раком желудка (у мужчин 25,7 на 100 тысяч населения и у женщин — 11,7 на 100 тысяч населения) оказались достоверно выше средневропейских значений — 15,4±1,6;  $p=0,95, t=2$  и 7,0±0,6;  $p=0,95, t=2$  соответственно [10, 16]. Однако, в период с 2012 по 2017 гг. показатель среди мужчин снизился с 23,6 до 21,1 на 100 тысяч населения, или на 6,9%, а среди женщин — с 9,5 до 8,7 на 100 тысяч населения или на 8,8% (табл. 2) [13, 16].

Смертность от рака желудка в Самарской области в 2012 г. составила 11,5 на 100 тысяч населения, что достоверно выше средневропейского значения (6,8±0,6;  $p=0,95, t=2$ ) [1, 13, 16]. За последние 5 лет показатель снизился на 13,3% и в 2017 г. составил — 10,0 на 100 тысяч населения [13, 16]. Однако 5-летняя относительная выживаемость больных, взятых на учет в 2010-2014 гг., по данным международного исследования Concord-3, составила всего 20,0%, что достоверно ниже средневропейского уровня (25,9±1,0;  $p=0,95, t=2$ ) [14, 16]. И несмотря на наметившуюся тенденцию ее роста — до 23,8%, продолжает оставаться значительно ниже, чем в странах Европейского региона (табл. 3) [15, 16].

Третье место в структуре ЗНО органов пищеварения принадлежит ЗНО поджелудочной железы — 1 874 случая (11,2%). Их удельный вес в структуре ЗНО органов пищеварения у мужчин составил 11,4%, а у женщин — 11,0% [19] (табл. 1).

В период 2008-2012 гг. в Самарской области заболеваемость раком поджелудочной железы среди мужчин (9,6 на 100 тысяч населения) достоверно не отличалась от средневропейского

значения (9,1±0,29;  $p=0,95, t=2$ ), а среди женщин (4,9 на 100 тыс. нас.) была достоверно ниже, чем в среднем по Европе (5,9±0,19;  $p=0,95, t=2$ ) [10]. Однако, в период 2012-2017 гг. отмечен рост заболеваемости раком поджелудочной железы с 5,8 до 6,2 на 100 тысяч населения или на 12,8%, в том числе среди мужчин на 5,9%, а среди женщин на 24,3% (табл. 2) [13].

В 2012 г. в показателе смертности от рака поджелудочной железы (6,4 на 100 тысяч населения) достоверных отличий, по сравнению со средневропейским показателем (6,7±0,16;  $p=0,95, t=2$ ), не зарегистрировано [1, 13]. К 2017 г., несмотря на рост заболеваемости, смертность снизилась на 5,4% и составила 5,5 на 100 тысяч населения [13]. Однако 5-летняя относительная выживаемость этой группы больных, взятых на учет в 2010-2014 гг. составила всего 3,2%, что достоверно ниже средневропейского уровня (7,5±0,58;  $p=0,95, t=2$ ) [14]. Более того, анализ тенденций этого показателя в период с 2003 по 2012 гг., показал значительную тенденцию его снижения с 7,3% до 4,0%, или на 57,6% (табл. 3) [15].

Четвертое место в структуре ЗНО органов пищеварения занимает гепатоцеллюлярный рак — 769 случаев (4,6%). Его удельный вес в структуре ЗНО органов пищеварения у мужчин составил 5,1%, а у женщин — 4,1% [10] (табл. 1). Уровень заболеваемости раком печени у мужчин в Самарской области в период 2008-2012 гг. составлял 4,4 на 100 тысяч населения, что достоверно ниже средневропейского значения (6,0±0,47;  $p=0,95, t=2$ ). Заболеваемость среди женщин составила 2,0 на 100 тысяч населения, что соответствовало среднему значению по Европейскому региону (2,0±0,12;  $p=0,95, t=2$ ) [10]. В период с 2012 по 2017 гг. заболеваемости раком печени возросла с 2,5 до 3,7 на 100 тысяч населения, или на 44,8%, в том числе среди мужчин на 72,7%, а среди женщин — на 13,0% (табл. 2) [13]. Выполненный компонентный анализ абсолютного прироста заболеваемости показал, что увеличение числа больных раком печени связано преимущественно с усиливающимся воздействием на население факторов риска (ФР), так как среднеобластное значение компоненты прироста, связанной с ФР, в период 2003-2016 гг. составило 46,7%.

Показатель смертности в 2012 г. составил 2,9 на 100 тысяч населения, что достоверно ниже средневропейского значения (4,0±0,25;  $p=0,95, t=2$ ) [1, 13]. В период с 2012 по 2017 гг. при значительном росте заболеваемости, смертность от рака печени возросла лишь на 14,9% [13]. Однако 5-летняя относительная выживаемость этой группы больных, взятых на учет в 2010-2014 гг., по данным международного исследования

Concord-3, составила всего 5,7%, что достоверно ниже средневропейского уровня ( $11,3 \pm 1,0$ ;  $p=0,95$ ,  $t=2$ ) [14]. В тоже время, анализ тенденций этого показателя в период 2003-2012 гг. показал положительную тенденцию его роста — с 5,3% до 5,6%, или на 27,5% [15] (табл. 3).

Пятое место в структуре ЗНО органов пищеварения принадлежит ЗНО пищевода — 754 случая (4,5%). Их удельный вес в структуре ЗНО органов пищеварения у мужчин составил 7,2%, а среди женщин — 1,8% [10] (табл. 1). Уровень заболеваемости у мужчин достоверно не отличался от средневропейского значения ( $6,3 \pm 0,4$ ;  $p=0,95$ ,  $t=2$ ) и составлял 6,1 на 100 тысяч населения, а у женщин — всего 0,7 на 100 тысяч населения, что достоверно ниже, чем в целом по Европе ( $1,2 \pm 0,2$ ;  $p=0,95$ ,  $t=2$ ) [10]. В период 2012-2017 гг. показатель заболеваемости в регионе снизился на с 2,8 до 2,5, или на 7,8%, в том числе на 8,7% у мужчин и на 2,1% у женщин (табл. 2) [13].

Смертность от рака пищевода в 2012 г. достоверно не отличалась от средневропейского показателя ( $2,4 \pm 0,17$ ;  $p=0,95$ ,  $t=2$ ) и составила 2,3 на 100 тысяч населения [1, 13]. К 2017 г. показатель снизился до 2,1 на 100 тысяч населения или на 4,3% [13]. Однако 5-летняя относительная выживаемость, взятых на учет в 2010-2014 гг., по данным международного исследования Concord-3, составила всего 10,0%, что достоверно ниже средневропейского уровня ( $12,7 \pm 1,1$ ;  $p=0,95$ ,  $t=2$ ) [14]. Более того, анализ тенденций этого показателя среди больных, взятых на учет в период 2003-2012 гг., показал негативную тенденцию его снижения с 10,5% до 7,4% или на 12,6% (табл. 3) [15].

На шестом месте в структуре ЗНО органов пищеварения находятся ЗНО желчного пузыря — 394 случая (2,3%). Их удельный вес в структуре ЗНО органов пищеварения у мужчин составил 1,6%, а среди женщин — 3,1% [10] (табл. 1). В период 2008-2012 гг. в Самарской области уровень заболеваемости ЗНО желчного пузыря, как у мужчин, так и у женщин, был достоверно ниже средневропейских значений ( $2,1 \pm 0,14$ ;  $p=0,95$ ,  $t=2$ ;  $2,0 \pm 0,17$ ;  $p=0,95$ ,  $t=2$  соответственно) и составлял 1,3 на 100 тысяч населения [10]. В период 2012-2017 гг. показатель заболеваемости возрос с 1,1 до 1,2 или 14,7%, в том числе среди мужчин на 2,4%, а среди женщин — на 23,2% (табл. 2) [13]. Выполненный компонентный анализ абсолютного прироста заболеваемости показал, что увеличение числа больных раком желчного пузыря преимущественно связано с усиливающимся воздействием на население региона факторов риска (ФР), так как среднеобластное значение компоненты прироста, связанной с ФР, в период 2003-2016 гг. составило 58,4%.

Смертность от рака желчного пузыря в 2012 г. достоверно не отличалась от средневропейского показателя ( $1,8 \pm 0,13$ ;  $p=0,95$ ,  $t=2$ ) и составила 1,1 на 100 тысяч населения [1, 13]. В период 2012-2017 гг. показатель возрос на 10,3% [13]. Анализ тенденций показателя 5-летней относительной выживаемости в период 2003-2012 гг. показал негативную тенденцию его снижения с 23,6% до 31,1% или на 39,1% (табл. 3) [15].

Седьмое место в структуре ЗНО органов пищеварения принадлежит раку тощей кишки — 134 случая (0,8%). Его удельный вес в структуре ЗНО органов пищеварения у мужчин составил 0,7%, а среди женщин — 0,9% [10] (табл. 1).

В период с 2008 по 2012 гг. в Самарской области уровень заболеваемости ЗНО тощей кишки, как у мужчин, так и у женщин, был достоверно ниже средневропейских значений ( $1,0 \pm 0,1$ ;  $p=0,95$ ,  $t=2$ ;  $0,67 \pm 0,05$ ;  $p=0,95$ ,  $t=2$  соответственно) и составлял всего 0,5 на 100 тысяч населения [10]. В период 2012-2017 гг. показатель заболеваемости в регионе возрос с 0,6 до 0,9 на 100 тысяч населения или на 41,4%, в том числе на 82,6% у мужчин и на 21,1% у женщин (табл. 2).

Смертность от рака тощей кишки в Самарской области в 2012 г. составила 0,5 на 100 тысяч населения. К 2017 г. она снизилась на 21,7% [13]. Кроме того, анализ тенденций показателя 5-летней относительной выживаемости в период 2003-2012 гг. показал положительную тенденцию роста с 17,7% до 34,5% или на 76,1% (табл. 3) [15].

## Обсуждение

Проведенное международное исследование показало, что в Самарской области, по сравнению со странами Европы, практически при всех злокачественных новообразованиях органов пищеварения, при невысокой заболеваемости отмечены высокая смертность и низкая выживаемость. Так, при достоверно невысоких показателях заболеваемости КРР зарегистрированы достоверно высокие показатели смертности и достоверно низкие показатели выживаемости. При раке желудка при достоверно высоких показателях заболеваемости и смертности отмечены достоверно низкие показатели выживаемости. Сложной эпидемиологической обстановкой остается и при раке поджелудочной железы и печени, так как, по сравнению со странами Европы, при достоверно низких показателях заболеваемости и смертности отмечены достоверно низкие показатели выживаемости. При раке пищевода при достоверно невысоких показателях заболеваемости и смертности достоверно низкие показатели выживаемости, не имеющие тенденции роста. При раке желчного пузыря при до-

стоверно низких показателях заболеваемости и смертности, имеющих тенденцию роста за счет воздействия факторов риска, зарегистрирована тенденция снижения показателей выживаемости.

Относительно стабильной эпидемиологическая обстановка оказалась лишь при раке тощей кишки, так как при достоверно низком показателе заболеваемости, имеющем тенденцию роста, выявлены положительные тенденции в показателях смертности и выживаемости.

### Выводы

Проведенное нами международное исследование, выполненное в соответствии с международными стандартами, позволило научно обосновать, конкретизировать и детализировать комплекс мер по борьбе со ЗНО органов пищеварения, проводимых в рамках региональной национальной программы «Борьба с онкологическими заболеваниями в Самарской области в 2019-2024 гг.». При этом установлено, что в регионах РФ, при освоении финансовых, кадровых и организационных ресурсов национального проекта по борьбе со злокачественными новообразованиями, необходимо особое внимание уделять программам первичной профилактики рака толстой кишки, печени и желчного пузыря; организации комплексных программ скрининга колоректального рака; а также активному проведению программ ранней диагностики и эффективного лечения рака желудка, поджелудочной железы, печени, пищевода и желчного пузыря.

#### Благодарность

*Авторы выражают благодарность за помощь в обработке статистического материала программистам Самарского ракового регистра — Ершову А.А., Лутковскому А.В., Шарафутдинову А.Г., Лысовой Н.А., Вишняевой М.Г.*

#### Acknowledgments

*The authors would like to thank the programmers of the Samara Cancer Registry for their help in processing the statistical material — A.A. Ershov, A.V. Lutkovsky, A.G. Sharafutdinov, N.A. Lysova, M.G. Vizhnyeva.*

#### Информация о конфликте интересов

*Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.*

#### Information about conflicts of interest

*Authors declare lack of the possible conflicts of interests*

#### Финансирование

*Исследование не имело спонсорской поддержки.*

#### Financing

*The study did not have sponsorship.*

### ЛИТЕРАТУРА

1. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. v.1.0 [Internet]. IARC CancerBase №11. [cited 2020 25 August]. Available from: <https://publications.iarc.fr/Databases/Iarc-Cancerbases/GLOBOCAN-2012-Estimated-Cancer-Incidence-Mortality-And-Prevalence-Worldwide-In-2012-V1.0-2012>.
2. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена- филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019:250 [Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2018 godu (zabolevaemost' i smertnost'). Ed by Kaprin A.D., Starinskii V.V., Petrova G.V. Moscow: MNI OI im. P.A. Gertsena- filial FGBU «NMITs radiologii» Minzdrava Rossii; 2019:250 (In Russ.)].
3. Петрова Г.В., Каприн А.Д., Грецова О.П., Старинский В.В. Злокачественные новообразования в России. Обзор статистической информации за 1993-2013гг./ под общей редакцией чл.-корр.РАН, проф. А.Д.Каприна, проф. В.В. Старинского. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ» Минздрава России, 2015:511 [Petrova G.V., Kaprin A.D., Gretsova O.P., Starinskii V.V. Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii. Obzor statisticheskoi informatsii za 1993-2013gg. Kaprin A.D., Starinskii V.V., editors. Moscow: MNI OI im. P.A. Gertsena — filial FGBU «NMITs» Minzdrava Rossii. 2015:511 (In Russ.)].
4. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена- филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. 2018:250 [Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2016 godu (zabolevaemost' i smertnost'). Ed by Kaprin A.D., Starinskii V.V., Petrova G.V. Moscow: MNI OI im. P.A. Gertsena- filial FGBU «NMITs radiologii» Minzdrava Rossii; 2018:250 (In Russ.)].
5. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность)/ Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена- филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. 2018:250 [Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2017 godu (zabolevaemost' i smertnost'). Ed by Kaprin A.D., Starinskii V.V., Petrova G.V. Moscow: MNI OI im. P.A. Gertsena- filial FGBU «NMITs radiologii» Minzdrava Rossii. 2018:250 (In Russ.)]
6. Федеральный проект «Борьба с онкологическими заболеваниями» [Federal'nyi proekt «Bor'ba s onkologicheskimi zabolevaniyami» (In Russ.)] [Internet]. Ministry of health of the Russian Federation. [updated 2019 July 16; cited 2020 August 24]. Available from: <https://minzdrav.gov.ru/poleznye-resursy/natsproektzdravoohranenie/onko>
7. Двойрин В.В., Аксель Е.М. Компонентный анализ динамики заболеваемости злокачественными новообразованиями. Методические рекомендации. М., 1987:11 [Dvoirin V.V., Aksel' E.M. Komponentnyi analiz dinamiki zabolevaemosti zlokachestvennyimi novoobrazovaniyami. Metodicheskie rekomendatsii. Moscow. 1987:11 (In Russ.)].
8. Мерабишвили В.М. Выживаемость онкологических больных.- Санкт-Петербург: ООО «Фирма КОСТА». 2006:440 [Merabishvili V.M. Survival of cancer patients. Saint-Petersburg: ООО «Firma KOSTA». 2006:440 (In Russ.)].

9. Мерабишвили В.М. Выживаемость онкологических больных. Выпуск второй, часть I /под ред. проф. Ю.А.Щербука. СПб: ООО «Фирма КОСТА». 2011:332 [Merabishvili V.M. Survival of cancer patients. 2d Issue. Part I. Shcherbuk Yu.A., editor. Saint-Petersburg. 2011:332 (In Russ.)].
10. Bray F., Colombet M., Mery L. et al. Cancer Incidence in Five Continents, Vol. XI (electronic version). Lyon: International Agency for Research on Cancer. 2017. Available from: <https://ci5.iarc.fr>.
11. Egorova A., Orlov A. Analysis of cancer morbidity in the Samara region (Russia) in the period 2008 to 2012. In: Cancer registration: from data generation to decision-making: Proceedings of the 40th annual scientific meeting International Association of Cancer Registry; 2018 November 13-15; Arequipa, Peru. IACR; 2018: 128.
12. Егорова А.Г., Юсупов Р.Н., Орлов А.Е., Сомов А.Н. Оценка качества оказания медицинской помощи больным колоректальным раком в Самарской области / Материалы V Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2019». СПб. 2019: 251 [Egorova A.G., Yusupov R.N., Orlov A.E., Somov A.N. Otsenka kachestva okazaniya meditsinskoi pomoshchi bol'nym kolorektal'nym rakom v Samarskoi oblasti. (Conference proceedings). In: Proceedings of the V Peterburgskii mezhdunarodnyi onkologicheskii forum «Belye nochi 2019»; 2019 June 20-23; Saint-Petersburg, Russia. Saint-Petersburg; 2019: 251 (In Russ.)].
13. Егорова А.Г., Орлов А.Е., Сомов А.Н. и др. Злокачественные новообразования в Самарской области: обзор статистической информации по результатам обработки базы данных ракового регистра в 2016–2017гг. Часть I. Показатели заболеваемости, смертности и состояния медицинской помощи / под общей редакцией д.м.н. А.Е.Орлова, С.В. Козлова, д.м.н. С.А. Суслина. Саратов: ООО «Амирит». 2019:188 [Egorova A.G., Orlov A.E., Somov A.N. et al. Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Samarskoi oblasti: obzor statisticheskoi informatsii po rezul'tatam obrabotki bazy dannykh rakovogo registra v 2016–2017gg. Chast' I. Pokazately zabolevaemosti, smertnosti i sostoyaniya meditsinskoi pomoshchi. Orlov A.E., Kozlov S.V., Suslin S.A., editors. Saratov: ООО «Amirit»; 2019:188 (In Russ.)].
14. Allemani Claudia, Matsuda Tomohiro, Di Carlo Veronica et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet*. 2018; 391(10125):1023-1075. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33326-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33326-3).
15. Егорова А.Г., Орлов А.Е., Сомов А.Н. и др. Злокачественные новообразования в Самарской области: обзор статистической информации по результатам обработки базы данных ракового регистра в 2016–2017гг. Часть II. Динамика показателей выживаемости онкологических больных по 1-годовалым, 5-летним и 4-летним интервалам / под общей редакцией д.м.н. А.Е. Орлова, С.В. Козлова, д.м.н. С.А. Суслина. Самара: ООО «Амирит», 2019:520 [novoobrazovaniya v Samarskoi oblasti: obzor statisticheskoi informatsii po rezul'tatam obrabotki bazy dannykh rakovogo registra v 2016–2017gg. Chast' II. Dinamika pokazatelei vyzhivaemosti onkologicheskikh bol'nykh po 1-godichnym, 5-letnim i 4-letnim intervalam. Orlov A.E., Kozlov S.V., Suslin S.A., editors. Saratov: ООО «Amirit». 2019:520 (In Russ.)].
16. Егорова А.Г., Юсупов Р.Н., Орлов А.Е. Оценка качества оказания медицинской помощи больным раком желудка в Самарской области (международное сравнительное исследование)//Материалы X Съезда онкологов России 17-19 апреля 2019 года. Нижний Новгород. М.: Медицинское Маркетинговое Агентство. 2019:42 [Egorova A.G., Yusupov R.N., Orlov A.E. Otsenka kachestva okazaniya meditsinskoi pomoshchi bol'nym rakom zheludka v Samarskoi oblasti (mezhdunarodnoe sravnitel'noe issledovanie). In: Proceedings of the X S'ezd onkologov Rossii; 2019 April 17-19; Nizhniy Novgorod, Rossiya. Moscow: Meditsinskoe Marketingovoe Agentstvo. 2019:42 (In Russ.)].

Поступила в редакцию 03.09.2020 г.

*A.G. Egorova<sup>1</sup>, A.E. Orlov<sup>1</sup>, S.A. Suslin<sup>2</sup>*

**Justification of regional programs for the control and prevention of malignant neoplasms of the digestive system based on an international comparison of morbidity, mortality and survival rates (research based on materials from CI5 and Concord 3)**

<sup>1</sup>State Budget Healthcare Institution «Samara Regional Clinical Oncological Dispensary»,

<sup>2</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Samara State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

In the Russian Federation, in comparison with the average European indicators, mortality with malignant neoplasm of the digestive system, even against the background of low morbidity, remains high.

For the scientific substantiation and detailing of organizational measures to improve the control and prevention programs for malignant neoplasm of the digestive system, currently being carried out within the framework of the national project “Fight against cancer in 2019-2024”, using the example of one of the typical regions of the Russian Federation — the Samara region, an international assessment was carried out the quality of medical care for this group of patients. At the same time, data on patients included in the database of the Samara population cancer registry in the period 2003-2017, data on cancer patients in the Samara region for the period 2008-2012, included in Cancer Incidence in Five Continents Vol.XI, as well as data on patients with malignant neoplasms registered in the Samara region in 2010-2014 and included in the Concord 3 study. The quality of medical care was assessed for all localizations of the digestive system based on the analysis of trends in morbidity, mortality and relative survival rates.

An international study has shown that in the Samara region, in comparison with European countries, practically in all malignant neoplasms of the digestive system, with a low morbidity, high mortality and low survival are noted.

Based on the data of a reliable onco-epidemiological study carried out in accordance with international standards, it was found that in the regions of the Russian Federation, when developing the financial, human and organizational resources of the national project to combat malignant neoplasms, special attention should be paid to primary prevention programs for colon cancer, liver cancer and gallbladder; organization of comprehensive colorectal cancer screening programs; as well as active implementation of programs for early diagnosis and effective treatment of stomach, pancreas, liver, esophagus and gallbladder cancer.

Key words: malignant neoplasms of the digestive system, indicators of morbidity, mortality and relative survival

## А. Клинические исследования

© Коллектив авторов, 2021  
УДК 616.24-006  
doi: 10.37469/0507-3758-2021-67-1-59-63

Вопросы онкологии, 2021. Том 67, № 1

*Е.В. Левченко, С.М. Ергнян, В.А. Шутков, Н.Ф. Кротов, Н.Е. Левченко,  
Р.И. Юрин, А.И. Муртазин, В.И. Шабинская*

## Резекция и пластика верхней поллой вены в хирургическом и комбинированном лечении рака легкого

ФБГУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

В статье обобщен собственный опыт реконструктивных операций с резекцией и пластикой верхней поллой вены в хирургии местнораспространенного рака легкого. Подробно описаны как технические аспекты, так и методологические подходы к данному типу комбинированного вмешательства. Анализированы данные 45 пациентов, которым выполнялись краевые (21) и циркулярные (24) резекции ВПВ. В 65% случаев резекция и пластика вен сочеталась с мультиорганными резекциями других анатомических структур грудной полости. 87% получали комбинированное лечение в различных вариантах. Послеоперационные осложнения составили 40%, летальность — 13%. Отрицательными факторами послеоперационного прогноза оказались пожилой возраст, пневмонэктомия, сочетание ангиопластики вены с циркулярной резекцией бифуркации трахеи. 5-летняя выживаемость составила 18,5%, медиана жизни  $19,4 \pm 4,6$  мес. Результаты работы позволяют рекомендовать выполнение подобных операций в узкоспециализированных клиниках, имеющих большой опыт трахеобронхоангиопластических операций и высокий уровень анестезиологии и реанимации. Мультимодальная терапия позволяет достичь удовлетворительных отдаленных результатов.

**Ключевые слова:** рак легкого, комбинированные операции, резекция верхней поллой вены

### Введение

Опухолевое поражение верхней поллой вены (ВПВ) на протяжении долгих лет считалось противопоказанием к хирургическому лечению. Вовлечение в опухолевый процесс ВПВ и ее притоков чаще происходит при опухолях тимуса, раке легкого (РЛ), метастатическом поражении лимфоузлов средостения. С одной стороны, выраженное местное распространение опухоли предполагает плохой прогноз заболевания, с

другой — техническая сложность реконструкции поллой вены и ее притоков чревата высоким риском периоперационных осложнений, что ставило под сомнение целесообразность попытки хирургического лечения таких пациентов [1, 14]. Первые сообщения об успешной пластике ВПВ принадлежат Carlson HA, Klassen KP [7, 8]. В настоящее время публикации о резекции и пластике ВПВ в онкологической практике насчитывают десятки операций, редко превышая 100 наблюдений в одной клинике [2, 11]. Развитие хирургической техники и анестезиологического пособия за последние декады позволило значительно снизить риски осложнений при подобных вмешательствах, в частности, таких как нарушение мозгового кровообращения, тромбоз и инфекция в области сосудистых протезов [14]. Согласно публикациям авторов, обладающих опытом таких операций, имеются приемлемые цифры 5-летней выживаемости, однако частота послеоперационных осложнений и летальности имеют большой разброс, последняя может достигать 20% и более [1, 2, 3, 4, 9, 14].

Объем резекции и вариант реконструкции зависит от степени вовлечения вены. При ограниченном поражении (менее 1/2 окружности вены) представляется возможным частичная краевая резекция ВПВ с ушиванием сосудистым швом или с использованием сосудистых степлеров. В случаях инфильтрации более 50% окружности ВПВ или брахицефальных вен требуется тотальное протезирование ВПВ, в том числе в некоторых случаях, с использованием экстралюминального шунта, установленного между левой брахицефальной веной и правым предсердием. Осложненное течение заболевания, включая выраженный синдром сдавления ВПВ, не рассматривается как абсолютное противопоказание к хирургическому лечению, а скорее является показанием при отсутствии альтернативных вариантов терапии [1, 3, 4, 5, 14]. Что касается рака легкого, есть отобранная группа пациентов с НМРЛ, которым целесообразны обширные комбинированные реконструктивные операции

при поражении ВПВ. Предикторами удовлетворительных ближайших и отдаленных результатов считаются: отсутствие поражения лимфоузлов N2, отсутствие циркулярного прорастания опухоли в ВПВ, полная R0 резекция, выполнение объема легочной резекции — меньше пневмонэктомии [11, 14].

Технические и методологические аспекты данного вопроса требуют дальнейшего анализа на большом клиническом материале.

## Материал и методы

За период с 1998 по 2020 гг. в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России 45 пациентам с НМРЛ выполнены различные варианты резекции и реконструкции ВПВ и брахицефальных вен. Средний возраст больных составил  $61,9 \pm 7,6$  (46-75) лет. Мужчин было 41, женщин — 4. Морфологически опухоль была представлена следующими типами: плоскоклеточный рак у 35 (77,8%), аденокарцинома — у 8 (17,8%), диморфный рак — у 1 (2,2%), карциноид — у 1 (2,2%).

По стадиям заболевания (TNM, 8th ed.) больные НМРЛ распределены: ПВ — 1 (2,2%), ПИА — 14 (31,1%), ППВ — 26 (57,8,1%), IV — 4 (8,9%) пациентов. Предоперационная уточняющая диагностика включала компьютерную томографию грудной клетки и брюшной полости с контрастом, эхокардиографию, МРТ головного мозга, остеосцинтиграфию или ОФЭКТ КТ скелета, в отдельных случаях ПЭТ КТ всего тела с глюкозой. Особенностью предоперационной диагностики у этих пациентов является оценка функционального состояния, определяемого осложненным течением, в том числе степенью выраженности синдрома сдавления ВПВ, тромбозом в ее бассейне, а также затрудненная оценка резектабельности в силу локализации и степени распространения опухолевого процесса и параканкрозных изменений. Клинические проявления рака легкого имелись у 41 (91%), среди них у 14 (31%) синдром сдавления ВПВ различной степени выраженности. КТ признаки тромбоза вен бассейна ВПВ выявлены в 7 (15,6%) случаях. Комбинированное или комплексное лечение в различных режимах получили 39 (86,7%) пациентов. Индукционная терапия проведена 24 (61,5%) из них.

Все операции выполнены без применения искусственного кровообращения. Доступ — преимущественно боковая торакотомия в 4-м межреберье, в 2 случаях — полная продольная стернотомия, в одном случае — стерноторакотомия. Три пациента оперированы после ранее перенесенной торакотомии — в объеме эксплоративной в 2 случаях и верхней лобэктомии в одном. Средняя продолжительность операции составила  $312 \pm 57$  мин, средний объем кровопотери —  $852 \pm 83$  мл. Обеспечение центрального венозного доступа осуществлялось катетеризацией бедренных вен. Аппарат Cell-saver для реинфузии аутокрови применен в 7 случаях. В 9 (20%) случаях оперативные вмешательства можно было расценивать как «хирургию отчаяния».

Все пациенты имели правостороннюю локализацию опухоли, центральный рак — легкого был у 39 (86,7%) пациентов, периферический — у 6 (13,3%). Вовлечение ВПВ в опухолевый процесс происходило наиболее часто — 80% (36) при перибронхиальном росте опухоли верхнедолевого бронха с распространением на главный и/или трахеобронхиальный угол, прямой инвазии периферической опухоли S1/S3 сегментов — 6,7% (3) и прорастании лимфогенных метастазов в стенку вены — 13,3% (6). Наиболее часто опухолевая инвазия вены была зарегистрирована в области задней стенки первичной опухолью или метастатическими

лимфоузлами групп 4R,2R,10. Необходимость резекции и пластики верхней полый или брахицефальных вен оценивалась после широкой медиастиномии, перикардотомии, иссечения адвентиции сосуда в пределах интактных тканей и лигирования непарной вены. При вовлечении в опухолевый процесс стенки непарной вены резецировалась ее дуга с лигированием I-II межреберных вен и моноблочным иссечением в блоке с опухолью и резецируемыми структурами. Оценку состояния структур корня легкого и объем резекции легкого производили после мобилизации опухолевого компонента в области ВПВ или ее притоков и выполнения ангиопластического этапа операции (рис. 1, 2).

Из 45 вмешательств с резекцией ВПВ краевая резекция вены произведена у 21 больного при интимном подрастании опухоли, метастатических или параканкрозно измененных лимфоузлов к стенке сосуда, не позволяющих мобилизовать ее на безопасном и/или абластичном расстоянии, вовлечении не более 1/3 окружности сосуда. Иссечение стенки сосуда и формирование сосудистого линейного шва производилась после пережатия сосуда в дистальном и проксимальном направлении от участка резекции. Инвазия или прорастание стенки более 1/3 окружности сосуда являлось показанием к циркулярной резекции вены с ее протезированием. В 22 случаях выполнено аллопротезирование сосуда синтетическими сосудистыми протезами из политетрафторэтилена. Использовались сосудистые протезы фирмы Goretex, Vascutek диаметром от 10 до 18 мм. В 2 случаях пластика полый вены выполнена лоскутом аутоперикарда, сформированным интраоперационно в виде трубчатого трансплантата диаметром, соответствующим диаметру вены. Анастомозирование производилось между каудальный и краниальный (конфлюенсом) культями полый вены в 14 случаях, между краниальной культей полый вены и ушком правого предсердия 4 в случаях, между одним из плечеголовных стволов и ушком правого предсердия — в 2 случаях. У 2 больных в связи с прогрессирующим синдромом сдавления ВПВ выполнена шунтирующая операция без удаления опухоли — протез установлен между левой плечеголовной веной и ушком правого предсердия. Циркулярные сосудистые анастомозы формировались непрерывным обвивным швом проленовой нитью 5-0 на атравматической игле. Во всех случаях сосудистые зажимы накладывались на расстоянии 1,5-2,0 см от видимых границ поражения. Сосуд отсекался на расстоянии 3-5 мм от края зажима. В первую очередь формировался краниальный анастомоз, далее — каудальный. Среднее время пережатия полый вены во время протезирования составило  $23,7 + 5,2$  мин. Средняя протяженность длины резецированной вены составила  $6,5 + 1,9$  см (min — 2,5, max — 8,6). После протезирования зажимы снимались, проверялась герметичность анастомозов и геометрическая адекватность протеза.

Ангиопластика ВПВ и ее притоков сочеталась с лобэктомией в 14 случаях, с билобэктомией в 5, пневмонэктомией в 24. Распространение опухолевого процесса на смежные органы и выраженный параканкрозный процесс явились показанием к резекции других анатомических структур — перикарда, левого предсердия, правого предсердия, легочной артерии, бифуркации трахеи, мышечной стенки пищевода. Мультиорганный характер резекций имел место у 28 (65,1%) больных. В 22 случаях резекция и пластика ВПВ (10 протезирование, 12 краевых резекций) сочеталась с циркулярной резекцией карины трахеи.

Статистическая обработка материала проводилась на ПК с помощью стандартного пакета STATISTICA 12. Использовались параметрические и непараметрические методы статистического анализа. Непосредственные результаты лечения оценивались по частоте и структуре осложнений, госпитальной летальности и их причин. Отдаленные результаты лечения оценивались по медиане выживаемости и безрецидивного периода, 3-х и 5-летней общей выживаемости.

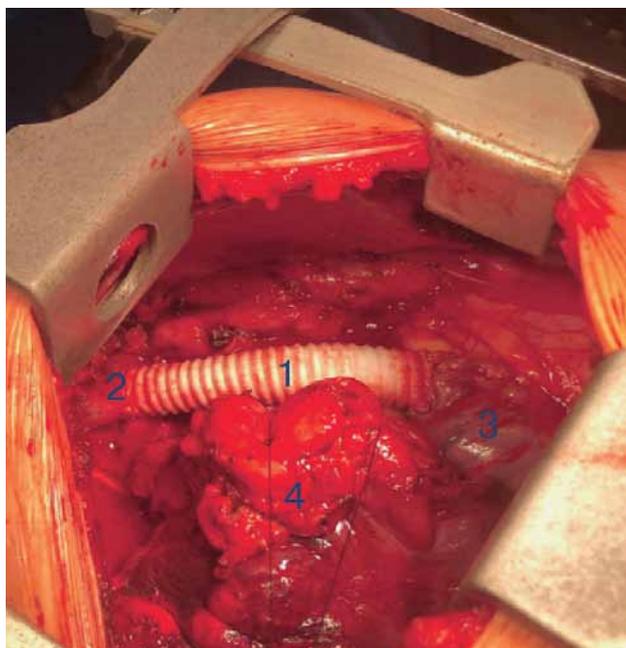


Рис. 1. Интраоперационное фото. Этап резекции и пластики ВПВ (сформированы анастомозы сосудистого протеза с конфлюенсом ВПВ и ушком правого предсердия). Примечание: 1 — сосудистый протез ВПВ, 2 — конфлюенс ВПВ, 3 — правое предсердие, 4 — мобилизованный блок опухоли с правым легким

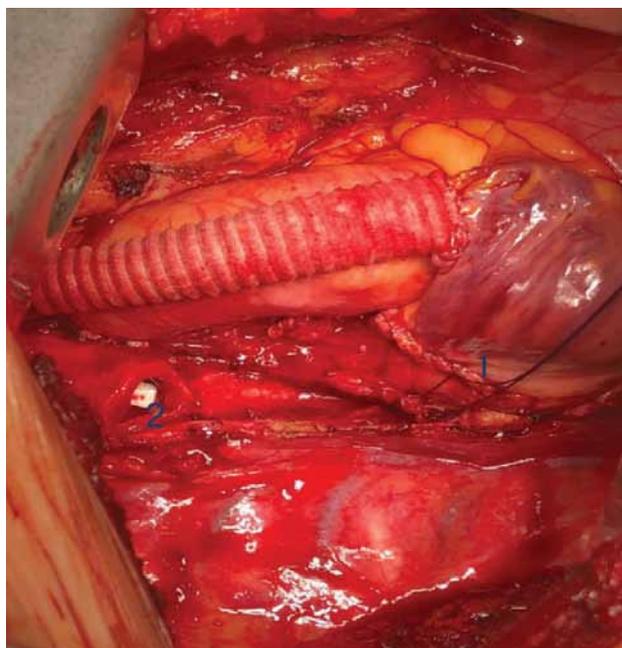


Рис. 2. Вид операционного поля после пневмонэктомии справа, резекции обоих предсердий и пластики ВПВ. Примечание: 1 — шов на предсердиях, 2 — культя правого главного бронха

Таблица 1. Осложнения и летальность после операций с резекцией и пластикой ВПВ

Осложнения	Пневмонэктомия		Лоб(билоб)эктомия	
	осложнения	летальность	осложнения	летальность
Пневмония, РДС, дыхательная недостаточность	4	3	1	-
Нарушения сердечного ритма	2			
Гемотрансфузионный шок	1	1		
Аррозивное кровотечение из легочной артерии			1	1
Несостоятельность трахеобронхиального анастомоза	3	-	-	
Тромбоз сосудов бассейна впв	1	-	2	-
Сердечно-сосудистые нарушения	1		1	
ДВС синдром	1	1		
Всего:	13	5	5	1

### Результаты

Характер операций: R0 резекция произведена в 39 (87%) случаев R1 в 4 (9%) R2 в 2 (4%).

Послеоперационные осложнения различной сложности развились в 40% (18) случаев. Среди них преобладали пневмонии, дыхательная недостаточность, нарушения сердечного ритма, несостоятельность трахеобронхиальных анастомозов. Зафиксировано 3 случая тромбоза в венах из бассейна ВПВ (плечеголовные, яремные, подключичные) после ее протезирования (12,5%) , в одном из них после паллиативной операции — с тромбированием синтетического протеза, однако во всех случаях на фоне консервативной терапии наступила реканализация сосудов без влияния на исход лечения. Других проблем со стороны сосу-

дистых швов и анастомозов (перекрут, кровотечение, стеноз и т.д.) не отмечено. Частота осложнений была достоверно чаще после пневмонэктомий по сравнению с лоб(билоб)эктомиями — 54,2% (13) против 26,3% (5),  $\chi^2 = 5,5$   $p=0,02$ .

Послеоперационная 30-дневная летальность составила 13,3% (6). Всем этим пациентам выполнялись обширные мультиорганные резекции, протезирование полых вен у 3. Причины летальности у 5 пациентов, перенесших одномоментную кардинальную резекцию (пневмонэктомия — 4, верхняя билобэктомия — 1) — гемотрансфузионный шок — 1, аррозивное кровотечение из легочной артерии — 1, пневмония и дыхательная недостаточность, сопряженная с несостоятельностью трахеобронхиальных анастомозов — 3. Одна пациентка после пневмонэктомии

с протезированием ВПВ и одномоментной резекцией левого предсердия умерла на фоне массивной кровопотери и ДВС синдрома. Таким образом, 5 из 6 погибших оперированы в объеме комбинированной мультиорганной пневмонэктоми, 1 — в объеме комбинированной мультиорганной билобэктомии. Ни в одном случае летальный исход не был связан с проблемами со стороны сосудистых швов и анастомозов. После лоб(билоб)эктomieй смертность составила 5,2% (1), после пневмонэктomieй — 20,8% (5),  $\chi^2 = 6,7$  ( $p=0,004$ ). Смертность после операций в сочетании с каринальной резекцией и без нее составила 22,7% (5) против 4,3% (1),  $x^2 = 8,1$  ( $p=0,001$ ).

Для оценки вклада каждого из факторов, значимо влияющих на непосредственные результаты лечения, нами применена логистическая регрессия (Logistic regression, Statistica 12).

**Таблица 2. Шкала оценки факторов риска развития осложнений ( $p=0,03$ )**

Предикторы	Коэффициент регрессии $\beta$
Пол	0,2
Возраст	2,1
Объем операции	2,4
Мульти-резекции	1,65
Индукционная терапия	1,1
Вариант резекции ВПВ	0,9
Объем кровопотери	0,7

Регрессионный анализ подтвердил значимость таких факторов как возраст, объем операции и мультиорганной характер резекции ( $\beta > 1,5$ ). Отрицательными факторами послеоперационного прогноза оказались пожилой возраст, пневмонэктоми, сочетание ангиопластики вены с циркулярной резекцией бифуркации трахеи.

Отдаленные результаты лечения закономерно отражали выживаемость больных при местнораспространенном раке легкого. Прослежена судьба 34 пациентов. Мы исключили из анализа 2 пациентов, которым выполнялось только шунтирование без радикальной операции, которые прожили 9 и 15 мес. Более 5 лет прожили 8, еще 6 пациентов живы без прогрессирования менее 5 лет. От прогрессирования опухолевого процесса умерло 13 человек, от неуточненных причин — 7. Рецидив заболевания происходил в большинстве случаев в течение 2-х лет после операции. Внутригрудные рецидивы достоверно диагностированы у 2 больных, в остальных случаях имело место отдаленное метастазирование. Пациенты с прогрессированием заболевания направлялись на системную терапию.

Медиана жизни выписанных из стационара больных составила  $19,4 \pm 4,6$  мес. 3-летняя выживаемость составила 33,7%, 5-летняя — 18,5%.

Качество жизни пациентов определялось прежде всего объемом выполненной легочной резекции. Пластика полой вены или перевязка одной брахицефальной вены не ухудшали качество жизни и функциональный прогноз заболевания.

## Обсуждение

Резекция и пластика ВПВ и ее притоков при раке легкого осуществимы без применения искусственного кровообращения в узкоспециализированных клиниках с высоким уровнем торакальной онкохирургии, анестезиологического пособия и реанимационного сопровождения. Техническая сложность, высокие риски периоперационных осложнений и летальности обусловлены выраженным местнорегионарным распространением опухоли с вовлечением смежных анатомических структур грудной клетки, требующих выполнения мультиорганной резекции, в том числе бронхоангиопластических, трахеобронхоангиопластических вмешательств. Показания к подобным вмешательствам могут носить urgentный характер, а неэффективность или невозможность проведения консервативной терапии могут являться составляющими при формировании показаний к «хирургии отчаяния». С другой стороны, мультимодальный подход к лечению данных пациентов, безусловно, остается ведущим фактором в получении удовлетворительных отдаленных результатов. Преобладание среди данной категории больных с ППВ стадией определяет необходимость строго отбора кандидатов для хирургического лечения с учетом известных факторов прогноза непосредственных и отдаленных результатов лечения. Результаты нашей работы указывают на возможность увеличения выживаемости больных НМРЛ, относящихся к ППВ стадии (по 8-й TNM) при условии применения всех вариантов современного комбинированного лечения. Об этом свидетельствуют так же литературные данные тех немногочисленных клиник, опыт которых позволяет оценить отдаленные результаты таких хирургических вмешательств [3, 5, 6, 11, 14]. Однако они пока остаются в ранге нестандартных, не включенных в рекомендации для рутинного применения в онкологической практике. На наш взгляд, тезис о необходимости исключения из кандидатов к хирургии пациентов с N2 bulky статусом представляется оспоримым, поскольку во многих случаях резекция и пластика ВПВ производится именно при прорастании метастатическими медиастинальными лимфоузлами. Проведение индукционной терапии позволяет оперировать в абластичных условиях, о чем свидетельствует высокий процент полных резекций в нашей когорте больных. Согласно работам, обобщенным L. Spaggiari et al. [11], в отношении

отдаленных результатов индукционная терапия с радикальной операцией представляется предпочтительней консервативной терапии. Данные рандомизированного исследования (RTOG 9309) указывают на достоверное увеличение безрецидивной выживаемости и медианы жизни, а также двухкратное увеличение 5-летней общей выживаемости (22 vs 11%) в группе больных с III стадией, получивших трехмодальную терапию по сравнению с группой химиолучевой терапии [6]. В консервативной терапии III стадии лучшие результаты обеспечиваются конкурентной химиолучевой терапией, однако медиана жизни после нее в среднем составляет 10–15 мес., а 5-летняя выживаемость не превышает 8–16%. [6,12,13]. При этом можно полагать, что в исследуемых когортах включены в том числе потенциально резектабельные пациенты. В любом случае, гетерогенность больных с местнораспространенным раком легкого не позволяет делать однозначные выводы в отношении предпочтительной тактики у той иной категории подобных больных. Это обусловлено, в том числе, тем, что критерии резектабельности имеют широкие границы в зависимости от конкретной клиники и опыта хирургов. При накоплении и метаанализе подобного опыта в дальнейшем удастся успешно оптимизировать как показания, так и критерии отбора пациентов для хирургических вмешательств данного типа.

### Выводы

1. Комбинированные операции с резекцией и пластикой ВПВ являются одним из сложнейших видов хирургических вмешательств в лечении рака легкого. Мультимодальная терапия является обязательным в лечении пациентов с инвазией ВПВ и ее притоков, обеспечивая абластичность хирургического вмешательства и возможность влияния на результаты отдаленной выживаемости.

2. Выполнение подобных операций представляется возможным в узкоспециализированных клиниках, имеющих большой опыт трахеобронхоангиопластических операций и высокий уровень анестезиологии и реанимации. Маршрутизация в специализированные региональные или федеральные центры подобного уровня может способствовать уменьшению неоправданных отказов в хирургическом лечении у потенциально операбельных больных.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Бисенков Л.Н. Хирургия далеко зашедших и осложненных форм рака легкого. СПб: Гиппократ. 2006:431 [Bisenkov L.N. Surgery for advanced and complicated forms of lung cancer. SPb, Hippokrat. 2006:431 (In Russ.)].
2. Ергнян С.М., Левченко Е.В., Барчук А.С. Комбинированные оперативные вмешательства при раке легкого

с инвазией крупных сосудов и предсердия. Вестник хирургии имени И.И. Грекова. 2010; 171(1):97-101 [Ergnyan S.M., Levchenko E.V., Barchuk A.S. Combined surgical interventions for lung cancer with invasion of great vessels and left atrium. Vestnik Chirurgii named I. I. Grekov. 2010; 171(1):97-101 (In Russ.)].

3. Порханов В.А., Поляков И.С., Кононенко В.Б. и др. Операции при местнораспространенном немелкоклеточном раке легкого с инвазией в верхнюю полую вену. Онкохирургия. 2008;1:125 [Porkhanov V.A., Polyakov I.S., Kononenko V.B. et al. Operations for locally advanced non-small cell lung cancer with vena cava superior invasion. Oncochirurgia. 2008; 1:125 (In Russ.)].
4. Тарасов В.А., Ставровицкий В.В., Побегалов Е.С. и др. Техника резекции и реконструкции магистральных вен в хирургии внутригрудных злокачественных опухолей. Торакальная хирургия. 2007;10:23-26 [Tarasov V.A., Stavrovetsky V.V., Pobegalov E.S. et al. Technique of resection and reconstruction of magistral veins in surgery of intra-thoracic malignant tumors. Thoracalnaya chirurgia. 2007;10:23-26 (In Russ.)].
5. Тарасов А.С., Богданович А.Ю., Литвинов И.А. и др. Резекция и протезирование верхней полой вены при солидных злокачественных опухолях грудной клетки. Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования. 2011;3(2):26-31 [Tarasov A.S., Bogdanovich A.Yu., Litvinov I.A. et al. Resection and prosthetics of the superior vena cava in solid malignant chest tumors. Bulletin of the Saint Petersburg medical Academy of postgraduate education. 2011;3(2):26-31 (In Russ.)].

Поступила в редакцию 29.09.2020 г.

*E.V. Levchenko, S.M. Ergnyan, V.A. Shutov,  
N.F. Krotov, N.E. Levchenko, R.I. Yurin, A.I. Murtazin,  
V.I. Shabinskaya*

### Superior vena cava resection and plastic repair as a part of surgical and combined treatment of lung cancer

FSBI «Petrov Research Institute of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint Petersburg

This article summarizes our own experience of reconstructive operations with resection and plastic repair of the superior vena cava in the field of locally advanced lung cancer surgery. Both technical aspects and methodological approaches of this type of combined interventions are described in detail. Data from 45 patients who underwent wedge (21) and circular (24) superior vena cava resections were analyzed. In most (65%) cases, venous resection and reconstruction were combined with multi-organ resections of other anatomical structures of the chest cavity. 87% of patients received combined treatment in different directions. Postoperative complications were registered in 40% of cases, and the mortality rate was 13%. The unfavorable postoperative prognostic factors were followings: old age, pneumonectomy, combination of vein angioplasty with carinal resection. The 5-year survival rate was 18.5%, with a median survival of 19.4 + 4.6 months. The results allow us to recommend such operations in highly specialized clinics that have extensive experience in tracheobronchial angioplastic surgery and highly-qualified anesthesia care providers. Multimodal treatment allows to achieve satisfactory long-term results.

Key words: lung cancer, extended surgery, superior vena cava resection

*К.В. Вабалайте, А.Ф. Романчишен*

## **Эффективность интраоперационного мониторинга добавочных нервов при операциях на шее**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» (СПбГПМУ) Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

Цель исследования явилось изучение эффективности и безопасности интраоперационного нейромониторинга (ИОНМ) добавочных нервов (ДН) в ходе боковых шейных лимфаденэктомий (БШЛАЭ).

**Материал и методы.** Основная группа исследования — 63 больных раком щитовидной железы (РЩЖ) с подтверждением метастатического поражения лимфатических узлов II-V групп шеи, и у которых предпринят ИОНМ ДН во время БШЛАЭ. Группа контроля — 60 больных, у которых ИОНМ ДН во время БШЛАЭ не проводился. В основной группе был 21 (33,3%) мужчина и 42 (66,7%) женщины, средний возраст  $50,7 \pm 8,7$  лет. В контрольной группе мужчин — 11 (18,2%), женщин — 49 (81,8%), средний возраст —  $47,2 \pm 6,8$  лет.

**Результаты.** У всех больных основной исследуемой группы получен ответ на электрическое раздражение ДН во время проведения ИОНМ.

Клинически у больных основной группы: в 58 (92,1%) наблюдениях без изменений; в 4 (6,3%) случаях — умеренная боль при подъеме и отведении верхней конечности в срок до двух недель после операции; у 1 (1,6%) пациентки — временное затруднение отведения руки в плечевом суставе до 90°. В контрольной группе: в 5 (8,3%) наблюдениях — повреждение ДН, проявлявшееся в виде отсутствия сокращения трапецевидной мышцы в ответ на электрическое раздражение нерва; в 12 (20%) наблюдениях — боли при подъемах и отведениях верхних конечностей с соответствующих сторон в сроки до 3-4 недель после операций.

**Заключение.** ИОНМ ДН является безопасным и эффективным способом снижения частоты повреждения ДН, что доказано уменьшением нарушений функции верхних конечностей с 13,3% до 1,6% в период с 2000 до 2020 гг. в сочетании с усовершенствованиями органосохраняющей техники операций.

**Ключевые слова:** рак щитовидной железы, интраоперационный нейромониторинг, добавочный нерв

### **Введение**

Рак щитовидной железы (РЩЖ) является самой частой онкологической патологией органов эндокринной системы и составляет 75–80%. Основным способом лечения больных дифференцированными формами (папиллярная, фолликулярная, медулярная) РЩЖ является хирургический. Однако единого мнения в выборе объема хирургических вмешательств на железе, лимфатическом аппарате шеи и применении дополнительных методов лечения в настоящее время нет [1].

Остается дискуссионной тактика лечения больных с клинико-морфологическими признаками регионарного метастазирования РЩЖ. Метастатическое распространение РЩЖ в лимфатические узлы шеи и средостения встречается в 30–80% наблюдений. Тиреоидные карциномы чаще распространяются в лимфатические узлы пре- и паратрахеальной зоны, трахеопищеводной борозды (VI группа), боковой поверхности шеи (II–V группы) и средостения (VII группа). По данным разных авторов [2, 3] частота реализации метастазов в лимфатических узлах II–V групп составляет до 40%. В соответствии с Российскими клиническими рекомендациями, стандартом Американской тиреоидной ассоциации, Национальной всеобщей онкологической сети (National Comprehensive Cancer Network) всем пациентам РЩЖ с цитологически доказанным поражением лимфатического аппарата шеи показана центральная и боковая шейная лимфаденэктомия (БШЛАЭ).

G.W. Crile (1906) первым разработал и начал регулярно применять шейную лимфаденэктомию при метастазах рака органов головы и шеи [4]. Кроме ЩЖ он рекомендовал удалять мышцы шеи, яремную вену и добавочный нерв. Существенными недостатками подобных операций можно назвать косметические дефекты после удаления мышц боковой поверхности шеи и расстройство функции верхней конечности, проявляющиеся ограни-

чением отведения плеча. Причиной нарушения функции плеча является атрофия трапециевидной мышцы из-за травмы добавочного нерва (ДН), что было названо синдромом «висящего плеча» (рис. 1). В дальнейшем был предложен «щитовидный» вариант операции Крайла [5, 6]. Другие названия этого варианта операции: «Modified Radical Neck Dissection (модифицированная радикальная диссекция шеи), «центральная (VI группа шейных лимфоузлов) и боковая лимфаденэктомия» (иссечение II-VII групп шейных и верхней части медиастинальных лимфатических узлов с окружающей клетчаткой с сохранением грудино-ключично-сосцевидной мышцы, подчелюстных лимфатических узлов и слюнной железы, глубокой яремной вены, ДН).

Приоритетом онкохирургии последних лет является достижение приемлемых функционального и эстетического результатов операций вместе с избавлением больного от опухоли. В настоящее время для выполнения БШЛАЭ в нашей клинике чаще применяется доступ Mac Fee [7] или А.Ф. Романчишена [8, 9].

Интраоперационный нейромониторинг (ИОНМ) возвратных гортанных нервов в России, в частности впервые в Санкт-Петербургском Центре эндокринной хирургии и онкологии, применяется с 2000 г. Сочетание глубоких знаний топографической анатомии головы и шеи, опытность оператора и применение ИОНМ обеспечили значительное улучшение результатов хирургического лечения.

Исследования эффективности и безопасности ИОНМ ДН в начале 2000-х гг. единичны [10, 11]. Ряд авторов лишь сообщает о возможности использования ИОНМ ДН [12, 13, 14]. У. Berinci, А. Genc, М.С. Ecevit et al. (2014) сообщили об ИОНМ ДН лишь у 20 больных РЩЖ. Авторами не были представлены анатомические основы использования ИОНМ ДН, но отметили эффективность методики [12, 13]. Следовательно, вопрос о применении ИОНМ ДН у больных РЩЖ остается не до конца изученным. Наша работа была направлена на сравнение частоты послеоперационных осложнений с применением ИОНМ ДН и без него.

Целью исследования явилось изучение эффективности и безопасности интраоперационного нейромониторинга добавочных нервов (ИОНМ ДН) в ходе боковых шейных лимфаденэктомий (БШЛАЭ).

## Материал и методы

С 2000 г. на кафедре госпитальной хирургии Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета (Санкт-Петербургского Центр

хирургии и онкологии органов эндокринной системы — руководитель — д.м.н. профессор А.Ф. Романчишен) применяется ИОНМ ДН в ходе БШЛАЭ.

Показанием для выполнения БШЛАЭ служило наличие морфологического подтверждения метастазов РЩЖ по результатам тонкоигольной аспирационной биопсии. Больные, которым по показаниям выполнялась профилактическая БШЛАЭ, в настоящее исследование не вошли.

В исследование включены 63 больных РЩЖ с подтвержденным метастатическим поражением лимфатических узлов II-V групп шеи, из них 56 — пациенты папиллярным РЩЖ, 4 — фолликулярным РЩЖ, 3 — медуллярным РЩЖ. Всем больным выполнялась БШЛАЭ с одной (48) или двух (15) сторон с применением ИОНМ ДН. Инвазия РЩЖ в ДН являлась критерием исключения. В исследуемой группе мужчин было 21 (33,3%), женщин — 42 (66,7%), средний возраст  $50,7 \pm 8,7$  лет. Классификация клинических наблюдений по стадиям опухолей осуществлялась в соответствии с последним, восьмым изданием «AJCC. Cancer Staging Manual» 2017 г. Интратиреоидное распространение карцином у больных основной группы было следующим: опухоли размерами T1 выявлены у 2 пациентов, T2 — у 4, T3 — у 48, T4 — у 9. Метастазы РЩЖ у больных основной группы чаще выявлялись в IV (44 наблюдения) и III (43 случая) группах шейных лимфатических узлов, реже — во II (37 больных) и V (9 пациентов) группах<sup>1</sup>. 18 пациентов основной группы в разные сроки наблюдения получали лечение радиоактивным йодом.

60 больным контрольной группы ИОНМ ДН не проводился. Папиллярный РЩЖ диагностирован у 52 пациентов указанной группы, реже встречался фолликулярный (4 случая) и медуллярные (4 наблюдения) РЩЖ. В контрольной группе было мужчин 11 (18,2%), женщин — 49 (81,8%) средним возрастом  $47,2 \pm 6,8$  лет. Интратиреоидное распространение карцином было следующим: опухоли размерами T1 выявлены у 2 пациентов, T2 — у 3, T3 — у 45, T4 — у 10. Метастазы РЩЖ у больных контрольной группы чаще выявлялись в IV (43 наблюдения) и III (41 случай) группах шейных лимфатических узлов, реже — во II (35 больных) и V (8 пациентов) группах<sup>2</sup>. 20 пациентов основной группы в разные сроки наблюдения получали лечение радиоактивным йодом.

Таким образом, обе клинические группы были сопоставимы по основным показателям (морфологической структуре РЩЖ, интратиреоидному распространению опухоли, полу, возрасту и времени послеоперационного наблюдения).

При выполнении БШЛАЭ выделялся сосудисто-нервный пучок шеи. Фасциальный футляр (париетальный листок IV фасции шеи) продольно рассекался от ключицы до основания черепа. Клетчатка и паравасальные лимфатические узлы разделялись на наружную и внутреннюю группы. При удалении наружной части клетчатки особое внимание уделялось сохранению целостности ДН (сверху вниз), блуждающего нервов, диафрагмального, плечевого сплетения, симпатического ствола, ветвей глубокой яремной вены и сонной артерии, грудного лимфатического протока, подключичной вены. ДН выходил из черепа и опускался вдоль внутренней яремной вены, проходил через грудино-ключично-сосцевидную мышцу (ГКСМ) и делился на 2 ветки. Одна из них опускалась вниз в толще ГКСМ и иннервировала ее, вторая — в области наружного треугольника шеи образовывала дугу, идущую от заднего края ГКСМ к трапециевидной мышце и иннервировала ее (рис. 2).

<sup>1</sup> Примечание: общее количество превышает 60, так как у большинства пациентов были метастазы в несколько групп шейных лимфатических узлов.

<sup>2</sup> Примечание: общее количество превышает 60, так как у большинства пациентов были метастазы в несколько групп шейных лимфатических узлов.

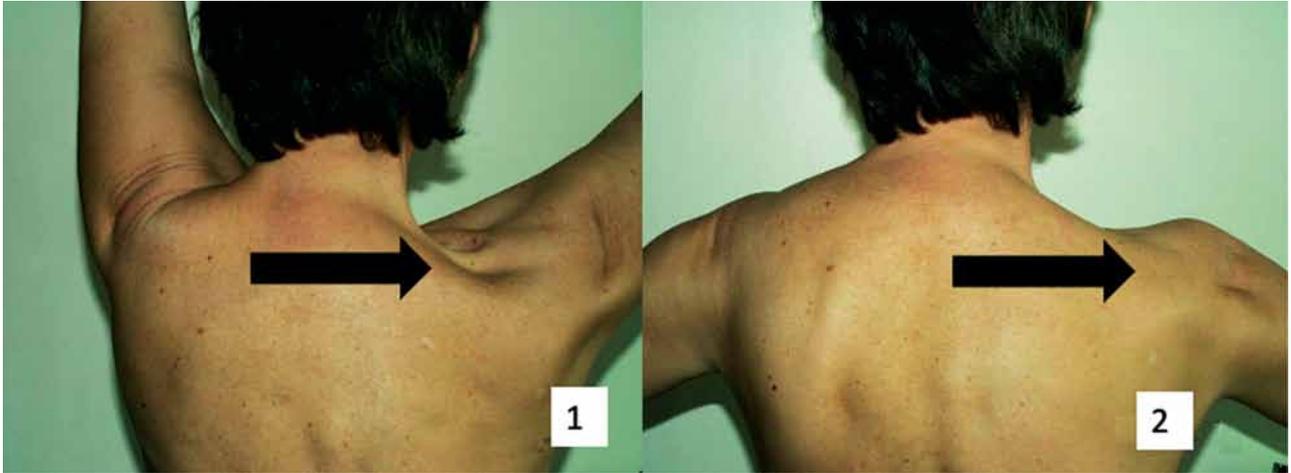


Рис. 1. Синдром «висячего плеча» при повреждении добавочного нерва и атрофии трапециевидной мышцы: 1 — правая рука поднята вверх, 2 — правая рука опущена вниз. Стрелка указывает на трапециевидную мышцу

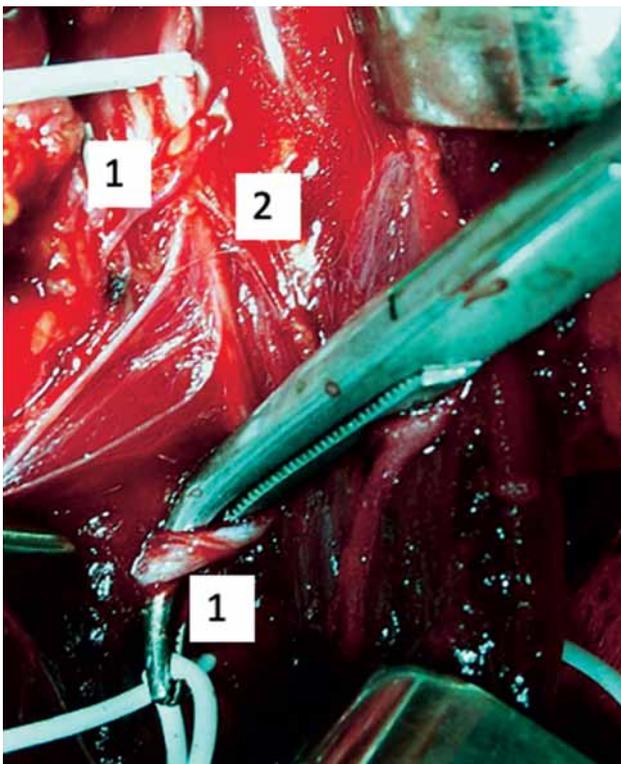


Рис. 2. Интраоперационное выделение добавочного нерва: 1 — добавочный нерв, 2 — грудинно-ключично-сосцевидная мышца

Для ИОНМ ДН использовался аппарат NIM 3,0 фирма Medtronic. Регистрация потенциала мышечного сокращения осуществлялась игольчатыми электродами. Электроды были установлены в трапециевидную мышцу на уровне седьмого шейного позвонка на 5 и 7 см латеральнее средней линии спины по 2 электрода со стороны хирургического вмешательства. Нейтральный электрод вводили в мышцу плеча (рис. 3).

Во время операции применяли импульсы тока силой в 0,25 миллиампер (мА). Это позволило зарегистрировать сокращения трапециевидной мышцы и сохранить информацию на мониторе прибора и бумажном носителе. ДН выделялся от места его выхода из яремного отверстия до входа в ГКСМ, где проводилась стимуляция ДН первый раз монополярным стимулятором. В области наружного треугольника шеи, где ДН проходил от заднего края ГКСМ к трапециевидной мышце, выполнялся ИОНМ ДН второй раз. В конце БШЛАЭ проводили ИОНМ ДН третий раз.

Статистическая обработка материала и расчеты показателей проведены с использованием Microsoft Excel, Statistica for Windows v.10 и SPSS v.21. Непрерывные переменные сравнивали с использованием Т-критерия Стьюдента или U-критерия Манна-Уитни, категориальные переменные сравнивали с использованием Хи-квадрата Пирсона или точного критерия Фишера. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

Мы изучали движение в плечевом суставе на стороне операции до операции, в первые сутки после вмешательства, через 1 неделю, 1 месяц.

Для оценки качества жизни использован опросник «SF-36 Health Status Survey».

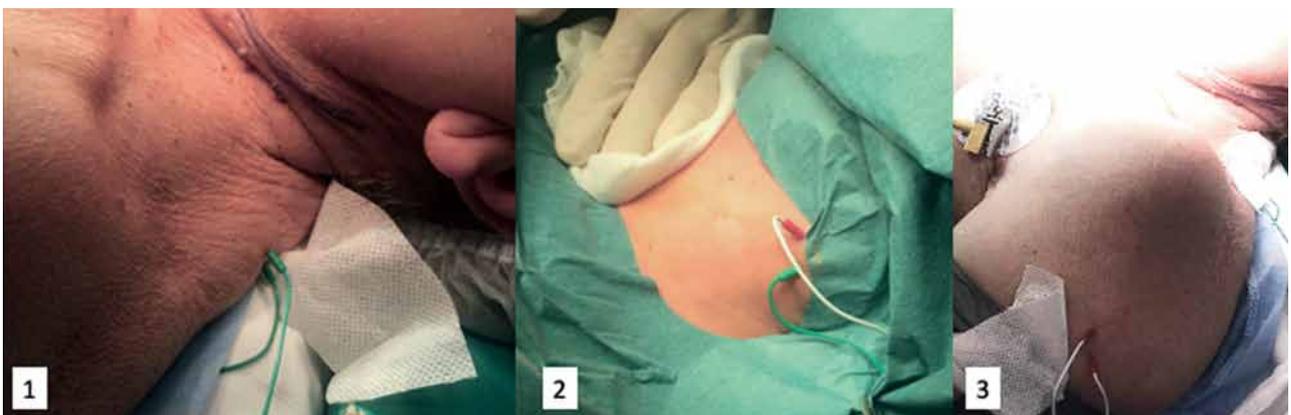


Рис. 3. Расположение электродов для интраоперационного нейромониторинга добавочного нерва: 1 — в трапециевидной мышце, 2 — в грудинно-ключично-сосцевидной мышце, 3 — в дельтовидной мышце (нейтральный электрод)

## Результаты

У больных исследуемой группы был получен ответ во время ИОНМ ДН. Средняя амплитуда сокращения трапециевидной мышцы при первом нанесении раздражения составила 1480 (531-2320) мВ, в конце операции — 680 (328-864) мВ.

У двух больных на протяжении 15 минут после 4 раздражений ДН с положительным ответом мышц амплитуда сокращения была 0 мВ. После этой небольшой паузы ответ на раздражение получен. Данная негативная реакция объяснялась «усталостью» нервно-мышечной передачи.

У 58 (92,1%) больных клинических изменений функции плечевого сустава отмечено не было (движения были безболезненными и в полном объеме). Умеренную боль при подъеме и отведении верхней конечности отмечали 4 (6,3%) пациентов, симптомы купированы в течение двух недель после операции. Транзиторное нарушение отведения руки в плечевом суставе имелось у 1 (1,6%) больного.

В 8 (13,3%) наблюдениях контрольной группы зафиксировано повреждение ДН ( $p < 0,05$ ), проявившиеся затруднением движений плечевого сустава (отсутствием возможности самостоятельно поднять и отвести руку в плечевом суставе на стороне поражения до 90 градусов). Указанное осложнение привело к ухудшению качества жизни пациентов. 12 (20%) больных указали на боль при подъеме и отведении верхней конечности в срок до 3–4 недель после операции.

## Обсуждение

До применения ИОНМ ДН сообщалось [15, 16] о высокой частоте повреждения ДН, которое клинически проявлялось синдромом «висячего плеча». В. Leizing et al. (1986) при анализе лечения 109 больных РЩЖ с регионарными метастазами сообщили, что при выделении и сохранении ДН, грудинно-ключично-сосцевидной мышцы и внутренней яремной вены у 30% больных выявлено изменение подвижности плеча [16]. При выполнении операции Крайла подобное осложнение зафиксировано у 60% пациентов. Аналогичные данные о повреждении ДН во время шейной лимфаденэктомии получили D. Rammler (1986) [17], L. Erisen (2004) [18], A. Kouyasioglu (2000) [19]. Некоторые исследователи [11] считают, что чаще повреждаются ДН при выполнении БШЛАЭ, чем при селективной лимфаденэктомии. Объясняют это выделением ДН на большем протяжении, в том числе в заднем треугольнике шеи, а также и сильной тракции нерва при удалении метастатически измененных лимфатических узлов.

Существуют работы, посвященные исследованию функции ДН с помощью электромиографии. L. Erisen et al. (2004) отметил, что почти нет различия в электромиограмме у пациентов, которым выделяли или не выделяли ДН во время БШЛАЭ, но клинически функция плеча была значимо лучше у больных с интраоперационным выделением ДН [18]. T. Tsuji et al. (2007) при анализе электромиограмм у 54 оперированных больных выявил, что изменений электромиограмм не было только у 5,7% пациентов, легкая нейропраксия зафиксирована у 10% больных, частичная аксональная дегенерация — у 25,7%, полная аксональная дегенерация — у 58,6% [20]. Похожие результаты получили Y. Birinci et al. (2014) [12]. J. Cappiello et al. (2005) обратил внимание, на то что при удалении V группы лимфатических узлов шеи только в 15% наблюдений не было изменений при электромиографии [21]. Если указанная группа лимфатических узлов не удалялась, подобный результат зафиксирован у 80% больных. По результатам этих исследований автор предположил, что удаление V группы шейных лимфатических узлов связано с повреждением ДН.

Несмотря на длительный опыт применения ИОМ черепно-мозговых нервов отсутствуют электрофизиологические критерии, на основании которых можно прогнозировать сохранение функции этих нервных структур. M. Grosheva et al. (2008) отметила, что снижение амплитуды более, чем на 75% от первичной при раздражении лицевого нерва, является неблагоприятным фактором [22]. Y. Birinci et al. (2014) считают, что неблагоприятным фактором постоянного нарушения функции ДН является снижение амплитуды ответа на 72% и более [13]. W.L. Witt et al. (2006, 2007) при анализе результатов двух исследований по ИОНМ ДН и послеоперационной функции плеча, пришли к выводу, что снижение нарушений функции плеча у больных при ИОНМ ДН было только у 11% пациентов [10, 11].

Мы обследовали функцию плеча в первые сутки, через 1 неделю и через месяц после операции. В послеоперационном периоде после использования ИОНМ ДН через 1 месяц нарушения функции плеча не зафиксировано, в том числе при удалении лимфатических узлов шеи V группы. Похожие данные получили Y. Birinci et al. (2014) [13]. В нашем исследовании было 2 (3,2%) наблюдения снижения амплитуды ответа при раздражении ДН, в последующем функция нерва полностью восстановилась у всех пациентов. W.L. Witt et al. (2007) в 3 (14%) случаях из 22 зафиксировали снижение амплитуды ответа ДН на раздражение и послеоперационным

нарушением функции плеча [11]. По-видимому, это связано с силой раздражения ДН, мы применяли силу тока 0,25 мА, в работе W.L. Witt et al. (2007) — 0,4 мА [11].

### Заключение

ИОНМ ДН является эффективным и безопасным лечебно-диагностическим способом, обеспечившим вместе с анатомически обоснованной техникой БШЛАЭ, значительное снижение частоты повреждения ДН с 13,3% до 1,6% в период с 2000-2020 гг.

*Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.*

### ЛИТЕРАТУРА

1. Романчишен А.Ф., Багатурия Г.О., Вабалайте К.В., Сокуренок Г.Ю. Местно-распространенный рак щитовидной железы: диагностика, лечение, отдаленные и непосредственные результаты: учебное пособие. СПб: СпецЛит, 2017: 175 [Romanchishen A.F., Bagaturija G.O., Vabalayte K.V., Sokurenko G.Ju. Mestno-rasprostranennyj rak shhitovidnoj zhelezy: diagnostika, lechenie, otdalennye i neposredstvennyye rezul'taty: uchebnoe posobie. SPb: SpecLit, 2017: 175 (In Russ.)].
2. Kim S.Y., Kim B-W., Pyo J.Y. et al. Macrometastasis in Papillary Thyroid Cancer Patients is Associated with Higher Recurrence in Lateral Neck Nodes. *World J Surg.* 2018; 42:123–129. <https://doi.org/10.1007/s00268-017-4158-5>.
3. Randolph G.W. *Surgery of thyroid and parathyroid gland.* 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013.
4. Crile G. Excision of cancer. *JAMA.* 1906; 47: 1780-1786 <https://doi.org/10.1001/jama.1906.25210220006001a>
5. Marchetta F.C., Sako K., Matsuura H. Modified neck dissection for carcinoma of the thyroid gland. *Am J Surg.* 1970; 120 (4): 452-455. [https://doi.org/10.1016/s0002-9610\(70\)80005-8](https://doi.org/10.1016/s0002-9610(70)80005-8).
6. Sako K., Marchetta F.C., Razack M.S., Shedd D.P. Modified radical neck dissection for metastatic carcinoma of the thyroid. A reappraisal. *Am J Surg.* 1985; 150 (4): 500-502. [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(85\)90163-1](https://doi.org/10.1016/0002-9610(85)90163-1).
7. MacFee W.F. Transverse incisions for neck dissection. *Plastic and Reconstructive Surgery.* 1960; 26(2):242. <https://doi.org/10.1097/00006534-196008000-00019>.
8. Романчишен А.Ф., Гостимский А.В., Мосягин В.Б. и др. Оперативные доступы в экстренной и плановой хирургии органов шеи. *Хирургия.* 2018; (5): 75-80 [Romanchishen A.F., Gostimsky A.V., Mosyagin V.B. et al. Surgical approaches in urgent and elective surgery of the neck. *Khirurgiia (Mosk).* 2018; (5):75-80. <https://doi.org/10.17116/hirurgia2018575-80> (In Russ.)].
9. Романчишен А.Ф., Вабалайте К.В., Романчишен Ф.А., Карпатский И.В. Первый опыт в России использования эстетических доступов и интраоперационного нейромониторинга возвратных гортанных и добавочных нервов при операциях по поводу рака щитовидной железы и рецидивного зоба у детей. *Педиатр.* 2017; 8 (S1): M278-M279 [Romanchishen A.F., Vabalayte K.V., Romanchishen F.A., Karpatsky I.V. Pervyi opyt v Rossii ispol'zovaniya esteticheskikh dostupov i intraoperatsionnogo neiromonitoringa vozvratnykh gortannykh i dobavochnykh nervov pri operatsiyakh po povodu raka shhitovidnoi zhelezy i retsidivnogo zoba u detei. *Pediatr.* 2017; 8 (S1): M278-M270 (In Russ.)].
10. Witt R.L., Gillis T., Pratt R, Jr. Spinal accessory nerve monitoring with clinical outcome measures. *Ear Nose Throat J.* 2006;85:540-544. <https://doi.org/10.1177/014556130608500820>.
11. Witt R.L., Rejto L. Spinal accessory nerve monitoring in selective and modified neck dissection. *Laryngoscope.* 2007; 117:776-780. <https://doi.org/10.1097/mlg.0b013e3180341a0c>.
12. Dillon F.X. Electromyographic (EMG) neuromonitoring in otolaryngology head and neck surgery. *Anesthesiol Clin.* 2010. 2010; 28:423-442. <https://doi.org/10.1016/j.anclin.2010.07.011>.
13. Birinci Y., Genc A., Ecevit M.C. et al. Spinal Accessory nerve monitoring and clinical outcome result of nerve-sparing neck dissection. *Head and Neck Surgery.* 2014; 151(2):253-259. <https://doi.org/10.1177/0194599814531021>.
14. Румянцев П.О. Интраоперационный нейромониторинг при операциях на щитовидной железе. *Эндокринная хирургия.* 2012; 6 (2):42-47 [Rumyantsev P.O. Intraoperative neuromonitoring in thyroid surgery. *Endocrine surgery.* 2012; 6 (2): 42-47. <https://doi.org/10.14341/2306-3513-2012-2-42-47> (In Russ.)].
15. Kupferman M.E., Patterson D.M., Mandel S.J. et al. Safety of modified radical neck dissection for differentiated thyroid carcinoma. *Laryngoscope.* 2004; 114: 403-406. <https://doi.org/10.1097/00005537-200403000-00002>.
16. Leipzig B., Suen J.Y., English J.L. Functional evaluation of the spinal accessory nerve after neck dissection. *Am J Surg.* 1983; 146:526-530. [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(83\)90246-5](https://doi.org/10.1016/0002-9610(83)90246-5).
17. Remmler D., Byers R., Scheetz J. et al. A prospective study of shoulder disability resulting from radical and modified neck dissections. *Head Neck Surg.* 1986;8:280-286. <https://doi.org/10.1002/hed.2890080408>.
18. Erisen L., Basel B., Irdesel J. et al. Shoulder function after accessory nerve-sparing neck dissections. *Head Neck.* 2004;26: 967-971. <https://doi.org/10.1002/hed.20095>.
19. Koybasioglu A., Tokcaer A.B., Uslu S. et al. Accessory nerve function after modified radical and lateral neck dissections. *Laryngoscope.* 2000;110:73-77. <https://doi.org/10.1097/00005537-200001000-00014>.
20. Tsuji T., Tanuma A., Onitsuka T. et al. Electromyographic findings after different selective neck dissections. *Laryngoscope.* 2007;117:319-322. <https://doi.org/10.1097/01.mlg.0000249781.20989.5c>.
21. Cappiello J., Piazza C., Giudice M. et al. Shoulder disability after different selective neck dissections (levels II-IV versus levels II- V): a comparative study. *Laryngoscope.* 2005; 115:259-263. <https://doi.org/10.1097/01.mlg.0000154729.31281.da>.
22. Grosheva M., Wittekindt C., Guntinas-Lichius O. Prognostic value of electroneurography and electromyography in facial palsy. *Laryngoscope.* 2008;118:394-397. <https://doi.org/10.1097/mlg.0b013e31815d8e68>.

Поступила в редакцию 07.05.2020 г.

*K.V. Vabalayte, A.F. Romanchishen*

### **Effectiveness of spinal accessory intraoperative nerve monitoring during neck dissections**

Federal State Budgetary Educational Institution  
of Higher Education «Saint Petersburg State Pediatric  
Medical University» Ministry of Healthcare  
of the Russian Federation,  
St. Petersburg

The aim of the study is to evaluate the efficiency and safety of intraoperative neuromonitoring (IONM) of accessory nerves during lateral lymphodissection (LLD).

**Materials and Methods.** Main group consisted of 63 patients with thyroid cancer (TC) with confirmed metastatic spread into cervical lymph nodes of II-V groups, and which underwent IONM of accessory nerve during LLD. Control group consisted of 60 patients in which no IONM was performed during LLD. Main group consisted of 21 males (33.3%); 42 females (66.7%); mean age  $50.7 \pm 8.7$ . Control group consisted of 11 males (18.2%); 49 females (81.8%); mean age  $47.2 \pm 6.8$ .

**Results.** All patients of main group responded to electric stimulation of accessory nerve during IONM. 58 (92.1%) patients did not present new symptom, whereas 4 (6.3%) noted a moderate pain while lifting and stretching the upper extremity during two weeks. In 1 (1.6%) — temporary difficulty in arm abduction up to  $90^\circ$  was observed. In control group, in 5 (8.3%) — damage to accessory nerve was found which manifested as lack of contraction of trapezius muscle in response to electric stimulus. In 12 (20%) — pain during lifting and abduction of upper extremity on respective side was observed up to 3-4 weeks after surgery.

**Conclusions.** IONM of accessory nerve is a safe and effective way to reduce probability of accessory nerve damage, which, together with improvement in organ-preserving techniques, is demonstrated by decrease of functional loss in upper extremities from 13.3% to 1.6% during the period from 2000 to 2020.

**Key words:** thyroid cancer, intraoperative neuromonitoring, spinal accessory nerve

*М.С. Князева<sup>1,2,3</sup>, Л.М. Забегина<sup>1,2,3</sup>, Е.И. Сидина<sup>1</sup>, А.А. Карицкий<sup>4</sup>, Е.В. Цырлина<sup>1</sup>,  
А.С. Артемьева<sup>1</sup>, И.В. Кузнецова<sup>5</sup>, С.Л. Воробьев<sup>5</sup>, А.В. Малек<sup>1,2</sup>*

## Особенности профиля экспрессии микроРНК ткани анапластического рака щитовидной железы

<sup>1</sup>ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург,

<sup>2</sup>ООО «Онко-система», Москва,

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург,

<sup>4</sup>Университет ИТМО, Санкт-Петербург,

<sup>5</sup>ООО «Национальный центр клинической морфологической диагностики», Санкт-Петербург

Развитие злокачественных образований из фолликулярного эпителия щитовидной железы (ЩЖ) сопровождается специфическими изменениями профиля экспрессии внутриклеточных микроРНК. Оценка этих изменений находит практическое применение в ходе первичной или дифференциальной диагностики узловых образований ЩЖ. Анапластический рак ЩЖ (АРЩЖ) является относительно редкой формой заболевания, характеризуется злокачественным течением и высокой летальностью. Исследование роли микроРНК в процессе развития АРЩЖ создает основу для разработки новых диагностических и лечебных подходов. Цель исследования: анализ профиля экспрессии микроРНК в ткани АРЩЖ, идентификация микроРНК потенциально вовлеченных в патогенез заболевания. Материалы и методы: в исследование были включены образцы ткани АРЩЖ (n.20) и образцы нормальной ткани ЩЖ (n.22), анализ уровня экспрессии 85 опухоль-ассоциированных микроРНК был проведен методом ОТ-ПЦР. Результаты: в клетках АКЩЖ активирована экспрессия miR-375, miR-1246 и miR-21, снижена экспрессия miR-Let7b, miR-125b и miR-181a. Выводы: Дальнейшие исследования роли микроРНК в карциногенезе АРЩЖ необходимы для разработки новых подходов к диагностике и терапии этого заболевания.

**Ключевые слова:** анапластический рак щитовидной железы, микроРНК

### Введение

МикроРНК — короткие молекулы РНК, регулирующие экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. Важное значение микроРНК в развитии различных форм злокачественных новообразований щитовидной железы (ЩЖ) было показано в ряде отечественных [1] и зарубежных исследований [2, 3]. На стадии

внедрения в клиническую практику находятся несколько методов дифференциальной диагностики узловых образований ЩЖ, основанных на микроРНК-профилировании (Rosetta GXReveal, Rosetta Genomics) или комбинации анализа соматических мутаций и микроРНК (ThyGenX/ThyraMIR, Interpace diagnostics). Существующие решения позволяют дифференцировать различные варианты папиллярных и фолликулярных новообразований ЩЖ и повышать точность дооперационной диагностики [4].

Анапластический рак щитовидной железы (АРЩЖ) относится к редким опухолям с очень агрессивным течением. Эффективных способов лечения анапластической карциномы не существует, и это заболевание практически неизменно приводит к летальному исходу. На долю АРЩЖ приходится около 2% от всех злокачественных опухолей щитовидной железы и от 14 до 39% летальных исходов [5]. Медиана выживаемости с момента установления диагноза АРЩЖ составляет от 3 до 7 мес., 1- и 5-летний уровни выживаемости — 17 и 8% соответственно [6]. Согласно существующим представлениям АРЩЖ может возникать “de novo”, но по нашим данным в подавляющем большинстве случаев (более 80%) в ткани агрессивной опухоли удается обнаружить участки из предшествующих неоплазий (фолликулярная аденома, высокодифференцированная фолликулярная карцинома, папиллярная карцинома) и, как правило, эти опухоли с признаками Гюртле-клеточной дифференцировки [7]. Риск развития АРЩЖ повышается при наличии в ткани щитовидной железы очагов патологической пролиферации (аденомы) или наследственных синдромов (Гарднера, Каудена, синдромы МЭН 2А и 2В и др.) [6, 8]. В ткани АРЩЖ обнаруживается широкий спектр мутаций, включая мутации характерные для более частых форм РЩЖ (TP53 — 54%, (H-K-N)RAS — 43%, BRAF гена — 13,8%, PI3K-AKT — 17%) [9]. Эти данные указывают на высокую степень

генетической нестабильности клеток АРЦЖ, которая безусловно имеет связь с высоким потенциалом злокачественности.

Подозрение на АРЦЖ возникает в первую очередь на основании клинической картины — прогрессивного роста узлов щитовидной железы [10]. Диагноз ставится после цитологического или гистологического исследования. Но с учетом злокачественного характера течения заболевания, в подавляющем большинстве случаев имеющиеся терапевтические средства оказываются неэффективны. В этой связи актуальным становится необходимость поиска и внедрения в клиническую практику новых методов ранней диагностики АРЦЖ. В качестве потенциальных молекулярных маркеров заболевания, которые могут быть детектированы в биопсийном материале или в циркулирующей крови, рассматривают генетические мутации (изменения структуры ДНК), эпигенетические изменения (появление участков аномального гипометилирования), молекулярные маркеры стволовых клеток и изменения профиля экспрессии микроРНК [11].

По сравнению с обилием публикаций на тему особенностей профиля экспрессии микроРНК в клетках фолликулярных и папиллярных форм РЩЖ [12], участие микроРНК в развитии АРЦЖ исследовано слабо. В ряде работ описаны экспрессионные изменения отдельных молекул, оценка которых проводилась в образцах ткани АРЦЖ или в клеточных культурах. Например, экспрессия miR-125b miR-30a подавлена [13, 14], а экспрессия miR-483 — активирована [15] в клетках АРЦЖ. Для некоторых молекул (miR-144, miR-27b) показано участие в регуляции ответа клеток АРЦЖ на цитостатическую терапию [16, 17]. Очевидно, углубление имеющихся знаний, получение и анализ новых данных об участии микроРНК в развитии АРЦЖ необходимы для разработки новых подходов к диагностике и/или терапии этого заболевания.

## Материалы и методы

*Выделение РНК из образцов ткани.* В исследовании были использованы архивные образцы ткани АРЦЖ (п. 20) и образцы нормальной ткани щитовидной железы (п. 22) от пациентов, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России и в ФГБУ «Национальный медико-хирургический Центр имени Н.И. Пирогова» Минздрава России за период 2008 по 2015 гг. Образцы были получены после оперативного лечения (экстирпаций ЩЖ), прошли традиционные процедуры фиксации формалином и заливки в парафин. После гистологической верификации диагноза из каждого образца (блока) было получено 8-12 срезов толщиной 5 мкм. Выделение РНК из препаратов проводилось с помощью набора RNeasy FFPE Kit (Qiagen, №73504) в соответствии с протоколом производителя. Качество и количество выделенной РНК оценивалось с помощью флуориметра Qubit 4 (Invitrogen).

Профайлинг опухоль-ассоциированных микроРНК. С целью «широкого» анализа экспрессии молекул микроРНК были приготовлены т.н. «пулы». 22 образца РНК, выделенной из здоровой ткани щитовидной железы были объединены в эквимольных количествах для получения пула «норма», аналогичным образом из 20 образцов был получен пул «АРЦЖ». Последующий анализ проводился с двумя комплексными образцами, «пулами». Для этого был использован набор реагентов, производства компании Exiqon (miScript II RT Kit, miRCURY LNA miRNA Cancer-Focus PCR Panel), который позволяет провести реакцию универсальной (не микроРНК-специфической) обратной транскрипции и последующий ПЦР в реальном времени для 85 молекул. Все реакции были проведены в соответствии с протоколом производителя.

Оценка экспрессионных изменений отдельных молекул микроРНК. С целью валидации обнаруженных при анализе «пулов» различий уровней экспрессии ряда молекул микроРНК, анализ концентрации этих молекул был проведен методом ОТ-ПЦР в каждом образце отдельно. Был использован метод микроРНК-специфичной обратной транскрипции с последующей ПЦР, впервые описанный группой чешских исследователей под руководством М. Kubista [18] и реализованной с незначительными модификациями в виде набора для количественного анализа микроРНК (AL-miR, ООО «Альгимед-Техно, Минск). Набор для анализа каждой микроРНК содержал «two-tailed» праймер для обратной транскрипции, праймеры для ПЦР, флуоресцентный ПЦР зонд и ферментные смеси. Исследования были проведены в соответствии с протоколом производителя.

Анализ данных: анализ результатов микроРНК профайлинга был проведен путем простого сравнения значений Ct, полученных при анализе «пулов» РНК. Результаты, полученные при анализе экспрессии выбранных молекул в индивидуальных образцах РНК были нормализованы относительно значения Ct, среднего для каждого образца, по стандартной методике подсчета  $dCt (2^{Ct(average)-Ct(miR)})$ . После этого определялось среднее значение Ct для групп «АРЦЖ» и «Норм. ЩЖ», статистическая значимость разницы этих значений оценивалась с помощью U-критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test). Поиск оптимальных соотношений относительных концентраций двух молекул с разнонаправленными изменениями уровней экспрессии был проведен с использованием специально разработанного программного решения для частичной автоматизации процесса обработки данных. С его помощью для всех возможных пар молекул из исследуемого множества микроРНК (количество пар = (количество размещений), где N — количество микроРНК в исследуемом множестве) высчитывались относительные концентрации и значение AUC, а также проводилась оценка диагностической значимости каждой пары с помощью построения ROC-кривой.

## Результаты

С целью предварительной оценки возможной разницы профиля экспрессии микроРНК в ткани АРЦЖ и ткани нормальной железы образцы РНК, выделенной из соответствующих гистологических препаратов, были объединены в равных долях в т.н. «пулы». Такой подход обеспечил достаточное количество материала для проведения «профайлинга» экспрессии таких молекул микроРНК, которые имеют доказанное отношение к развитию онкологических заболеваний. Использованный набор реактивов предполагал анализ 85 молекул микроРНК.

В проведенном эксперименте хотя бы в одном из пулов была детектирована экспрессия только 41 молекулы из 85 (АРЦЖ и норм.ЩЖ). Для нормализации результатов для данных по каждому «пулу» было подсчитано среднее значение, затем результат по каждой микроРНК был нормализован относительно среднего значения. На рис. 1 схематично представлены результаты: так уровень экспрессии ряда молекул совпадал или отличался не существенно в образцах нормальной ткани щитовидной железы и АРЦЖ (miR-126-3p, miR-150-5p, miR-214-3p, miR-223-3p, miR-26a-5p — обозначены зеленым цветом), уровень экспрессии ряда анализируемых молекул существенно отличался между двумя «пулами». В частности, в ткани АРЦЖ была детектирована сниженная экспрессия miR-let7b-5p, miR-125b-3p и miR-181a и повышенная экспрессия miR-21-5p, miR-375-3p и miR-1246-3p по сравнению с нормальной тканью щитовидной железы (рис. 1). Определенная разница уровня экспрессии наблюдалась также для других молекул микроРНК, но с учетом отсутствия возможности оценки статистической значимости, полученные данные могли быть расценены лишь как предварительные и нуждались в валидации.

Для получения статистически значимых результатов оценки уровня экспрессии нескольких потенциально «маркерных» молекул микроРНК, анализ относительной концентрации таких молекул был проведен во всех образцах РНК, полученных из ткани АРЦЖ (n. 20) и ткани нормальной железы (n.22). Результаты представлены на рис. 2. Так, экспрессия miR-21-5p, miR-375-3p и miR-1246-3p была статистически значимо выше в группе образцов ткани АРЦЖ по сравнению с группой образцов нормальной ткани щитовидной железы. Обратная ситуация наблюдалась относительно miR-let7b-5p, miR-125b-3p и miR-181a. Экспрессия этих молекул в клетках опухоли была ниже, чем в клетках нормальной ткани щитовидной железы. Представленные данные отражают возникающие в процессе развития АРЦЖ изменения уровня экспрессии и, вероятно, функциональной активности, нескольких молекул микроРНК.

Эти результаты являются усредненными для двух клинических групп, но их трудно экстраполировать на ситуацию анализа биопсийного материала конкретного пациента с быстро растущим узловым образованием щитовидной железы. В нескольких ранних исследованиях нами был предложен метод подбора и анализа так называемых «реципрокных пар» микроРНК [19, 20]. Принцип этого подхода заключается в поиске пар молекул, для которых характер-

ны разнонаправленные изменения уровней экспрессии. Например, в клетках АРЦЖ можно предполагать сочетанное угнетение экспрессии miR-125b-3p и активацию экспрессии miR-21-5p, но для проверки этого предположения необходимо определить соотношение концентраций двух молекул во всех анализируемых образцах и оценить корреляцию этого параметра (Ratio) с гистологическим диагнозом. В рамках данного исследования был разработан и автоматизирован алгоритм поиска таких «реципрокных микроРНК пар», при этом диагностическая значимость каждой возможной пары оценивалась путем ROC анализа распределения значений параметра Ratio в двух группах образцов: АРЦЖ и норм. ЩЖ. Так, например, соотношение концентраций двух молекул miR-21 и miR-125b позволяет уверенно дифференцировать АРЦЖ и нормальную ткань щитовидной железы: AUC = 0.99, чувствительность = 95.45%, специфичность = 92.86%. Аналогичные показатели диагностической значимости для пары miR-375/miR-125b составили: AUC = 0.97, чувствительность = 90.91%, специфичность = 100%, для пары miR-375/Let7b: AUC = 0.95, чувствительность = 90.91%, специфичность = 85.71%, соответственно. ROC-кривые для данных трех пар представлены на рис. 3.

### Обсуждение

АРЦЖ — относительно редкая опухоль, на долю которой приходится лишь 1-2% от всех злокачественных новообразований щитовидной железы [21]. Это объясняет тот факт, что количество исследований молекулярных особенностей этой опухоли несоизмеримо мало по сравнению с количеством работ, сфокусированных на более дифференцированных вариантах РЦЖ. Но анализ даже столь ограниченного числа релевантных публикаций выявил совпадение полученных данных по некоторым молекулам микроРНК. Так, например, в недавней работе было показано угнетение экспрессии miR-125b в клетках ткани АРЦЖ и клеточных линиях [13]. Авторы этого исследования изучали биологические эффекты наблюдаемого снижения активности miR-125b и продемонстрировали, что мишенью негативной регуляции miR-125b является белок семейства фосфоинозитол-3-киназ (PI3K), который стимулирует двигательную активность и повышает инвазивность клеток АРЦЖ. Таким образом, следствием снижения концентрации miR-125b является патологическая активация PI3K, опосредующая высокий потенциал инвазивного роста АРЦЖ. В другой работе было показано, что следствием угнетения экспрессии микроРНК

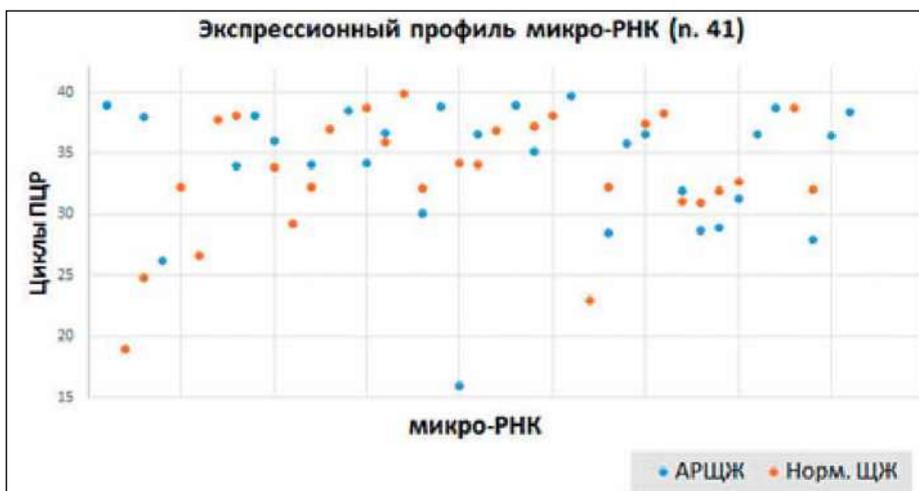


Рис. 1. Экспрессионный профиль 41 молекулы микроРНК определенным методом ОТ-ПЦР в двух «пулах» образцов РНК, выделенной из здоровой ткани щитовидной железы (оранжевый) и выделенной из ткани АРЦЖ (голубой)

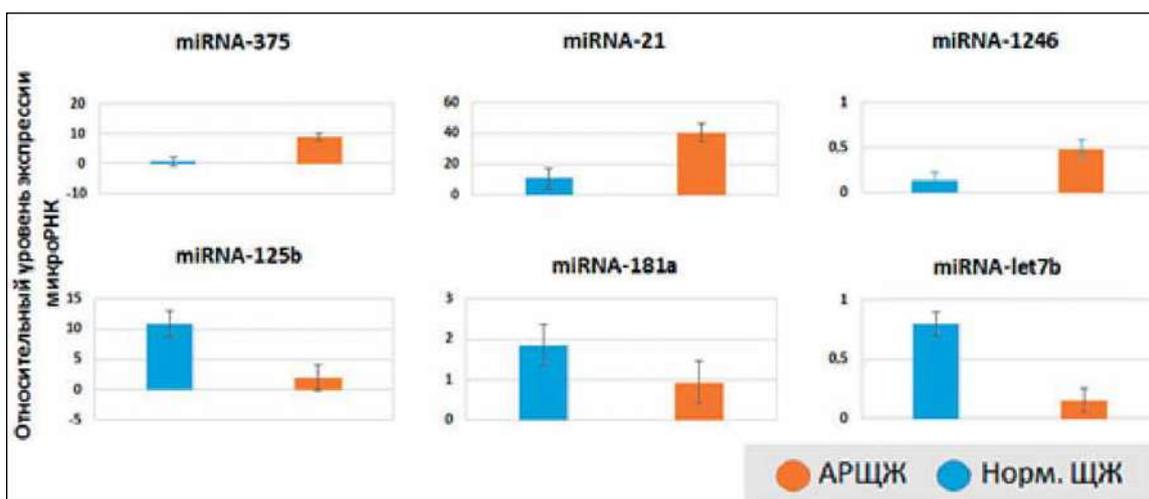


Рис. 2. Результаты анализа экспрессии микроРНК в образцах нормальной ткани ЩЖ (n. 22) и образцах ткани АРЦЖ (n. 20). Результаты нормализованы в рамках каждого образца, затем вычислены средние значения для двух клинических групп. Оценка статистической значимости проведена с помощью метода Манна–Уитни;  $p < 0,5$  (\*);  $p < 0,05$  (\*\*);  $p < 0,005$  (\*\*\*)

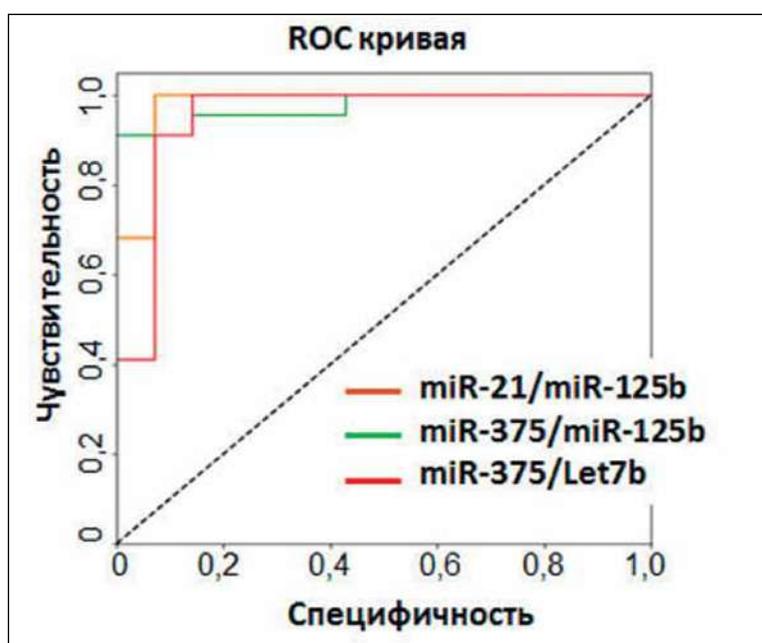


Рис. 3. Оценка диагностической значимости «реципрокных пар» микроРНК (параметра Ratio) в материале гистологических образцов (парафиновых блоков) ткани АРЦЖ (n. 20) и образцов нормальной ткани щитовидной железы (n. 22) с помощью построения ROC-кривой

Let7b в клетках различных вариантов РЩЖ, включая АРЩЖ, является ре-активация синтеза ядерного фактора HMGA2 [22]. В норме этот белок активен лишь в период эмбрионального развития, в клетках взрослого организма его синтез угнетается, но ре-экспрессия HMGA2 наблюдается в различных опухолях [23, 24], включая РЩЖ [25]. Повышение концентрации и функциональной активности miR-21 в клетках АРЩЖ было показано в ряде публикаций [26-28]. Результаты анализа экспрессии других микроРНК в клетках АРЩЖ не нашли подтверждения в литературе. Так, в нашей работе впервые показано, что в клетках АРЩЖ активирован синтез miR-375 и miR-1246, и угнетена экспрессия miR-181a. Дальнейшие исследования необходимы для понимания роли этих молекул в канцерогенезе АРЩЖ.

Высокая летальность АРЩЖ определяет как несвоевременной диагностикой, так и низкой эффективностью стандартных методов лечения. Поэтому новые данные о молекулярных особенностях этого типа опухоли должны анализироваться с точки зрения возможностей разработки новых методов ранней диагностики и новых терапевтических подходов. В контексте разработки новых диагностических подходов особый интерес представляют различные варианты так называемой «жидкостной биопсии» [29]. С учетом крайне агрессивного характера опухоли, морфологическая или молекулярная диагностика биопсийного материала на этапе макроскопического узла является «a priori» поздней в случае АРЩЖ. Среди различных стратегий жидкостной биопсии наибольший интерес исследователей концентрируется на разработке методов детекции специфических мутаций в пуле свободно-циркулирующей ДНК [30]. Результаты таких исследований позволяют пока лишь предлагать методы стратификации пациентов с определенными мутациями (т.н. «druggable target»), диагностический потенциал методов анализа циркулирующей ДНК пока не понятен. Перспективной представляется разработка методов анализа циркулирующих нано-везикул, в частности оценка состава везикулярных микроРНК [1, 31]. К настоящему моменту опубликованы результаты нескольких исследований, посвященных разработке методов диагностики дифференцированных форм РЩЖ. Актуальность разработки аналогичного подхода к проблеме ранней диагностики АРЩЖ представляется очевидной.

Исследование микроРНК-опосредованных механизмов формирования агрессивного фенотипа клеток АРЩЖ открывает перспективы разработки новых терапевтических подходов

[12]. Пока лишь в экспериментальных условиях было показано, что активация экспрессионной активности или введение в клетки АРЩЖ синтетических аналогов «tumor-suppressive» молекул микроРНК (miR-599, miR-128, miR-544, miR-34b, miR-125b [13, 32-35] может иметь терапевтический потенциал. Модификации состава микроРНК в клетках АРЩЖ может также рассматриваться как стратегия повышения их чувствительности к традиционным цитостатикам [16, 17]. Интересным подходом представляется технология редактирования генома (CRISPR/Cas9), позволяющая стабильно инактивировать экспрессию про-опухолевых микроРНК (так называемых «онко-миР») в клетках АРЩЖ [36].

В целом исследование роли микроРНК в развитии АРЩЖ ведется активно в различных лабораториях и исследовательских центрах, что позволяет надеяться на улучшение показателей летальности этой, к счастью редкой, формы рака щитовидной железы.

### Заключение

Профиль экспрессии микроРНК в клетках АРЩЖ имеет характерные отличия от профиля экспрессии микроРНК в клетках нормальной ткани щитовидной железы. В частности, в клетках АКЩЖ активирована экспрессия miR-375, miR-1246 и miR-21, снижена экспрессия miR-Let7b, miR-125b и miR-181a.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Samsonov R., Burdakov V., Shtam T. et al.: Plasma exosomal miR-21 and miR-181a differentiates follicular from papillary thyroid cancer. *Tumour Biol.* 2016; 37(9):12011-12021.
2. Nikiforova M.N., Chiosea S.I., Nikiforov Y.E. MicroRNA expression profiles in thyroid tumors. *Endocr Pathol.* 2009; 20(2):85-91.
3. Nikiforov Y.E. Role of Molecular Markers in Thyroid Nodule Management: Then and Now. *Endocr Pract.* 2017; 23(8):979-988.
4. Sciacchitano S., Lavra L., Olivieri A. et al. Comparative analysis of diagnostic performance, feasibility and cost of different test-methods for thyroid nodules with indeterminate cytology. *Oncotarget.* 2017; 8(30):49421-49442.
5. Seshadri K.G. Anaplastic Cancer of the Thyroid: The Viper in the Pit. *Indian J Endocrinol Metab.* 2019; 23(1):1-2.
6. Haddad R.I., Lydiatt W.M., Ball D.W. et al. Anaplastic Thyroid Carcinoma, Version 2.2015. *J Natl Compr Canc Netw.* 2015; 13(9):1140-1150.
7. Воробьев С.В.: Морфологическая диагностика заболеваний щитовидной железы (цитология для патологов, патология для цитологов), СПб: КОСТА; 2014:104.
8. Smallridge R.C., Copland J.A. Anaplastic thyroid carcinoma: pathogenesis and emerging therapies. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2010; 22(6):486-497.

9. Bonhomme B., Godbert Y., Perot G. et al. Molecular Pathology of Anaplastic Thyroid Carcinomas: A Retrospective Study of 144 Cases. *Thyroid*. 2017; 27(5):682-692.
10. Кореньюк В.А., Сосновский В.А., Мануилова А.А. et al.: Клинико-морфологический анализ анапластического рака щитовидной железы Молодой ученый. 2018; 16:31-32.
11. Bozorg-Ghalati F., Hedayati M.: Molecular Biomarkers of Anaplastic Thyroid Carcinoma. *Curr Mol Med*. 2017; 17(3):181-188.
12. Pishkari S., Paryan M., Hashemi M. et al. The role of microRNAs in different types of thyroid carcinoma: a comprehensive analysis to find new miRNA supplementary therapies. *J Endocrinol Invest*. 2018; 41(3):269-283.
13. Bu Q., You F., Pan G. et al. MiR-125b inhibits anaplastic thyroid cancer cell migration and invasion by targeting PIK3CD. *Biomed Pharmacother*. 2017; 88:443-448.
14. Boufraqueh M., Nilubol N., Zhang L. et al.: miR30a inhibits LOX expression and anaplastic thyroid cancer progression. *Cancer Res*. 2015; 75(2):367-377.
15. Zhang X., Liu L., Deng X. et al. MicroRNA 483-3p targets Pard3 to potentiate TGF-beta1-induced cell migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition in anaplastic thyroid cancer cells. *Oncogene*. 2019; 38(5):699-715.
16. Liu J., Feng L., Zhang H. et al.: Effects of miR-144 on the sensitivity of human anaplastic thyroid carcinoma cells to cisplatin by autophagy regulation. *Cancer Biol Ther*. 2018; 19(6):484-496.
17. Xu Y., Han Y.F., Ye B. et al. miR-27b-3p is Involved in Doxorubicin Resistance of Human Anaplastic Thyroid Cancer Cells via Targeting Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2018; 123(6):670-677.
18. Androvic P., Valihrach L., Elling J. et al. Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification. *Nucleic acids research*. 2017; 45(15):e144.
19. Колесников Н.Н., Титов С.Е., Верякина Ю.А. и др. Повышение точности и информативности тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии опухолей молочной железы путем анализа микроРНК в материале цитологического мазка. *Успехи молекулярной онкологии*. 2016; 3(1):44-52.
20. Архангельская П.А., Самсонов Р.Б., Штам Т.А. и др. Оценка экспрессии 4 микроРНК в цитологических препаратах в качестве дополнительного метода диагностики рака шейки матки. *Опухоли женской репродуктивной системы*. 2017; 13(3):63-72.
21. Nagaiah G., Hossain A., Mooney C.J. et al. Anaplastic thyroid cancer: a review of epidemiology, pathogenesis, and treatment. *Journal of oncology*. 2011; 2011:542358.
22. Damanakis A.I., Eckhardt S., Wunderlich A. et al. MicroRNAs let7 expression in thyroid cancer: correlation with their deputed targets HMGA2 and SLC5A5. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2016; 142(6):1213-1220.
23. Malek A., Bakhidze E., Noske A. et al. HMGA2 gene is a promising target for ovarian cancer silencing therapy. *Int J Cancer*. 2008; 123(2):348-356.
24. Zhang S., Mo Q., Wang X. Oncological role of HMGA2 (Review). *International journal of oncology*. 2019; 55(4):775-788.
25. Титов С.Е., Иванов М.К., Цивликова Е.В. и др. Анализ относительной экспрессии гена HMGA2 и онкогенной микроРНК-221 в цитологических препаратах, полученных при тонкоигольной аспирационной биопсии узлов щитовидной железы. *Успехи молекулярной онкологии*. 2017; 4:24-31.
26. Allegri L., Rosignolo F., Mio C. et al. Effects of nutraceuticals on anaplastic thyroid cancer cells. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2018; 144(2):285-294.
27. Haghpanah V., Fallah P., Tavakoli R. et al. Antisense-miR-21 enhances differentiation/apoptosis and reduces cancer stemness state on anaplastic thyroid cancer. *Tumour Biol*. 2016; 37(1):1299-1308.
28. Frezzetti D., De Menna M., Zoppoli P. et al. Upregulation of miR-21 by Ras in vivo and its role in tumor growth. *Oncogene*. 2011; 30(3):275-286.
29. Khatami F., Tavangar S.M. Liquid Biopsy in Thyroid Cancer: New Insight. *International journal of hematology-oncology and stem cell research*. 2018; 12(3):235-248.
30. Sandulache V.C., Williams M.D., Lai S.Y. et al. Real-Time Genomic Characterization Utilizing Circulating Cell-Free DNA in Patients with Anaplastic Thyroid Carcinoma. *Thyroid*. 2017; 27(1):81-87.
31. Lee J.C., Zhao J.T., Gundara J. et al. Papillary thyroid cancer-derived exosomes contain miRNA-146b and miRNA-222. *The Journal of surgical research*. 2015; 196(1):39-48.
32. Bi J.W., Zou Y.L., Qian J.T. et al.: MiR-599 serves a suppressive role in anaplastic thyroid cancer by activating the T-cell intracellular antigen. *Experimental and therapeutic medicine*. 2019; 18(4):2413-2420.
33. Chen J., Zhao D., Meng Q. Knockdown of HCP5 exerts tumor-suppressive functions by up-regulating tumor suppressor miR-128-3p in anaplastic thyroid cancer. *Biomed Pharmacother*. 2019; 116:108966.
34. Wang F., Li Z., Sun B. miR-544 inhibits the migration and invasion of anaplastic thyroid cancer by targeting Yin Yang-1. *Oncology letters*. 2019; 17(3):2983-2992.
35. Maroof H., Islam F., Dong L. et al.: Liposomal Delivery of miR-34b-5p Induced Cancer Cell Death in Thyroid Carcinoma. *Cells*. 2018; 7(12).
36. Fuziwara C.S., Saito K.C., Kimura E.T. Thyroid follicular cell loss of differentiation induced by miRNA miR-17-92 cluster is attenuated by CRISPR/Cas9n gene silencing in anaplastic thyroid cancer. *Thyroid*. 2019.

Поступила в редакцию 24.09.2020 г.

*M.S. Knyazeva<sup>1,2,3</sup>, L.M. Zabegina<sup>1,2,3</sup>, E.I. Sidina<sup>1</sup>,  
A.A. Karizky<sup>4</sup>, E.V. Tsyrlina<sup>1</sup>, A.S. Atrem'eva<sup>1</sup>,  
I.V. Kuznetsova<sup>5</sup>, S.L. Vorobyev<sup>5</sup>, A.V. Malek<sup>1,2</sup>*

**Mirna expression profiling of anaplastic thyroid cancer**

<sup>1</sup>N.N. Petrov National Medical Center of Oncology,  
Saint Petersburg,

<sup>2</sup>Oncosystem Company Limited, Moscow,

<sup>3</sup>Institute of Biomedical Systems and Biotechnologies,  
Peter the Great Saint. Petersburg Polytechnic University  
(SPbPU), Saint Petersburg,

<sup>4</sup>Information Technologies and Programming Faculty,  
Information Technologies, Mechanics and Optics (ITMO)  
University, Saint-Petersburg,

<sup>5</sup>National Center of Clinical Morphological Diagnostics,  
Saint Petersburg

Introduction: Malignant transformation of follicular epithelium of the thyroid gland is associated with specific alterations of miRNA profile. Evaluation of miRNAs expression changes is being applied for primary or differential diagnostic of thyroid nodes. Anaplastic thyroid cancer (ATC) is relatively rare form of thyroid cancer with high malignant potency and rate of lethality. Investigation of miRNAs role in ATC might provide with soul for development of new diagnostic and therapeutic approaches. Goal: To analyze expression profile of miRNA in ATC and to identify miRNAs involved in pathogenesis of ATC. Material and Methods: Samples of ATC (n.20) and normal thyroid tissue (n. 22) were included in the study, expression levels of 85 cancer-associated miRNAs were analyzed by RT-PCR. Results: Expression of miR-375, miR-1246 and miR-21 is activated while expression of miR-Let7b, miR-125b and miR-181a is suppressed in cells of ATC. Conclusions: Further investigation of miRNA involvement into carcinogenesis of ATC is needed for development of new diagnostic and therapeutic approaches.

Key words: anaplastic thyroid cancer, microRNA

*В.В. Масляков<sup>1</sup>, Д.Ю. Гребнев<sup>2</sup>, Л.М. Ким<sup>1</sup>*

## **Патофизиологическое обоснование применения фотодинамической терапии в начальной стадии плоскоклеточного рака кожи**

<sup>1</sup>Частное образовательное учреждение высшего образования «Медицинский университет «РЕАВИЗ», г. Саратов,

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уральский государственный медицинский университет», г. Екатеринбург

Работа основана на анализе течения заболевания у 185 пациентов с плоскоклеточным раком кожи. Программа исследования включала в себя исследования в трех основных группах. В первую вошли 74 (40%) пациента, которым было проведено комбинированное лечение: операция, включающая широкое иссечение опухоли под внутривенным наркозом + фотодинамическая терапия (группа 1). Вторую группу составили 111 (60%) пациентов с плоскоклеточным раком кожи, которым было выполнено только оперативное лечение. Для контроля и сопоставления полученных лабораторных показателей была создана вторая группа, в которую вошли пациенты без установленной патологии. В данную группу вошли 17 человек, которые дали добровольное согласие на проведение исследования. В исследовании была прослежена динамика изменений показателей гемостаза и металлопротеиназ в двух сравниваемых группах. В группе пациентов с плоскоклеточным раком кожи отмечается статистически достоверное снижение значений ингибитора металлопротеиназ-1, что приводило к увеличению всех показателей металлопротеиназ-2, -7 и -9. Выполнение оперативного лечения не приводило к коррекции данных показателей как в ближайшем, так и в отдаленном периодах после завершения лечения. Механизм влияния фотодинамической терапии при плоскоклеточном раке кожи можно охарактеризовать следующим образом: происходит снижение ингибитора металлопротеиназ-1, что приводит к увеличению матричных металлопротеиназ-2, -7 и -9 в крови, в результате происходит повреждение эндотелия сосудистой стенки, что подтверждается увеличением эндотелина, это, в свою очередь, приводит к развитию вазоконстрикции и усилению прокоагулянтной активности крови, к изменениям показателей гемостаза. Применение фотодинамической терапии восстанавливает показатель ингибитора металлопротеиназ-1, это приводит к восстановлению матричных металлопротеиназ-2, -7 и -9 в крови и предот-

ращению повреждения сосудистой стенки. Комплексное лечение пациентов с плоскоклеточным раком кожи в начальной стадии заболевания должно включать в себя проведение фотодинамической терапии с одновременным внутривенным облучением крови, лазерное облучение опухоли, а затем выполнение оперативного лечения, заключающегося в иссечении опухоли с соблюдением онкологических принципов.

**Ключевые слова:** плоскоклеточный рак кожи, фотодинамическая терапия, гемостаз, металлопротеиназы, послеоперационный период

### **Введение**

В последние десять лет происходит значительное увеличение числа злокачественных новообразований кожных покровов во всех странах мира. При этом некоторые страны заняли ведущие места в отношении показателей этой патологии. Например, согласно статическим данным, представленным Германией, рак кожи занимает второе место в структуре онкологической патологии, уступая злокачественным новообразованиям легких у мужчин и злокачественным новообразованиям молочной железы у женщин. Данная патология встречается у мужчин в 93,4 на 100 тысяч населения у мужчин и в 55,8 на 100 тысяч у женщин. Согласно результатам исследования, которое провело Немецкое дерматологическое общество, число больных с онкологической патологией кожных покровов увеличивается в два раза в течение каждых пятнадцати лет [1, 2]. В Российской Федерации, данная патология является одной из ведущих и находится на третьем месте. Согласно представленным данным, рак кожи среди мужского населения страны уступает онкологическим заболеваниям легких и желудка. В структуре онкологических заболеваний рак кожи среди мужского населения нашей страны составляет 7,5%. При этом, у женщин рак кожи встречается в 1,6 раз чаще, чем у мужчин. Онкологическая патология кожных покровов, по частоте встре-

чаемости, уступает только раку молочных желез и находится на втором месте в структуре онкологической заболеваемости. Среди женского населения рак кожи составляет 11,8% от числа впервые выявленных онкологических больных. Необходимо отметить тот факт, что с 1993 года в РФ наблюдается тенденция к увеличению роста раковых опухолей кожи, как среди мужского, так и среди женского населения страны. Темп годового прироста составляет 3,4%. Наиболее часто данная патология встречается у пожилых людей старше семидесяти лет [2]. К одной из самых злокачественных эпителиальных опухолей кожных покровов, которая развивается из кератиноцитов, относится плоскоклеточный рак кожи (ПКРК) [3]. Этот вид опухоли имеет деструктивный рост, постепенно прогрессирует, инфильтрирует близлежащие ткани, метастазирует в лимфатические узлы. При этом, лимфогенные метастазы, которые поражают как регионарные, так и отдаленные лимфоузлы, встречаются в 85% случаев. Кроме лимфогенного данный вид рака метастазирует и гематогенным путем, такой вид метастазирования встречается в 15% наблюдений [3]. В настоящее время предложены различные методы лечения этой патологии, которые включают в себя хирургическое иссечение опухоли, лучевую терапию, криодиструкцию, иссечение лазером, а также использование метода, который получил название «фотодинамическая терапия» (ФДТ). Использование ФДТ можно охарактеризовать как применение современного физического метода, направленного на уничтожение опухолевого процесса. К преимуществам ФДТ можно отнести ее малоинвазивность и эффективность в лечении плоскоклеточного рака кожи, которая основана на эффекте фотодинамического разрушения раковой опухоли за счет фотодинамической реакции [5, 6]. ФДТ основана на введении фотосенсибилизатора и облучении лучом лазера, который имеет определенную длину волны. К одному из преимуществ этого метода можно отнести тот факт, что ФДТ занимает небольшое время, как правило, не больше двух часов, а время госпитализации в стационаре не превышает семи-десяти дней. Наиболее перспективной представляется комбинация ФДТ с другими методами лечения, такие как лучевая или химиотерапия [7, 8]. Вместе с тем, остается множество нерешенных вопросов, касающихся изменения микроциркуляции при различных злокачественных образованиях кожи. К настоящему времени накоплено значительное количество данных о патогенезе рака кожи. Изучены патогенетические звенья развития этого процесса, не вызывает сомнения роль микроциркуляции в данной патологии [9]. Вместе с тем, остается еще множество нерешенных вопросов.

Цель исследования. Дать патофизиологическое обоснование применения фотодинамической терапии в комплексном лечении начальной стадии плоскоклеточного рака кожи.

### Материалы и методы

Работа основана на анализе течения заболевания у 185 пациентов с плоскоклеточным раком кожи (ПКРК), находившихся на амбулаторном и стационарном лечении в лечебных учреждениях г. Энгельс и Саратов в период с 2015 по 2019 годы. Из общего количества пациентов, мужчин было 129 (69,7%) человек, а женщин — 56 (31,2%). Большинство пациентов были старше 50 лет.

Исследование включало в себя три основные группы. В первую вошли 74 (40%) пациента, которым было проведено комбинированное лечение: операция, включающая широкое иссечение опухоли под внутривенным наркозом, вместе с ФДТ (группа 1). Вторую группу составили 111 (60%) пациентов с ПКРК, которым было выполнено только оперативное лечение. Для контроля и сопоставления полученных лабораторных показателей, была создана вторая группа, в которую вошли пациенты без установленной патологии. В данную группу вошли 17 человек, которые дали добровольное согласие на проведение исследования. На основании проведенного анализа локализации данной патологии по анатомическим областям было установлено, что в 25% случаев опухоль локализовалась в области нижних конечностей, в области лица злокачественное новообразование имело локализацию в 15% наблюдений, в области различных отделов верхних конечностей развитие опухолевого образования было отмечено в 20% наблюдений, в 18% случаях локализация была в области шеи, в 12% — в различных отделах груди и еще в 10% наблюдениях занимала различные анатомические области спины. Диагноз ПКРК устанавливался на основе сбора анамнестических данных, жалоб, которые предъявляли пациенты, морфологического исследования опухолей. Для проведения морфологического исследования проводилась биопсия опухолевой ткани, после получения результата устанавливался окончательный диагноз. В исследование включались пациенты с начальной стадией ПКРК (T1-2N0M0). В исследование не включались пациенты с диссеминацией опухолевого процесса, а также те пациенты, которым была проведена лучевая и/или химиотерапия. На основании морфологических заключений веретенноклеточная форма ПКРК установлена в 16% случаях, в остальных 84% — диагностирована акантолитическая форма. Проведенный анализ анамнестических данных позволил установить, что у пациентов основной группы в 26% случаев было отмечено воздействие профессиональных вредностей, генетическая предрасположенность обнаружена в 14%, курение табака — в 27% случаев, в 33% наблюдений причину развития ПКРК установить не удалось. У пациентов группы сравнения профессиональные вредности были выявлены в 12%, курение — в 48%, возраст — в 28% наблюдений, еще в 12% случаев установить причину развития данной патологии не удалось. У пациентов с ПКРК, сопутствующая патология была выявлена у 98 (52,7%) человек, из них у пациентов, которым не была выполнена ФДТ, они были выявлены у 43 (23,4%) человек, в группе пациентов которым были выполнены ФДТ и оперативное лечение — у 55 (29,7%) человек.

Все исследование проводилось после получения разъяснения целей и задач исследования и получения у пациентов информированного согласия. План исследования был заслушан на локальном этическом комитете «Медицинского университета «Реавиз», где получил разрешение и одобрение.

В процессе исследования осуществлялось определение тканевого уровня меллопротеиназы-1 (TIMP-1), матричных металлопротеиназ-2, -7, -9 (MMPs-2, -7, -9) в сыворотке крови. Выбор этих показателей основывался на том, что им отводится большая роль в развитии и прогрессировании злокачественной опухоли. Уровень TIMP-1 определялся иммуноферментным методом с применением реактивов R&D Diagnostics Inc. (США). Данный метод определяет количественное содержание данного вещества в биологическом субстрате, в нашем случае, в плазме крови, путем соединения этого вещества с антителами. Количественное определение MMPs-2; 7; 9 в сыворотке крови с использованием сывороток «Human/Mouse/Rat (total)» фирмы Quantikine®, «R&D Systems», которые являются стандартными и предназначены для выполнения прямого иммуноферментного анализа. Согласно инструкции, для измерений использовался автоматический универсальный ридер ELX800 фирмы «Bio-Tek Instruments, Inc.», производства США, предназначенный для микропланшетов. Выбор данных показателей был определен тем, что по данным литературы доказано, что металлопротеиназы играют центральную роль в процессах опухолевой трансформации и метастазирования. Забор биологического материала (крови) производился однократно у пациентов без установленного диагноза.

Оценку коагуляционной способности крови, проводили по исследованию величины времени свертывания не стабилизированной крови, силиконового времени свертывания крови, времени рекальцификации плазмы, тромбинового времени. Время свертывания цельной крови (ВСК) устанавливали с применением методики, предложенной Ли-Уайтом. Определение времени рекальцификации плазмы (ВРП) было основано на установлении временного промежутка, который требуется для образования сгустка фибрина из плазмы крови, после того, как в него добавляются соли калия. Определение тромбинового времени (ТВ) заключалось в следующем: после внесения 0,1 мл контрольной плазмы в кювету крагулометра, ее подогревали до 37°C, подогрев длился в течение одной минуты. После этого туда же добавлялся 0,1 мл раствора тромбина, а затем регистрировалась время, затраченное на свертывание. Оценку первой фазы свертывания крови осуществляли с помощью определения активированного частичного тромбoplastинового времени (АЧТВ). Определение величины протромбинового времени (ПТВ) и протромбинового индекса (ПТИ), использовалась для оценки второй фазы. Оценка третьей фазы проводилась по определению количества фибриногена крови. Фибриноген изучался на полуавтоматическом программируемом двухканальном коагулометре, используемым для анализа показателей гемостаза АПГ2-02-П ЭМКО по методу Клаусса. В оснащение данного прибора входит двухстрочный матричный дисплей с подсветкой. Определение активности антикоагуляции, проводилось по результатам, полученным при определении активности АТ III. Для определения самого мощного сосудосуживающего агента проводилось определение уровня эндотелина-1.

Результаты, полученные в ходе исследования, подвергались математической обработки на персональном компьютере имеющем пакет прикладных программ Statistica версии 6.0, также Excel. Для расчета зависимых величин использовался критерий Уилкоксона, а для расчета независимых — критерий Манна-Уитни. Рассчитывали медианы квадрелей, как верхних, так и нижних и определялась достоверность различий (р).

## Результаты

Лечение ПКРК в начальной стадии заболевания с применением ФДТ проводилось в несколько этапов. На первом этапе выполняли

ФДТ до начала операции, в качестве фотосенсибилизатора применяли препарат Фотолон в дозе 1,0-2,0 мг/кг, внутривенно капельно. В соответствии с инструкцией препарата. После того, как была рассчитана необходимая дозировка, препарат добавляли в физиологический раствор, объем которого составлял 200 мл. Полученный раствор вводился при помощи капельной внутривенной инфузии, время введения занимало около 30 мин. После проведения инфузионной терапии проводилось лазерное облучение крови использованием криптонового лазера, имеющего длину волны 647-675 нм, с мощностью 120-300 мВт/см<sup>2</sup>. Получаемая доза при лазерном облучении была не меньше 100 Дж/см<sup>2</sup>. После окончания инфузионной терапии проводился второй этап лечения: через 3-4 часа проводили сеанс локального облучения опухоли, для этого использовали лазерный аппарат «Латус» ( $\lambda$ –662 nm, E = 100-200-300-600 Дж/см<sup>2</sup>), в количестве 3 сеансов. Третий этап включал выполнение оперативного лечения. Операция пациентам этой группы была выполнена через 5 дней после окончания выполнения ФДТ. На основании полученных результатов можно сделать заключение, что применение ФДТ перед выполнением оперативного лечения, по поводу ПКРК, приводит к статистически достоверному снижению количества TIMP-1, что закономерно приводило к увеличению количества MMPs-2, MMPs-7 и MMPs-9. Одновременно с этим в группе пациентов с ПКРК без проведения ФДТ, отмечается значительное, статистически достоверное снижение показателя TIMP-1, и, как следствие, увеличение всех показателей MMPs в сравнении с результатами, полученными как у пациентов без установленной патологии, так и с результатами, полученными в группе пациентов с ФДТ. Из этого можно сделать заключение, что ПКРК приводит к изменениям в показателях TIMP-1 и MMPs-2, MMPs-7 и MMPs-9.

В соответствии с данными, которые представлены в табл. 1, в первые сутки после выполненного оперативного лечения у пациентов с ПКРК, которым не было проведено лечение ФДТ, происходило уменьшение TIMP-1 в крови, что приводило к увеличению MMPs. Данные изменения были статистически достоверными. В группе больных, оперированных по поводу ПКРК, лечение которым было дополнено применением ФДТ, статистически достоверных изменений в исследуемых показателях получено не было. К третьим суткам после выполненной операции лабораторные исследования показали, что пациентам с ПКРК, которым не было проведено выполнение ФДТ, статистически достоверных отличий в полученных результатах не было получено. Одновременно с этим у пациентов

с ПКРК, которым оперативное лечение было дополнено ФДТ, выявлено повышение количества TIMP-1. Увеличение этого показателя было статистически достоверным и достигло уровня, полученного у пациентов без установленной патологии, что закономерно приводило к снижению MMPs-2, MMPs-7 и MMPs-9, однако, они были статистически достоверно повышены по сравнению с данными относительно здоровых людей (табл. 2).

К пятым суткам после выполненного оперативного лечения у пациентов с ПКРК, которым не проводилось ФДТ, статистически достоверных изменений в лабораторных показателях не отмечалось. Одновременно с этим пациентом с ПКРК, которым оперативное лечение было дополнено ФДТ, был отмечен тот факт, что показатели MMPs-2, MMPs-7 и MMPs-9, статистически достоверно снижались и не отличались от данных, полученных в группе пациентов у которых не была выявлена патология (табл. 3).

Существенных изменений в исследуемых показателях в двух анализируемых группах на седьмые послеоперационные сутки отмечено не было. Полученные показатели статистически достоверно не отличались от тех результатов, ко-

торые были получены при исследованиях, проведенных к пятым суткам после выполненной операции.

Результаты лабораторных исследований показывают, что к десятым суткам после выполнения оперативного лечения у пациентов, которым данный вид лечения был дополнен применением ФДТ, статистически достоверных перемен не получено, в группе пациентов с ПКРК без ФДТ, отмечалось увеличение показателя TIMP-1, как следствие, уменьшение MMPs-2, MMPs-7, MMPs-9, однако, они оставались статистически достоверно повышенными по сравнению с данными, полученными у относительно здоровых людей. Полученные данные стали соответствовать результатам, установленным до начала оперативного лечения (табл. 4). В отдаленном послеоперационном периоде изменений в анализируемых показателях у пациентов двух групп отмечено не было. Результаты исследования прокоагулянтных механизмов системы гемостаза, полученные в группе пациентов с ПКРК, которым была выполнена ФДТ и оперативное лечение и оперативное лечение без фотодинамической терапии, до начала оперативного лечения, представлены в табл. 5.

**Таблица 1. Показатели TIMP-1 и MMPs в сыворотке крови у пациентов с ПКРК в первые сутки после выполненной операции (M ± m)**

Исследуемые показатели крови, нг/мл	Результаты в группах		
	группа 1 (n=111)	здоровые (n=17)	группа 2 (n=74)
TIMP-1	436,4±0,1*	789 ± 0,4	680 ± 0,3*
MMPs-2	741 ± 0,4*	254 ± 0,3	315 ± 0,5*
MMPs-7	12,3 ± 0,2*	3,8 ± 0,2	4,3 ± 0,5*
MMPs-9	952 ± 0,5*	396 ± 0,2	414 ± 0,4*

Примечание: здесь и далее \* — знак, показывающий статистическую достоверность (p < 0,05)

**Таблица 2. Показатели TIMP-1 и MMPs в сыворотке крови у пациентов с ПКРК на третьи сутки после выполненной операции (M ± m)**

Исследуемые показатели крови, нг/мл	Результаты в группах		
	группа 1 (n=111)	здоровые (n=17)	группа 2 (n=74)
TIMP-1	442,4±0,1*	789 ± 0,4	787 ± 0,2
MMPs-2	741 ± 0,4*	254 ± 0,3	299 ± 0,3*
MMPs-7	12,3 ± 0,5*	3,8 ± 0,2	4,2 ± 0,1*
MMPs-9	952 ± 0,3*	396 ± 0,2	401 ± 0,2*

**Таблица 3. Показатели TIMP-1 и MMPs в сыворотке крови у пациентов с ПКРК на пятые сутки после выполненной операции (M ± m)**

Исследуемые показатели крови, нг/мл	Результаты в группах		
	группа 1 (n=111)	здоровые (n=17)	группа 2 (n=74)
TIMP-1	441,3 ± 0,4*	789 ± 0,4	783 ± 0,3
MMPs-2	741 ± 0,5*	254 ± 0,3	249 ± 0,2
MMPs-7	12,3 ± 0,4*	3,8 ± 0,2	3,6 ± 0,4
MMPs-9	952 ± 0,1*	396 ± 0,2	391 ± 0,5

**Таблица 4. Показатели TIMP-1 и MMPs в сыворотке крови у пациентов с ПКРК на десятые сутки после выполненной операции послеоперационные сутки (M ± m)**

Исследуемые показатели крови, нг/мл	Результаты в группах		
	группа 1 (n=111)	здоровые (n=17)	группа 2 (n=74)
TIMP-1	345,1±0,3*	789 ± 0,4	785± 0,2
MMPs-2	612 ± 0,2*	254 ± 0,3	248± 0,3
MMPs-7	10,2 ± 0,3*	3,8 ± 0,2	3,4± 0,1
MMPs-9	862 ± 0,2*	396 ± 0,2	395± 0,2

**Таблица 5. Показатели коагуляционного звена системы гемостаза у пациентов с ПКРК до начала оперативного лечения (M ± m)**

Исследуемые показатели крови	Результаты в группах		
	группа 1 (n=111)	здоровые (n=17)	группа 2 (n=74)
ВСК, с	7,8 ± 0,5	7,4 ± 0,4	7,8 ± 0,3
ВРП, с	98,2 ± 0,3*	121 ± 0,4	123 ± 0,5
Силиконовое время свертывания крови, с	98 ± 0,3*	118 ± 0,4	117 ± 0,6
ТВ, с	8,6 ± 0,6*	10,1 ± 0,3	11,2 ± 0,7
АЧТВ, с	14,1 ± 0,3*	29,1 ± 0,3	28,1 ± 0,3
ПТВ	32,1 ± 0,1*	17,2 ± 0,3	17,7 ± 0,3
ПТИ	121,2 ± 0,1*	98,1 ± 0,8	100,1 ± 0,2

**Таблица 6. Показатели коагуляционного звена системы гемостаза у пациентов с ПКРК в первые послеоперационные сутки (M ± m)**

Исследуемые показатели крови	Результаты в группах		
	группа 1 (n=111)	здоровые (n=17)	группа 2 (n=74)
ВСК, с	7,4 ± 0,5	7,4 ± 0,4	7,5 ± 0,3
ВРП, с	95,1 ± 0,3*	121 ± 0,4	110 ± 0,5*
Силиконовое время свертывания крови, с	93 ± 0,3*	118 ± 0,4	114 ± 0,6*
ТВ, с	6,4 ± 0,7*	10,1 ± 0,3	9,1 ± 0,3*
АЧТВ, с	12,3 ± 0,3*	29,1 ± 0,3	21,4 ± 0,3*
ПТВ	36,4 ± 0,7*	17,2 ± 0,3	19,4 ± 0,3*
ПТИ	125,2 ± 0,6*	98,1 ± 0,8	108,5 ± 0,5*

**Таблица 7. Показатели коагуляционного звена системы гемостаза у пациентов с ПКРК на третьи послеоперационные сутки (M ± m)**

Исследуемые показатели крови	Результаты в группах		
	группа 1 (n=111)	здоровые (n=17)	группа 2 (n=74)
ВСК, с	7,6± 0,5	7,4 ± 0,4	7,4 ± 0,3
ВРП, с	94,5 ± 0,4*	121 ± 0,4	120 ± 0,6
Силиконовое время свертывания крови, с	92 ± 0,2*	118 ± 0,4	117 ± 0,7
ТВ, с	6,1 ± 0,4*	10,1 ± 0,3	9,1 ± 0,3
АЧТВ, с	11,7 ± 0,7*	29,1 ± 0,3	29,4 ± 0,6
ПТВ	35,7 ± 0,5*	17,2 ± 0,3	17,8 ± 0,7
ПТИ	127,1 ± 0,5*	98,1 ± 0,8	97,5 ± 0,5

**Таблица 8. Показатели коагуляционного звена системы гемостаза у пациентов с ПКРК на пятые послеоперационные сутки (M ± m)**

Исследуемые показатели крови	Результаты в группах		
	группа 1 (n=111)	здоровые (n=17)	группа 2 (n=74)
ВСК, с	7,8± 0,5	7,4 ± 0,4	7,4 ± 0,3
ВРП, с	87,4 ± 0,2*	121 ± 0,4	121 ± 0,6
Силиконовое время свертывания крови, с	84 ± 0,7*	118 ± 0,4	118 ± 0,7
ТВ, с	4,4 ± 0,3*	10,1 ± 0,3	9,7 ± 0,3
АЧТВ, с	8,5 ± 0,7*	29,1 ± 0,3	29,8 ± 0,6
ПТВ	45,5 ± 0,5*	17,2 ± 0,3	17,8 ± 0,7
ПТИ	130,3 ± 0,5*	98,1 ± 0,8	97,6 ± 0,5

**Таблица 9. Показатели коагуляционного звена системы гемостаза у пациентов с ПКРК на седьмые послеоперационные сутки (M ± m)**

Исследуемые показатели крови	Результаты в группах		
	группа 1 (n=111)	здоровые (n=17)	группа 2 (n=74)
ВСК, с	7,6 ± 0,5	7,4 ± 0,4	7,4 ± 0,3
ВРП, с	94,5 ± 0,4*	121 ± 0,4	121 ± 0,6
Силиконовое время свертывания крови, с	92 ± 0,2*	118 ± 0,4	118 ± 0,7
ТВ, с	6,1 ± 0,4*	10,1 ± 0,3	9,7 ± 0,3
АЧТВ, с	11,7 ± 0,7*	29,1 ± 0,3	29,8 ± 0,6
ПТВ	35,7 ± 0,5*	17,2 ± 0,3	17,8 ± 0,7
ПТИ	127,1 ± 0,5*	98,1 ± 0,8	97,6 ± 0,5

**Таблица 10. Показатели коагуляционного звена системы гемостаза у пациентов с ПКРК на десятые послеоперационные сутки (M ± m)**

Исследуемые показатели крови	Результаты в группах		
	группа 1 (n=111)	здоровые (n=17)	группа 2 (n=74)
ВСК, с	7,8 ± 0,5	7,4 ± 0,4	7,4 ± 0,3
ВРП, с	98,2 ± 0,3*	121 ± 0,4	121 ± 0,6
Силиконовое время свертывания крови, с	98 ± 0,3*	118 ± 0,4	118 ± 0,7
ТВ, с	8,6 ± 0,6*	10,1 ± 0,3	9,7 ± 0,3
АЧТВ, с	14,1 ± 0,3*	29,1 ± 0,3	29,8 ± 0,6
ПТВ	32,1 ± 0,1*	17,2 ± 0,3	17,8 ± 0,7
ПТИ	121,2 ± 0,1*	98,1 ± 0,8	97,6 ± 0,5

Из данных, представленных в табл. 5 видно, что у пациентов с ПКРК до оперативного лечения без применения ФДТ, отмечается активация коагуляционного звена системы гемостаза, что подтверждается статистически достоверным укорочением времени рекальцификации плазмы и тромбинового времени. Данные изменения были обусловлены усилением образования кровяной и тканевой протромбиназ. Это подтверждается тем, что в данной группе пациентов с ПКРК выявлено сокращение активированного частичного тромбопластинового времени и протромбинового времени. При этом, в группе с пациентами с ПКРК и применением ФДТ, изменений в показателях коагуляционного звена системы гемостаза до начала оперативного лечения выявлено не было. Все исследуемые показатели статистически достоверно не отличались от результатов, полученных в группе сравнения из относительно здоровых людей.

При исследовании показателей коагуляционного звена системы гемостаза в первые послеоперационные сутки было установлено, что в группе пациентов с ПКРК без использования ФДТ, происходило статистически достоверное укорочение времени рекальцификации плазмы и тромбинового времени, сокращение активированного частичного тромбопластинового времени и протромбинового времени. В тоже время в группе пациентов, оперированных по поводу ПКРК с применением ФДТ, выявлены анало-

гичные статистически достоверные изменения. Однако эти изменения были менее выражены по сравнению с данными, полученными в группе пациентов с ПКРК без применения ФДТ. Исходя из этого, можно предположить, что данные изменения являются не специфическими, а связанными с воздействием оперативного лечения (табл. 6).

На третьи послеоперационные сутки, в группе пациентов с ПКРК без применения ФДТ, существенных изменений выявлено не было, все анализируемые показатели практически не изменялись по сравнению с данными, полученными в первые послеоперационные сутки. В группе пациентов, оперированных по поводу ПКРК с применением ФДТ, отмечалось восстановление исследуемых показателей, которые стали соответствовать данным, полученным до начала оперативного лечения (табл. 7). На пятые послеоперационные сутки в группе пациентов с ПКРК с применением ФДТ, существенных изменений в исследуемых показателях отмечено не было. Все исследуемые показатели были практически идентичны результатам, полученным на третьи послеоперационные сутки. В группе пациентов с ПКРК без применения ФДТ, было зарегистрировано значительное, статистически достоверное, укорочение времени рекальцификации плазмы и тромбинового времени, сокращение активированного частичного тромбопластинового времени и протромбинового времени (табл. 8).

Результаты, полученные на седьмые послеоперационные сутки у пациентов обеих групп, представлены в таблице 9. Из данных, представленных в таблице 9, видно, что в группе пациентов с ПКРК с применением ФДТ, существенных изменений выявлено не было. В тоже время в группе пациентов с ПКРК без применения ФДТ, происходило некоторое восстановление исследуемых показателей, которые стали соответствовать данным, полученным на третьи послеоперационные сутки. На десятые послеоперационные сутки изменений в группе ПКРК с применением ФДТ, изменений не было выявлено, в группе ПКРК без применения ФДТ, все исследуемые показатели стали соответствовать данным, полученным до начала оперативного лечения. При этом они не стали соответствовать физиологически нормальным показателям (табл. 10).

При исследовании данных показателей в отдаленном послеоперационном периоде, существенной динамики в показателях обеих групп получено не было, все исследуемые показатели соответствовали данным, полученным на десятые послеоперационные сутки.

На основании анализа уровня фибриногена можно утверждать, что ПКРК без применения ФДТ, так и ПКРК с применением ФДТ, приводят к нарушению конечной фазы свертывания крови, что проявляется гиперкоагуляцией, при этом она более выражена в группе ПКРК без применения ФДТ. Выполнение оперативного лечения с применением ФДТ приводит к его коррекции, выполнение оперативного иссечения ПКРК без ФДТ, не приводит к коррекции данного показателя как в ближайшем, так и в отдаленном послеоперационных периодах. При исследовании показателей тромбоцитов периферической крови установлено, что у пациентов с ПКРК без применения ФДТ, до начала оперативного лечения был зарегистрирован тромбоцитоз. Необходимо отметить, что в группе пациентов с ПКРК, не зависимо от применения или не применения ФДТ, количество тромбоцитов в периферической крови было выше в 4,5 раза по сравнению с данными, полученными в группе относительно здоровых людей. Так, у относительно здоровых людей количество тромбоцитов в периферической крови составило  $340 \pm 1,2 \times 10^9/\text{л}$ , а в группе пациентов с ПКРК —  $501 \pm 1,3 \times 10^9/\text{л}$  ( $p < 0,05$ ). Одновременно с этим отмечалась повышенная агрегационная активность тромбоцитов, индуцированных АДФ ( $5 \times 10^{-6}$  М). В группе относительно здоровых людей этот показатель составил  $81,5 \pm 0,6\%$ , а в группе пациентов с ПКРК —  $126,2 \pm 0,3\%$  ( $p < 0,05$ ).

## Выводы

1. В группе пациентов с плоскоклеточным раком кожи отмечается статистически достоверное снижение показателя ингибитора металлопротеиназ-1, что приводило к увеличению всех показателей металлопротеиназ-2, -7 и -9. Выполнение оперативного лечения не приводило к коррекции данных показателей как в ближайшем, так и в отдаленном периодах после лечения.

2. Механизм влияния фотодинамической терапии при плоскоклеточном раке кожи можно охарактеризовать следующим образом: происходит снижение ингибитора металлопротеиназ-1, что приводит к увеличению матричных металлопротеиназ-2, -7 и -9 в крови, в результате происходит повреждение эндотелия сосудистой стенки, что подтверждается увеличением эндотелина, это, в свою очередь, приводило к развитию вазоконстрикции и усилению прокоагулянтной активности крови, приводит к изменениям показателей гемостаза. Применение фотодинамической терапии восстанавливает показатель ингибитора металлопротеиназ-1, это приводит к восстановлению матричных металлопротеиназ-2, -7 и -9 в крови и предотвращению повреждения сосудистой стенки.

3. Комплексное лечение пациентов с плоскоклеточным раком кожи в начальной стадии заболевания должно включать в себя проведение фотодинамической терапии с одновременным внутривенным облучением крови, лазерное облучение опухоли, а затем выполнение оперативного лечения, заключающегося в иссечении опухоли с соблюдением онкологических принципов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2015 году. Под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, Г. В. Петровой. М.: МНИОИ им. П. А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2016:236 The state of oncological assistance to the population of Russia in 2015. editet by A.D. Kaprina, V.V. Starinskogo, G.V. Petrovoj. M.: P.A. Herzen Moscow Cancer Research Institute — a branch of the Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Center for Radiology» of the Ministry of Health, 2016: 236 (In Russ.).
2. Хатырев С.А., Погосян А.А., Харатишвили Т.К. Лечение плоскоклеточного рака кожи (обзор литературы). Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 2003; 14(2-1):69-72 [Hatyrev S.A., Pogosjan A.A., Haratishvili T.K. Treatment of squamous cell skin cancer (literature review). Bulletin Russian Oncology Center named after N.N. Blokhin of the Russian Academy of Medical Sciences. 2003; 14 (2-1): 69-72 (In Russ.).]
3. Дзыбова Э.М., Варданян К.Л., Василевская Е.А. Плоскоклеточный рак кожи: клиника, диагностика, методы лечения и профилактики. Клиническая дерматология и венерология; 2015(4):4-14 [Dzybova Je.M., Vardanyan

- K.L., Vasilevska E.A. Squamous cell skin cancer: clinic, diagnosis, methods of treatment and prevention. Clinical dermatology and venereology. 2015; 4: 4-14 (In Russ.).
4. Матвеева О.В. Результаты фотодинамической терапии базально-клеточного рака кожи с локальным использованием фотосенсибилизатора радахлорин // Радиация и риск (Бюллетень Национального радиационно-эпидемиологического регистра). 2016; 2: 79-90 [Matveeva O.V. Results of photodynamic therapy of basal cell skin cancer with local use of radachlorin photosensitizer. Radiation and risk (Bulletin of the National Radiation and Epidemiological Register). 2016; 2: 79-90 (In Russ.)].
  5. Капинус В.Н., Каплан М.А., Спиченкова И.С. и др. Фотодинамическая терапия эпителиальных злокачественных новообразований кожи. Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. 2014; 3(3):9-14 [Kapinus V.N., Kaplan M.A., Spichenkova I.S. et al. Photodynamic therapy of epithelial skin malignancies. Photodynamic therapy and photodiagnosics. 2014; 3 (3): 9-14 (In Russ.)].
  6. Кацалап С.Н., Романко Ю.С. Выбор варианта фотодинамической терапии рецидивной базалиомы. Вестник эстетической медицины. 2012; 11(1):44-48 [Kacalap S.N., Romanko Ju.S. Selection of a photodynamic therapy option for recurrent bazalioma. Bulletin of aesthetic medicine. 2012; 11 (1): 44-48 (In Russ.)].
  7. Каплан М.А., Капинус В.Н., Попучиев В.В. и др. Фотодинамическая терапия: результаты и перспективы. Радиация и риск (Бюллетень Национального радиационно-эпидемиологического регистра). 2013; 22(3):115-123 [Kaplan M.A., Kapinus V.N., Popuchiev V.V. et al. Photodynamic therapy: results and perspectives. Radiation and risk (Bulletin of the National Radiation and Epidemiological Register). 2013; 22 (3): 115-123 (In Russ.)].
  8. Беляев А.М., Прохоров Г.Г., Раджабова З.А., Байкалова О.И. Обзор современных методов лечения плоскоклеточного рака кожи. Вопросы онкологии. 2019; 65(1):7-15 [Belyaev A.M., Prohorov G.G., Radzhabova Z.A., Bajkalova O.I. Review of current treatments for squamous cell skin cancer. Oncology questions. 2019; 65 (1): 7-15 (In Russ.)].
  9. Масляков В.В., Гребнев Д.Ю., Ким Л.М., Дралина О.И., Поляков А.В. Значимость изменений некоторых показателей микроциркуляции у больных базально-клеточным раком кожи в патогенезе развития заболевания. Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. 2020; 9(2):42-47. doi.org/10.17116/onkolog2020902142 [Masljakov V.V., Grebnev D.Ju., Kim L.M., Dralina O.I., Poljakov A.V. The significance of changes in some microcirculation indicators in patients with basal cell skin cancer in the pathogenesis of disease development. Oncology Magazine named after P.A. Herzen. 2020; 9 (2): 42-47. doi.org/10.17116/onkolog2020902142 (In Russ.)].

V.V. Masljakov<sup>1</sup>, D.Ju. Grebnev<sup>2</sup>, L.M. Kim<sup>1</sup>

### Pathophysiological justification of the use of photodynamic therapy in the initial stage of squamous cell skin cancer

<sup>1</sup>Private educational institution of higher education «Medical University «REAVIZ», Saratov, <sup>2</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Ural State Medical University», Yekaterinburg

The work is based on an analysis of the course of the disease in 185 patients with squamous cell skin cancer. The study program included studies in three major groups. The first included 74 (40%) patients who underwent combined treatment: an operation involving widespread excision of a tumor under intravenous anesthesia + photodynamic therapy (group 1). The second group was 111 (60%) patients with squamous cell carcinoma of the skin who received only operative treatment. To control and compare the obtained laboratory indicators, a second group was created, which included patients without established pathology. This group included 17 people who voluntarily agreed to conduct the study. The study traced the dynamics of changes in hemostasis scores and metalloproteinases in the two groups being compared. In the group of patients with squamous cell skin cancer, there was a statistically significant decrease in the metalloproteinase-1 inhibitor index, which led to an increase in all metalloproteinase-2, -7 and -9 indicators. Performing surgical treatment did not lead to correction of these indicators, both in the near and distant periods after treatment. The mechanism of influence of photodynamic therapy in squamous cell skin cancer can be characterized as follows: there is a decrease in the inhibitor of metalloproteinase-1, which leads to an increase in matrix metalloproteinases-2, -7 and -9 in the blood, as a result of damage to the endothelium of the vascular wall, which is confirmed by an increase in endothelin, this, in turn, led to the development of vasoconstriction and increased procoagulant activity. The use of photodynamic therapy restores the index of metalloproteinase-1 inhibitor, this leads to the restoration of matrix metalloproteinases-2, -7 and -9 in the blood and the prevention of damage to the vascular wall. Comprehensive treatment of patients with squamous cell skin cancer in the initial stage of the disease should include photodynamic therapy with simultaneous intravenous blood irradiation, laser tumor training, and then surgical treatment, consisting in excision of the tumor with observance of oncological principles.

Key words: squamous cell skin cancer, photodynamic therapy, hemostasis, metalloproteinases, postoperative period

Поступила в редакцию 17.07.2020 г.

*А.Л. Чернышова<sup>1</sup>, В.А. Антипов<sup>2</sup>, Л.А. Коломиец<sup>1,5</sup>, В.И. Чернов<sup>1,3</sup>, В.Э. Гюнтер<sup>4</sup>,  
Е.С. Марченко<sup>4</sup>, Т.Л. Чекалкин<sup>4</sup>*

## **Опыт проведения радикальной трахелэктомии с транспозицией матки в комбинированном органосохраняющем лечении инвазивного рака шейки матки IV-II стадий**

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск,

<sup>2</sup>Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова, Москва,

<sup>3</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», г. Томск,

<sup>4</sup>НИИ медицинских материалов и имплантатов с памятью формы, г. Томск,

<sup>5</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск

Приоритетным направлением современной онкологии является разработка и внедрение органосохраняющих методов лечения у больных репродуктивного возраста. В настоящее время становятся актуальными способы расширения показаний для проведения органосохраняющего лечения у онкологических больных. В статье представлен опыт проведения радикальной трахелэктомии с транспозицией матки в составе комбинированного лечения больных раком шейки матки IV-II стадий. Предлагаемая комбинация лечебных мероприятий позволяет обеспечить функциональную сохранность матки и придатков у пациенток с инвазивными формами рака шейки матки нуждающихся в проведении комбинированного лечения, т.е. выполнении расширенной операции с последующим лучевым или химиолучевым воздействием на область малого таза. Основным техническим приемом является транспозиция матки с придатками, выполняемая в составе радикальной абдоминальной (или лапароскопической) трахелэктомии, позволяющая вывести маточно-овариальный комплекс из зоны лучевой нагрузки. По завершении лучевого лечения матку с придатками «возвращают» в малый таз и формируют маточно-влагалищный анастомоз при помощи имплантат из никелида титана. Самостоятельная беременность, а также использование вспомогательных репродуктивных технологий разрешаются по прошествии наиболее вероятного срока реализации отдаленных метастазов.

**Ключевые слова:** рак шейки матки, трахелэктомия, имплантат, сторожевые лимфатические узлы, интраоперационная лучевая терапия, репродуктивная функция

### **Введение**

Рак шейки матки остается одной из наиболее распространенных злокачественных опухолей у женщин, занимая V место (5,3%) в общей структуре онкологической патологии у женщин и I ранговое место (21,9%) в возрастной категории от 15 до 39 лет [1]. Результаты многочисленных многоцентровых исследований свидетельствуют о неуклонном росте числа вновь выявленных случаев инвазивного рака шейки матки у женщин репродуктивного возраста [2].

Вопросы органосохраняющего лечения рака шейки матки в течение многих десятилетий продолжают оставаться в центре внимания ведущих отечественных и зарубежных онкологов в связи с высоким уровнем данной патологии у пациенток репродуктивного возраста, что обуславливает не только медицинскую, но и социальную значимость проблемы [3].

Традиционное противоопухолевое лечение при начальных стадиях рака шейки матки позволяет сохранить жизнь пациентки, однако приводит к необратимой утрате фертильности, что значительно снижает качество жизни у молодых женщин, особенно в случаях с нереализованной репродуктивной функцией. В настоящее время, в связи с улучшением скрининга рака шейки матки и тенденцией к деторождению в более старшем возрасте, органосохраняющие операции являются методом выбора у больных раком шейки матки репродуктивного возраста. По данным статистики у 43% пациенток с диагнозом рак шейки матки верифицируется в возрасте до 45 лет, а у 28-30% — в возрасте моложе 40 лет [4]. В связи с чем, приоритетным направлением в современной онкологии является разработка органосохраняющих методов лечения. В настоящее время радикальная трахелэктомия, фак-

тически, является единственным вошедшим в международные стандарты органосохраняющим вариантом лечения для пациенток с инвазивным раком шейки матки [NCCN, 2018]. При этом онкологическая эффективность радикальной трахелэктомии не уступает таковой при тотальной гистерэктомии. Впервые технику радикальной трахелэктомии описал профессор Dargent в 1987 г. — была представлена радикальная вагинальная трахелэктомия, которая явилась модификацией операции Schauta (1901) — радикальной вагинальной гистерэктомии. Данный вид оперативного вмешательства начинался с лапароскопической лимфаденэктомии, а вторым этапом осуществляется вагинальный компонент трахелэктомии. Спустя 10 лет профессором L. Ungar (1997) была описана техника радикальной абдоминальной трахелэктомии (РАТ), объем которой сопоставим с расширенной экстирпацией матки, и включает удаление шейки матки с параметриями и манжетой влагалища, а также тазовую лимфаденэктомию, при этом сохраняются воронко-тазовые и собственные связки яичников, с последующим формированием анастомоза между телом матки и влагалищем. В последующем опубликован целый ряд работ, посвященных разработке и внедрению преимущественно лапароскопического и роботизированного доступов при радикальной трахелэктомии [5].

Стремление расширить рамки органосохраняющего лечения у молодых больных раком шейки матки приводит к появлению хирургических технологий, направленных на сохранение репродуктивной функции при инвазивной форме данного заболевания. Низкие показатели метастазирования и высокие показатели выживаемости создали предпосылки для разработки и широкого применения органосохраняющего лечения в объеме радикальной трахелэктомии [6]. В настоящее время разработан целый ряд новых технологий, которые позволяют улучшить как онкологические, так и репродуктивные результаты органосохраняющего лечения у больных инвазивным раком шейки матки I стадии в репродуктивном возрасте [7]. В связи с чем, закономерным стал вопрос о целесообразности расширения показаний для проведения органосохраняющего лечения в объеме радикальной трахелэктомии в плане комбинированного лечения у больных раком шейки матки IV- II стадий.

Предлагаемая комбинация лечебных мероприятий позволяет обеспечить функциональную сохранность матки и придатков у пациенток с инвазивными формами рака шейки матки, нуждающихся в проведении комбинированного лечения, т.е. выполнении расширенной операции с последующим лучевым или химиолучевым воздействием на область малого таза. Основ-

ным техническим приемом является транспозиция матки с придатками, выполняемая в составе радикальной абдоминальной (или лапароскопической) трахелэктомии, позволяющая вывести маточно-овариальный комплекс из зоны лучевой нагрузки. По завершении лучевого лечения матку с придатками «возвращают» в малый таз и формируют маточно-влагалищный анастомоз при помощи имплантата из никелида титана. Самостоятельная беременность, а также использование вспомогательных репродуктивных технологий разрешаются по прошествии наиболее вероятного срока реализации отдаленных метастазов.

Данный подход также может быть реализован у молодых пациенток со злокачественными опухолями анального канала и вульвы, требующими лучевого лечения.

В настоящее время авторами из Латинской Америки представлены единичные сообщения, касающиеся транспозиции матки у пациенток со злокачественными опухолями шейки матки, влагалища и прямой кишки [8]. В данной публикации представлена техника транспозиции матки для сохранения фертильности у пациентов, которым требуется лучевая терапия таза. Транспозиция матки была разработана на основе адаптации хорошо зарекомендовавших себя хирургических методов с целью удержания матки и придатков вне поля лучевой терапии, чтобы сохранить их функцию. Техника транспозиции матки представлена шаг за шагом, с обсуждением литературы, которая послужила основой для разработки методики. Технические детали, касающиеся возможных осложнений и их последствий, также обсуждаются. Хотя его основы определены, необходимость в улучшении остается. Результаты методики ожидают рассмотрения и требуют дальнейшего изучения.

Основная цель разрабатываемой методики лечения — расширение показаний для проведения органосохраняющего лечения у больных инвазивным раком шейки матки IV- II стадий. А также сохранение и улучшение условий для осуществления репродуктивной функции за счет разработки новых технологичных подходов.

## Материал и методы

В настоящее время комбинированное лечение в полном объеме проведено 5 пациенткам, хирургический этап лечения осуществлялся на базе онкогинекологического отделения НИИ онкологии Томского НИМЦ и отделения гинекологии ГКБ №24 Москвы в течение 2019-2020 гг. Средний возраст больных составил 29±3,8 лет, гистологически — плоскоклеточный неороговевающий рак шейки матки, стадия: T1b1-2No-1Mo. Все пациентки подписали информированное согласие о сохранении репродуктивных намерений и были предварительно проконсультированы

врачом-репродуктологом с целью оценки овариального резерва.

Согласно предлагаемой нами методике хирургического вмешательства всем 5 больным проводилось назначение агонистов рилизинг-факторов одновременно с началом курсов неoadьювантной химиотерапии (т.е. за 2-3 мес. до оперативного вмешательства) с целью исключения менструального цикла, что позволило уменьшить травматичность операции за счет простой фиксации матки в параумбиликальную область без наложения стомы на переднюю брюшную стенку. Следующей отличительной особенностью явилось проведение интраоперационной лучевой терапии (ИОЛТ) в дозе 10 Гр на культю влагалища во время проведения 1-го этапа хирургического вмешательства (у 1-ой пациентки), что значительно сократило сроки проведения лучевой терапии и, по нашему мнению, обеспечит снижение частоты лучевых осложнений.

На этапе реконструктивно-пластической операции нами проводилось формирование запирающего аппарата матки путем использования имплантата из никелида титана с новыми усовершенствованными техническими характеристиками (у 2-х пациенток). Во время реконструктивно-пластического этапа операции зону анастомоза от нижнего сегмента матки до верхней 1/3 влагалища с внешней стороны покрывали сетчатым имплантатом с размером ячеек сетки от 3 до 5 мм, шириной 35-40 мм и длиной 80-90 мм, при этом диаметр нити ленты составил 10-15 мкм, размер ячейки 3-4 мм, сплетенным в виде чулка из сверхэластичных никелид-титановых нитей, далее имплантат фиксировали отдельными швами по периметру.

Разработанная методика комбинированного лечения инвазивного РШМ, которая включает в себя комбинацию лечебных мероприятий, позволяет обеспечить функциональную сохранность матки и придатков у пациенток с инвазивными формами рака шейки матки, нуждающихся в проведении комбинированного лечения, т.е. выполнении расширенной операции с последующим лучевым или химиолучевым воздействием на область малого таза. Основным техническим приемом является транспозиция матки с придатками, выполняемая в составе радикальной абдоминальной (или лапароскопической) трахелэктомии, позволяющая вывести маточно-овариальный комплекс из зоны лучевой нагрузки. По завершении лучевого лечения матка с придатками «возвращается» в малый таз, формируется маточно-вагинальный анастомоз. Самостоятельная беременность, а также использование вспомогательных репродуктивных технологий разрешаются, но планируется по прошествии наиболее вероятного срока реализации отдаленных метастазов.

Данный подход также может быть реализован у молодых больных со злокачественными опухолями анального канала и вульвы, требующими лучевого лечения.

Разработаны показания и условия для выполнения операции:

1. Плоскоклеточный, аденогенный рак шейки матки.
2. Стадии T1B1-2No-1Mo, T2A-BNo-1Mo.
3. Репродуктивный возраст (до 45 лет).
4. Наличие овариального резерва.
5. Сохранение репродуктивных намерений.
6. Возможность динамического контроля.

В соответствии со стандартами комбинированное (комплексное) лечение инвазивного рака шейки матки у больных репродуктивного возраста предполагает проведение химиотерапии на I этапе, оперативное вмешательство (расширенная экстирпация матки с транспозицией яичников) на II этапе, сочетанное лучевое или химиолучевое лечение на III этапе [9, 10].

В нашем исследовании этапы комбинированного органосохраняющего лечения инвазивного рака шейки матки представлены в следующей последовательности:

I этап — химиотерапевтическое лечение 2-3 курса (гемзар или таксаны + платиновые производные),

II этап — хирургический (онкологический и реконструктивный),

III этап — сочетанное лучевое или химиолучевое лечение,

IV этап — хирургический (реконструктивно-восстановительный),

V этап — репродуктивный.

*I ЭТАП (химиотерапевтический).* В I этапе проводится стандартное химиотерапевтическое лечение с использованием гемзара, таксанов и производных платины в количестве 2-3 курсов с трехнедельным интервалом. В нашем исследовании три пациентки получили 2 курса предоперационной полихимиотерапии по схеме гемзар+цисплатин, две пациентки 2 курса по схеме таксотер+цисплатин. Хирургическое лечение может быть выполнено после нормализации гематологических показателей, в среднем через 2-3 недели после окончания курса химиотерапии. Кроме того, в ходе операции необходимо соблюсти возможность реализации менструальной функции, т.к. послеоперационный период и продолжительность лучевой терапии суммарно должны составить не более трех мес. Поэтому нами предложена методика назначения препаратов агонистов рилизинг-факторов (Бусерелин, Люкрин-депо) для исключения менструальной функции на весь период лечения.

Продолжительность приема указанных лекарственных средств определяется датой выполнения реконструктивной операции, восстанавливающей анатомические взаимоотношения — низведение матки и формирование маточно-вагинального анастомоза. После проведения данного оперативного вмешательства АГНРГ могут быть отменены.

*II ЭТАП (хирургический).* Варианты доступа: 1. Транс-абдоминальный: срединно-, нижнесрединная лапаротомия; 2. Лапароскопический.

Ход операции: в I этапе выполнялось оперативное вмешательство, которое полностью соответствовало радикальной трахелэктомии, т.е. удалялась шейка матки с околошеечной клетчаткой, влагалищной манжетой, тазовыми лимфатическими узлами. Производилась интраоперационная морфологическая оценка состояния лимфатических узлов и линии резекции шейки матки (проксимальной и дистальной). Важно отметить, что наличие метастазов в регионарных (тазовых) лимфатических узлах не является противопоказанием к продолжению операции, но может требовать выполнения поясничной (парааортальной) лимфаденэктомии.

Обязательным является пересечение маточных сосудов, обеспечивающее радикальное удаление околошеечной клетчатки. Соответственно, кровоснабжение транспозируемой матки осуществляется за счет сосудов расположенных в воронко-тазовых связках. На примере применяющейся в настоящее время радикальной трахелэктомии доказана достаточность данного варианта «питания» матки.

2-й этап: артерии и вены воронко-тазовых связок выделялись с обеих сторон максимально «высоко», до уровня их отхождения от магистральных коллекторов поясничной области (аорта и нижняя полая вена, почечные сосуды). За счет данного технического приема достигается мобильность «маточно-овариального» комплекса, позволяющая выполнить его «временную» (на период проведения послеоперационной лучевой терапии) транспозицию в область мезогастрия в целях исключения лучевого повреждения (рис. 1).

*III этап — сочетанное лучевое или химиолучевое лечение,* проводится по принятым стандартам в соответствии с основными онкологическими показателями. Нами предлагается следующая тактика проведения лучевой терапии:

*1 группа:* больным с T1B1-2No-1Mo, T2A-BNo-1Mo, проводится сочетанная лучевая терапия по стандартной

методике: курс дистанционной лучевой терапии (ДГТ) 44 Гр, вн/полостная лучевая терапия 50 Гр с радиомодификацией цисплатином в суммарной дозе 200 мг.

**2 группа:** А. Больным с T1B1-2NoMo, T2A-BNoMo, размером опухолевого очага до 4 см, проводится лучевая терапия с использованием интраоперационной лучевой терапии электронным излучением малогабаритного бетатрона с фиксированной энергией пучка 6 МэВ, установленного в операционной в разовой дозе 10 Гр., что по изоэффекту соответствует 24,8 Гр. стандартного курса облучения на культю влагалища. Б. Больным с T1B1-2No-1Mo, T2A-BNo-1Mo размером опухолевого очага более 4 см, проводится лучевая терапия с использованием интраоперационной лучевой терапии электронным излучением малогабаритного бетатрона с фиксированной энергией пучка 6 МэВ, установленного в операционной в разовой дозе 10 Гр., что по изоэффекту соответствует 24,8 Гр. стандартного курса облучения на культю влагалища. В послеоперационном периоде проводится курс дистанционной лучевой терапии на параметральную зону и пути лимфооттока в стандартном режиме фракционирования. Использование методики интраоперационной лучевой терапии позволяет улучшить переносимость курса лучевой терапии и существенно сократить сроки III этапа лечения.

Проведение интраоперационной лучевой терапии при трансабдоминальном доступе проводится по стандартной методике. При лапароскопическом доступе мы планируем проведение мини-лапаротомного разреза по Пфаненштилю с дальнейшей навигацией бетатрона на культю влагалища.

**IV этап (хирургический)** — реконструктивный, включает в себя восстановление анатомических взаимоотношений: матка разъединяется с передней брюшной стенкой, матка низводится в малый таз, формируется маточно-влагалищный анастомоз (рис. 2).

На этапе реконструктивно-пластической операции нами предлагается формирование запирающего аппарата матки путем использования имплантата из никелида титана с новыми усовершенствованными техническими характеристиками. Во время реконструктивно-пластического этапа операции зону анастомоза от нижнего сегмента матки до верхней 1/3 влагалища с внешней стороны покрывается сетчатым имплантатом с размером ячеек сетки от 3 до 5 мм, шириной 35-40 мм и длиной 80-90 мм, при этом диаметр нити ленты составляет 10-15 мкм, размер ячейки 2-4 мм, сплетенным в виде чулка из сверхэластичных никелид-титановых нитей с последующей фиксацией отдельными швами по периметру. Применение имплантата позволяет сформировать запирающий аппарат матки и укрепить зону маточно-влагалищного анастомоза [10, 11]. Использование имплантата из сверхэластичного никелида титана не создает препятствий для ультразвукового мониторинга в различные периоды динамического наблюдения, кроме того, благодаря слабой рентгеноконтрастности данного материала возможно проведение обзорной рентгенографии с целью оценки состояния анастомоза. Оценка эффективности применения имплантата при УЗИ показало сформированный запирающий аппарат в области нижнего сегмента матки длиной 1,5-3 см.

**V этап (репродуктивный)** — разрешен через 6 и более мес. после окончания специального лечения (определяется сроком реализации отдаленных метастазов). После самостоятельных попыток беременности возможно использование вспомогательных репродуктивных технологий. В нашем исследовании две пациентки находятся под динамическим наблюдением врачей-репродуктологов на различных этапах подготовки к ЭКО.

Динамическое наблюдение за больными осуществляется в соответствии со стандартами принятыми в онкологии. В табл. 1 приведен анализ гинекологического паритета и течения заболевания у оперированных больных.

**Таблица 1. Особенности гинекологического паритета и течения заболевания у больных РШМ (T1B1-2No-1Mo) стадии после РТ в составе комбинированного лечения**

Variables	PAT	P value	Adjusted P value
Количество операций	5	-	-
возраст	29±3,8	0,178	NS
Количество беременностей в анамнезе:			
- родов	3	-	-
-абортов	5	-	-
Овариальный резерв (уровень АМГ)	5(11,1)	0,31	NS
Репродуктивный потенциал	78(91,2)	0,489	NS
Менструальная функция:			
-продолжительность менструального цикла	27±3,5	-	-
-продолжительность менструации	3,2	-	-
Стеноз внутреннего зева после ПАТ	0	-	-

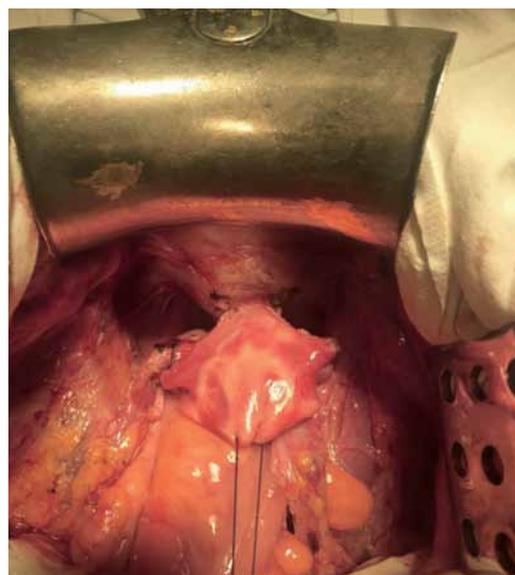


Рис. 1. Этапы оперативного вмешательства. Выделение воронко-тазовых связок и фиксация матки в параумбиликальную область

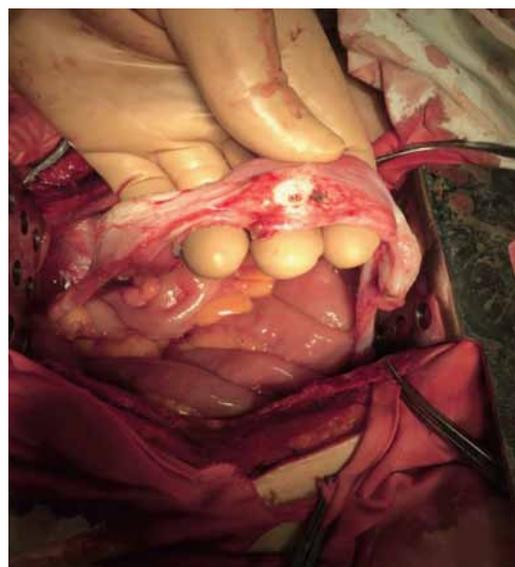


Рис. 2. Этапы оперативного вмешательства. Этап реконструктивно-пластической операции

## Результаты

В настоящее время нами проведено 5 операций в объеме радикальной трахелэктомии с транспозицией матки и отсроченным реконструктивно-пластическим этапом лапаротомным доступом. Медиана наблюдения за прооперированными больными составляет 16,2 мес. На данный момент данных за рецидивы и метастазы нет. Оценка менструальной функции показала, что продолжительность менструального цикла после хирургического лечения в предложенном объеме составила  $27 \pm 3,5$  дней и достоверно не отличалась от показателей перед операцией. Продолжительность менструаций также достоверно не отличалась до и после хирургического лечения. Гипоменструальный синдром был выявлен у 1 пациентки. Анализ состояния гормонального статуса показал, что содержание лютеинизирующего гормона (ЛГ) было практически одинаковым до и после операции. Уровень фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) был достоверно выше в послеоперационном периоде, при этом индекс ЛГ/ФСГ, содержание пролактина, эстрадиола и сексстероидосвязывающего глобулина достоверных различий не имели. Уровень прогестерона и тестостерона не отличался в пред- и послеоперационном периоде.

## Заключение

Таким образом, предлагаемая комбинация лечебных мероприятий позволяет обеспечить функциональную сохранность матки и придатков у пациенток с инвазивными формами рака шейки матки нуждающихся в проведении комбинированного лечения по радикальной программе, т.е. выполнении расширенной операции с последующим лучевым или химиолучевым воздействием на область малого таза. При этом полученные данные позволяют сделать предварительные выводы о полноценном функциональном сохранении менструальной и гормональной функций.

Данное исследование показывает достаточно большие перспективы совершенствования органосохраняющего лечения в онкогинекологии, при этом актуальность практического применения предложенных медицинских технологий не вызывает сомнений. На основании уже известных опубликованных исследований и результатов нашей работы можно однозначно сделать вывод о необходимости тесной консолидации врачей акушеров-гинекологов, онкологов и репродуктологов для решения вопросов о способах достижения и вынашивания беременности [12].

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследование не имело спонсорской поддержки.*

## ЛИТЕРАТУРА

- Каприн, А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2016 году. А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. М.: Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена. 2017: 236 [Kaprin, A.D. The state of oncological care for the population of Russia in 2016 / A.D. Kaprin, V. V. Starinsky, G. V. Petrova. M.: Moscow Research Oncological Institute named after P. A. Herzen. 2017: 236 (In Russ.)].
- Nezhat C., Roman R.A., Rambhatla A., Nezhat F. Reproductive and oncologic outcomes after fertility-sparing surgery for early stage cervical cancer: a systematic review. *Fertil Steril.* 2020 Apr; 113(4):685-703. doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.02.003.PMID: 32228873.
- Антипов В.А., Новикова Е.Г., Балахонцева О.С. Особенности функциональной и анатомической реабилитации после радикальной абдоминальной трахелэктомии. *Проблемы репродукции.* 2010; 1: 103-107. [Antipov V.A., Novikova E.G., Balakhontseva O.S. Features of functional and anatomical rehabilitation after radical abdominal trachelectomy. *Problems of reproduction.* 2010; 1: 103-107 (In Russ.)].
- Чернышова А.Л., Коломиец Л.А., Красильников С.Э. Органосохраняющее лечение при инвазивном раке шейки матки. *Сибирский онкологический журнал.* 2011; 2:72-78. [Chernyshova A. L., Kolomiets L. A., Krasilnikov S. E. Organ-preserving treatment in invasive cervical cancer. *Siberian Oncological Journal.* 2011; 2:72-78 (In Russ.)].
- Lanowska M. et al. Radical vaginal trachelectomy after laparoscopic staging and neoadjuvant chemotherapy in women with early-stage cervical cancer over 2 cm: oncologic, fertility, and neonatal outcome in a series of 20 patients. *Int J Gynecol Cancer.* 2014; 24(3): 586-93.
- Новикова Е.Г., Антипов В.А., Балахонцева О.С. Первый опыт применения вспомогательных репродуктивных технологий после радикальной абдоминальной трахелэктомии. *Российский онкологический журнал.* 2012; 1: 40 [Novikova E.G., Antipov V.A., Balakhontseva O.S. The first experience of using assisted reproductive technologies after radical abdominal trachelectomy. *Russian Oncological Journal.* 2012; 1: 40 (In Russ.)].
- Чернышова А.Л., Коломиец Л.А., Гюнтер В.Э., Марченко Е.С. Новые хирургические аспекты органосохраняющего лечения у больных инвазивным раком шейки матки после радикальной трахелэктомии. *Вопросы онкологии.* 2017; 63(5):743-747 [Chernyshova A.L., Kolomiets L.A., Gunter V.E., Marchenko E.S. New surgical aspects of organ-preserving treatment in patients with invasive cervical cancer after radical trachelectomy. *Questions of oncology.* 2017; 63(5):743-747 (In Russ.)].
- Ribeiro R. et al. Uterine transposition technique: update and review *Minerva Ginecol.* 2019 Feb;71(1):62-71. doi: 10.23736/S0026-4784.18.04360-5.
- Robova H., Rob L., Halaska M.J. et al. Review of Neoadjuvant Chemotherapy and Trachelectomy: Which Cervical Cancer Patients Would Be Suitable for Neoadjuvant Chemotherapy Followed by Fertility-Sparing Surgery? *Current Oncol. Reports.* 2015; 19(132):656-67.

10. Чернышова А.Л., Ляпунов А.Ю., Коломиец Л.А. и др. Определение сторожевых лимфатических узлов при хирургическом лечении рака шейки матки. Сибирский онкологический журнал. 2012; 3: 28-33 [Chernyshova A.L., Lyapunov A.Yu., Kolomiets L.A. et al. Determination of sentinel lymph nodes in the surgical treatment of cervical cancer. Siberian Journal of Oncology. 2012; 3: 28-33 (In Russ.)].
11. Willows K., Lennox G., Covens A. Fertility-sparing management in cervical cancer: balancing oncologic outcomes with reproductive success. Gynecol Oncol Res Pract. 2016 Oct 21;3:9. doi: 10.1186/s40661-016-0030-9.
12. Chernyshova A., Kolomiets L., Chekalkin T. et al. Fertility-Sparing Surgery Using Knitted TiNi Mesh Implants and Sentinel Lymph Nodes: A 10-Year Experience. Journal of investigative surgery. <https://doi.org/10.1080/08941939.2020.1745965>.

Поступила в редакцию 19.06.2020 г.

*A.L. Chernyshova<sup>1</sup>, V.A. Antipov<sup>2</sup>, L.A. Kolomiets<sup>1,5</sup>,  
V.I. Chernov<sup>1,3</sup>, V.E. Gyunter<sup>4</sup>, E.S. Marchenko<sup>4</sup>,  
T.L. Chekalkin<sup>4</sup>*

**Experience of performing radical trachelectomy with uterine transposition in organ-preserving treatment of stage IB-II invasive cervical cancer**

<sup>1</sup>Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk,

<sup>2</sup>Moscow State University, Moscow,

<sup>3</sup>National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk,

<sup>4</sup>Research Institute of Medical Materials and Shape-Memory Implants, Tomsk,

<sup>5</sup>Siberian State Medical University, Tomsk

The development and implementation of organ-preserving treatment modalities is the priority trend in the current cancer treatment of patients of the reproductive age. Methods of expanding indications for organ-preserving treatment in cancer patients are becoming relevant. We present our experience in performing radical trachelectomy with uterine transposition in patients with stage IB-II cervical cancer. Our surgical technique allows the preservation of the uterus and adnexa in patients with invasive cervical cancer, who need to receive combined modality treatment including extended surgery followed by chemotherapy or radiation therapy to the pelvis. Transposition of the uterus and adnexa after radical abdominal or laparoscopic trachelectomy allows the movement of the uterus and ovaries out of the radiation field. After completion of radiation therapy, the uterus with adnexa is repositioned into the pelvis and uterine-vaginal anastomosis is formed using an implant made of titanium nickelide. Independent pregnancy and the use of assisted reproductive technologies are permitted after passing the time when distant metastases are most likely to develop.

**Key words:** cervical cancer, trachelectomy, implant, sentinel lymph nodes, intraoperative radiation therapy, reproductive function

*Р.Ш. Хасанов<sup>1</sup>, Е.В. Файзуллина<sup>2</sup>, И.М. Хисматулина<sup>2</sup>, А.И. Муртазин<sup>3</sup>*

## Кератиноцитарные опухоли кожи: структура клинических проявлений у дерматологических пациентов

<sup>1</sup>Казанская государственная медицинская академия — филиал ФГБОУДПО РМАНПО Минздрава России, г. Казань,

<sup>2</sup>Казанского государственного медицинского университета Минздрава России, г. Казань,

<sup>3</sup>ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Базальноклеточный рак кожи (БКРК) — наиболее распространенное злокачественное новообразование, встречающееся на дерматологическом приеме. Цель исследования: изучить структуру клинических проявлений БКРК у дерматологических пациентов на амбулаторном приеме. Исследование проводилось с 2015 по 2017 гг. в негосударственной клинике г. Казани, имеющей лицензию на оказание медпомощи по специальностям «дерматовенерология», «хирургия». Изучены результаты обследования 2730 пациентов с образованиями кожи, имеющих в амбулаторных картах формы 025-у. Обследован 101 пациент с гистологически верифицированным БКРК, из них 29% мужчин (n=29) и 71% женщин (n=72), средний возраст — 59,7±14,9 лет (медиана — 61,5 года). Доля пациентов с БКРК среди больных со всеми злокачественными новообразованиями кожи на дерматологическом приеме составила 95,3% (n=101). Чаще всего БКРК страдали женщины и мужчины в возрасте 60 — 74 лет — 21,0% (n=21) и 16,0% (n=16) соответственно. Доля женщин в возрасте 45 — 59 лет была достоверно выше — 20,0%, чем доля мужчин — 9,0% (p<0,05). Обращаемость к дерматологу в срок менее года с момента возникновения заболевания была достоверно больше у мужчин — 55,0%, чем у женщин — 21,4% (p<0,01). Доля женщин 44,6%, отметивших появление опухоли в течение длительного периода (≥5 лет), была достоверно меньше, чем доля мужчин 15,0% (p<0,05). Наиболее распространенным вариантом БКРК явилась узловая форма n=77 (76,2%), при которой первичные элементы в 80,5% случаев идентифицировались врачами-дерматологами как единичные папулы размерами 5-10 мм. Окуло-фронтально-назальная область вовлекалась в патологический процесс в 47,5% (n=48) случаев, что достоверно чаще, чем при других локализациях (p<0,05). Дерматоскопия улучшала визуализацию атипичной сосудистой сети.

**Ключевые слова:** базально-клеточный рак кожи, базалиома

### Введение

Базальноклеточный рак кожи (БКРК) относится к числу наиболее часто встречающихся опухолей человека [1, 2, 3]. Согласно литературным данным, доля БКРК составляет до 75% всех кератиноцитарных новообразований кожи. Так, в 2017 г. показатель заболеваемости (не стандартизированный) всеми немеланомными эпителиальными опухолями кожи составил 53,9 на 100 000 для обоих полов и занял первое место в структуре онкологической заболеваемости. С 2007 по 2017 гг. отмечается прирост заболеваемости на 31,1%. Средний возраст пациентов составил 69,2 года [2, 4].

Цель исследования: изучить структуру клинических проявлений БКРК у дерматологических пациентов на амбулаторном приеме.

### Материалы и методы

Исследование проводилось с 2015 по 2017 гг. в негосударственной клинике г. Казани, лицензированной по специальностям «дерматовенерология», «хирургия». Исследование носило ретроспективный характер (серия случаев). Изучены результаты обследования 2730 пациентов с образованиями кожи, имеющих в амбулаторных картах формы 025-у.

Критерии включения в исследование: пациенты в возрасте старше 18 лет с гистологически подтвержденным диагнозом БКРК, с размерами образования до 2 см (T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>).

Критерии исключения: пациенты с доброкачественными образованиями кожи эпителиальной природы; пациенты с меланоцитарными доброкачественными и злокачественными образованиями кожи; пациенты с размерами образования 2 см и более; возраст младше 18 лет.

Клиническими критериями постановки диагноза БКРК явились новообразования (единичные и множественные) на коже лица, волосистой части головы и открытых участках тела: пятна розового цвета округлой или овальной формы с блестящей поверхностью и приподнятыми нитевидными краями; четко очерченные папулы серого, розового или желтовато-коричневого цвета с истонченной поверхностью перламутрового оттенка, узлы куполообразной формы с корками, чешуйками, телеангиоэктазиями на поверхности; длительно незаживавшие узлы с изъязвленными валикообразными краями и папилломатозными выростами [5, 6, 7].

Распределение первичных элементов по количеству: единичные (от 1 до 3) и множественные (более 3).

В исследование включались пациенты с размерами образований до 2 см<sup>1</sup>.

Клинические элементы при БКРК были дифференцированы в зависимости от локализации: область лба, носа и вокруг глаз; область подбородка и вокруг рта, щечно-скуловая область, область ушных раковин, волосистая часть головы, другие локализации [8, 9].

Пациенты с БКРК были обследованы по следующему алгоритму: сбор анамнеза; клиническое обследование, включая данные дерматоскопии; гистологическое исследование взятых при биопсии образцов препаратов [10]<sup>2</sup>.

Забор материала осуществлялся хирургическим иссечением в пределах здоровых тканей и с помощью радиочастотного аппарата «Сургитрон ЕМС» Elmann®, USA.

При обработке результатов исследования использовались методы непараметрической статистики с расчетом критерия хи-квадрата ( $\chi^2$ ) Пирсона. Медико-биологические данные исследования обрабатывались с помощью программной системы Microsoft Excel 2017 (версия 15.32).

## Результаты

На дерматологическом приеме за 2015-2017 гг. был обнаружен 101 случай БКРК, что составило 95% от всех обращений по поводу злокачественных новообразований кожи. Среди пациентов с БКРК было 28,7% мужчин (n=29) и 71,3% женщин (n=72), средний возраст составил 59,7±14,9 лет (медиана — 61,5 года).

Структура всех выявленных новообразований кожи и подкожной клетчатки (n=2730) была следующая: доля кератиноцитарных веррукозных образований — 47,5% (n=1297), пигментных доброкачественных опухолей — 31,5% (n=859), акантом — 9,8% (n=268), других опухолей кожи и подкожной клетчатки — 7,5% (n=205), БКРК — 3,7% (n=101). Злокачественных новообразований кожи выявлено — 106 случаев, 95,3% (n=101) составил БКРК.

Исходя из данных, представленных в табл. 1, чаще всего БКРК страдали женщины и мужчины в возрасте 60 — 74 лет — 21,0% (n=21) и 16,0% (n=16) соответственно. Доля женщин в возрасте 45 — 59 лет достоверно (p<0,05) выше — 20,0% (n=20), чем доля мужчин — 9,0% (n=9). Наиболее распространенным морфологическим вариантом БКРК явилась узловатая форма (n=77; 76,2%), которая диагностировалась во всех возрастных группах. Поверхностная форма составила 7,9% (n=8) от общего количества пациентов с БКРК. Этот вариант БКРК (n=8) распределялся по возрастным группам равномерно и встречался только у женщин. Мультицентрическая форма была диагностирована у 3 пациентов (3%). В 12,9% (n=13) случаев не удалось верифицировать форму БКРК.

Самой распространенной локализацией БКРК явилась окуло-фронтально-назальная область лица — в 47,5% (n=48) случаев. Эта область чаще всего поражалась в возрастной группе 60-74 года — выявлена у 19 больных. Волосистая часть головы (ВЧГ) достоверно чаще вовлекалась в процесс в возрастных группах 60-74 года и 75-90 лет — 8,9% (n=9) (p=0,01). Область подбородка и вокруг рта, а также щечно-скуловая зона поражались с одинаковой частотой — по 7 пациентов в каждой группе (6,9%). У 2 пациентов (2%) БКРК располагался на коже ушных раковин. Другие локализации составили 27,7% (n=28) от общего количества пациентов с БКРК, включали в себя область спины (n=9), передне-верхнюю поверхность груди (n=8), шеи (n=6), надплечья (n=5).

Данные по распределению пациентов по локализации и формам БКРК представлены в табл. 2. «Излюбленной» локализацией наиболее распространенного узловатого варианта БКРК оказалась область лба, носа и вокруг глаз (n=39) (50,6% всех случаев узловатого варианта базалиомы). Интересно, что 100% случаев (n=3) мультицентрической формы и 62,5% (n=5) поверхностного варианта базальноклеточного рака локализовались не в области головы.

Поверхностная форма БКРК характеризовалась, как правило, наличием единичных пятен (n=1) и плоских папул (n=6), размерами до 2 см. При узловатой форме первичные элементы чаще всего (80,5%) описывались врачами-дерматологами как единичные папулы размерами 5-10 мм (n=62) (табл. 3).

При каждом отдельном случае БКРК могли быть описаны сразу несколько вторичных элементов, или они могли вовсе отсутствовать. Вторичные элементы были выявлены в ходе дерматологического осмотра у 62,5% пациентов с поверхностной формой (n=5), у 64,9% (n=50) — с узловатой формой и у 100,0% (n=3) пациентов с мультицентрической формой БКРК. Чаще всего из вторичных элементов при дерматологическом осмотре выявлялись корочки у 40 пациентов (39,6%) и усиление пигментации образований у 27 больных (26,7%). Телангиэктазии (описывались врачами как: «расширенная капиллярная сеть», «образование пронизано сосудами») встречались в 22 (21,8%) наблюдениях. Склонность к травматизации кожных образований была отмечена в 34,7% всех наблюдений (n=35), что и стало одной из основных причин обращений пациентов к врачу. Лишь у 2 пациентов с узловатой формой БКРК образования оказались болезненными при пальпации (табл. 3).

Длительность заболевания смогли указать 76 пациентов — 75,2% , из них 20 мужчин и 56 женщин. Обращаемость к дерматологу в срок

1 Приказ от 20 декабря 2012 года N 1143н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при злокачественных новообразованиях кожи (меланома, рак) I-IV стадии (обследование в целях установления диагноза заболевания и подготовки к противоопухолевому лечению)». <http://docs.cntd.ru/document/499001047>.

2 Проводилось на базе гистологической лаборатории Республиканского клинического кожно-венерологического диспансера Министерства здравоохранения Республики Татарстан (РККВД МЗ РТ).

**Таблица 1. Распределение пациентов по возрасту, полу и формам БКРК**

№ п/п	Возраст, лет	Пол	Формы БКРК								Всего	
			поверхностная (n=8)		узловая(n=77)		мультицентрическая (n=3)		неуточненные формы (n=13)			
			абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
1	18-44	женщины	3	37,5	9	11,7	2	66,7	1	7,7	15	15,0
		мужчины	-	0	3	3,9	-	0	-	0	3	3,0
2	45-59	женщины	2	25,0	13	16,9	-	0	5	38,4	20	20,0*
		мужчины	-	0	8	10,3	-	0	1	7,7	9	9,0*
3	60-74	женщины	1	12,5	17	22,1	-	0	3	23,1	21	21,0
		мужчины	-	0	14	18,2	-	0	2	15,4	16	16,0
4	75-90	женщины	2	25,0	12	15,6	1	33,3	1	7,7	16	16,0
		мужчины	-	0	1	1,3	-	0	-	0	1	1,0
Итого			8	100,0	77	100,0	3	100,0	13	100,0	101	100,0

Примечание: \* p<0,05

**Таблица 2. Распределение пациентов по локализации и формам БКРК**

№ п/п	Локализация	Формы БКРК								Всего	
		поверхностная (n=8)		узловая(n=77)		мультицентрическая (n=3)		неуточненные формы (n=13)			
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
1	ВЧГ	1	12,5	8	10,4	-	0	-	0	9	9,0
2	Область подбородка и вокруг рта	-	0	6	7,8	-	0	1	7,7	7	7,0
3	Область лба, носа и вокруг глаз	1	12,5	39	50,6*	-	0	8	61,5	48	48,0
4	Щечно-скуловая область	-	0	6	7,8	-	0	1	7,7	7	7,0
5	Область ушных раковин	1	12,5	1	1,3	-	0	-	0	2	2,0
6	Другие локализации	5	62,5	17	22,1*	3	100,0	3	23,1	28	28,0
Итого		8	100,0	77	100,0	3	100,0	13	100,0	101	100,0

Примечание: \* p<0,05

**Таблица 3. Распределение пациентов по структуре первичных и вторичных элементов и формам БКРК**

	Первичные и вторичные элементы, травмированность образований	Формы БКРК								Всего	
		поверхностная (n=8)		узловая(n=77)		мультицент-рическая (n=3)		неуточненные формы (n=13)			
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Первичные	пятна	1	12,5			1	33,3	2	15,4	4	4,0
	папулы	6	75,0	62	80,5	2	66,7	11	84,6	81	80,2
	узлы	1	12,5	15	19,5	-	0	-	0	15	15,8
Вторичные	эрозии	-	0	1	1,3	-	0	-	0	1	1,0
	язвы	-	0	1	1,3	-	0	-	0	1	1,0
	гиперпигментация	1	12,5	21	27,3	1	33,3	4	30,8	27	26,7
	корки	2	25,0	32	41,6	1	33,3	5	38,5	40	39,6
	шелушение	3	37,5	10	13,0	2	66,7	2	15,4	17	16,8
	телеангиэктазии	2	25,0	17	22,1			3	23,1	22	21,8
Сопутствующие признаки	отсутствие вторичных элементов	3	37,5	27	35,1	1	33,3	3	23,1	34	33,7
	травма	2	25,0	28	36,4	0		5	38,5	35	34,7
	боль	-	0	2	2,6	-	0	-	0	-0	

менее года с момента возникновения заболевания была достоверно больше у мужчин — 55,0%, чем у женщин — 21,4% ( $p < 0,01$ ). Доля женщин (44,6%), отметивших появление опухоли в течение длительного периода ( $\geq 5$  лет), была достоверно меньше, чем доля мужчин (15,0%) ( $p < 0,05$ ).

При дерматоскопическом исследовании БКРК у дерматологических пациентов были выявлены следующие особенности. Атипичные сосуды визуализировались у 73,3% ( $n=74$ ) базалиом. Врачи-дерматологи описывали их как «древовидные», «извитые», в виде «точек», «шпилек», «клубочков». При этом только в 22 случаях «телеангиэктазии» на поверхности образований были заметны «невооруженным глазом» при простом клиническом осмотре. Изъязвления на поверхности образований дерматоскопически находили у 41,6% ( $n=42$ ) пациентов, что соотносилось с 42 пациентами, имевшими при простом осмотре корки ( $n=40$ ), язвы ( $n=1$ ) и эрозии ( $n=1$ ). Светящиеся гомогенные зоны белого-розового цвета («роговые жемчужины») визуализировались у 51,5% пациентов ( $n=52$ ).

Большая часть пациентов (75,2%;  $n=76$ ) явились за результатами гистологического исследования, блоками и стеклами с микропрепаратами в течение первого месяца после их извещения. Восемь человек, будучи извещенными о готовности результатов, не явились вовсе.

### Обсуждение

Доля пациентов с БКРК среди больных со всеми злокачественными новообразованиями кожи на дерматологическом приеме составила 95,3% ( $n=101$ ). В то же время по данным литературы доля базалиом составляет 75% немеланомных раков кожи. Это означает, что пациенты с БКРК чаще, чем с другими видами рака кожи (меланомы, плоскоклеточный рак), предпочитают обращаться в дерматологическую клинику, не ощущая себя нуждающимися в онкологической помощи [2, 4, 5].

Возрастно-половая структура, а также распределение БКРК по формам заболевания на дерматологическом приеме не отличается от данных, приведенных в литературе [2, 4, 5]. БКРК страдали женщины и мужчины в возрасте 60 — 74 лет — 21,0% и 16,0% соответственно. Доля женщин в возрасте 45-59 лет достоверно выше — 20,0%, чем доля мужчин — 9,0% (критерий  $\chi^2$  с поправкой Йейтса:  $df=1$ ,  $\chi^2=4,1724$ ,  $p=0,0411$ ). Самой распространенной морфологической формой БКРК являлась узловая  $n=77$  (76,2%). Следует отметить слабую работу гистологической службы

в клиниках дерматологического профиля. Так, при гистологической верификации базалиом в заключении не указывались формы злокачественного новообразования (неуточненные формы) в 13 случаях из 101 (12,9%). Наиболее часто — в 47,5% ( $n=48$ ) случаев БКРК поражал окуло-фронтально-назальную область, что объясняется наибольшей подверженностью этой части лица ультрафиолетовому излучению. Узловая форма БКРК достоверно чаще встречается в Т-зоне (области лба, носа и вокруг глаз), чем в какой-либо другой (критерий  $\chi^2$  с поправкой Йейтса:  $df=1$ ,  $\chi^2=4,226$ ,  $p < 0,05$ ). Доля лиц с локализацией БКРК на ВЧГ отмечалась достоверно чаще в возрастных группах 60-74 года и 75-90 лет (критерий  $\chi^2$  с поправкой Йейтса:  $df=1$ ,  $\chi^2=6,669$ ,  $p=0,01$ ).

При узловой форме первичные элементы чаще всего (80,5%) описывались врачами-дерматологами как единичные папулы размерами 5-10 мм ( $n=62$ ). Это говорит о том, что в клинику кожных болезней обращаются пациенты с внешне «незапущенными» формами БКРК, однако, гистологически у них обнаруживаются признаки глубокой узловой формы [2].

Длительность заболевания смогли указать 76 пациентов — 75,2%, из них 20 мужчин и 56 женщин. Обращаемость к дерматологу в срок менее года с момента возникновения заболевания была достоверно больше у мужчин ( $n=11$ ) — 55,0%, чем у женщин ( $n=12$ ) — 21,4% (критерий  $\chi^2$  с поправкой Йейтса:  $df=1$ ,  $\chi^2=6,531$ ,  $p < 0,01$ ). Доля мужчин ( $n=3$ ) и женщин ( $n=25$ ), отметивших появление опухоли в течение длительного периода ( $\geq 5$  лет), составила 15,0% и 44,6%, соответственно (критерий  $\chi^2$  с поправкой Йейтса:  $df=1$ ,  $\chi^2=4,43$ ,  $p < 0,05$ ). Более позднее обращение женщинами в дерматологическую клинику с целью удаления образований на коже можно объяснить тем, что женщины склонны рассматривать кожные опухоли как чисто косметологическую, «несерьезную» проблему.

Дерматоскопия улучшала визуализацию такого специфического для базалиомы феномена как атипичная сосудистая сеть. Атипичные сосуды визуализировались у 73,3% ( $n=74$ ) базалиом. При этом только в 22 случаях «телеангиэктазии» и «сосудистая сеть» на поверхности образований были заметны «невооруженным глазом» при простом клиническом осмотре [10].

Следует отметить, что 76 пациентов (75,2%) ответственно подошли к своему здоровью, явившись за результатами гистологического заключения, а также за блоками и стеклами с микропрепаратами, в течение первого месяца после их извещения о готовности результатов, при этом 8 (7,9%) человек, будучи извещенными, не явились вовсе.

## Выводы

При изучении структуры клинических проявлений БКРК у дерматологических пациентов выявлены следующие тенденции.

1. Доля пациентов с БКРК среди больных со всеми злокачественными новообразованиями кожи на дерматологическом приеме составила 95,3% (n=101).

2. Чаще всего БКРК страдали женщины и мужчины в возрасте 60–74 лет — 21,0% и 16,0% соответственно. Доля женщин в возрасте 45–59 лет была достоверно выше — 20,0%, чем доля мужчин — 9,0% (p<0,05).

3. Наиболее распространенным вариантом БКРК явилась узловая форма n=77 (76,2%), при которой первичные элементы 80,5% идентифицировались врачами-дерматологами как единичные папулы, размерами 5–10 мм. Окуло-фронтально-назальная область вовлечена в патологический процесс достоверно чаще, чем при других локализациях — в 47,5% (n=48) случаев (p<0,05).

4. Дерматоскопические методы исследования конкретизировали визуализацию такого специфического для базалиомы феномена как атипичная сосудистая сеть: атипичные сосуды наблюдались у 73,3% (n=74) пациентов с базалиомами. При этом только в 22 случаях «телеангиэктазии» и «сосудистая сеть» на поверхности образований были заметны «невооруженным глазом» при простом клиническом осмотре.

5. Обращаемость к врачу-дерматологу в срок менее года с момента возникновения заболевания была достоверно больше у мужчин — 55,0%, чем у женщин — 21,4% (p<0,01). Доля женщин 44,6%, отметивших появление опухоли в течение длительного периода (≥5 лет), была достоверно больше чем доля мужчин 15,0% (p<0,05).

*Благодарности. Авторы выражают благодарность заведующему гистологической лабораторией РККВД МЗ РТ Нефедову Олегу Валерьевичу и к.м.н., доценту Нефедову Валерию Петровичу за помощь в сборе данных о результатах гистологического исследования при написании статьи.*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Беляев А.М., Прохоров Г.Г., Раджабова З.А. и др. Пункционная криодеструкция рецидивных базалиом области лица с ультразвуковым сканированием и мониторингом операции. Вопросы онкологии.

2016; 62(2): 296-301 [Belyaev A.M., Prokhorov G.G., Radzhabova Z.A. et al. Puncture cryodestruction of recurrent facial area basalomas with ultrasound scan and surgery monitoring. Voprosy Oncologii. 2016;62(2):296-301(In Russ.)].

2. Гамаюнов С.В., Шумская И.С. Базальноклеточный рак кожи — обзор современного состояния проблемы. Практическая онкология. 2012; 13(2): 92-106 [Gamayunov S.V., Shumskaya I.S. Basal cell carcinoma — overview of the current state of the problem. Prakticheskaya onkologiya. 2012;13(2):92-106 (In Russ.)].
3. Elder D.E., Massi D., Scolyer R.A. et al. WHO Classification of Skin Tumours. Lyon, France: IARC, 2018.
4. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность) / под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. 2018: 250 [Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V., editors. Malignant neoplasms in Russia in 2017 (morbidity and mortality). Moscow: 2018:250 (In Russ.)].
5. Рак кожи базальноклеточный и плоскоклеточный. Ассоциация онкологов России, Ассоциация специалистов по проблемам меланомы, Российское общество клинической онкологии. Клинические рекомендации. Год утверждения: 2018. [http://www.oncology.ru/association/clinical-guidelines/2018/rak-kozhi-bazalnokletochnyj-i-ploskokletochnyj\\_pr2018.pdf](http://www.oncology.ru/association/clinical-guidelines/2018/rak-kozhi-bazalnokletochnyj-i-ploskokletochnyj_pr2018.pdf) [Basal cell and squamous cell carcinoma. [Russian Oncology Association, Russian melanoma professional association. Russian Society of Clinical Oncology. Clinical guidelines. 2018 (In Russ.)].
6. Bichakjian C.K., Olencki T., Aasi S.Z. et al. Basal Cell Skin Cancer, Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw. 2016;14(5):574–597. doi:10.6004/jncn.2016.0065.
7. Молочков В.А., Молочков А.В. Клиническая дерматоонкология. М.: Из-во студия МДВ, 2011: 340 [Molochkov V.A., Molochkov A.V. Clinical dermatooncology. Moscow: MDV Studio, 2011:340 (In Russ.)].
8. Дерматовенерология. Национальное руководство. Краткое издание / под ред. Ю. С. Бутова, Ю. К. Скрипкина, О. Л. Иванова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013: 896 [Butova Y.S., Skripkina Y.K., Ivanova O.L., editors. Dermatology. National guidelines. M.: GEOTAR-Media, 2013:896 (In Russ.)].
9. Шляхтунов Е.А., Гиранович А.В., Луд Н.Г. и др. Рак кожи: современное состояние проблемы. Вестник ВГМУ. 2014; 13(3):20-28 [Shlyahyunov E.A., Gidranovich A.V., Lud N.G. et al. Skin cancer: current state of the problem. Bulletin of Vitebsk state medical university. 2014;13(3):20-28 (in Russ.)].
10. Боулинг Д. Диагностическая дерматоскопия [Текст]: иллюстрированное руководство /под общ. ред. Кубановой А.А.; пер. с англ.: Романов Д.В. Москва, Изд-во Панфилова: Бином, 2013:145 [Bowling J. Diagnostic Dermoscopy. The Illustrated Guide / Kubanova AA, editor; transl. by Romanov DV. Moscow, Binom, 2013; 145 (in Russ.)].

Поступила в редакцию 28.06.2020 г.

*R.S. Khasanov<sup>1</sup>, E.V. Faizullina<sup>2</sup>,  
I.M. Khismatulina<sup>2</sup>, A.I. Murtazin<sup>3</sup>*

### **Structural composition and clinical features of dermatological patients with keratinocytic skin tumors**

<sup>1</sup>Kazan State Medical Academy-Branch Campus  
of the Russian Medical Academy of Continuous  
Professional Education  
Kazan,

<sup>2</sup>Kazan State Medical University, Kazan,

<sup>3</sup>N.N. Petrov National Medical Research Center  
of Oncology, St. Petersburg

Basal cell skin cancer (BCC) is the most common malignancy that is found in dermatological practice. The purpose of the study: to determine the structure of clinical manifestations of BCC in ambulant dermatological patients. The study was conducted from 2015 to 2017 in a private clinic in Kazan, which has a license to provide medical care in the specialties «dermatovenerology» and «surgery». We studied the results of examination of 2730 patients with skin tumors available in outpatient cards. 101 patients with histologically verified BCC were examined, including 29% of men (n=29) and 71% of women (n=72), the average age was 59.7±14.9 years (median — 61.5 years). The percentage of patients with BCC among patients with all skin malignancies at the dermatological reception was 95.3% (n=101). Most often, patients aged 60-74 years suffered from BCC: women — in 21.0% (n=21) and men — in 16.0% (n=16), respectively. The proportion of women aged 45-59 years was significantly higher — 20.0%, than the proportion of men — 9.0% (p<0.05). Men were significantly more likely to see a dermatologist — 55.0% in less than a year from the onset of the disease, than women — 21.4% (p<0.01). The proportion of women (44.6%) who noted the appearance of a tumor over a long period (≥5 years) was significantly less than the proportion of men 15.0% (p<0.05). The most common variant of BCC was the nodular form n=77 (76.2%), in which the primary elements of 80.5% were identified by dermatologists as single 5-10 mm papules. The oculo-fronto-nasal region was involved in the pathological process in 47.5% (n=48) of cases, which is significantly more frequent than in other localisations (p<0.05). Dermatoscopy improved the visualization of the atypical vascular network.

Key words: basal cell skin cancer, basal cell skin carcinoma

*А.А. Семенов, Д.М. Бузанаков, Р.А. Черников, И.В. Слепцов, В.А. Макарыш,  
А.А. Успенская, Н.И. Тимофеева, И.К. Чинчук, Ю.В. Карелина, К.Ю. Новокшионов,  
Е.А. Федоров, Ю.Н. Малюгов, С.А. Алексеева, И.В. Саблин, Н.А. Горская, А.В. Золотуха,  
Д.В. Реброва, Е.А. Валдина, А.Н. Бубнов*

## **Предоперационная оценка риска агрессивного течения медуллярной карциномы щитовидной железы**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Клиника высоких медицинских технологий имени Н.И. Пирогова, Санкт-Петербург

**Цели:** изучить отдаленные результаты хирургического лечения больных с медуллярной карциномой щитовидной железы и оценить значимость прогностических факторов.

**Материалы и методы:** в сплошное ретроспективное исследование были включены 169 пациентов с гистологически подтвержденным МК, первично прооперированных в Северо-Западном центре эндокринологии и эндокринной хирургии КВМТ им Н.И. Пирогова СПбГУ с 2010 по 2016 гг. Они были разделены на прогностические группы в соответствии с уровнем и динамикой послеоперационного кальцитонина и клиническими проявлениями болезни.

**Результаты:** проведенное исследование позволило оценить влияние прогностических факторов на риски прогрессирования и рецидива при медуллярном раке щитовидной железы.

Так, размер первичной опухоли более 2 см значимо увеличивает риск прогрессирования заболевания (OR=6,56 (0,52-17,96)  $p=0,00001495$ ). Инвазия капсулы ЩЖ и метастазы в региональные лимфоузлы имеют еще более важное прогностическое значение (OR=49,08 (10,72-224,89),  $p=0,00000011$  и OR=30,63 (9,75-96,27),  $p<0,0000001$  соответственно).

Регионарные метастазы МРЩЖ представляют значимую угрозу для жизни пациента. Это обстоятельство является принципиальным отличием МРЩЖ от ДРЩЖ, регионарные метастазы которого практически не влияют на прогноз.

В данном исследовании не удалось связать прогноз с возрастом пациента.

Уровень базального кальцитонина >600 пг/мл отчетливо влияет на прогноз МРЩЖ (OR=6,65 (2,53-17,59)  $p=0,01055$ ). Его прогностическая ценность сопоставима с таковой у размеров первичной опухоли и заметно меньше, чем у наличия регионарных и отдаленных метастазов.

**Выводы:** Неблагоприятный прогноз у 21 (12,4%) наблюдаемого пациента обусловлен не только наличием отдаленных метастазов, но и во многом — регионарных.

**Ключевые слова:** медуллярная карцинома щитовидной железы, кальцитонин, прогноз

Медуллярная карцинома щитовидной железы (МК) — относительно редкая опухоль, развивающаяся из парафолликулярных С-клеток щитовидной железы, характеризующаяся более агрессивным течением по сравнению с дифференцированными карциномами из фолликулярного эпителия. Хотя доля МК в структуре заболеваемости раком щитовидной железы (ЩЖ) составляет всего 1-7%, на данную опухоль приходится до 13% всей смертности от рака ЩЖ [1, 2]. В последнее время доля медуллярной карциномы среди злокачественных опухолей щитовидной железы снижается, что может быть во многом связано со значительным увеличением выявляемости папиллярной карциномы ЩЖ. В абсолютных цифрах, однако, заболеваемость МК незначительно, но стабильно возрастает, хотя и значительно медленнее других видов рака ЩЖ [3].

Исторически прогноз при МК расценивался как крайне неблагоприятный, ввиду способности опухоли к раннему метастазированию [4]; в последние годы такое заключение изменилось в связи с совершенствованием методов диагностики и выявлением заболевания на более ранних стадиях. По опубликованным данным 5-летняя выживаемость составляла 89% для всех пациентов, 91% — для пациентов с локорегиональным распространением заболевания и 51% — для пациентов с отдаленными метастазами [5]. Сейчас течение большинства случаев МК описывают как индолентное, при этом опухоль мало чувствительна к системной терапии, что указывает на необходимость оценки показателей 10-летней выживаемости среди пациентов с остаточной болезнью — она заметно меньше и составляет

около 65% [6]. Хирургическое лечение остается единственным методом, способным обеспечить полное излечение [7]. В связи с этим крайне важной представляется задача стратификации пациентов по группам риска для оптимизации наблюдения и лечения.

Цель: изучить отдаленные результаты хирургического лечения больных с МК и оценить значимость прогностических факторов.

## Материалы и методы

### *Характеристика пациентов*

В сплошное ретроспективное исследование были включены 169 пациентов с гистологически подтвержденным МК, первично прооперированных в Северо-Западном центре эндокринологии и эндокринной хирургии КВМТ им Н.И. Пирогова СПбГУ с 2010 по 2016 гг. Из них — 130 женщин (76,9%), 39 — мужчин. На момент операции женщины были старше мужчин ( $54,7 \pm 16,7$  лет и  $49,1 \pm 15,9$  соответственно), однако разница не была статистически достоверной ( $p=0,075$ ).

Большинство случаев МК составляет спорадическая форма — до 75%, оставшиеся приходятся на семейную форму, связанную с наследованием аутосомно-доминантной мутации гена *RET* [8]. В большинстве случаев исключение герминативной природы опухоли в силу длительности исследования происходит после первичного лечения. Спорадические опухоли в большинстве случаев обусловлены такими же мутациями гена *RET* и в меньшей степени мутациями *RAS* [9, 10]. Поэтому в данное исследование включались все случаи первичного лечения МК, кроме профилактических тиреоидэктомий. Разделение на группы по критерию семейной или не семейной формы намеренно не проводилась. Частота семейных форм в данной когорте составила 11,8%.

### *Критерии включения и исключения*

Критерием включения был морфологически подтвержденный диагноз медулярная карцинома щитовидной железы после первичного оперативного лечения.

Критериями исключения были длительное симптомное течение заболевания у пациентов намеренно отказывавшихся от специализированной помощи, специфическое лечение медулярной карциномы под маской иного заболевания, психические заболевания влияющие на комплаентность.

### *Характеристика методов обследования*

Были изучены данные предоперационного УЗ-исследования на аппарате Medison Accuvix V10 (линейный датчик 38 мм, 7-16 МГц), данные цитологического исследования ТАБ узлов ЩЖ с и без использования смыва на кальцитонин, данные планового гистологического исследования операционного материала с использованием рутинных методик проводки и окраски, в ряде случаев проведение иммуногистохимического исследования), биохимические маркеры (кальцитонин, РЭА), а также оценивалась динамика кальцитонина и РЭА в послеоперационном периоде (Определение уровня кальцитонина и РЭА производилось на аппаратах Liasson XL (Diasorini) и Abbot Architect). Первые 4 точки уровня кальцитонина и РЭА определялись с интервалом 2 месяца, для расчета скорости удвоения, далее интервал мог увеличиваться в зависимости от отсутствия динамики, но не реже одного раза в год.

### *Характеристика методов лечения*

Всем были выполнены резекция щитовидной железы в объеме тиреоидэктомии и центральная шейная лимфодиссекция, в 30 случаях (17,8%) была выполнена боковая шейная лимфодиссекция.

### *Статистическая обработка данных*

Материалы исследования были подвергнуты статистической обработке с использованием методов параметрического и непараметрического анализа. Накопление, корректировка, систематизация исходной информации и визуализация полученных результатов осуществлялись в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2016. Статистический анализ проводился с использованием пакетов и сред Statsoft Statistica 9.0, OpenEpi 3.11, R-studio 1.2.1 (с компилятором R версии 3.0.1).

Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению, для этого использовался критерий Шапиро-Уилка (при числе исследуемых менее 50) или критерий Колмогорова-Смирнова (при числе исследуемых более 50), а также показатели асимметрии и эксцесса.

В случае описания количественных показателей, имеющих нормальное распределение, полученные данные объединялись в вариационные ряды, в которых проводился расчет средних арифметических величин ( $M$ ) и стандартных отклонений ( $SD$ ).

Номинальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей.

При попарном сравнении средних величин в нормально распределенных совокупностях количественных данных рассчитывался  $t$ -критерий Стьюдента. При сравнении нескольких групп использовался метод ANOVA. Различия показателей считались статистически значимыми при уровне значимости  $p < 0,05$ .

Сравнение номинальных данных проводилось при помощи критерия  $\chi^2$  Пирсона, позволяющего оценить значимость различий между фактическим количеством исходов или качественных характеристик выборки, попадающих в каждую категорию, и теоретическим количеством, которое можно ожидать в изучаемых группах при справедливости нулевой гипотезы.

В качестве количественной меры эффекта при сравнении относительных показателей нами использовался показатель отношения шансов ( $OR$ ).

Для оценки диагностической значимости количественных признаков при прогнозировании определенного исхода, в том числе вероятности наступления исхода, рассчитанной с помощью регрессионной модели, применялся метод анализа ROC-кривых. С его помощью определялось оптимальное разделяющее значение количественного признака, позволяющее классифицировать пациентов по степени риска исхода, обладающее наилучшим сочетанием чувствительности и специфичности. Качество прогностической модели, полученной данным методом, оценивалось исходя из значений площади под ROC-кривой со стандартной ошибкой и 95% доверительным интервалом ( $DI$ ) и уровня статистической значимости.

Оценка функции выживаемости пациентов проводилась по методу Каплана-Мейера. График оценки функции выживаемости представляет из себя убывающую ступенчатую линию, значения функции выживаемости между точками наблюдений считаются константными.

Метод Каплана-Мейера позволяет выполнять анализ цензурированных данных, т.е. оценивать выживаемость с учетом того, что пациенты могут выбывать в ходе эксперимента или иметь разные сроки наблюдения.

## Результаты

Данные безрецидивной выживаемости для всей когорты отображены на рис. 1, временем рецидива считали время от первичной операции до повторной, до времени назначения системной терапии или смерти пациента.

Таблица 1. Распределение пациентов по группам прогноза и основным исследуемым параметрам (N=169)

	группы прогноза				Chi2/ANOVA F	p
	1	2	3	4		
Количество пациентов	115	33	14	7		
Пол						
Ж	96 (83,5%)	25 (75,8%)	7 (50,0%)	2 (28,6%)	17.74	0.0004965
М	19 (16,5%)	8 (24,2%)	7 (50,0%)	5 (71,4%)		
Возраст на момент первой операции	54,06±15,82	51,73±17,51	51,29±12,33	62,71±8,14	1.08084	0.358805
Размер доминантного очага опухоли	1,55±0,90	1,67±1,33	2,38±1,20	3,27±1,76	7.88807	0.000059608
Базальный кальцитонин до операции	969,77±2918,42	1678,92±4138,49	3939,12±4542,54	8086,46±18885,92	5.91193	0.00074065
Количество пораженных лимфоузлов	0,26±0,90	5,39±8,65	17,71±19,34	11,57±11,39	31.0621	<0.0000001
Мультифокальная опухоль						
односторонняя	6	4	5	0	17.33	0.008148
двусторонняя	15	4	3	1		
Инвазивный рост первичной опухоли						
Отсутствие инвазии	108	16	1	1	92.2	<0.0000001
Инвазия капсулы железы	7	14	9	3		
Инвазия в окружающие ткани	0	3	4	3		
Отсутствие сосудистой инвазии	109	31	11	4	15.83	0.001226
Сосудистая инвазия	6	2	3	3		
лимфоузлы						
N0	101	8	1	1	104	<0.0000001
N1a	11	14	2	1		
N1b	3	11	11	5		
метастазы						
M0	115	32	12	4	40.56	<0.0000001
M1	0	1	2	3		

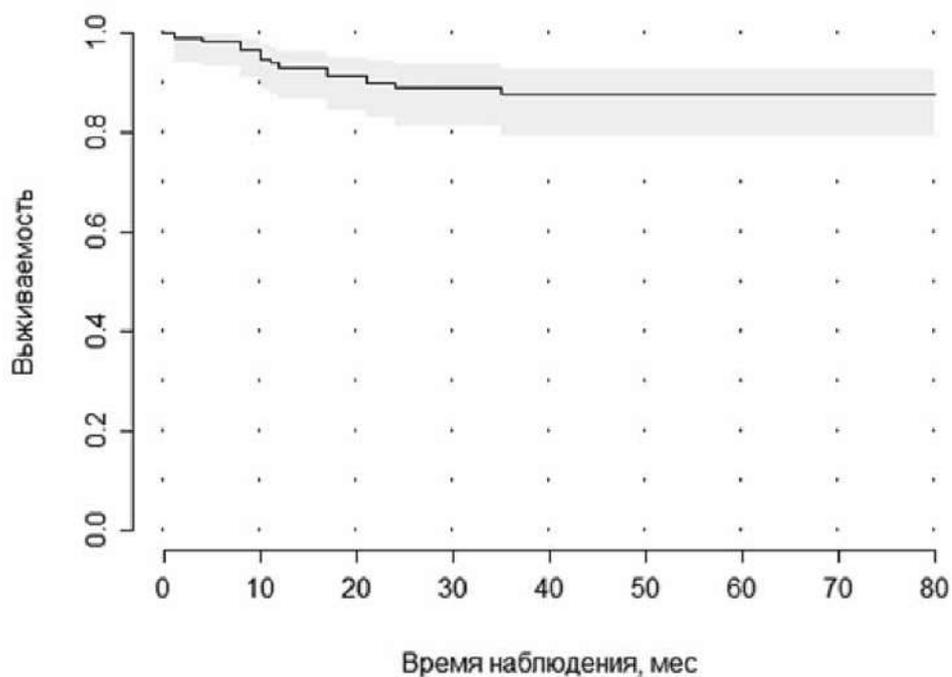


Рис. 1. Кривая без рецидивной выживаемости

Все пациенты были разделены на 4 группы в зависимости от динамики уровня кальцитонина и исхода:

1) пациенты с уровнем кальцитонина, не превышающим референтных значений на момент последнего контакта;

2) пациенты с повышенным уровнем кальцитонина без его роста на протяжении времени наблюдения, либо с периодом удвоения кальцитонина более 12 мес. [11];

3) пациенты, имевшие период удвоения кальцитонина менее 12 мес., либо признаки прогрессии по критериям RECIST, либо пациенты с сохранением клинических симптомов (в основном диареи);

4) пациенты, погибшие от прогрессии медуллярной карциномы щитовидной железы.

Часть пациентов 3-й группы в период наблюдения получали терапию вандетанибом, однако даже при значительном регрессе опухоли прогностическая группа не менялась.

Распределение основных параметров выборки по группам прогноза приведено в табл. 1.

Возраст, вопреки ожиданиям [12], на прогноз достоверно не влиял.

В связи с малочисленностью групп 3 и 4 для адекватности сравнения отношение шансов рассчитывалось для объединенных групп с «хорошим» (1-я и 2-я) и «плохим» (3-я и 4-я) прогнозом. Мужской пол оказался неблагоприятным прогностическим фактором (OR=5,98 (2.29-15.60),  $p=0.0007839$ ). Вероятно, это обусловлено не связью с половыми гормонами, а низким процентом случайно выявленных микрокарцином у мужчин и более поздним обращением за медицинской помощью.

Важным фактором, влияющим на прогноз, считается размер первичной опухоли. По полученным данным по мере увеличения размера опухоли достоверно ухудшался прогноз. Для определения порогового значения максимального размера опухоли, ассоциированного с риском прогрессирования, был выполнен ROC-анализ (рис. 2): AUC=0,863, оптимальная чувствительность составила 86,7%, а специфичность — 77,7% для порога в 2 см, что совпадает с границей T1/T2.

Прогноз у пациентов с первичной опухолью более 2 см был достоверно хуже (OR=6,56 (0.52-17.96)  $p=0,00001495$ ). На рис. 3 отображено влияние размера опухоли на безрецидивную выживаемость. Обращает на себя внимание то, что через 5 лет кривые вновь начинают сближаться. Вероятно, это следствие того, что способность метастазировать у медуллярной карциномы проявляется еще в начале заболевания.

Мультифокальное поражение в три раза увеличивало вероятность неблагоприятного прогноза (OR=3,08 (1.18-8.00),  $p=0,008435$ ). Причем при одностороннем поражении — за счет внутриорганного метастазирования, а при двустороннем (ассоциированным с наследственными формами) — с более ранним дебютом заболевания. Наличие инвазии капсулы железы ожидаемо достоверно влияло на прогноз (OR=49,08 (10.72-224.89),  $p=0,00000011$ ), хотя нельзя исключить прямую связь с размером опухоли. Удивительно, что сосудистая инвазия в меньшей степени влияла на прогноз OR=7 (2,14-22,89),  $p=0.0001566$ . Впрочем, анализ причин гибели пациентов с медуллярной карциномой, показывает, что нередко причинами являлись рецидивы на шее и в верхнем средостении, что практически не наблюдается при папиллярных карциномах.

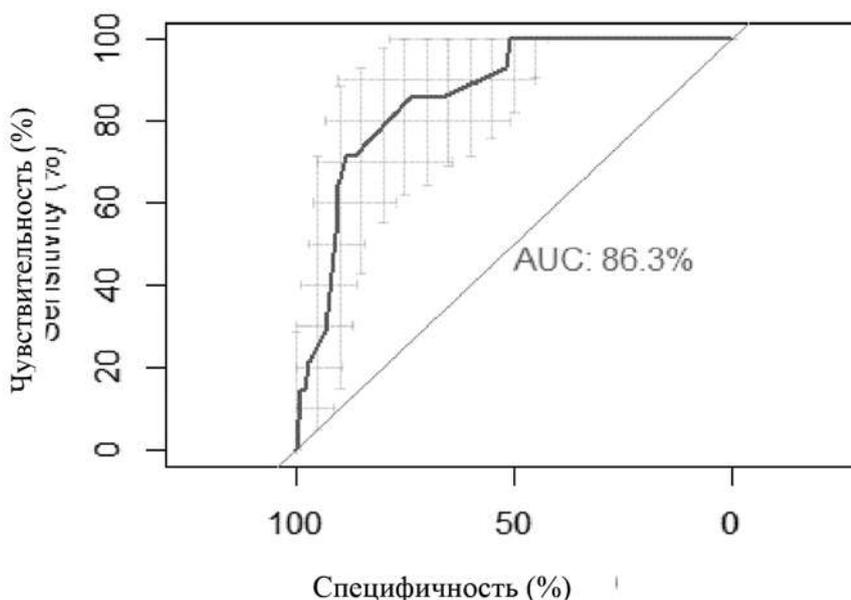


Рис. 2. ROC анализ прогностической значимости размера опухоли

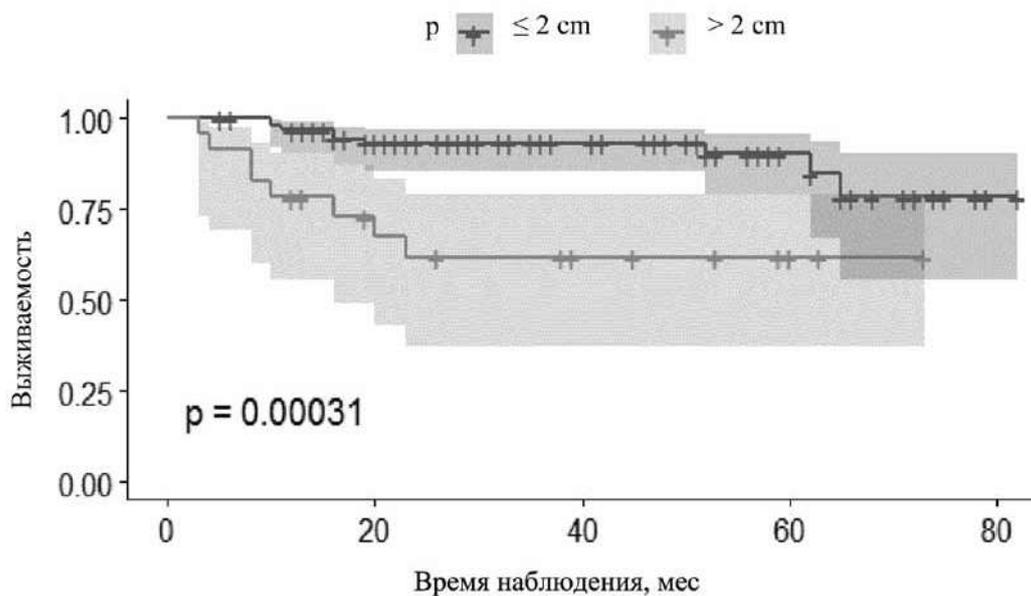


Рис. 3. Кривые безрецидивной выживаемости для опухолей не более 2 см и более

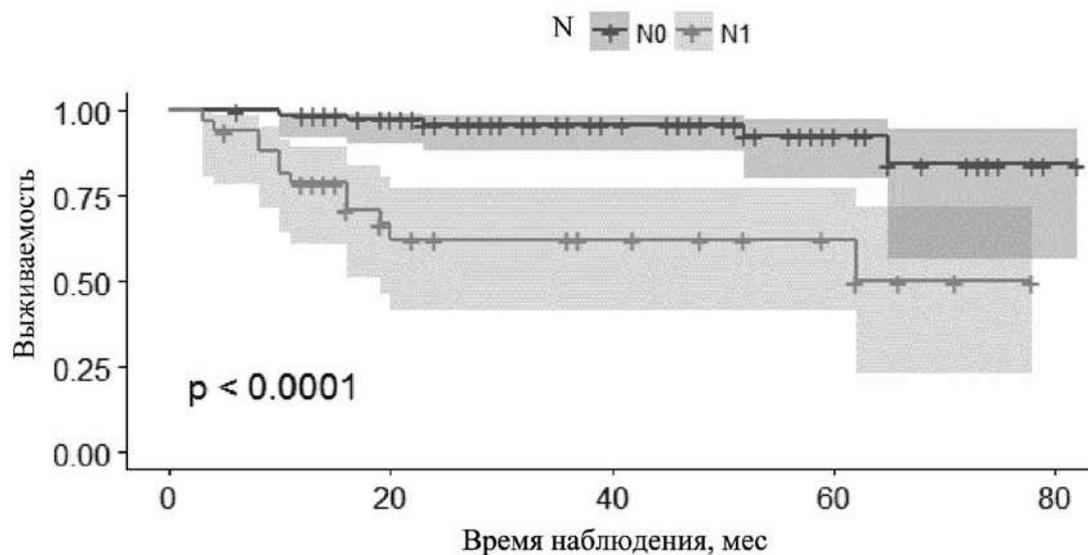
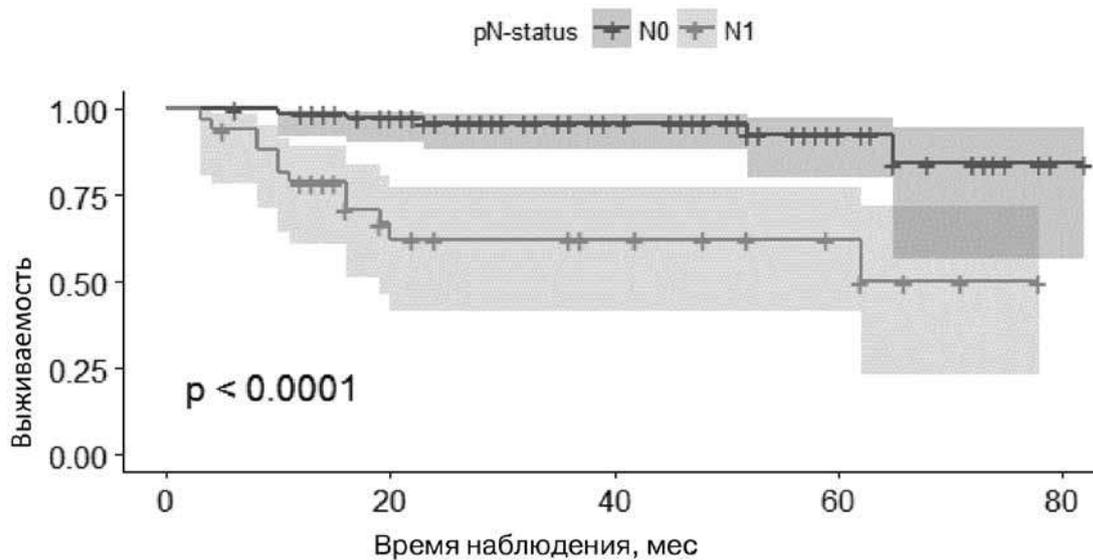


Рис. 4. Кривые безрецидивной выживаемости в зависимости от наличия лимфогенных метастазов

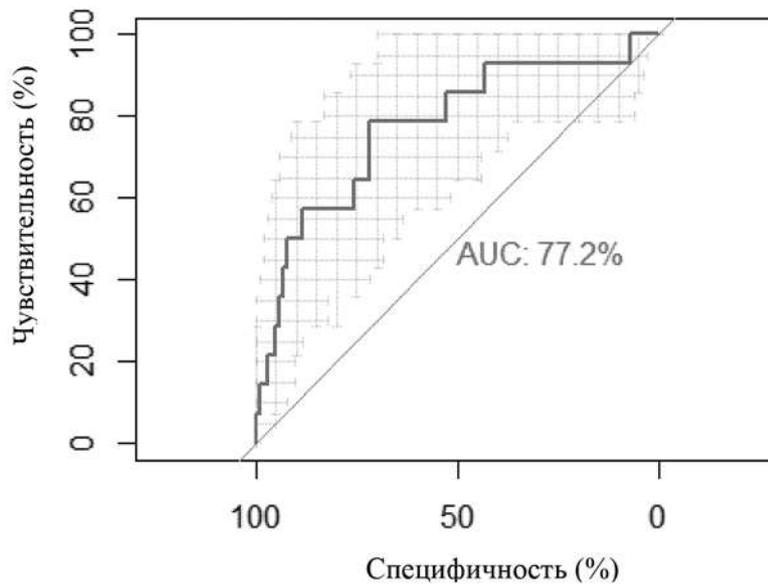


Рис. 5. ROC анализ прогностической значимости изначального уровня кальцитонина

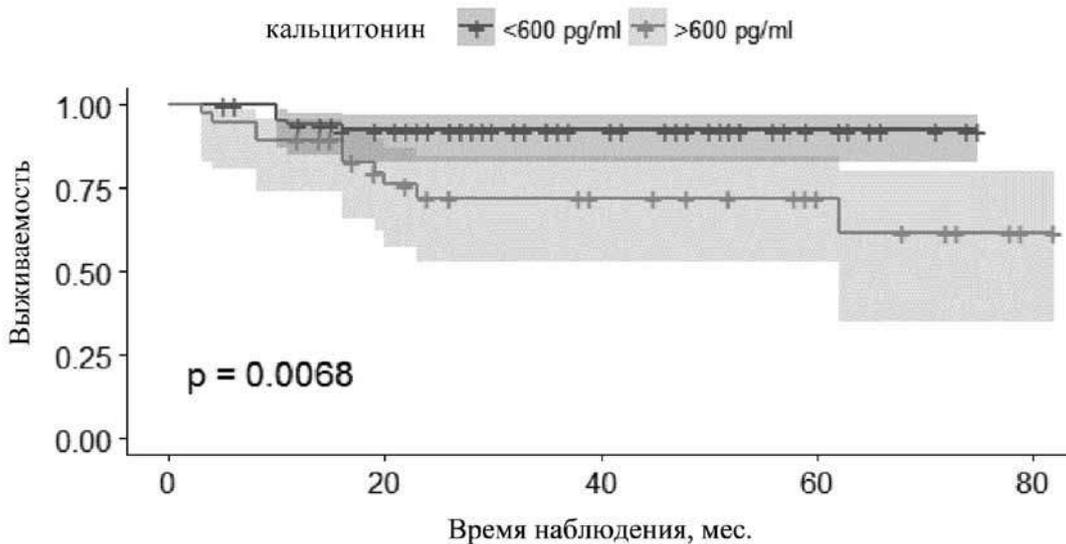


Рис. 6. Кривые безрецидивной выживаемости для пациентов и изначальным кальцитонином не более 600 пг/мл и более

Примечательно, что экстратиреоидный рост опухоли является не более значимым фактором, чем просто инвазия капсулы железы (OR=24.16 (5.62-104.01),  $p=0.000001$ ). Скорее всего, это объясняется тем, что для медуллярной карциномы это достаточно редкое явление.

Всем пациентам до операции неоднократно (на догоспитальном этапе и перед операцией) выполнялось УЗИ шеи, при наличии подозрительных или увеличенных лимфоузлов в боковой клетчатке выполнялась ТАБ со смывом на кальцитонин. При этом вероятность неблагоприятного прогноза у пациентов с метастазами в боковой клетчатке, выявленными при УЗИ до первой операции, была многократно выше, чем у пациентов с визуально неизмененными узлами (OR=30,63 (9,75-96,27),  $p<0.0000001$ ). На-

личие лимфогенных метастазов в центральной или боковой клетчатке шеи значительно увеличивало вероятность неблагоприятного прогноза (OR=26,55 (5,91-119,26),  $p<0.0000001$ ). Вероятно, разница обусловлена благоприятным прогнозом пациентов с единичными микрометастазами в центральной клетчатке. Для оценки влияния статуса регионарных лимфатических узлов на безрецидивную выживаемость были построены следующие кривые Каплана-Майера (рис. 4). Наличие лимфогенных метастазов эффективно предсказывало большую вероятность повторных операций, однако отсутствие метастазов не гарантировало отсутствия риска их отсроченного выявления.

Наличие отдаленных метастазов также достоверно ухудшало прогноз (OR=45.94 (5,048-418,00),  $p<0.0000001$ ).

При оценке влияния уровня базального кальцитонина на прогноз было выявлено, что высокие уровни кальцитонина достоверно увеличивали риск прогрессирования медуллярной карциномы и гибели пациента. Однако влияние это было менее интенсивное, нежели изменение размера опухоли и количество пораженных лимфоузлов.

Для определения порогового уровня кальцитонина, ассоциированного с риском прогрессирования, был выполнен ROC-анализ (рис. 5): AUC=0,772, оптимальная чувствительность составила 76,5%, а специфичность — 79,8% для отсечки в 600 пг/мл, отношение шансов для этой отсечки составило 6,65 (2,53-17,59)  $p=0.01055$ . При исследовании влияния уровня изначального кальцитонина на безрецидивную выживаемость были построены следующие кривые Каплана-Майера (рис. 6).

Уровень кальцитонина в большей степени дает долгосрочный прогноз выживаемости, нежели размер узла. Наиболее простое объяснение этому у пациентов с небольшими опухолями — значительный вклад в уровень кальцитонина со стороны лимфогенных метастазов.

### Заключение

Исследование прогностических факторов агрессивного течения медуллярной карциномы, проводившееся при анализе сведений о больных, прооперированных в период с 2010-2016 гг., было направлено, в первую очередь, на получение актуальных представлений о прогнозе пациентов с медуллярной карциномой щитовидной железы в условиях «не сплошного» скрининга УЗИ и кальцитонина.

Полученные данные, с одной стороны, в значительной мере подтверждают общепринятые положения: мужской пол ассоциирован с неблагоприятным прогнозом, размер первичной опухоли более 2 см увеличивает риск прогрессирования более чем в 6 раз, в то время как инвазия капсулы в 10 раз, а метастазы в регионарных узлах в 26,5 раз. В отличие от исследований [12, 13], в данном не была выявлена связь возраста плохим прогнозом, как и в работе De Groot [14]. Однако есть и менее очевидные наблюдения: так в отличие от дифференцированного рака щитовидной железы [15], где регионарные метастазы в меньшей степени влияют на прогноз, для медуллярной карциномы способность к регионарному метастазированию — значимая угроза жизни пациента. В других работах прямое сравнение не выполнялось [16].

При сравнении кривых безрецидивного дожития отмечается продолжающееся расхождение

кривых только для уровня базального кальцитонина; вероятно это связано с его значительным увеличением у больных с маленькими опухолями. При этом сам по себе уровень кальцитонина в данной работе обладает прогностическим значением, сопоставимым с таковым значением при учете размера опухоли [17, 18].

Выполнение расширенных и в определенном смысле «агрессивных» центральных и боковых лимфодиссекций — потенциально важнейший на данный момент элемент, способный повлиять на прогноз пациентов с медуллярной карциномой. Это заставляет искать возможности снижения рисков осложнений (влияющих на качество жизни пациентов) в использовании таких технологий, как нейромониторинг [19], визуализация околощитовидных желез [20] или уменьшение объема резекции щитовидной железы до гемитиреоидэктомии у пациентов со спорадическими формами, как это рекомендовано некоторыми азиатскими руководствами [21].

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*Исследование не имело спонсорской поддержки.*

### ЛИТЕРАТУРА

1. Kebebew E., Ituarte P.H.G., Siperstein A.E. et al. Medullary thyroid carcinoma. *Cancer*. 2000; 88: 1139-1148. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(20000301\)88:5<1139::AID-CNCR26>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(20000301)88:5<1139::AID-CNCR26>3.0.CO;2-Z).
2. Lim H., Devesa S.S., Sosa J.A. et al. Trends in Thyroid Cancer Incidence and Mortality in the United States, 1974-2013. *JAMA*. 2017;317(13):1338-1348. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.2719>.
3. Oh C.M., Jung K.W., Won Y.J. et al. Age-period-cohort analysis of thyroid cancer incidence in Korea. *Cancer Research and Treatment*. 2015;47(3):362-369. <https://doi.org/10.4143/crt.2014.110>.
4. Hazard J.B., Hawk W.A., Crile G. Medullary (solid) carcinoma of the thyroid—a clinicopathologic entity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1959;19(Issue 1):152-161. <https://doi.org/10.1210/jcem-19-1-152>.
5. Randle R.W., Balentine C.J., Levenson G.E. et al. Trends in the presentation, treatment, and survival of patients with medullary thyroid cancer over the past 30 years. *Surgery*. 2017; 161(1): 137-146. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2016.04.053>.
6. Elisei R., Pinchera A. Advances in the follow-up of differentiated or medullary thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8:466-475. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.38>.
7. Wells S.A., Asa S.L., Dralle H. et al. Revised American Thyroid Association Guidelines for the Management of Medullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid*. 2015;25(6): 567-610. <https://doi.org/10.1089/thy.2014.0335>.
8. Lodish M.B., Stratakis C.A. RET oncogene in MEN2, MEN2B, MTC and other forms of thyroid cancer, Expert Review of Anticancer Therapy. 2008; 8(4): 625-632. <https://doi.org/10.1586/14737140.8.4.625>.

9. Elisei R., Cosci B., Romei C. et al. Prognostic Significance of Somatic RET Oncogene Mutations in Sporadic Medullary Thyroid Cancer: A 10-Year Follow-Up Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008; 93(3): 682-687. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-1714>.
10. Ciampi R., Romei C., Ramone T. et al. Genetic Landscape of Somatic Mutations in a Large Cohort of Sporadic Medullary Thyroid Carcinomas Studied by Next-Generation Targeted Sequencing. *iScience*. 2019 Oct 25;20:324-336. doi: 10.1016/j.isci.2019.09.030.
11. Meijer J.A.A., le Cessie S., van den Hout W.B. et al. Calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling times as prognostic factors in medullary thyroid carcinoma: a structured meta-analysis. *Clinical Endocrinology*. 2010; 72(4):534-542. doi:10.1111/j.1365-2265.2009.03666.x.
12. Hyer S.L., Vini L., A'Hern R. et al. Medullary thyroid cancer: Multivariate analysis of prognostic factors influencing survival. *European Journal of Surgical Oncology*. 2000; 26(7):686-690. <https://doi.org/10.1053/ejso.2000.0981>.
13. Kuo E.J., Sho S., Li N. et al. Risk factors associated with reoperation and disease-specific mortality in patients with medullary thyroid carcinoma. *JAMA Surgery*. 2018; 153(1): 52-59. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2017.3555>.
14. De Groot J.W.B., Plukker J.T.M., Wolffenbuttel B.H.R. et al. Determinants of life expectancy in medullary thyroid cancer: age does not matter. *Clinical Endocrinology*. 2006; 65: 729-736. doi:10.1111/j.1365-2265.2006.02659.x.
15. Черников Р.А., Валдина Е.А., Воробьев С.Л., Слепцов И.В., Семенов А.А., Чинчук И.К., и др. Отдаленные результаты хирургического лечения при папиллярном раке щитовидной железы и сравнительная оценка тактики лечения. *Клиническая и экспериментальная тиреоидология*. 2014;10(1):31-37. <https://doi.org/10.14341/SET201410131-37>.
16. Roman S., Lin R., Sosa J.A. Prognosis of medullary thyroid carcinoma. *Cancer*. 2006; 107: 2134-2142. doi:10.1002/cncr.22244.
17. Медведев В.С., Исаев П.А., Ильин А.А. и др. Медуллярная карцинома щитовидной железы. Опухоли головы и шеи. 2013;(2):31-36. <https://doi.org/10.17650/2222-1468-2013-0-2-31-36> [Medvedev V.S., Isayev P.A., Ilyin A.A. et al. Medullary thyroid carcinoma. *Head and Neck Tumors* 2013;(2):31-36 (In Russ.)].
18. Румянцев П.О., Ильин А.А., Румянцева У.В. и др. Факторы клинического прогноза медуллярного рака щитовидной железы. Опухоли головы и шеи. 2011; 4: 48-54 [Rumyantsev P.O., Ilyin A.A., Rumyantseva U.V. et al. Clinical prognostic factors in medullary thyroid carcinoma. *Head and Neck Tumors* 2011; 4: 48-54 (In Russ.)].
19. Макарын В.А., Успенская А.А., Семенов А.А., и др. Потеря сигнала (loss of signal) при интраоперационном нейромониторинге гортанных нервов как предиктор послеоперационного пареза гортани: анализ 1065 последовательных операций на щитовидной и околощитовидных железах. Тактика хирурга. *Эндокринная хирургия*, 10(3), 15-24. doi:10.14341/serg2016315-24 [Makarın V., Uspenskaya A., Semenov A. et al. Loss of signal during intraoperative neuromonitoring of laryngeal nerves as a predictor of postoperative larynx paresis: Analysis of 1065 consecutive thyroid and parathyroid operations. *Surgeons' algorithm (tactics)*. *Endocrine Surgery*. 2017 10(3), 15-24. doi: 10. 15. 10.14341/serg2016315-24 (In Russ.)].
20. Слепцов И.В., Бубнов А.Н., Черников Р.А. и др. Фотодинамическая визуализация околощитовидных желез — результаты клинического применения. *Клиническая и экспериментальная тиреоидология*. 2009;5(1):35-40. doi: 10.14341/ket20095135-40 [Slepzov I.V., Bubnov A.N., Chernikov R.A. et al. Photodynamic Visualization of Parathyroid Glands — Results of Clinical use *Eng. Clinical and experimental thyroidology*. 2009;5(1):35-40. <https://doi.org/10.14341/ket20095135-40> (In Russ.)].
21. Takami H., Ito Y., Noguchi H. et al. (eds.). *Treatment of Thyroid Tumor: Japanese Clinical Guidelines*. doi:10.1007/978-4-431-54049-6.

Поступила в редакцию 01.04.2020 г.

*A.A. Semenov, D.M. Buzanakov, R.A. Chernikov, I.V. Sleptsov, V.A. Makarin, A.A. Uspenskaya, N.I. Timofeeva, I.K. Chinchuk, I.V. Karelina, K.Y. Novokshonov, E.A. Fedorov, I.N. Maliugov, S.A. Alekseeva, I.V. Sablin, N.A. Gorskaya, A.V. Zolotukho, D.V. Rebrova, E.A. Valdina, A.N. Bubnov*

### **Quantitative assessment of preoperative risk factors for aggressive course of medullary thyroid carcinoma**

St. Petersburg University, Medical Clinic

**Objectives:** to study the long-term results of surgical treatment of patients with medullary thyroid carcinoma and evaluate the significance of prognostic factors.

**Materials and methods:** the continuous retrospective study included 169 patients with histologically confirmed medullary cancer who were initially operated at the Northwestern Center for Endocrinology and Endocrine Surgery of the SPbSU University Clinic from 2010 to 2016. They were divided into prognostic groups according to the level and dynamics of postoperative calcitonin and clinical manifestations of the disease.

**Results:** The study allowed to assess the effect of predictive factors on the risks of progression and recurrence in medullary thyroid cancer.

Size of the primary tumor more than 2 cm significantly increases the risk of disease progression (OR=6,56 (0.52-17.96) p=0,00001495). Invasion of the thyroid capsule and metastases to regional lymph nodes are even more important prognostic value as OR=49,08 (10.72-224.89), p=0,00000011 и OR=30,63 (9,75-96,27), p<0.0000001 respectively.

Regional MTC metastases are a significant threat to the life of the patient. This fact is a fundamental difference with differentiated thyroid carcinoma were regional metastases do not affect the prognosis.

This study failed to link the prognosis to the patient's age. As expected the level of basal calcitonin >600 pg/ml affects the prognosis (OR=6,65 (2,53-17,59) p=0.01055). Its prognostic value is comparable to the size of the primary tumor and significantly less than the presence of regional and distant metastases.

**Conclusions:** Unfavorable prognosis in 21 (12.4%) observed patients is associated not only with the presence of distant metastases, but also and independently with regional ones.

**Key words:** medullary thyroid cancer, calcitonin, prognosis

*А.Ю. Кишкина, Н.В. Юнусова, Л.А. Коломиец, Е.С. Колегова, И.В. Кондакова*

## **Значимость клинических и гормонально-метаболических параметров в дооперационном прогнозировании риска лимфогенного метастазирования у больных раком эндометрия I клинической стадии**

НИИ онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск

У больных раком эндометрия при инвазии опухоли до половины миометрия и при умеренной степени дифференцировки (промежуточный риск) нет конкретных показаний к выполнению или невыполнению лимфодиссекции. С учетом высокой распространенности метаболического синдрома (МС) среди больных раком эндометрия (до 62%) и большой доли умереннодифференцированных опухолей при наличии МС, при прогнозировании риска лимфогенного метастазирования учитывались антропометрические и гормонально-метаболические параметры. Для построения модели дооперационного прогноза лимфогенного метастазирования был применен метод логистической регрессии. В анализ были взяты данные на 53 больных раком эндометрия I клинической стадии. Всем больным было проведено оперативное лечение в объеме тотальной гистерэктомии с билатеральной сальпингоовариоэктомией и тазовой лимфодиссекцией лапароскопическим доступом. В операционном материале метастатическое поражение лимфатических узлов обнаружено у шести больных. Выявлены дополнительные параметры риска лимфогенного метастазирования у больных раком эндометрия I стадии: уровень лептина (AUC = 0,957), уровень висфатина (AUC = 0,918), индекс массы тела (AUC = 0,911), возраст больной (AUC = 0,828), уровень ХС ЛПВП (AUC = 0,699). Разработана модель дооперационного прогнозирования риска лимфогенного метастазирования для больных раком эндометрия I стадии с промежуточным риском, которая включала, кроме традиционных факторов риска (глубина инвазии и степень дифференцировки опухоли), дополнительные параметры: возраст, индекс массы тела, уровень ХС ЛПВП, уровень гормонов жировой ткани лептина и висфатина в плазме крови. Показатели чувствительности и специфичности разработанной модели составляют 83,3% и 97,9%.

**Ключевые слова:** рак эндометрия; метаболический синдром; прогноз лимфогенного метастазирования

Согласно рекомендациям RUSSCO (2019), выбор объема хирургического лечения больных раком эндометрия определяется факторами риска лимфогенного метастазирования, к которым относятся наличие миометральной инвазии и степени дифференцировки опухоли. По результатам консенсуса ESGO, ESMO, ESTRO (2014), были выделены группы риска лимфогенного метастазирования с учетом данных параметров. Однако при инвазии до половины миометрия и при умеренной степени дифференцировки (промежуточный риск) нет конкретных показаний к выполнению или не выполнению лимфодиссекции.

Существуют разные методики оценки состояния регионарных лимфатических узлов до операции: применение ультразвукового исследования и магнитно — резонансной томографии, а также интраоперационно (пальпация и биопсия увеличенных лимфатических узлов) [1]. Кроме того, предоперационное обследование, на основании которого предполагается планировать лимфодиссекцию, к сожалению, имеет целый ряд ограничений. Прежде всего, это вероятность снижения степени дифференцировки опухоли в окончательном гистологическом заключении, что наблюдается в 19% случаев, распространение опухоли за пределы матки — 10,5%, а также трудности макроскопической оценки глубины инвазии при умеренно- и низкодифференцированных опухолях [2]. Таким образом, для того чтобы адекватно оценить степень распространенности процесса до операции и выбрать оптимальный объем оперативного лечения, необходимо правильно предсказать риск метастатического поражения лимфатических узлов у больных I стадии.

Рак эндометрия традиционно относят к эстрогензависимым опухолям [3]. Значимость жировой ткани в процессе развития, роста и метастазирования опухоли является относительно новой областью исследования. В 2005 г. экспертами IDF consensus group была рекомендована оценка уровня гормонов жировой ткани в сыворотке и плазме крови в качестве дополнительных параметров, ассоциированных с метаболическим

синдромом (МС), для определения его варианта и оптимизации стратегии лечения. Такие гормоны жировой ткани как лептин, висфатин, резистин, адипонектин и другие являются биологически активными веществами пептидной природы и их концентрация зависит от объема жировой ткани и индекса массы тела (ИМТ). С учетом высокой распространенности МС среди больных раком эндометрия (62%), большой доли умереннодифференцированных опухолей при наличии МС [4], изучение отдельных аспектов патогенеза сочетания рака эндометрия и МС и выявление новых гормонально-метаболических факторов дооперационного риска лимфогенного метастазирования представляются актуальными как с научной, так и с практической точек зрения.

### Материалы и методы

Для построения модели дооперационного прогноза лимфогенного метастазирования был применен метод логистической регрессии. В анализ были взяты данные на 53 больных раком эндометрия I клинической стадии. Всем больным было проведено оперативное лечение в объеме тотальной гистерэктомии с билатеральной сальпингоовариэктомией и тазовая лимфодиссекция лапароскопическим доступом с гистологическим исследованием операционного материала. Все опухоли были представлены эндометриоидными карциномами. В операционном материале метастатическое поражение лимфатических узлов обнаружено у шести больных.

Наличие МС у больных раком эндометрия диагностировано согласно рекомендациям IDF (2005), где основными критериями МС — является центральное (абдоминальное) ожирение (окружность талии более 94 см у мужчин и более 80 см у женщин — европеоидной расы) в сочетании как минимум с двумя из следующих 4 факторов:

- повышением триглицеридов (ТГ) более 1,7 ммоль/л или лечением дислипидемии;
- снижением ХС липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП) менее 1,03 ммоль/л у мужчин и менее 1,29 ммоль/л у женщин или специфическим лечением;
- повышением артериального давления: систолического более 130 мм рт. ст. или диастолического более 85 мм рт. ст. или антигипертензивной терапией;
- повышением глюкозы венозной плазмы натощак более 5,6 ммоль/л или ранее выявленный сахарный диабет II типа.

Критериями «метаболически здорового ожирения» (МЗО), согласно рекомендациям International Diabetes Federation (2005) и NCEP ATP III является помимо обязательного критерия — абдоминального типа ожирения (для женщин окружность талии более 80 см), отсутствие дополнительных критериев МС либо наличие не более одного из дополнительных критериев:

- повышение ТГ более 1,7 ммоль/л или проводимое ранее лечение дислипидемии;
- снижение ХС ЛПВП менее 1,29 ммоль/л;
- повышение артериального давления или проводимая терапия артериальной гипертензии;
- повышение глюкозы крови натощак более 5,6 ммоль/л, или нарушение толерантности к глюкозе, или выявленный СД 2-го типа.

Наличие миомы матки у больных было подтверждено при ультразвуковом исследовании. Исследование уровня лептина, адипонектина, висфатина и резистина в сыворотке крови выполнялось методом ELISA по стандартной методике с использованием наборов фирмы R&D (США) и RayBio (США). Согласно рекомендациям производителя коммерческих наборов, а также в соответствии с рекомендациями IDF (2005) нормальные уровни лептина у женщин старше 20 лет составляют 7–27 нг/мл, адипонектина — от 0,8 до 28,2 мкг/мл.

### Результаты

На первом этапе нами были проанализированы возможные предикторы дооперационного прогноза лимфогенного метастазирования у больных раком эндометрия I клинической стадии, к которым были отнесены количественные и качественные показатели. Количественные показатели включали возраст, вес, ИМТ, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, уровень адипокинов плазмы крови (висфатина, лептина, адипонектина, резистина). К качественным показателям были отнесены наличие или отсутствие МС, варианты МС, наличие сахарного диабета II типа, наличие миомы матки, наличие гипертонической болезни с использованием непараметрических критериев  $\chi^2$  Пирсона, точный критерий Фишера или  $\phi$  и V Крамера (табл. 1) и Манна-Уитни (табл. 2).

**Таблица 1. Частоты встречаемости качественных клинкоморфологических показателей у больных раком эндометрия в зависимости от наличия метастазов в лимфатических узлах**

Параметры		Метастазов нет	Метастазы есть
		Наличие миомы матки	Нет Есть P
Наличие гипертонической болезни	Нет	13	2
	Есть	39	4
	P	0,659	
Наличие СДII	Нет	40	5
	Есть	11	1
	P	0,781	
Наличие МС (1 — МС, 2 — МЗО, 3 — нет метаболических нарушений)	1	31	4
	2	14	0
	3	7	2
	P	0,220	
Вариант МС (0-синдрома нет, 3 — МС3, 4 — МС4, 5- МС5)	0	21	2
	3	17	1
	4	6	0
	5	8	3
	P	0,203	

Примечание: МС3 — трехкомпонентный МС, МС4 — четырехкомпонентный МС, МС5 — пятикомпонентный МС

**Таблица 2. Количественные показатели у больных раком эндометрия в зависимости от наличия метастазов в лимфатических узлах**

Параметр	Метастазов нет	Метастазы есть	P
Возраст, лет	55,87±1,28	61,67±1,48	0,096
Вес, кг	86,61±2,46	75,17±6,84	0,168
ИМТ	29,00 (25,55; 37,55)	27,15 (21,40; 33,20)	0,201
ХС, ммоль/л	5,36±0,18	5,75±0,54	0,246
ТГ, ммоль/л	1,71±0,13	1,84±0,52	0,815
ХС ЛПНП, ммоль/л	3,36±0,17	3,92±0,49	0,193
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,27±0,07	1,00±0,09	0,160
Глюкоза, ммоль/л	5,70±0,16	5,90±0,72	0,939
Висфатин, нг/мл	29,50 (25,75; 37,55)	27,40 (20,00; 33,20)	0,150
Адипонектин, нг/мл	22,20 (7,60; 39,26)	28,64 (4,55; 42,30)	0,844
Лептин, пг/мл	267,40 (219,05; 360,95)	234,60 (121,40; 310,50)	0,202
Резистин, нг/мл	2,41 (1,95; 2,69)	2,35 (2,20; 2,86)	0,955

Примечание: в табл. значения представлены как среднее, разброс значений как стандартная ошибка среднего для нормально-распределенных признаков; медиана, разброс значений — как (25%; 75%) квантили для ненормально-распределенных признаков

Исходя из приведенных данных видно, что самостоятельно ни один из изученных пара-

метров не оказался статистически значимым фактором в прогнозе предоперационного лимфогенного метастазирования. В связи с этим на втором этапе количественные и качественные показатели с уровнем значимости  $p \leq 0,2$  были проверены как предикторы в модели логистической регрессии дооперационного прогнозирования лимфогенного метастазирования. По результатам разработанной модели по критерию Хосмера-Лемешова ( $p > 0,05$ , R-квадрат Найджелкерка  $> 0,5$ ), были определены 5 предикторов, которые можно использовать для дооперационного прогнозирования лимфогенного метастазирования у больных раком эндометрия, такие как возраст, ИМТ, ХС ЛПВП, висфатин и лептин.

На следующем этапе был оценен вклад каждого значимого показателя, которыми явились возраст, ИМТ, ХС ЛПВП, висфатин, лептин в прогнозирование лимфогенного метастазирования ROC-анализом. Точность прогнозирования параметров наглядно демонстрируется с помощью ROC кривой. Таким образом, предиктором для предсказания наличия лимфогенных метастазов у больных раком эндометрия является уровень лептина (AUC=0,957), висфатина (AUC=0,918), ИМТ (AUC=0,911), возраст пациентки (AUC=0,828) и уровень ХС ЛПВП (AUC=0,699) (рис. 1).

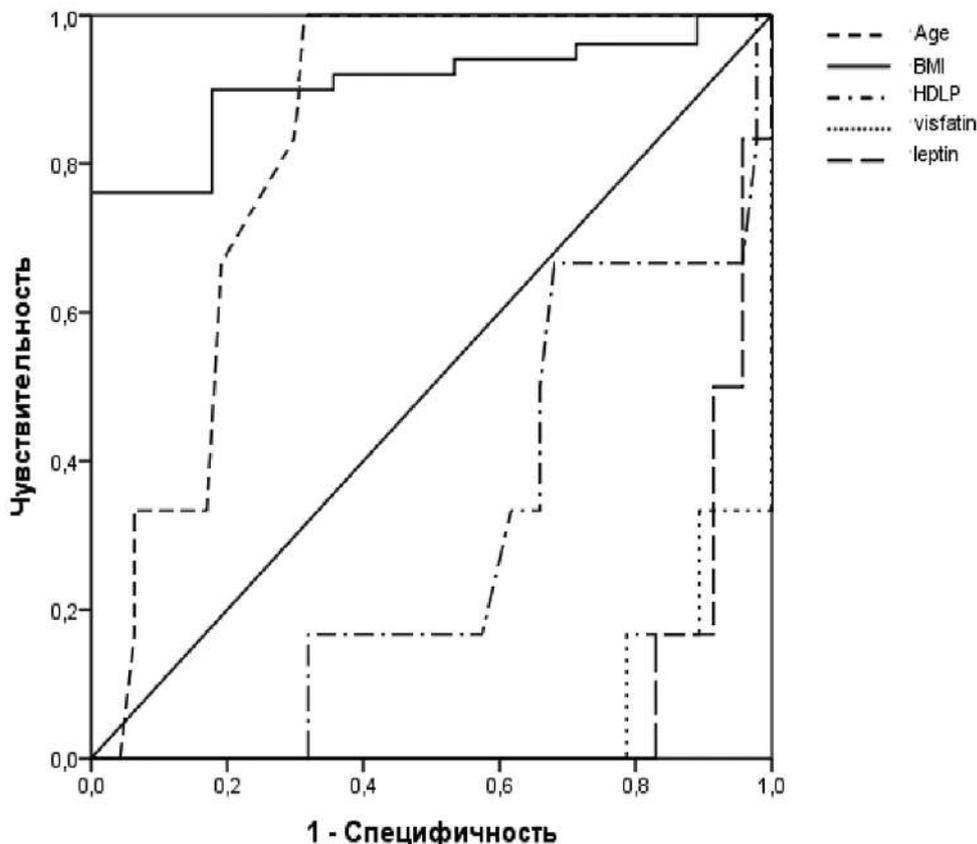


Рис. 1. ROC-кривые для определения оценки качества бинарной классификации статистически значимых предикторов

Далее проведена оценка чувствительности и специфичности данной модели, которые составили 83,3% и 97,9% соответственно. На основании полученных результатов разработанная модель логистической регрессии имеет вид:

$$F=2,069*[\text{возраст}]+7,155*[\text{ИМТ}]-6,619*[\text{ХС ЛПВП}]-8,049*[\text{висфатин}]-1,049*[\text{лептин}]+15,419,$$

где, возраст — возраст пациентки в годах, ИМТ — индекс массы тела, рассчитанный по стандартной формуле,

ХС ЛПВП — ХС липопротеидов высокой плотности плазмы крови, ммоль/л,

висфатин — висфатин плазмы крови в нг/мл, лептин — лептин плазмы крови в пг/мл.

Значение вероятности наличия лимфогенных метастазов рассчитывают, учитывая значение регрессионной функции  $F$  и основание натурального логарифма ( $e$ ):

$$p = \frac{1}{1 + e^{-F}},$$

где  $P$  — вероятность наличия лимфогенных метастазов,  $e$  (основание натурального логарифма) = 2,718,  $F$  — значение регрессионной функции.

При значении  $P \geq 0,5$  предполагают наличие лимфогенных метастазов, при значении  $P < 0,5$  — отсутствие лимфогенных метастазов.

Разработанная математическая модель дооперационного прогнозирования риска лимфогенного метастазирования у больных раком эндометрия I клинической стадии имеет высокую доступность и позволяет персонализировать показания к лимфодиссекции у больных с МС, так как кроме традиционных факторов риска она отражает и гормонально-метаболические изменения.

### Обсуждение

Пожилой возраст больных и высокая частота разнообразных, нередко тяжелых, сопутствующих заболеваний объясняет дискуссии, касающиеся тактики лечения больных раком эндометрия. Основные дискуссии касаются оценки состояния регионарных лимфатических узлов при I клинической стадии, на долю которой приходится 70-75%, при этом почти 65% пациентов раком эндометрия, которые подвергаются первичному лечению имеют ожирение или избыточную массу тела [5-7]. Учитывая то, что I стадия больных раком эндометрия неоднородная, по результатам широкомасштабного рандомизированного исследования GOG 33 было показано, что для достижения оптимальных клинических результатов лечения необходимо выявить груп-

пу пациенток, которым не показано проведение лимфаденэктомии. Первой моделью прогнозирования риска лимфогенного метастазирования у больных раком эндометрия была модель Mayo Clinic, предложенная A. Mariani et al. [8]. Данная модель основана на интраоперационной оценке четырех основных параметров, включающих глубину инвазии опухоли в миометрий более 50%, размер опухоли в полости матки 2 см или более, степень дифференцировки опухоли (умеренная или низкая) и гистологический тип опухоли (эндометриоидная аденокарцинома), а также на гистологическом исследовании опухоли в послеоперационном периоде. Чувствительность и специфичность способа составляют 87,5% и 36,2% соответственно.

Еще одна модель прогноза предложена Yang et al. (2016) [9]. Способ основан на измерении уровня онкомаркера СА-125 в сыворотке крови и определении иммуногистохимических маркеров рецептора прогестерона и Ki67. У пациенток со значением маркера СА-125 ниже 30 МЕ/мл, а также с положительным значением рецептора прогестерона более чем в 50% клеток и Ki67 менее, чем в 40% клеток определяется низкий риск лимфогенного метастазирования. Хотя данный способ не учитывает такие важные параметры, как степень дифференцировки опухоли, степень инвазии опухоли в миометрий, его чувствительность и специфичность составляют 84,6% и 67,4% соответственно. Для использования модели необходимо проведение иммуногистохимического исследования, чтобы определить уровень рецепторов прогестерона и Ki67, а это не всегда возможно на дооперационном этапе.

В нашем исследовании мы предположили, что ассоциированные с МС и ожирением клинические и гормонально-метаболические факторы также могли бы быть полезными в предоперационном прогнозировании лимфогенного метастазирования у больных I клинической стадии. Наряду с такими параметрами как степень дифференцировки опухоли и глубина инвазии опухоли в миометрий в анализ были взяты такие параметры как возраст, наличие/отсутствие МС и его вариант, наличие/отсутствие миомы матки, наличие СДII, гипертонической болезни, вес, ИМТ, показатели липидного профиля и уровень глюкозы натощак, уровень гормонов жировой ткани. Из 12-ти отобранных в модель факторов значимыми оказались такие параметры как возраст, ИМТ, уровень лептина, висфатина и ХС ЛПВП. Причем согласно данным ROC-анализа, показатели оказывают разнонаправленное действие на частоту метастазирования. Такие показатели как возраст и ИМТ ассоциированы с повышенным риском метастазирования, в то время как лептин,

висфатин и ХС ЛПВП оказывают противоположное действие.

Необходимо отметить, что наличие МС и его компонентность не явились значимыми факторами прогноза, однако основные (ХСЛПВП) и дополнительные критерии МС (по рекомендации IDF, 2005) (ИМТ, уровень лептина, висфатина) явились значимыми предикторами лимфогенного метастазирования у больных раком эндометрия. Это свидетельствует о чрезвычайной гетерогенности и многокомпонентности МС, и, вместе с тем, о важности изучения как антропометрических, так и гормонально-метаболических параметров. Анализируя данные РОС-анализа необходимо отметить протективный эффект в отношении лимфогенного метастазирования у больных раком эндометрия гормонов жировой ткани лептина и висфатина. Ранее в литературе были представлены данные об индуцированной лептином пролиферации, инвазии, чрезмерной подвижности клеток с образованием ламеллоподий на клеточных культурах колоректального рака и рака эндометрия через множественные сигнальные пути, включая активацию PI3K/Akt/mTOR, наиболее важного пути, ассоциированного с выживаемостью опухолевых клеток [10–13]. Однако прометастатический эффект лептина на моделях *in vivo* не был отмечен. В исследовании T.T. Pham et al. (2015) высокие уровни висфатина были связаны с глубиной инвазии опухоли в миометрий, а высокие уровни резистина были связаны с лимфогенным метастазированием [14], однако в нашем исследовании взаимосвязей висфатина и глубины миометриальной инвазии не было выявлено, а как предиктор лимфогенного метастазирования висфатин — его снижал. В работе W. Tian et al. (2013) продемонстрировано, что только высокая внутриопухолевая экспрессия висфатина ассоциировалась с более запущенной стадией по FIGO (2013) и более глубокой миометриальной инвазией, которые являются традиционными прогностическими признаками при раке эндометрия [15]. Оценка глубины инвазии опухоли в миометрий при раке эндометрия также входит как параметр при предоперационном прогнозировании лимфогенного метастазирования для определения тактики лечения больных. Такая несколько противоречивая роль гормонов лептина и висфатина при раке эндометрия, по-видимому, объясняется существованием сывороточной и тканевой формы висфатина, не исключено, с различными функциями [16], наличием несоответствия между эффектами гормонов на опухолевых клеточных культурах *in vitro* и на лабораторных моделях рака эндометрия на фоне ожирения и МС *in vivo* и клинических вариантах рака эндометрия на фоне метаболических сдвигов у женщин.

## Заключение

Выявлены дополнительные параметры риска лимфогенного метастазирования у больных раком эндометрия I стадии: уровень лептина (AUC = 0,957), уровень висфатина (AUC = 0,918), ИМТ (AUC = 0,911), возраст больной (AUC = 0,828), уровень ХС ЛПВП (AUC = 0,699). Разработана модель дооперационного прогнозирования риска лимфогенного метастазирования для больных раком эндометрия I стадии с промежуточным риском, которая включает, кроме традиционных факторов риска (глубина инвазии и степень дифференцировки опухоли), дополнительные параметры: возраст, индекс массы тела, уровень ХС ЛПВП, уровень гормонов жировой ткани лептина и висфатина в плазме крови. Показатели чувствительности и специфичности разработанной модели составляют 83,3 % и 97,9%.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Очиров М.О., Трухачева Н.Г., Коломиец Л.А. и др. МРТ в дооперационном прогнозировании риска лимфогенного метастазирования у больных раком эндометрия первой клинической стадии. *Росс. электр. журнал лучевой диагностики*. 2018;8(3):190-204 [Ochirov M.O., Trukhacheva N.G., Kolomiets L.A. et al. MRI in preoperative prediction of the risk of lymph node metastasis in patients with endometrial cancer of the first clinical stage. *REJR* 2018; 8 (3):190-204. doi:10.21569/2222-7415-2018-8-3-190-204 (In Russ.)].
2. Нечушкина В.М., Морхов К.Ю., Кузнецов В.В. и др. Современные подходы к хирургическому лечению рака тела матки ранних стадий. *Вопросы онкологии*. 2015;61(3):346–351 [Nechushkina V.M., Morkhov K.Y., Kuznetsov V.V. et al. Modern approaches to the surgical treatment for early-stage endometrial cancer. *Vopr Onkol*. 2015;61(3):346–351 (In Russ.)].
3. Бочкарева Н.В., Коломиец Л.А., Кондакова И.В. и др. Ферменты метаболизма эстрогенов при раке эндометрия. *БЭБиМ*. 2006;141(2):240–242 [Bochkareva N.V., Kolomiets L.A., Kondakova I.V. et al. Enzymes of estrogen metabolism in endometrial cancer. *Bull Exp Biol Med*. 2006;141(2):240–242. doi:10.1007/s10517-006-0138-8 (In Russ.)].
4. Кишкина А.Ю., Коломиец Л.А., Юнусова Н.В. Клинические варианты метаболического синдрома у больных раком эндометрия. *Сибирский Онкологический Журнал*. 2019; 18(5): 38–44. [Kishkina A.Yu., Kolomiets L.A., Yunusova N.V. Clinical options for metabolic syndrome in patients with endometrial cancer. *Siberian Journal of Oncology*. 2019; 18(5): 38-44. — doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-5-38-44 (In Russ.)].
5. Mahdi H., Jernigan A.M., Aljebori Q. et al. The impact of obesity on the 30-day morbidity and mortality after surgery for endometrial cancer. *J Minim Invasive Gynecol*. 2015;22:94-102.
6. Suidan R.S., He W., Sun C.C. Impact of body mass index and operative approach on surgical morbidity and costs in women with endometrial carcinoma and hyperplasia. *Gynecol Oncol*. 2017;145:55-60.

7. Bouwman F., Smits A., Lopes A. et al. The impact of BMI on surgical complications and outcomes in endometrial cancer surgery: An institutional study and systematic review of the literature. *Gynecol Oncol.* 2015;139(2):369-76.
8. Mariani A., Dowdy S., Cliby W.A. et al. Prospective assessment of lymphatic dissemination in endometrial cancer: a paradigm shift in surgical staging. *Gynecol Oncol.* 2008; 109(1):11-18.
9. Yang B., Shan B., Xue X. et al. Predicting Lymph Node Metastasis in Endometrial Cancer Using Serum CA125 Combined with Immunohistochemical Markers PR and Ki67, and a Comparison with Other Prediction Models. *PLoS ONE.* 2016; 11(5):e0155145. doi:10.1371/journal.pone.0155145.
10. Catalano S., Mauro L., Marsico S. et al. Leptin induces, via ERK1/ERK2 signal, functional activation of estrogen receptor alpha in MCF-7 cells. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(19):19908-15.
11. Kim A.Y., Lee Y.S., Kim K.H. et al. Adiponectin represses colon cancer cell proliferation via AdipoR1- and -R2-mediated AMPK activation. *Mol. Endocrinol.* 2010; 24(7): 1441-52.
12. Koda M., Sulkowska M., Wincewicz A. et al. Expression of leptin, leptin receptor, and hypoxia-inducible factor 1 alpha in human endometrial cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1095: 90-8.
13. Gao J., Tian J., Lu Y. et al. Leptin induces functional activation of cyclooxygenase-2 through JAK2/STAT3, MAPK/ERK, and PI3K/AKT pathways in human endometrial cancer cells. *Cancer Sci.* 2009;100(3):389-95.
14. Ilhan T.T. , Kebapcilar A., Yilmaz S.A. et al. Relations of serum visfatin and resistin levels with endometrial cancer and factors associated with its prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015; 16(11):4503-8.
15. Tian W., Zhu Y., Wang Y. et al. Visfatin, a potential biomarker and prognostic factor for endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2013; 29(3): 505-12.
16. Шпаков А.О. Висфатин и его роль в регуляции репродуктивной системы. *Трансляционная медицина.* 2019; 6(2): 25-36 [Shpakov AO. Visfatin and Its Role in the Regulation of the Reproductive System. *Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine.* 2019;6(2):25–36. (In Russ.)].

*A.Y. Kishkina, N.V. Yunusova, L.A. Kolomiets,  
E.S. Kolegova, I.V. Kondakova*

**The significance of clinical and hormonal-metabolic parameters in the preoperative prediction of the risk of lymphogenous metastasis in patients with stage I endometrial cancer**

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

In patients with moderately differentiated endometrial cancer with less than half myometrial invasion, there are no specific indications for performing or not performing lymphadenectomy. Given the high prevalence of metabolic syndrome (MS) among patients with endometrial cancer (up to 62%) and a large proportion of G2 tumors in combination with MS, the anthropometric and hormonal-metabolic parameters were considered for predicting the risk of lymphogenous metastasis. To build a model of preoperative prognosis of lymphogenous metastasis, the method of logistic regression was used. Data on 53 patients with stage I endometrial cancer was analyzed. All patients underwent total laparoscopic hysterectomy with bilateral salpingo-ovariectomy and pelvic lymphadenectomy. Positive lymph nodes were found in the surgical specimen of six patients. The additional risk parameters for lymphogenous metastasis were revealed in patients with stage I endometrial cancer, namely: leptin level (AUC = 0.957), visfatin level (AUC = 0.918), body mass index (AUC = 0.911), patient age (AUC = 0.828), and HDL cholesterol (AUC = 0.699). In addition to traditional risk factors (the depth of invasion and tumor differentiation grade), the model of preoperative prediction of the risk of lymphogenous metastasis for patients with intermediate- risk stage I endometrial cancer included the following parameters: age, body mass index, HDL cholesterol, level of adipose hormones leptin and visfatin in blood plasma.. The sensitivity and specificity of the model were 83.3% and 97.9%, respectively

Key words: endometrial cancer; metabolic syndrome; predicting lymph nodes metastases

Поступила в редакцию 01.10.2020 г.

К.А. Загороднев<sup>1</sup>, А.А. Романько<sup>1,2</sup>, Ю. Горгуль<sup>1</sup>, А.О. Иванцов<sup>2</sup>, А.П. Соколенко<sup>1,2</sup>,  
И.В. Бизин<sup>2</sup>, Е.Ш. Кулигина<sup>1,2</sup>

## Поиск генетических детерминант наследственного риска рака молочной железы с помощью полноэкзомного секвенирования BRCA-негативных пациентов: новые кандидатные гены USP39, SLIT3, CREB3

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, Санкт-Петербург,

<sup>2</sup>ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Понимание молекулярно-генетического патогенеза наследственного ракового синдрома чрезвычайно важно для разработки персональных терапевтических подходов и для увеличения эффективности превентивных мер. Тем не менее, более половины случаев рака молочной железы (РМЖ) с признаками наследственной детерминации до сих пор не имеют генетического объяснения. Следовательно, поиск новых генов наследственного РМЖ и достоверный молекулярно-генетический диагноз, определяющий «каузативную» мутацию в каждом конкретном случае, является актуальной и клинически важной задачей.

С помощью полноэкзомного секвенирования (WES) мы провели анализ спектра генетических вариаций у 49 российских больных РМЖ с клиническими признаками наследственного заболевания, что позволило нам составить список из 229 потенциально патогенных мутаций. Далее кандидатные варианты были подвергнуты валидации методом секвенирования по Сэнгеру, частоты аллелей сопоставлены в группах больных РМЖ и здоровых женщин. Полученные сведения подтвердили предрасполагающую роль трех мутаций, затрагивающих онкологически значимые клеточные функции: USP39 с.\*208G>C, SLIT3 p.Arg154Cys, и CREB3 p.Lys157Glu. Данные гены-кандидаты впервые упоминаются в связи с наследственным риском рака молочной железы. Окончательным доказательством каузативной роли этих вариантов будут результаты функциональных тестов, а также анализ сегрегации патогенных мутаций в семьях.

Ключевые слова: наследственный рак молочной железы, полноэкзомное секвенирование

### Введение

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее частым видом злокачественных опухолей среди женщин. Полагают, что 5-10% РМЖ имеют причиной наследственные патогенные

мутации в генах-регуляторах онкологически важных клеточных процессов [2, 7]. К числу клинических признаков наследственной природы заболевания относят раннюю манифестацию, билатеральный характер поражения, отягощенный семейный анамнез, трижды-негативный рецепторный статус и РМЖ у мужчин [1, 4, 17]. Мутации в самых известных и хорошо изученных генах наследственного РМЖ — *BRCA1* и *BRCA2* — объясняют до 30% случаев заболеваний с признаками наследственного ракового синдрома [11, 13]. Другие гены, с разной степенью пенетрантности, такие как *ATM*, *TP53*, *PALB2*, *PTEN*, *STK11*, *CHEK2*, *BARD1*, *BRIP1*, *CDH1*, *BLM*, *NF1*, *RAD51C* и др. могут объяснить еще 10-15% случаев заболевания РМЖ [9, 12]. У 5-10% пациентов причиной заболевания, вероятно, является унаследованная неблагоприятная комбинация нескольких низко-пенетрантных предрасполагающих вариантов (SNP) (рис. 1). Таких локусов насчитывают десятки, каждый из них в отдельности не представляет угрозы, однако в совокупности, кумулятивный риск может достигать внушительных значений. Так или иначе, причины значительной части случаев наследственного РМЖ до сих пор остаются неизвестными. Между тем, понимание молекулярно-генетического патогенеза наследственного ракового синдрома чрезвычайно важно для разработки персональных терапевтических подходов и для увеличения эффективности превентивных мер [15, 16]. Поэтому поиск новых наследственных мутаций и точный молекулярно-генетический диагноз каузативного события в каждом конкретном, предположительно наследственном случае РМЖ является актуальной и клинически важной задачей.

Первые исследования, направленные на поиск генов ассоциированных с РМЖ, были сосредоточены на анализе обширных родословных пациентов. Такой подход оказался весьма успешным, о чем свидетельствует открытие генов *BRCA1* и *BRCA2*. Однако, исследования, основанные на анализе семейной истории,

способны идентифицировать в основном гены с высокой пенетрантностью, ограничивая возможность выявления клинически значимых генетических детерминант с умеренным вкладом в патогенез.

Разработка методов секвенирования нового поколения (NGS) дало колоссальные возможности для поиска генов наследственного рака и стало ключевым инструментом поиска новых генетических альтераций [1, 18]. Этот метод позволяет одновременно анализировать огромное число локусов и эффективно идентифицировать мутации в них. Важным компонентом успеха является подбор пациентов для NGS анализа. Обычно при этом в расчет берут такие признаки предрасположенности к РМЖ, как ранее начало заболевания (до 45-50 лет) и двустороннее поражение молочных желез. Важно отметить, что исследования наследственного РМЖ сильно затрудняет генетическая гетерогенность популяции. Наличие выраженного эффекта основателя («founder-effect») у жителей таких стран как Польша, Россия, Украина, Беларусь дает в этом отношении большое преимущество. Действительно, в таких популяционных системах если определенный ген играет роль в предрасположенности к заболеванию, то его патогенные аллели обычно представлены несколькими повторяющимися (рекуррентными) вариантами.

Любопытно, что почти все известные наследственные мутации раковых синдромов затрагивают гены-компоненты системы поддержания стабильности генома и защиты от повреждений ДНК. В случае РМЖ к таким локусам относятся *BRCA1/2* либо их непосредственные партнеры — *ATM*, *TP53*, *PALB2*, *PTEN*, *STK11*, *CHEK2*, *BARD1*, *BRIP1*, *CDH1*, *BLM*, *NF1*, *RAD51C* [9, 11, 12, 13]. При постановке диагноза «наследственный РМЖ» и поиске причинной («каузативной») мутации традиционно принято ограничивать поле внимания инактивирующими мутациями в генах, уже зарекомендовавшими себя в роли опухолевых супрессоров, включенных в так называемые «таргетные панели». Между тем вполне вероятно, что причиной развития рака могут быть: а) гены не связанные напрямую с системами репарации ДНК, опосредованно благоприятствующие злокачественной трансформации; б) не только белок-инактивирующие транскрибирующие мутации (стоп-кодона, сдвиги рамки считывания), но и точечные замены аминокислот, ассоциированные с утратой функциональности белков.

Проблемой беспристрастного полноэкзомного скрининга является огромное число кандидатных вариантов и необходимость их классифицировать и разделять нейтральные «полиморфизмы» от предрасполагающих мутаций [5]. В 2004 г.

Goldgar et al. создали алгоритм определения патогенности полиморфизмов [6]. Критериями этого алгоритма стали: соотношение частоты варианта у больных и здоровых носителей, существование полиморфизма с известными патогенными мутациями, семейный анамнез онкологического заболевания, а также результаты функционального исследования [6]. Очевидно, что правильная характеристика функциональной значимости полиморфизма крайне важна для оценки, полученной в результате секвенирования генетической информации. Международное агентство по изучению рака (IARC) разделяет полиморфизмы на 5 классов (табл. 1). Классы 1 и 2 включают в себя доброкачественные и условно доброкачественные варианты. Полиморфизмы из классов 4 и 5 являются вероятно патогенными и патогенными соответственно. К классу 3 относятся варианты с неизвестным клиническим значением (VUS) [5, 14]. Важно отметить, что класс 3 является самым многочисленным по числу вариантов и составляет примерно 40% полиморфизмов, которые были открыты до настоящего времени [3].

Таблица 1. Классификация полиморфизмов [6]

Класс	Описание	Вероятность патогенности	Значимость
5	Патогенный	>0.99	Пациента-носителя следует отнести к группе высокого риска
4	Вероятно патогенный	0.95-0.99	Пациента-носителя следует отнести к группе высокого риска
3	Варианты с неизвестным клиническим значением (VUS)	0.05-0.949	Необходимы дополнительные сведения (семейной истории и т. д.)
2	Вероятно доброкачественный	0.001-0.049	Не является значимой мутацией
1	Доброкачественный	<0.001	Не является значимой мутацией

## Материалы и методы

С помощью полноэкзомного секвенирования (WES) мы проанализировали полный спектр наследственных вариаций у 49 российских пациентов с клиническими признаками наследственного заболевания. Все пациенты, включенные в исследование, не имели славянских founder-мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* и *NBS1*. В дополнение, были подвергнуты анализу 18 онкологически здоровых индивидуумов — эта группа «контрольных» экзомов была использована для уточнения частоты вариантов в российской популяции и исключения нерелевантных частей «полиморфизмов». Секвенирование выполнялось на платформах Illumina NextSeq (33 образца) и Illumina MiSeq (16 образцов). Для приготовления библиотек использовали набор для экзомного обогащения Nextera Rapid Capture Exome (Illumina, USA).

Частоты перспективных кандидатных аллелей изучали путем двухэтапного молекулярно-эпидемиологического исследования по схеме случай-контроль с использованием следующих когорт:

i) группа РМЖ «высокого риска» (high-risk) была представлена 797 женщинами (средний возраст 43 года (23-79 лет)); эти пациентки проходили генетическое тестирование в Институте онкологии им. Н. Н. Петрова (Санкт-Петербург, Россия) в 2008-2018 гг. и имели один или более клинический признак высокой предрасположенности к РМЖ (отягощенный семейный анамнез, двустороннее поражение, ранний возраст (<50 лет) манифестации заболевания);

ii) 1505 «случайных», последовательно отобранных пациенток с РМЖ (consecutive); средний возраст в этой группе составил 57 лет (24 — 90 лет));

iii) в контрольную группу вошли 1070 онкологически здоровых женщин (средний возраст 44 года (21 — 82 лет)).

Кандидатные варианты были генотипированы с помощью высокоточного анализа кривых плавления (HRM) с последующим секвенированием по Сэнгеру. Частоты генотипов в группе больных и контролей сравнивали при помощи критерия  $\chi^2$  и точного критерия Фишера.

### Результаты

У 21/49 (42,9%) изученных больных РМЖ были обнаружены наследственные мутации в генах с известной онкологической ролью: *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *BLM*, *RAD51C*, *RAD50*, *RAD54L*, *FANCM*, *WRN*, *MMS22L* и *ERCC4*. Анализ оставшихся 28 пациенток позволил идентифицировать 50554 альтернативных варианта, значительная часть которых в дальнейшем была отфильтрована из-за высокой частоты минорного аллеля (MAF) в популяции (более 1%, по данным ExAC database) или на основании присутствия в нашей коллекции «здоровых» экзомов. Это позволило сократить список до 9619 редких аллельных вариантов. Далее мы отобрали транквирующие мутации (n = 664) и миссенс-мутации с индексом патогенности CADD-score > 25 (n = 1737) (рис. 2). Оставшиеся варианты были приоритези-

ваны согласно рекомендациям Американского колледжа медицинской генетики (ACMG) — предпочтение отдавали патогенным и вероятно патогенным повторяющимся («рекуррентным») аллелям [6]. Также учитывались данные о встречаемости варианта в подгруппах онкологических больных и здоровых индивидуумов по сведениям базы gnomAD [<https://gnomad.broadinstitute.org/>], которые позволяли рассчитать величину риска (OR, odds ratio), ассоциированного с носительством аллеля и его достоверность. Превышение более чем в два раза частоты варианта среди онкологических пациентов рассматривалось как аргумент в пользу его потенциальной онкогенной роли. Таким образом, мы составили список из 229 наиболее перспективных мутаций. Сопоставление частот предположительно патогенных аллелей в группах больных РМЖ и здоровых женщин (молекулярно-эпидемиологическая валидация), подтвердила предрасполагающую роль трех мутаций: транквирующей мутации сайта сплайсинга *USP39 c.\*208G>C* и двух аминокислотных замен с высокими показателем патогенности *in silico* — *SLIT3 p.Arg154Cys* (CADD = 31) и *CREB3 p.Lys157Glu* (CADD = 29.3) (табл. 2).

Для *USP39 c.\*208G>C* частота мутантного гетерозиготного генотипа в группе РМЖ «высокого риска» составила 6/792 (0,75%), а среди «случайных» РМЖ — 9/1340 (0,67%). Примечательно, что среди 1066 здоровых женщин не было найдено ни одной носительницы этой мутации. Показатель риска OR составил, таким образом, 15,2 (95% CI 0.89 — 261.79, p = 0.06) для «случайных» РМЖ и 17,6 (95% CI 1.00 — 312.60, p = 0.05) для РМЖ «высокого риска».

Таблица 2. Частота кандидатных вариантов в группах больных РМЖ и здоровых индивидуумов

Мутация	РМЖ «высокого риска», OR (95% CI) p value	«Случайные» РМЖ, OR (95% CI) p value	Контроль (%)
USP39 c.*208G>C	6/792 (0.75%) 17.6 [1.00–312.60]; p=0.05	9/1340 (0.67%) 15.2 [0.89–261.79] p=0.06	0/1066 (0)
SLIT3 p.Arg154Cys	9/834 (1.1%) 3.99 [1.198–13.270] p=0.024	14/1239 (1.1%) 3.66 [1.041–12.886] p=0.043	3/1024 (0.03)
CREB3 p.Lys157Glu	6/832 (0.72%) 7.34 [0.882 — 61.134]; p=0.065	3/1242 (0.24%) 2.45 [0.254 — 23.570] p=0.439	1/1012 (0.1)

Таблица 3. Распределение идентифицированных аллелей у пациентов с РМЖ в зависимости от наличия клинических признаков наследственного заболевания

Мутация	Отягощенный семейный анамнез		Ранее начало (≤50 лет)		Множественные опухоли		Клинические признаки наследственного РМЖ		Трижды негативный РМЖ	
	Да	Нет	Да	Нет	Да	Нет	Да	Нет	Да	Нет
USP39 c.*208G>C	2/314 (0,64%)	13/1818 (0,72%)	8/974 (0,82%)	7/1158 (0,60%)	0/158 (0%)	15/1974 (0,76%)	9/1228 (0,7%)	9/904 (0,7%)	11/264 (4,2%)*	3/1159 (0,26%)
SLIT3 p.Arg154Cys	2/302 (0,66%)	21/1702 (1,23%)	12/950 (1,26%)	11/1054 (1,04%)	5/145 (3,45%)*	18/1859 (0,97%)	17/1189 (1,43%)	6/815 (0,74%)	5/223 (2,2%)	13/1004 (1,3%)
CREB3 p.Lys157Glu	3/304 (1,00%)	5/1711 (0,29%)	5/958 (0,52%)	3/1057 (0,28%)	1/149 (0,67%)	7/1866 (0,38%)	7/1200 (0,58%)	1/815 (0,12%)	1/223 (0,4%)	6/1010 (0,6%)

Примечание: \* статистически достоверная разница между группами (P < 0.05, точный критерий Фишера)



Рис. 1. Генетические детерминанты наследственного рака молочной железы



Рис. 2. Алгоритм отбора кандидатных мутаций

Частота гетерозиготного мутантного генотипа *SLIT3 p.Arg154Cys* оказалась равной 1,1% среди РМЖ «высокого риска» и «случайных» РМЖ (9/834 и 14/1239 соответственно), что было достоверно выше, чем в группе здоровых женщин (3/1024 (0.03%);  $p = 0.026$ ). Показатель риска OR достиг 3,99 (95% CI 1.198 — 13.270;  $p = 0.024$ ).

Наибольшая частота носительниц аминокислотной замены *CREB3 p.Lys157Glu* была зафиксирована среди больных РМЖ «высокого риска» 6/832 (0,72%); в группе «последовательных» РМЖ обнаружили 3/1242 (0,24%) носительниц, а в здоровом «контроле» — всего 1/1012. Показатели риска составили: OR (high-risk) = 7,34 (95% CI 0.882 to 61.134;  $p = 0.065$ ), and OR (consecutive) = 2,45 (95% CI 0.254 to 23.570;  $p = 0.439$ ).

Было обнаружено, что носительство мутация *USP39 c.\*208G>C* с высокой достоверностью определяет развитие трижды-негативного РМЖ ( $p = 0.0001$ ), а мутация *SLIT3 p.Arg154Cys* была ассоциирована с первично-множественным характером заболевания ( $p = 0.022$ ) (табл. 3).

## Дискуссия

Обнаруженные нами мутации затрагивают гены, которые впервые упоминаются в связи с наследственным риском РМЖ. Тем не менее, участие этих белков в регуляции онкологически важных клеточных процессов было неоднократно описано в литературе. Известно, что пептидаза USP39 (ubiquitin specific peptidase 39, или snRNP assembly defective 1 homolog) играет важную роль в сплайсинге пре-мРНК, а также регулирует деление клеток. Позитивная регуляция *USP39* связана со стимуляцией роста опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* [24]. Нокдаун *USP39* ингибирует пролиферацию в тканях молочной железы, желудка и печени, а также индуцирует апоптоз в опухолевых клетках [20, 22, 23, 26]. Белок *SLIT3* (multiple EGF-like domains protein 5) участвует в регуляции клеточной подвижности, ангиогенеза и пролиферации. *SLIT3* уже упоминался ранее в качестве опухолевого супрессора при различных онкопатологиях [16, 25], более того, на мышинной модели РМЖ было показано, что стимуляция экспрессии *SLIT3* подавляет рост опухолевых клеток [14]. Продукт гена *CREB3* (cyclic AMP-responsive element-binding protein 3) вовлечен в регуляцию пролиферации, клеточной миграции, индуцированную стрессом деградацию белков [10].

Несмотря на весьма вероятные по данным *in silico* анализа белок-инактивирующие последствия обнаруженных нами мутаций, а также их привлекательные потенциально онкогенные

свойства, окончательным доказательством патогенности станут результаты функциональных тестов на клеточных линиях, а также анализ сегрегации патогенных аллелей в «раковых» семьях. Выполненное исследование является серьезным аргументом в пользу целесообразности использования принципа беспристрастного отбора при поиске новых генетических детерминант рака. Выявленные нами кандидатные мутации могут объяснить лишь небольшую долю наследственного риска РМЖ (от 0,7% до 1,1% случаев РМЖ с признаками повышенного генетического риска), тем не менее, затронутые гены, возможно, станут существенным дополнением к таргетным панелям для молекулярной диагностики наследственных раковых синдромов. Следующим шагом, повышающим практическую ценность обнаруженных мутаций, является поиск генетических маркеров и биологических особенностей опухолей у носителей патогенных вариантов, способных стать мишенью для терапевтического воздействия.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-90086.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Afghahi A., Kurian W.A. the changing landscape of genetic testing for inherited breast cancer predisposition. Current treatment options in oncology. 2017; 18: 27. doi: 10.1007/s11864-017-0468-y.
2. Apostolou P., Fostira F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. BioMed Research International. 2013: 1-11. doi: 10.1155/2013/747318.
3. Balmana J., Digiovanni L., Gaddam P. et al. Conflicting interpretation of genetic variants and Cancer risk by commercial laboratories as assessed by the prospective registry of multiplex testing. Journal of Clinical Oncology. 2016; 34:4071-4078. doi: 10.1200/JCO.2016.68.4316.
4. Couch F.J., Shimelis H., Hu C. et al. Associations between cancer predisposition testing panel genes and breast cancer. JAMA Oncology. 2017; 3(9):1190–1196. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.0424.
5. Federici G., Soddu S. Variants of uncertain significance in the era of high-throughput genome sequencing: a lesson from breast and ovary cancers. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 2020; 39. doi: 10.1186/s13046-020-01554-6.
6. Goldgar D.E., Easton D.F., Deffenbaugh A.M. et al. Integrated evaluation of DNA sequence variants of unknown clinical significance: application to BRCA1 and BRCA2. The American Journal of Human Genetics. 2004; 75(4): 535-544. doi: 10.1086/424388.
7. Graffeo R., Livraghi L., Pagani O. et al. Time to incorporate germline multigene panel testing into breast and ovarian cancer patient care. Breast Cancer Res treat. 2016; 160:393-410. doi: 10.1007/s10549-016-4003-9.
8. Hahnen E., Hauke J., Engel C. et al. Germline Mutations in Triple-Negative Breast Cancer. Breast Care. 2017; 12(1):15-19. doi: 10.1159/000455999.

9. Hauke J., Horvath J., Gro E. et al. Gene panel testing of 5589 BRCA1/2-negative index patients with breast cancer in a routine diagnostic setting: results of the German Consortium for Hereditary Breast and ovarian Cancer. *Cancer Med.* 2018;7(4):1349-1358. doi: 10.1002/cam4.1376.
10. Howley B.V., Link L.A., Grelet S. et al. A CREB3-regulated ER-Golgi trafficking signature promotes metastatic progression in breast cancer. *Oncogene.* 2018; 37(10):1308-1325. doi: 10.1038/s41388-017-0023-0.
11. Joseph L., Cankovic M., Caughron S. et al. The Spectrum of clinical Utilities in Molecular Pathology Testing Procedures for inherited conditions and Cancer: a report of the Association for Molecular Pathology. *The Journal of Molecular Diagnostics.* 2016; 18(5):605-619. doi: 10.1016/j.jmoldx.2016.05.007.
12. Kast K., Rhiem K., Wappenschmidt B. et al. Prevalence of BRCA1/2 germline mutations in 21 401 families with breast and ovarian cancer. *J. Med. Genet.* 2016; 53: 465-471. doi: 10.1136/jmedgenet-2015-103672.
13. Lu H.M., Li s., Black M.H., Lee s. et al. Association of Breast and ovarian Cancers With Predisposition Genes Identified by Large-scale sequencing. *JAMA oncol.* — 2018. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.2956.
14. Marlow R., Strickland P., Lee J.S. et al. SLITs suppress tumor growth in vivo by silencing Sdf1/Cxcr4 within breast epithelium. *Cancer Research.* 2008; 68(19):7819-7827. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1357.
15. Nelson H.D., Pappas M., Zakher B. et al. Risk assessment, genetic counseling, and genetic testing for BRCA-related cancer in women: a systematic review to update the U.S. Preventive services task Force recommendation. *Ann Intern. Med.* 2014; 160: 255-266. doi: 10.7326/M13-1684.
16. Ng L., Chow A.K.M., Man J.H.W. et al. Suppression of Slit3 induces tumor proliferation and chemoresistance in hepatocellular carcinoma through activation of GSK3/-catenin pathway. *BMC Cancer.* 2018; 18(1): 621. doi: 10.1186/s12885-018-4326-5.
17. Oldfield CJ, Dunker AK. Intrinsically disordered proteins and intrinsically disordered protein regions. *Annu Rev Biochem.* 2014; 83: 553-584. doi: 10.2174/092986610791498984.
18. Plon S.E., Eccles D.M., Easton D. et al. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Human Mutation.* 2008; 29(11):1282-1291. doi: 10.1002/humu.20880.
19. Pohl-Rescigno E., Hauke J., Loibl S. et al. Association of Germline Variant Status with Therapy Response in High-risk Early-Stage Breast Cancer: A Secondary Analysis of the GeparOcto Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology.* 2020; 6(5):1-5. doi: 10.1001/jamaoncol.2020.0007.
20. Talhouet S., Peron J., Vuilleumier A. et al. Clinical outcome of breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations according to molecular subtypes. *Scientific Reports.* 2020;10(1). doi: 10.1038/s41598-020-63759-1.
21. Wang H., Ji X., Liu X. et al. Lentivirus-mediated inhibition of USP39 suppresses the growth of breast cancer cells in vitro. *Oncology Reports.* 2013; 30(6):2871-2877. doi: 10.3892/or.2013.2798.
22. Wang YA., Jian J.W., Hung C.F. et al. Germline breast cancer susceptibility gene mutations and breast cancer outcomes. *BMC Cancer.* 2018; 18(1). doi: 10.1186/s12885-018-4229-5.
23. Xing Z., Sun F., He W. et al. Downregulation of ubiquitin-specific peptidase 39 suppresses the proliferation and induces the apoptosis of human colorectal cancer cells. *Oncology Letters.* 2018; 15(4): 5443-5450. doi: 10.3892/ol.2018.8061.
24. Xu Y., Zhu M.R., Zhang J.Y. et al. Knockdown of ubiquitinspecific peptidase 39 inhibits the malignant progression of human renal cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports.* 2018; 17(3): 4729-4735. doi: 10.3892/mmr.2018.8421.
25. Yuan X., Sun X., Shi X. et al. USP39 promotes the growth of human hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Oncology Reports.* 2015; 34(2):823-832. doi: 10.3892/or.2015.4065.
26. Zhang C., Guo H., Li B. et al. Effects of Slit3 silencing on the invasive ability of lung carcinoma A549 cells. *Oncology Reports.* 2015; 34(2):952-960. doi: 10.3892/or.2015.4031.
27. Zhao F., Wang N., Yi Y. et al. Knockdown of CREB3/Luman by shRNA in Mouse Granulosa Cells Results in Decreased Estradiol and Progesterone Synthesis and Promotes Cell Proliferation. *PLoS ONE.* 2016; 11(12). doi: 10.1371/journal.pone.0168246.
28. Суспицын Е.Н., Тюрин В.И., Имянитов Е.Н., Соколенко А.П. Полноэкзомное секвенирование: принципы и диагностические возможности. *Педиатр.* 2016; 7(4): 142-146.

Поступила в редакцию 28.08.2020 г.

*K.A. Zagorodnev<sup>1</sup>, A.A. Romanko<sup>1, 2</sup>, U. Gorgul<sup>1</sup>,  
A.O. Ivantsov<sup>2</sup>, A.P. Sokolenko<sup>1,2</sup>, I.V. Bizin<sup>2</sup>,  
E.Sh. Kuligina<sup>2</sup>*

**Searching for the missing genetic determinants of hereditary breast cancer risk by whole-exome sequencing of BRCA-negative patients: new candidate genes USP39, SLIT3, CREB3**

<sup>1</sup>St.Petersburg State Pediatric Medical University, <sup>2</sup>FSBI «N.N. Petrov NMRC of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russia, St. Petersburg

The search for the new hereditary mutations and a precise molecular genetic diagnosis that determines the causative mutation in each specific case of hereditary breast cancer (BC) is a clinically important task since it helps to define the personal therapeutic approach and increase the effectiveness of preventive measures. Using whole-exome sequencing (WES) we analyzed the full spectrum of hereditary variations in 49 Russian patients with clinical signs of a hereditary disease which allowed us to compile a list of 229 candidate probably pathogenic germ-line variants. Then, the selected candidate mutations were validated by Sanger sequencing and molecular-epidemiological studies, the predisposing roles of three oncologically relevant mutations (*USP39 c.\*208G>C*, *SLIT3 p.Arg154Cys*, and *CREB3 p.Lys157Glu*) were confirmed. Our candidate genes are first mentioned in connection with the hereditary risk of BC. The final proofs of the causative roles of these variants could be obtained through functional tests as well as via the analysis of the mutations segregation in BC families.

Key words: hereditary breast cancer, whole exome sequencing

Л.В. Спирина<sup>1,2</sup>, С.Ю. Чижевская<sup>1,2</sup>, И.В. Кондакова<sup>1</sup>, Е.Л. Чойнзонов<sup>1,2</sup>, И.В. Ковалева<sup>1,2</sup>

## Экспрессия VHL при опухолевой патологии щитовидной железы: связь с распространенностью процесса, экспрессией транскрипционных, ростовых факторов и компонентов АКТ/m-TOR сигнального пути

<sup>1</sup>НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск

<sup>2</sup>Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

Белок-онкосупрессор VHL играет решающую роль в механизмах опухолевой прогрессии. Развитие злокачественных новообразований щитовидной железы связано с активацией транскрипционных и ростовых факторов. Однако роль гена VHL в механизмах развития рака щитовидной железы практически не изучена. Цель проведенного исследования заключалась в изучении клинико-морфологических особенностей, экспрессии транскрипционных, ростовых факторов и компонентов АКТ/m-TOR сигнального пути у пациентов с папиллярным раком щитовидной железы в зависимости от уровня экспрессии гена VHL.

**Материалы и методы.** В исследование было включено 46 пациентов с опухолевой патологией щитовидной железы: 20 пациентов с доброкачественными опухолями щитовидной железы и 26 пациентов с папиллярным раком щитовидной железы T<sub>1-4</sub>N<sub>0</sub>M0. Уровень мРНК изучаемых генов определялся методом ПЦР в реальном времени. Мутацию BRAF-V600E определяли в аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени.

**Результаты и их обсуждение.** Уровень мРНК гена VHL был сравнимым в двух группах пациентов с опухолевой патологией щитовидной железы (в ткани папиллярного рака и в ткани доброкачественных опухолей), но зависел от распространенности процесса и статуса гена BRAF. При наличии мутации BRAF-V600E экспрессия VHL увеличивалась на 12,28 Усл. Ед. по сравнению с больными без данной соматической мутации. Выявлено, что экспрессия NF-κB p65, NF-κB p50, HIF-1, HIF-2, ростовых факторов VEGF и CAIX у пациентов в группе с уровнем VHL >1,0 Усл. Ед. повышена по сравнению с пациентами с уровнем VHL <1,0 Усл. Ед. Также зафиксировано снижение уровня мРНК PDK, c-RAF, mTOR, 70s 6 киназы, PTEN у пациентов с повышенным уровнем экспрессии VHL по сравнению с пациентами с экспрессией VHL <1,0 Усл. Ед.

**Заключение.** Таким образом, выявлено, что экспрессия VHL связана с опухолевой прогрессией при папиллярном раке щитовидной железы и наличием мутантного белка bRAF. Отмечены ассоциации между экспрессией гена VHL и уровнем мРНК транскрипционных и ростовых факторов.

**Ключевые слова:** рак щитовидной железы, белок фон Хиппель-Линдау, транскрипционные факторы, ростовые факторы, компоненты АКТ/mTOR сигнального пути, BRAF-V600E, распространенность процесса

Рак щитовидной железы — одна из самых распространенных опухолевых патологий. Формирование гипоксии является ключевым событием в онкогенезе и связано с соматическими мутациями генов RET1, BRAF-V600E [1]. Известно, что интенсивность процесса неоангиогенеза жестко регулируется протеасомальной деградацией факторов и связана с функциональной активностью белка фон Хиппель-Линдау (VHL) [2].

Белок-онкосупрессор VHL играет значимую роль в механизмах опухолевой прогрессии при папиллярном раке щитовидной железы [3]. Стоит отметить тот факт, что соматические мутации и гиперметилование промотора гена VHL не выявлены при папиллярном раке щитовидной железы [4]. Известно, что экспрессия VHL снижена в ткани папиллярного рака щитовидной железы и не связана с клинико-морфологическими параметрами, а также со статусом гена BRAF [5]. При этом отмечается, что низкая экспрессия данного белка характерна для агрессивных форм опухоли [4, 6].

Развитие злокачественных новообразований щитовидной железы связано с активацией транскрипционных и ростовых факторов. В ранее проведенных исследованиях было показано, что в ткани папиллярного рака щитовидной железы происходит рост экспрессии ядерных факторов NF-κB и HIF-2, а также компонентов внутриклеточных сигнальных каскадов — АКТ, PTEN, на фоне низкой экспрессии c-RAF [7]. При этом

тяжесть гипоксии и повышение экспрессии факторов, индуцированных гипоксией, — HIF-1 и HIF-2 в ткани папиллярного рака щитовидной железы, характеризующее биологическое поведение опухоли, связано с формированием агрессивного метастатического потенциала [8]. Известно, что экспрессия HIF-1 определяется не только развитием гипоксии, но и стимулируется *BRAFV600E*-ассоциированным внутриклеточным сигнальным каскадом MAPK [9]. В ранее проведенных исследованиях отмечена низкая экспрессия компонентов АКТ/mTOR сигнального каскада в ткани папиллярного рака, наиболее выраженная при наличии мутации *BRAF-V600E* [7, 10].

Известно, что уровень транскрипционного фактора NF-κB ассоциирован с опухолевой прогрессией и формированием регионарных метастазов [11, 12], что связано с активацией факторов, индуцированных гипоксией, сопровождаемый ростом сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и карбоангидразы IX (CAIX) [13].

Имеются единичные данные о роли белка фон Хиппель-Линдау в регуляции экспрессии транскрипционных, ростовых факторов и компонентов внутриклеточных сигнальных каскадов. Известно, что при гипоксии изменение экспрессии компонентов АКТ/mTOR сигнального пути [14, 15], транскрипционных и ростовых факторов [16] происходит за счет прямого и непрямого влияния белка VHL на множество процессов онкогенеза (формирование воспаления, уход опухоли от иммунного надзора, развитие инвазивного потенциала опухоли и др.) и не ограничивается регуляцией протеосомальной деградации фактора HIF-1. В целом, роль изучаемого молекулярного маркера в развитии опухолевой патологии щитовидной железы, и его связь с молекулярными маркерами заболевания практически не изучена. Цель проведенного исследования заключалась в изучении клинико-морфологических особенностей, экспрессии транскрипционных, ростовых факторов и компонентов АКТ/m-TOR сигнального пути у пациентов с папиллярным раком щитовидной железы в зависимости от уровня экспрессии гена *VHL*.

## Материал и методы

В исследование было включено 46 пациентов с опухолевой патологией щитовидной железы: 20 пациентов с доброкачественными опухолями щитовидной железы (средний возраст — 53,0±4,4 лет) и 26 пациентов с папиллярным раком щитовидной железы (средний возраст — 52,0±2,6 года) со стадией опухолевого процесса T<sub>1-4</sub>N<sub>0-2</sub>M<sub>0</sub>. Всем пациентам было проведено оперативное лечение в клиниках НИИ онкологии Томского НИМЦ. Диагноз у всех больных был морфологически верифицирован.

Стадия T<sub>1-2</sub>N<sub>0-2</sub>M<sub>0</sub> наблюдалась у 24 пациентов, T<sub>3-4</sub>N<sub>0-2</sub>M<sub>0</sub> — у 2 пациентов. В зависимости от распространенности заболевания были выделены группы больных без регионарных метастазов и с наличием метастазов. Стадия T<sub>1-4</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> была диагностирована у 18 больных, а T<sub>1-4</sub>N<sub>1-2</sub>M<sub>0</sub> — у 8 пациентов. У всех пациентов был верифицирован классический вариант папиллярного рака щитовидной железы. Мутация *BRAF-V600E* была выявлена у 15 пациентов, и 11 пациентов имели негативный *BRAF* статус. Пониженная экспрессия VHL была зафиксирована у 16 пациентов (<1,0 Усл. Ед.), повышенный уровень экспрессии (>1,0 Усл.Ед.) — у 10 больных.

Материалом исследования являлись образцы опухолевой и неизмененной ткани щитовидной железы, находящиеся на расстоянии не менее 1 см от границы опухоли, которые после забора замораживались и хранились при t -80°C.

Проведение данной работы одобрено этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ. Все процедуры с вовлечением больных были проведены в соответствии с Протоколом Хельсинской декларации по правам человека (1964 г.) Все больные подписывали информированное согласие на участие в исследовании.

Выделение ДНК. ДНК выделяли с помощью набора FFPET DNA — Extraction Kit (Биолинк, Россия). Для оценки количества выделенной ДНК оценивали ее концентрацию на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA). Полученная ДНК использовалась для ПЦР в режиме реального времени.

Определение мутации *BRAF-V600E*. Мутацию *BRAF-V600E* определяли с помощью набора реагентов Real-time-PCR-*BRAF-V600E*, предназначенного для выявления точечной мутации GTG→GGG в 600 кодоне гена *BRAF*. Анализ проводится методом аллель-специфичной ПЦР в реальном времени.

Выделение РНК. РНК выделяли с помощью набора RNeasy mini Kit, содержащего ДНК-азу I (Qiagen, Germany). Для оценки количества выделенной РНК на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA) оценивали концентрацию и чистоту выделенной РНК. Концентрация РНК составила от 80 до 250 нг/мкл, A260/A280 = 1.95-2.05; A260/A230 = 1.90-2.31. Целостность РНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA) и набора R6K ScreenTape (Agilent Technologies, USA). RIN составил 5.6 — 7.8.

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Уровень экспрессии генов оценивали при помощи количественной обратно-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) с использованием красителя SYBR Green на амплификаторе iCycler (Bio-Rad, USA). Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора ОТ m-MuLV-RH (БиоЛабмикс, Россия) со случайными гексануклеотидными праймерами в соответствии с инструкцией к набору. ПЦР ставили в трех репликах в объеме 25 мкл, содержащем 12,5 мкл БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (БиоЛабмикс, Россия), 300 нМ прямого и обратного праймеров и 50 нг кДНК. CAIX: F 5¢-GTTGCTGTCTC-GCTTGGAA-3¢, R 5¢-CAGGGTGTGAGAGAGGGTGT-3¢; HIF-1a: F 5¢-CAAGAACCTACTGCTAATGCCA-3¢, R 5¢-TTTGGTGAGGCTGTCCGA-3¢; EPAS1: F 5¢-TGGAG-TATGAAGAGCAAGCCT-3¢, R 5¢-GGGAACCTGCTCTT-GCTGT-3¢; NFKB1: F 5¢-CGTGTAACCAAAAGCCCTA-AA-3¢, R 5¢-AACCAAGAAAGGAAGCCAAGT-3¢; RELA: F 5¢-GGAGCACAGATACCACCAAGA-3¢, R 5¢-GGGTT-GTTGTTGGTCTGGAT-3¢; VEGFA: F 5¢-AGGGCAGAAT-CATCACGAA-3¢, R 5¢-TCTTGCTCTATCTTTCTTTG-GTCT-3¢; KDR: F 5¢-AACACAGCGGAATCAGTCA-3¢, R 5¢-GTGKTGTGTGTCATCGGA-3¢; 4E-BP1: F 5¢-

CAGCCCTTTCTCCCTCACT -3¢, R 5¢- TTCCCAAGCA-CATCAACCT -3¢; AKT1: F 5¢- CGAGGACGCCAAGGAGA -3¢, R 5¢- GTCATCTTGGTCAGGTGGTGT -3¢; C-RAF: F 5¢- TGGTGTGCTCCTGCTCCCT -3¢, R 5¢- ACTGCCTGC-TACCTTACTTCCCT -3¢; GSK3b: F 5¢- AGACAAGGACG-GCAGCAA -3¢, R 5¢- TGGAGTAGAAGAAATAACGCAAT -3¢; 70S kinase alpha: F 5¢- CAGCACAGCAAATCCTCAGA -3¢, R 5¢- ACACATCTCCCTTCCACCTT -3¢; m-TOR: F 5¢- CCAAAGGCAACAAGCGAT-3¢, R 5¢- TTCACCAAAC-CGTCTCCAA -3¢; PDK1: F 5¢- TCACCAGGACAGCCAATA-CA -3¢, R 5¢- CTCCTCGGTCACTCATCTTCA -3¢; VHL F 5¢-GGCAGGCCGAATCTCTTGA-3¢, R 5¢-СТАТТТСТТ-ТАСТCAGCACCATT-3¢; GAPDH: F 5¢- GGAAGTCAG-GTGGAGCGA-3¢, R 5¢-GCAACAATATCCACTTTACCA-GA-3¢. Двухшаговая программа амплификации включала 1 цикл — 94°C, 10 мин — предварительная денатурация; 40 циклов — 1 шаг 94°C, 10 сек и 2 шаг 20 сек — при температуре 60°C. Праймеры были подобраны с использованием программы Vector NTI Advance 11.5 и базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore>).

В качестве референсного гена использовали ген «домашнего хозяйства» фермента GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), и уровень экспрессии каждого целевого гена нормализовали по отношению к экспрессии GAPDH. Количественный анализ экспрессии проводили по  $2\Delta\Delta Ct$  по отношению к конститутивно-экспрессируемому гену-рефери фермента GAPDH.

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета программ Statistica 8.0. Проверку нормальности проводили с помощью критерия Холмогорова-Смирнова. Результаты определения экспрессии генов представлены как Me (Q1; Q3). Значимость различий оценивали по критерию Манна-Уитни. Различия считали значимыми при  $p < 0.05$ . Значимость различий частот качественных признаков оценивали с помощью Хи квадрат критерия с поправкой Йетса.

## Результаты исследования

Выявлено отсутствие различий по уровню мРНК гена VHL в ткани между группами пациентов с папиллярным раком и доброкачественными опухолями щитовидной железы (таблица 1). При этом отмечена связь изучаемого показателя с распространённостью процесса и поражением регионарных лимфоузлов. У пациентов с наличием лимфогенных метастазов выявлено повышение уровня мРНК гена VHL в 45,8 раза по сравнению с пациентами с локализованным процессом. Отмечен тот факт, что экспрессия VHL зависела от статуса исследованного варианта мутации, а именно BRAF-V600E. При наличии мутации показатель увеличивался на 12,28 Усл. Ед. по сравнению с больными без данной соматической мутации.

В табл. 2 представлены данные о связи клиничко-морфологических параметров заболевания с повышенным и пониженным уровнем экспрессии VHL (менее и более 1,0 Усл. Ед.) в опухоли. Выявлено, что больные из двух изучаемых групп не различались по клиничко-морфологическим параметрам (размер опухоли, наличие регионарных метастазов). Однако при наличии мутации BRAF-V600E количество пациентов с повышенной экспрессией было больше в 2,4 раза по сравнению больными с отрицательным статусом BRAF-V600E.

**Таблица 1. Экспрессия VHL в ткани доброкачественных опухолей и папиллярном раке щитовидной железы, Me (Q1; Q3)**

VHL, Усл. Ед.		
в зависимости от вида опухолевой патологии	Доброкачественные опухоли	Папиллярный рак щитовидной железы
	0,41 (0,02-56,59)	0,41 (0,02-41,00)
В зависимости от размера опухоли	$T_{1-2}N_0M_0$	$T_{3-4}N_{0-1}M_0$
	0,41 (0,02-53,59)	0,46 (0,00-101,00)
При прогрессировании и поражении регионарных лимфоузлов	Первичная опухоль без регионарных метастазов	Первичная опухоль с наличием регионарных метастазов
	1,17 (0,02-5,59)	53,59 (20,11-154,00)*
в зависимости от статуса гена BRAF-V600E	отсутствие мутации BRAF-V600E	наличие мутации BRAF-V600E
	0,02 (0,0; 0,35)	12,3 (1,02; 56,67)**

Примечание: \* — значимость различий по сравнению с группой больных без регионарных метастазов,  $p < 0,05$ ; \*\* — значимость различий по сравнению с группой больных без мутации BRAF-V600E,  $p < 0,05$ ;

**Таблица 2. Клиничко-морфологические параметры больных с папиллярным раком щитовидной железы в зависимости от уровня экспрессии VHL, % (n)**

Клиничко-морфологические параметры	VHL <1,0 Усл. Ед.	VHL >1,0 Усл. Ед.	Значимость различий
В зависимости от стадии Т			$p = 0,318$
$T_{2-3}N_0M_0$	36% (n=9)	64% (n=15)	Критерий Хи-квадрат с поправкой Йейтса 0.997
$T_{3-4}N_0M_0$	100% (n=2)	0%(n=0)	
В зависимости от поражения регионарных лимфоузлов			$p = 0,510$
Без регионарных метастазов	16,7% (n=3)	83,3% (n=15)	Критерий Хи-квадрат с поправкой Йейтса 0.435
С наличием регионарных метастазов	37,5% (n=3)	62,5% (n=5)	
В зависимости от статуса гена BRAF-V600E			$P = 0.003$
Отсутствие мутации BRAF-V600E	11 (76%)	2 (24%)	Критерий Хи-квадрат с поправкой Йейтса 9.19
Наличие мутации BRAF-V600E	3 (42%)	12 (58%)	

Примечание: p — значимость различий;

**Таблица 3. Экспрессия транскрипционных факторов, ростовых факторов и компонентов АКТ/mTOR сигнального пути в ткани папиллярного рака щитовидной железы в зависимости от уровня мРНК VHL, Me (Q1; Q3)**

Показатель Усл. Ед.	VHL <1,0 Усл. Ед.	VHL >1,0 Усл. Ед.
Экспрессия транскрипционных факторов, ростовых факторов		
NF-κB p65	0,10 (0,00; 1,39)	8,69 (1,32; 36,00)*
NF-κB p50	0,51 (0,00; 7,39)	38,00 (1,40;145,00)*
HIF-1	0,06 (0,00-0,58)	3,85 (0,34-25,61) *
HIF-2	0,15 (0,005-1,43)	25,97 (0,67-48,53) *
VEGFR2	0,36 (0,02-3,65)	1,93 (0,05-8,51)
VEGF	0,05 (0,005-1,13)	7,89 (0,32-26,35) *
CAIX	0,30 (0,01-1,75)	2,94 (0,56-15,63)*
PDK	2,17 (0,29; 147,36)	0,15 (0,02; 1,90)*
Экспрессия компонентов АКТ/mTOR сигнального пути		
АКТ	2,73 (0,09; 14,67)	0,18 (0,01; 4,36)
c-RAF	4,47 (1,90; 31,44,)	0,03 (0,00; 1,44)*
GSK-3β	0,99 (0,39; 36,65))	0,21 (0,00; 1,39)
PTEN	6,78 (1,42; 48,00)	0,20 (0,02; 3,57)*
mTOR	8,40 (2,36; 107,01)	0,33 (0,01; 16,53)*
4EBP1	0,15 (0,01; 4,51)	0,33 (0,02; 1,99)
70s 6 киназа	4,14 (1,47; 31,4)	0,03 (0,00; 0,38)*

Примечание: \* — значимость различий по сравнению с пациентами с уровнем VHL <1, p <0,05;

В табл. 3 представлены данные об экспрессии транскрипционных факторов и ростовых факторов в зависимости от уровня экспрессии VHL. Выявлено, что экспрессия NF-κB p65, NF-κB p50, HIF-1, HIF-2, ростовых факторов VEGF и CAIX у пациентов с уровнем VHL >1,0 Усл. Ед. выше в 86,0; 74,5; 64,1; 173, 1 и 157, 8; 9,8 раза, соответственно, по сравнению с пациентами с уровнем VHL <1,0 Усл. Ед.

Уровень мРНК компонентов АКТ/mTOR сигнального пути также зависел от экспрессии гена VHL (Таблица 3). Зафиксировано снижение уровня мРНК PDK, c-RAF, mTOR, 70s 6 киназы у пациентов с повышенным уровнем экспрессии VHL в 14,44; 149; 25,2 и 138 раз по сравнению с пациентами с экспрессией VHL <1,0 Усл. Ед. При этом отмечено снижение экспрессии фосфатазы PTEN в 33,9 раза у пациентов в исследуемых группах.

### Обсуждение результатов исследования

Выявлена связь экспрессии гена VHL в ткани папиллярного рака щитовидной железы с развитием лимфогенных метастазов. Мутации гена VHL не обнаруживались при папиллярном раке щитовидной железы [4, 5]. Имеется ряд наблюдений, говорящих о том, что в ткани опухоли отмечается низкая экспрессия гена

VHL, что не связано с клинико-морфологическими параметрами заболевания [5]. Однако несколько авторов отметили связь изменения уровня мРНК гена VHL с агрессивностью заболевания [4, 6]. При этом в отличие от данных E. Baldini (2019) [5] в настоящей работе показана связь экспрессии VHL с мутацией гена *BRAF-V600E*.

В ранее проведенных исследованиях показано, что в ткани папиллярного рака щитовидной железы отмечается рост экспрессии транскрипционных и ростовых факторов на фоне снижения экспрессии компонентов АКТ/mTOR внутриклеточного каскада [7]. При этом отмечается, что при наличии варианта гена BRAF-V600E в опухоли экспрессия АКТ, c-RAF, GSK-3β снижалась, а уровень мРНК ядерных факторов NF-κB p65, HIF-1 и ростового фактора VEGF повышался [10].

Известно, что VHL способен не только регулировать содержание факторов, индуцированных гипоксией, но и влиять на продукцию ядерного фактора NF-κB [11, 12, 15, 16]. Именно уровень транскрипционного фактора NF-κB ассоциирован с опухолевой прогрессией, в том числе развитием инвазивного потенциала и формированием регионарных метастазов [11, 13]. Известно, что продукция HIF-1α регулируется не только гипоксией, но и компонентами BRAF-

V600E-ассоциированного внутриклеточного сигнального каскада [9]. Возможно, нарастание мРНК гена VHL, зафиксированное при наличии мутации гена *BRAF*, приводило к поражению регионарных лимфоузлов за счет влияния на значимые процессы опухолевой прогрессии, в том числе — формирование воспаления, развитие инвазивного потенциала опухоли. В связи с этим становятся более понятным и молекулярные основы развития заболевания при участии транскрипционных и ростовых факторов и их связь с экспрессией гена VHL.

### Заключение

Таким образом, выявлено, что экспрессия VHL связана с опухолевой прогрессией при папиллярном раке щитовидной железы. Рост показателя был связан с распространением процесса и наличием мутантного белка *bRAF* (вариант V600E). Показано, что экспрессия гена VHL в ткани опухоли ассоциирована с уровнем транскрипционных, ростовых факторов и компонентов АКТ/mTOR сигнального пути.

*Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.*

### ЛИТЕРАТУРА

- Li D.D., Zhang Y.F., Xu H.X. et al. The role of BRAF in the pathogenesis of thyroid carcinoma. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2015;20:1068-1078.
- Koperek O., Bergner O., Pichlhöfer B. et al. Expression of hypoxia-associated proteins in sporadic medullary thyroid cancer is associated with desmoplastic stroma reaction and lymph node metastasis and may indicate somatic mutations in the VHL gene. *J Pathol*. 2011;225(1):63-72. doi:10.1002/path.2926.
- Todorović L., Stanojević B., Mandušić V. et al. Expression of VHL tumor suppressor mRNA and miR-92a in papillary thyroid carcinoma and their correlation with clinical and pathological parameters. *Med Oncol*. 2018;35(2):17. doi:10.1007/s12032-017-1066-3.
- Stanojevic B., Saenko V., Todorovic L. et al. Low VHL mRNA expression is associated with more aggressive tumor features of papillary thyroid carcinoma. *PLoS One*. 2014;9(12):e114511. doi:10.1371/journal.pone.0114511.
- Baldini E., Tuccilli C., Arlot-Bonnemains Y. et al. Deregulated expression of VHL mRNA variants in papillary thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;443:121-127. doi:10.1016/j.mce.2017.01.019.
- Rossi E.D., Martini M., Bizzarro T. et al. Uncommon BRAF mutations in the follicular variant of thyroid papillary carcinoma: New insights. *Cancer Cytopathol*. 2015;123(10):593-602. doi:10.1002/cncy.21586.
- Спирина Л.В., Чижевская С.Ю., Кондакова И.В. Экспрессия транскрипционных, ростовых факторов и компонентов АКТ/m-TOR сигнального пути в ткани папиллярного рака щитовидной железы. *Проблемы эндокринологии*. 2018; 64(4): 208-215. doi: 10.14341/probl9310 [Spirina L.V., Chigevskaya S.Yu., Kondakova I.V. Expression of transcription, growth factors and components of AKT/m-TOR signaling pathway in papillary thyroid cancers. *Problems of Endocrinology*. 2018;64(4):208-215. doi: 10.14341/probl9310 (in Russ.)].
- Liu Y.M., Ying S.P., Huang Y.R. et al. Expression of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  correlates to biological and clinical significance in papillary thyroid carcinoma. *World J Surg Oncol*. 2016;14(1):30. doi:10.1186/s12957-016-0785-9.
- Zerilli M., Zito G., Martorana A. et al. BRAF(V600E) mutation influences hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression levels in papillary thyroid cancer. *Mod Pathol*. 2010;23(8):1052-1060. doi:10.1038/modpathol.2010.86.
- Спирина Л.В., Чижевская С.Ю., Кондакова И.В. и др. Связь мутации BRAF-V600E с экспрессией транскрипционных, ростовых факторов, компонентов АКТ/m-TOR сигнального пути в ткани папиллярного рака щитовидной железы. *Вопросы онкологии*. 2019;65(4): 608-613 [Spirina L.V., Chigevskaya S.Yu., Kondakova I.V. et al. The relationship of the BRAF-V600E mutation with the expression of transcriptional, growth factors, components of the AKT / m-TOR signaling pathway in the tissue of papillary thyroid cancer. *Problems in Oncology*. 2019;65(4): 608-613 (in Russ.)].
- Le F., Zhang J.Y., Liu W. et al. The levels of NF- $\kappa$ B p50 and NF- $\kappa$ B p65 play a role in thyroid carcinoma malignancy in vivo. *J Int Med Res*. 2018;46(10):4092-4099. doi:10.1177/0300060518785846.
- Park A., Lee Y., Kim M.S. et al. Prostaglandin E2 Secreted by Thyroid Cancer Cells Contributes to Immune Escape Through the Suppression of Natural Killer (NK) Cell Cytotoxicity and NK Cell Differentiation. *Front Immunol*. 2018;9:1859. doi:10.3389/fimmu.2018.01859.
- Azoitei N., Becher A., Steinestel K. et al. PKM2 promotes tumor angiogenesis by regulating HIF-1 $\alpha$  through NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cancer*. 2016;15:3. doi:10.1186/s12943-015-0490-2.
- Sun X., Feinberg M.W. NF- $\kappa$ B and hypoxia: a double-edged sword in atherosclerosis. *Am J Pathol*. 2012;181(5):1513-1517. doi:10.1016/j.ajpath.2012.09.001.
- Labrousse-Arias D., Martínez-Alonso E., Corral-Escariz M. et al. VHL promotes immune response against renal cell carcinoma via NF- $\kappa$ B-dependent regulation of VCAM-1. *J Cell Biol*. 2017;216(3):835-847. doi:10.1083/jcb.201608024.
- Спирина Л.В., Слонимская Е.М., Юрмазов З.А. и др. Роль ядерного фактора NF- $\kappa$ B и белка фон Хиппель-Линдау в формировании молекулярного портрета опухоли почки. *Молекулярная медицина*. 2019; 17(3):15-19. doi: 10.29296/24999490-2019-03-03 [Spirina L.V., Slonimskaya E.M., Yurmazov Z.A. et al. The role of TNF- $\kappa$ B and Hippel-Lindau protein in the creation of a molecular portrait of kidney cancers. *Molekulyarnaya meditsina*. 2019; 17 (3): 15-19. https://doi.org/10.29296/24999490-2019-03-03(in Russ.)].

Поступила в редакцию 03.07.2020 г.

L.V. Spirina<sup>1,2</sup>, S.Yu. Chizhevskaya<sup>1,2</sup>, I.V. Kondakova<sup>1</sup>,  
E.L. Choyznzonov<sup>1,2</sup>, I.V. Kovaleva<sup>1,2</sup>

**VHL expression in case of thyroid tumor pathology: connection with the prevalence of the disease, expression of transcription, growth factors and components of the AKT / m-TOR signaling pathway**

<sup>1</sup>Cancer Research Institute, Tomsk National Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk,  
<sup>2</sup>Siberian State Medical University, Tomsk

*Introduction.* The oncosuppressor protein VHL plays a decisive or at least important role in the mechanisms of tumor progression. The development of malignant neoplasms of the thyroid gland is associated with the activation of transcriptional and growth factors. However, the role of the VHL gene in the mechanisms of the development of thyroid cancer has hardly been studied.

The study aimed to study the clinical and morphological features, expression of transcription, growth factors, and components of the AKT / m-TOR signaling pathway in patients with papillary thyroid cancer depending on the level of expression of the VHL gene.

*Material and methods.* The study included 46 patients with tumor pathology of the thyroid gland: 20 patients with benign thyroid tumors and 26 patients with papillary thyroid cancer T1-4N0-2M0. The expression of parameters was determined by PCR in real-time. Mutation *BRAF-V600E* was determined in allele-specific PCR in real-time.

*Results and their discussion.* The mRNA level of the VHL gene remained virtually unchanged in the tissue of papillary cancer and benign thyroid tumors. It depended on the prevalence of the disease, the defeat of regional lymph nodes, and the *BRAF-V600E* status. In the presence of the *BRAF-V600E* mutation, VHL expression increased 615 times in patients with a mutation compared with patients without this somatic mutation. It was revealed that the expression of NF- $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ B p50, HIF-1, HIF-2, growth factors VEGF and CAIX in patients in the group with a VHL level > 1.0 RU increased compared with patients with a VHL level <1.0 RU. A decrease in PDK, c-RAF, mTOR, 70s 6 kinase, PTEN mRNA levels were also recorded in patients with increased levels of VHL expression compared with patients with VHL expression <1.0 RU.

*Conclusion.* That the association of the VHL expression with tumor progression in papillary thyroid cancer and the mutant protein BRAF presence was found. Also, associations between the VHL expression and the level of mRNA of transcription and growth factors are noted.

Key words: thyroid cancer, von Hippel-Lindau protein, transcription factors, growth factors, components of the AKT / mTOR signaling pathway, *BRAF-V-600E*, cancer spread

*С.В. Сметанина<sup>1</sup>, Е.Ю. Ускова<sup>1</sup>, О.В. Сметанина<sup>2</sup>*

## Диагностические параллели в цитологической диагностике плоскоклеточного рака молочной железы. Клиническое наблюдение

<sup>1</sup>ГБУЗ НО «Нижегородский областной онкологический диспансер», г. Нижний Новгород,

<sup>2</sup>Приволжский исследовательский медицинский университет, г. Нижний Новгород

**Плоскоклеточный рак относится к редкой форме рака молочной железы (РМЖ), составляет не более 2% инвазивного РМЖ, встречается обычно в пожилом возрасте. Эффективность цитологического метода исследования в предоперационной диагностике РМЖ напрямую зависит от пробоподготовки полученного материала. В работе представлены возможности цитологической диагностики при применении современных методов пробоподготовки, таких как жидкостная цитология, клеточные блоки. Особенности цитологической картины в совокупности с клинико-рентгенологическими данными должны стать основой достоверной диагностики плоскоклеточного РМЖ на дооперационном этапе.**

**Ключевые слова:** плоскоклеточный рак молочной железы, клиническое наблюдение, цитологическое исследование

Впервые плоскоклеточный рак (ПР) молочной железы (МЖ) был описан Troell в 1908 г. [1]. Обзор литературы показывает, что распространенность данной патологии из года в год не имеет тенденции к увеличению. В работах 80-90-х гг. выявлено, что частота встречаемости ПР МЖ колебалась между 0,06% и 2% [2, 3, 4]. О частоте встречаемости ПР МЖ в исследованиях первого десятилетия нашего столетия сообщают Aparicio et al. (2008 г.) и Cardoso et al. (2000 г.), что составило 0,19% и 0,1% соответственно [5, 6]. По данным Национального института рака (NCI) было зарегистрировано 168 случаев ПР с 2011 по 2015 гг., что составило 0,1% от общего числа инвазивного РМЖ [7]. В одном из последних исследований (2019 г.) авторы отмечают частоту встречаемости этой патологии 0,126% [8].

Плоскоклеточный рак молочной железы представляет собой опухоль с уникальными биологическими характеристиками [9]. Однако его клинические особенности и рентгенологические проявления не являются специфическими [10].

Существуют разные гипотезы, объясняющие гистогенез ПР МЖ. Он может возникать *de novo* из эпителия молочной железы или при-

сутствовать в виде небольших очагов в ранее существовавшей аденокарциноме или глубокой эпидермальной кисте [11, 12]. В предоперационной диагностике РМЖ одно из ведущих мест занимает цитологический метод, поскольку он отличается малой инвазивностью получения материала, доступностью, наличием специфики цитологических картин разных патологических процессов, обуславливающих достоверность исследования [13, 14].

Цитологические признаки ПР любой локализации специфичны: полиморфизм клеток плоского эпителия, гиперхромия ядер, полигональная цитоплазма, частично с ороговением или в виде узкого ободка. Расположение клеток разрозненное или в виде пластов. Фон препарата, как правило, составляют некротические массы, что может затруднять морфологическую диагностику [14]. В таких случаях традиционное цитологическое исследование значительно уступает дополнительным методам пробоподготовки, таким как жидкостная цитология (ЖЦ), позволяющая произвести очистку материала от диагностически незначимых примесей.

С учетом редкости данной опухоли мы считаем целесообразным поделиться нашим опытом пробоподготовки материала, полученного при тонкоигольной аспирационной биопсии МЖ. В настоящей работе показано значение ЖЦ и клеточного блока в диагностике РМЖ с плоскоклеточной дифференцировкой.

### Клиническое наблюдение

Пациентка Р. (79 лет) обратилась с жалобами на наличие образования в левой молочной железе.

Объективно: опухоль в верхнем наружном квадранте левой молочной железы плотная, смещаемая, диаметром около 3 см, с гиперемией кожи над образованием. Подмышечные, надключичные лимфатические узлы не увеличены.

Данные УЗИ: В левой молочной железе на 3 часах визуализируется неправильной овоидной формы жидкостно-солидное образование до 30x19мм с четкими мелконеровными контурами

с эффектом дистального усиления звука. В режиме ЦДК, ЭДК периферические сигналы в солидном компоненте, подкожная клетчатка, кожа над образованием с признаками отека (Cr? киста с признаками малигнизации? абсцесс?) BI-RADS RT 2/LT 4 (рис. 1).

На маммографии — образование на границе наружных квадрантов участок атипичной перестройкой структуры с лучистым контуром размером около 8,0х6,0х5,0см, в центре которого определяется более плотная округлая тень диаметром около 3,5 см, без включения микрокаль-

цинатов. Справа — без видимой патологии. BI-RADS справа/слева5.

В условиях поликлиники и стационара дважды производилась тонкоигольная аспирационная биопсия (ТИАБ) опухоли с получением крошкообразного содержимого белого цвета — 2 и 3 мл.

Цитологическое исследование от 17.04.2020: в препаратах преобладают некротические массы, среди которых единичные плохо сохранившиеся клетки, морфологически сходные с клетками плоского эпителия.



Рис. 1. Данные УЗИ: Жидкостно-солидное образование неправильной овоидной формы до 30х19мм с четкими мелконеровными контурами с эффектом дистального усиления звука

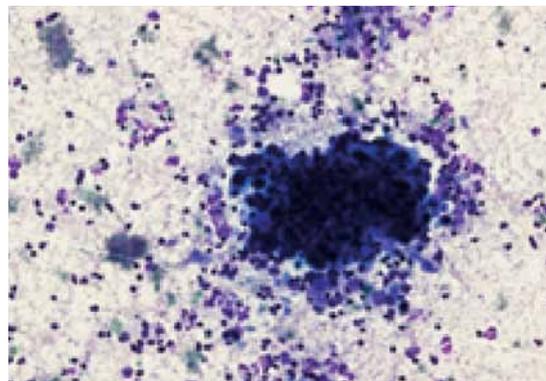


Рис. 2. В препарате комплекс опухолевых клеток плоскоклеточного рака, трудно поддающийся тщательному просмотру. Объектив x20. Окраска экспресс красителем LEUKODIF 200 производства Erba Lachema

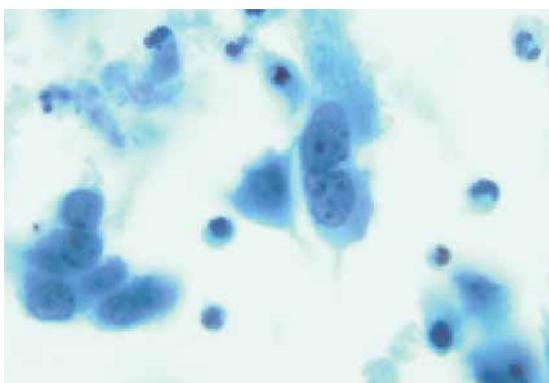


Рис. 3. В препарате группы клеток плоскоклеточного рака. Объектив x 100. Окраска по Папаниколау

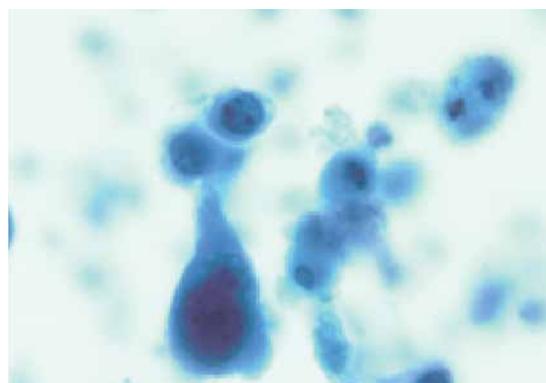


Рис. 4. В препарате группы клеток плоскоклеточного рака. Объектив x 100. Окраска по Папаниколау

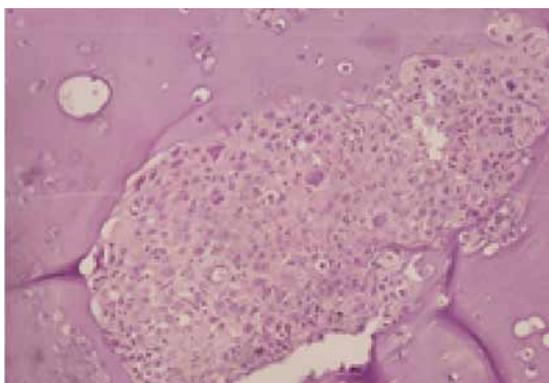


Рис. 5. Плоскоклеточный рак. Материал клеточного блока. Объектив x20. Окраска гематоксилином и эозином

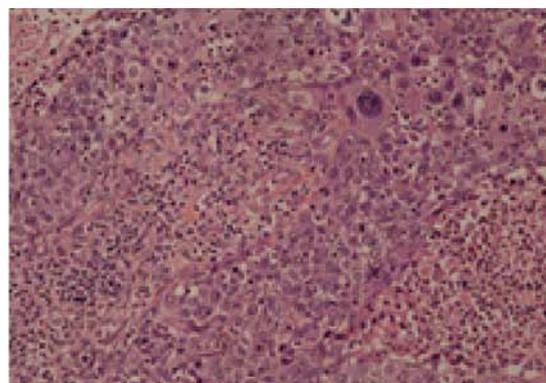


Рис. 6. Гистологическое исследование. Плоскоклеточный рак. Объектив x 20. Окраска гематоксилином и эозином

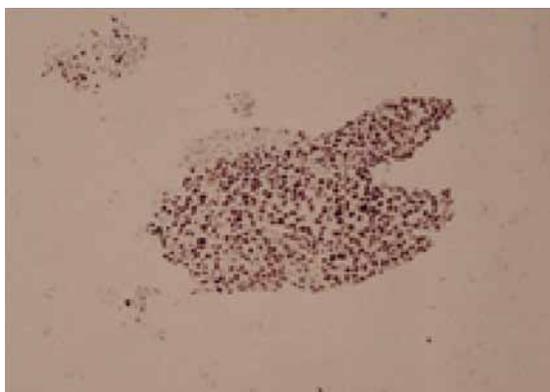


Рис. 7. Иммуноцитохимическое исследование с антителами P63. Материал цито-блока. Объектив x 10

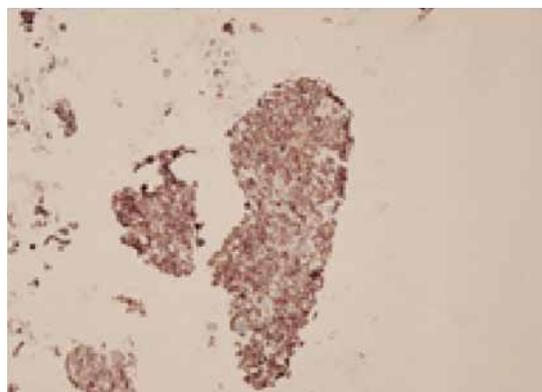


Рис. 8. Иммуноцитохимическое исследование с антителами CK5/6. Материал цито-блока. Объектив x 10

Цитологическое исследование от 07.05.2020: в препаратах преобладают некротические массы, среди которых плотные трудно просматриваемые комплексы опухолевых клеток плоскоклеточного рака (рис. 2).

Учитывая наличие достаточного количества полученного материала, оставшуюся его часть поместили в специальный контейнер (виалу) с жидкой транспортной средой на основе этилового спирта. Дальнейшая обработка материала осуществлялась по технологии BD SurePath™ на оборудовании BD TriPath. Технология официально одобрена FDA в США в 1999 году, имеет запатентованный метод клеточного обогащения. Система позволяет очистить клеточный образец от слизи и детрита с сохранением всех клинически значимых элементов в мазке. После данной пробоподготовки диагностический материал значительно превалировал над элементами некроза, а клеточный состав имел четкие морфологические признаки ПР. Цитологическое исследование от 10.05.2020: в препаратах мелкие комплексы плоскоклеточного рака (рис. 3, 4).

Принимая во внимание очень низкую частоту встречаемости ПР МЖ и наличие достаточного количества опухолевых клеток после очистки материала и его клеточного обогащения, было принято решение о применении техники цито-блока для проведения иммуноцитохимического исследования, с последующей архивацией материала. В материале клеточного блока (рис. 5) картина ПР была схожа с таковой в гистологических препаратах от 19.07.2020 (рис. 6). Подтверждением плоскоклеточной дифференцировки опухолевых клеток явилась положительная реакция с антителами P63, CK5/6 (рис. 7, 8).

Макроскопическое описание очагового образования: На разрезе найдена киста овальной формы 3x5 см., стенки которой шероховатые уплотнены с участками белесоватого цвета, местами кашицеобразной консистенции. Микроскопическое описание: Стенка кисты молочной железы представлена опухолью ацинарно-солид-

ного строения из клеток со светлой цитоплазмой и наличием межклеточных мостиков, с наличием центральных некрозов, напоминающих плоскоклеточный рак с признаками инвазивного роста. По границам резекции — опухолевого роста нет. Результат иммуногистохимического исследования: положительная реакция с антителами P63, CK5/6.

### Выводы

В исследовании представлен редкий клинический случай плоскоклеточного РМЖ, не вызывающий трудности при цитологической диагностике при условии применения современных методов пробоподготовки. Возможность произвести концентрацию клеточного образца с одновременной его очисткой наглядно показывает эффективность цитологического метода исследования.

*Авторы данной статьи подтверждают отсутствие финансовой поддержки/конфликты интересов, о котором необходимо сообщить.*

### ЛИТЕРАТУРА

1. Troell A. Zwei Falle von Plattenepithelcarcinom. Nord Med Arkh. 1908;1:1-11.
2. Wrightson W.R., Edwards M.J., McMasters K.M. Primary squamous cell carcinoma of the breast presenting as a breast abscess. Am Surg. 1999;65:1153-5.
3. Toikkanen S. Primary squamous cell carcinoma of the breast. Cancer. 1981;48:1629-32
4. Wargotz E.S., Norris H.J. Metaplastic carcinomas of the breast. IV. Squamous cell carcinoma of ductal origin. Cancer. 1990;65:272-6.
5. Aparicio I., Martínez A., Hernández G. et al. Squamous cell carcinoma of the breast. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2008;137:222-6.
6. Cardoso F., Leal C., Meira A. et al. Squamous cell carcinoma of the breast. Breast. 2000;9:315-9.
7. National Cancer Institute, Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program, Breast Cancer-Cancer Statistics Review, 2018.

8. Soliman M. Squamous cell carcinoma of the breast: A retrospective study. *J Can Res Ther.* 2019;15:1057-61.
9. Pandey A., Joshi K., Moussouris H., Joseph G. Case Reports on Metaplastic Squamous Cell Carcinoma of the Breast and Treatment Dilemma. *Case Rep Oncol Med.* 2019; 2019:4307281. doi:10.1155/2019/4307281.
10. Hennessy B.T., Krishnamurthy S., Giordano S. et al. Squamous cell carcinoma of the breast. *J Clin Oncol.* 2005;23:7827-35.
11. Ramos V., Fraga J., Simões T., M. Figueiredo Dias. Intracystic primary squamous cell carcinoma of the breast: a challenging diagnosis. *Case Reports in Obstetrics and Gynecology.* 2016: 4.
12. Siegelmann-Danieli N., Murphy T.J., Meschter S. C. et al. Primary pure squamous cell carcinoma of the breast. *Clinical Breast Cancer.* 2005; 6(3):270–272.
13. Волченко Н.Н., Славнова Е.Н., Гладунова З.Д. и др. Современная цитологическая диагностика заболеваний молочной железы. под ред. Н.Н. Волченко, Е.Н. Славновой. М. : Издательство МГТУ им. Н. Э. Баумана, 2014: 198 [Volchenko N.N., Slavnova E.N., Gladunova Z.D. et al. *Sovremennaya citologicheskaya diagnostika zabolevanij molochnoj zhelezy.* pod red. N.N. Volchenko, E.N. Slavnoj. M. : Izdatel'stvo MG TU im. N. E. Baumana, 2014:198 (in Russ.)].
14. Шапиро Н.А. Принципы цитологической диагностики злокачественных опухолей: цветной атлас. М.: Репроцентр М, 2008; 3 [Shapiro N.A. *Principy citologicheskoy diagnostiki zlokachestvennyh opuholej: cvetnoj atlas.* M.: Reprocentr M, 2008; 3 (in Russ.)].

*S.V. Smetanina, E.Yu. Uskova, O.V. Smetanina*

### **Diagnostic parallels in the cytological diagnosis of squamous breast cancer. Clinical case**

<sup>1</sup>Nizhny Novgorod Regional Clinical Oncology Center, Nizhny Novgorod,  
<sup>2</sup>FSBEI HE PRMU MOH Russia, Nizhny Novgorod

**Introduction.** Squamous cell carcinoma is a rare form of breast cancer, makes up no more than 2% of invasive breast cancer, usually found in old age. The effectiveness of the cytological research method in the preoperative diagnosis of breast cancer directly depends on the sample preparation of the obtained material. Description of the clinical case. The possibilities of cytological diagnostics are presented using modern methods of sample preparation such as liquid cytology, cell blocks. **Conclusion.** Features of the cytological picture in combination with clinical and radiological data should become the basis for reliable diagnosis of squamous breast cancer at the preoperative stage.

**Key words:** squamous breast cancer, clinical observation, cytological examination

Поступила в редакцию 21.05.2020 г.

## Б. Экспериментальные исследования

© Коллектив авторов, 2021  
УДК 616-006.6:612.084:612.089-61  
doi: 10.37469/0507-3758-2021-67-1-127-133

Вопросы онкологии, 2021. Том 67, № 1

*А.С. Гончарова<sup>1</sup>, Т.П. Протасова<sup>1</sup>, Е.А. Лукбанова<sup>1</sup>, В.Г. Воловик<sup>1</sup>, М.В. Миндарь<sup>1</sup>,  
Д.В. Ходакова<sup>1</sup>, А.В. Волкова<sup>1</sup>, Е.В. Заикина<sup>1</sup>, С.В. Чапек<sup>2</sup>, Н.С. Карнаухов<sup>1</sup>,  
Д.С. Потемкин<sup>1</sup>, Н.Г. Васильченко<sup>1</sup>, А.Ю. Максимов<sup>1</sup>*

### Разработка метода получения ксеногенной опухолевой модели с использованием пористого металлического скаффолда

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону,

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Донской государственный технический университет» Министерства образования Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону

Цель исследования — разработка метода получения ксеногенной опухолевой модели путем подкожной трансплантации пористого металлического скаффолда, заселенного культуральными клетками карциномы легкого человека.

Материалы и методы. Проведено исследование на 14 бестимусных самцах мышей Balb c/nude в возрасте 8-90 недель, массой 20-24 г. Всем животным подкожно в правую переднебоковую область спины вводили культуральные клетки человеческой карциномы легкого А549. В качестве носителей опухолевых клеток у животных основной группы (гр. 1, n=4) служили скаффолды с диаметром пор 0,5 мм, изготовленные из титан-алюминий-ванадиевого сплава при помощи промышленного 3D-принтера. Скаффолды были засеяны  $3 \times 10^6$  клеток культуры А549 и после инкубации в течение 7 дней имплантированы животным-реципиентам. В качестве сравнения использовали результаты перевивки опухолевой культуры с матригелем (100 мкл) в двух группах животных с разной дозировкой клеточной суспензии: в максимальной для *in vivo* прививочной дозе ( $10 \times 10^6$  клеток на мышь, 2 гр., n=5) и половиной максимальной дозы ( $5 \times 10^6$  соответственно, 3 гр., n=5). Затем в течение 55 суток отслеживали динамику роста опухолей в группах подопытных мышей: объемы ксенографтов рассчитывали по формуле Шрека для эллипсоида. По окончании эксперимента животным была выполнена эктаназия методом цервикальной дислокации.

Результаты. Контроль динамики объемов полученных ксенографтов показал, что наибольшие значения показателя наблюдались у мышей с имплантированными скаффолдами. Самый медленный рост ксенографтов был отмечен у животных, получивших максималь-

ную прививочную дозу опухолевых клеток с матригелем. Результат гистологического исследования показал соответствие опухолевого материала, полученного от всех животных, карциноме легкого А549.

Заключение. Использование металлического пористого скаффолда, предварительно инкубированного с клетками культуры А549 и имплантированного подкожно бестимусным мышам Balb c/nude, позволяет получить хорошо растущие ксенографты, гистологически соответствующие моделируемой опухоли.

Ключевые слова: клеточная культура А549; подкожные ксенографты; бестимусные мыши; опухолевая модель; скаффолды; матригель

#### Введение

Важную роль в экспериментальной онкологии играет выбор адекватной тест-системы, так как от спектра ее свойств и характеристик зависит возможность корректного моделирования изучаемых биологических процессов. В течение долгого времени классическим объектом в таких исследованиях остаются сингенные и ксеногенные модели *in vivo*, создаваемые путем инокуляции или трансплантации опухолевого материала экспериментальным животным. В настоящее время достаточно прочно утвердилось мнение относительно целесообразности проведения доклинических испытаний противоопухолевых средств *in vivo* с применением ортотопических patient derived xenograft — так называемых PDX-моделей [1, 2]. В многочисленных исследованиях показано, что PDX наиболее полно воспроизводят возможные варианты терапевтического ответа, поскольку они сохраняют клеточную гетерогенность, архитектуру и молекулярные характеристики человеческих опухолей

[2, 3]. Тем не менее, наиболее удобным и распространенным способом моделирования опухолевого процесса по-прежнему остается подкожная ксенотрансплантация линий раковых клеток, позволяющая без больших временных затрат получать хорошо описываемую и легко контролируруемую экспериментальную модель [4, 5].

В целях оптимизации процесса приживления культуральных клеток в организме животных-реципиентов применяют носители в виде гидрогелей или трехмерных матриц (скаффолдов) [6]. Такие носители позволяют не только уменьшать расход перевиваемого материала, но и получать ксенографты с фенотипическими характеристиками, соответствующими донорским опухолевым тканям [7]. В ряде работ показано, что применение 3D-каркасов, заселенных злокачественными клетками, приближает исследователей к моделированию не только клеточного фенотипа, но и тканевого, включая сложные опухоле-стромальные взаимодействия, ангиогенез, а также эпителиально-мезенхимальный переход, инвазию и метастазирование [4, 8, 9, 10].

Скаффолды из натурального материала успешно используются в качестве трехмерных матриц для изучения роста опухолевых клеток *in vitro* и моделирования микроокружения опухоли *in vivo* [11]. Однако остаточные антигенные свойства скаффолдов на основе ксеногенного внеклеточного матрикса остается главным препятствием к их широкому использованию [12, 13]. В качестве альтернативы 3D-матрицам естественного происхождения получили распространение биосовместимые неиммуногенные синтетические каркасы [14, 15]. Важными в выборе материала для носителя перевиваемых клеток в исследованиях *in vivo* являются такие характеристики, как хорошая приживляемость, отсутствие токсичности и туморогенности. Скаффолды из титан-алюминий-ванадиевого сплава отвечают вышеупомянутым требованиям [16, 17, 18], а их физические свойства обеспечивают возможность высокотемпературной стерилизации и повторно-го использования.

Целью исследования стала разработка и оценка эффективности метода получения ксеногенной опухолевой модели путем подкожной трансплантации бестимусным мышам пористого металлического скаффолда, заселенного клетками карциномы легкого человека в культуре A549.

### Материалы и методы

Исследование было проведено на 14 самцах бестимусных мышей Balb c/nude (рис. 1а) конвенционального содержания в возрасте 8-9 недель, массой 20-24 г. Все манипуляции с животными выполняли согласно правилам гуманного обращения и этики проведения исследований на позвоноч-

ных [19]. В эксперименте использовали минимальное количество особей, соблюдая правило 3R (replacement, reduction and refinement) [20].

Для получения подкожной опухолевой модели были использованы культуральные клетки карциномы легкого человека A549. Определение жизнеспособности и подсчет опухолевых клеток перед перевивкой осуществляли при помощи автоматического счетчика клеток EVE (Корея) по стандартной методике с трипановым синим.

В основной группе животных (1 гр., n=4) в качестве носителя злокачественных клеток были использованы скаффолды размером 8мм×4 мм×2мм с диаметром пор 5 мм (рис. 2), созданные методом лазерного плавления входящих в состав титана (90%), алюминия (6%) и ванадия (4%) (Ti6Al4V). Развитая шероховатая поверхность пор скаффолда создает условия для закрепления и роста клеточных колоний, а его пористопроницаемая структура обеспечивает проникновение питательных веществ из внешней среды (рис. 3).

Клетки культуральной линии рака легкого A549 засекали в количестве  $3 \times 10^6$  на каждый скаффолд и инкубировали в питательной среде RPMI в течение 7 суток при 37°C, 98% влажности и 5% содержании CO<sub>2</sub>. Затем скаффолды, заселенные клетками, имплантировали животным-реципиентам под кожу правой передне-боковой поверхности тела (рис. 1б). Процедура подкожной имплантации скаффолда была проведена с применением анестезии комплексным анестетиком для животных Золетил 100 в сочетании с премедикацией препаратом ксилазин.

В качестве сравнения использовали результаты перевивки опухолевой культуры A549 с матригелем (100 мкл на животное) в двух группах мышей (2-я и 3-я гр., по n=5 в каждой) с разными дозировками клеточной суспензии. Животным 2-й группы осуществляли подкожную инокуляцию злокачественных клеток в максимальном для перевивки *in vivo* количестве ( $10 \times 10^6$ ) [21, 22], тогда как в 3-й группе для этого использовали 50% от максимальной дозы ( $5 \times 10^6$  клеток на мышью соответственно).

Затем в течение 55 суток отслеживали динамику роста опухолей в группах подопытных животных. Объемы ксенографтов рассчитывали по формуле Шрека для эллипсоида:  $V = a \times b \times c \times \pi / 6$ , где V — объем опухоли (мм<sup>3</sup>), а, b, c — максимальные диаметры эллипсоида в трех плоскостях (мм) [23]. По окончании эксперимента животных подвергли эвтаназии методом дислокации шейных позвонков и выделили опухоли. Фрагменты опухолевых макропрепаратов поместили в 10% формалин на 24 ч, после чего готовили парафиновые блоки. Полученные из них микропрепараты окрашивали гематоксилином-эозином и проводили гистологическое исследование при увеличении  $\times 200$ ,  $\times 400$ .

Статистический анализ результатов исследования выполнили с помощью программы STATISTICA 12.0 (StatSoft Inc., США). Данные представлены в виде выборочного среднего значения, стандартного отклонения.

### Результаты

Контроль динамики объемов полученных ксенографтов на этапах исследования показал различные темпы опухолевого роста у животных изучаемых групп (рис. 4, табл.).

Очевидно, что с 14-х суток после перевивки опухолевого материала и на последующих этапах замеров опухолевых узлов наибольшие значения их объемов наблюдались у мышей с имплантированными скаффолдами (1 гр.). На 48-е сутки эксперимента средний объем опухолей у

животных 3 гр. заметно превысил (почти в 2 раза) значения данного показателя, полученного во 2-й гр., а на 55 сутки со дня перевивки опухолевого материала это соотношение составило уже 2,6 раза. Таким образом, самый медленный рост ксенографтов и наименьшие их объемы на этапах эксперимента (начиная с 41 суток) были отмечены у животных 2 гр., получивших максимальную прививочную дозу опухолевых клеток A549 с матригелем. Среднегрупповые значения объемов опухолей на этапах наблюдения отражены в табл.

Выделенные после эвтаназии подопытных животных макропрепараты опухолей представ-

ляли собой плотные образования с выраженной васкуляризацией, без участков некроза (рис. 5а). В результате проведенного гистологического исследования микропрепараты, полученные из ксенографтов мышей всех трех изучаемых групп, были охарактеризованы как низкодифференцированная немелкоклеточная карцинома солидного строения (рис. 6), что соответствует паспортной характеристике использованной для прививки культуральной клеточной линии карциномы легкого человека A549. Отличительной характеристикой микрокартины опухолей, выросших на скаффолдах, являлась инвазия в жировую ткань.

**Таблица. Среднегрупповые значения объемов опухолей на этапах наблюдения**

Группы животных	Объем опухолей (мм <sup>3</sup> ) на этапах наблюдения (сутки после перевивки)				
	14 сут.	28 сут.	41 сут.	48 сут.	55 сут.
I (n=4)	91±17,35	250±51,32	586±60,25	961±83,16	1233±123,87
II (n=5)	45,88±4,86	44,91±5,11	95,95±16,89	168,43±43,03	237,19±57,91
III (n=5)	45,75±3,98	39,81±7,61	126,5±11,08	333,88±31,82	611,64±79,72



Рис. 1. Мыши линии Balb c/nude, использованные в исследовании: а) интактное животное; б) животное в процессе имплантации скаффолда, заселенного культурой клеток карциномы легкого A549

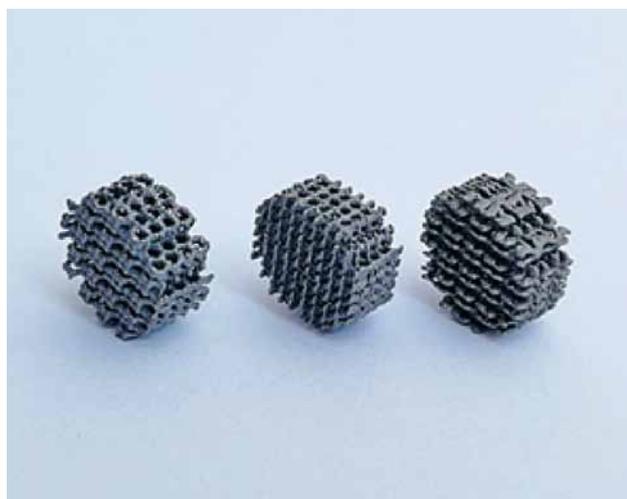


Рис. 2. Скаффолды, полученные методом лазерного плавления титана, алюминия и ванадия (Ti-6Al-4V): а) макроструктура; б) размеры

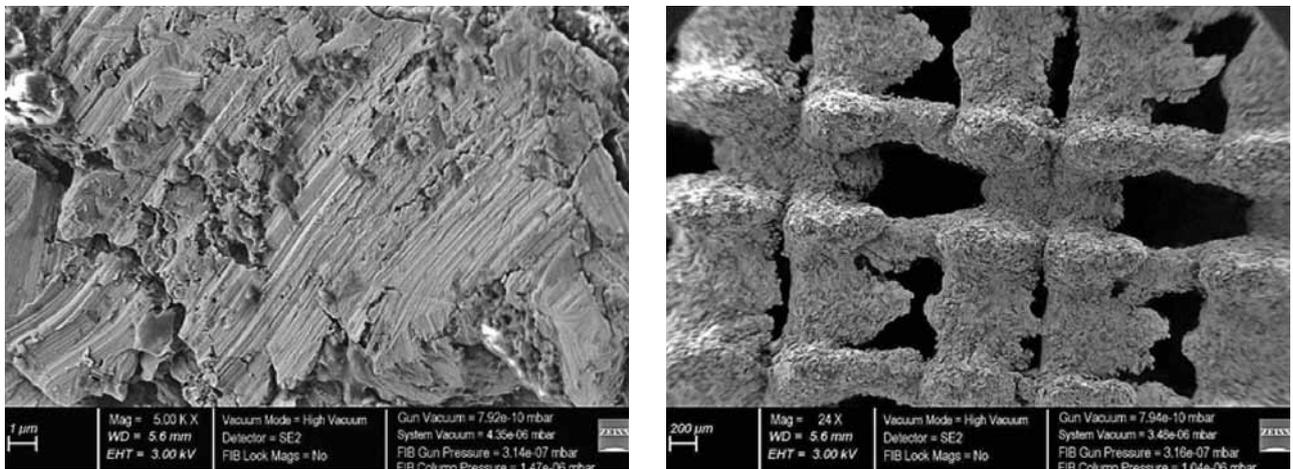


Рис. 3. Микроструктура пористого скаффолда (электронная микроскопия): а)  $\times 10000$ ; б)  $\times 500$

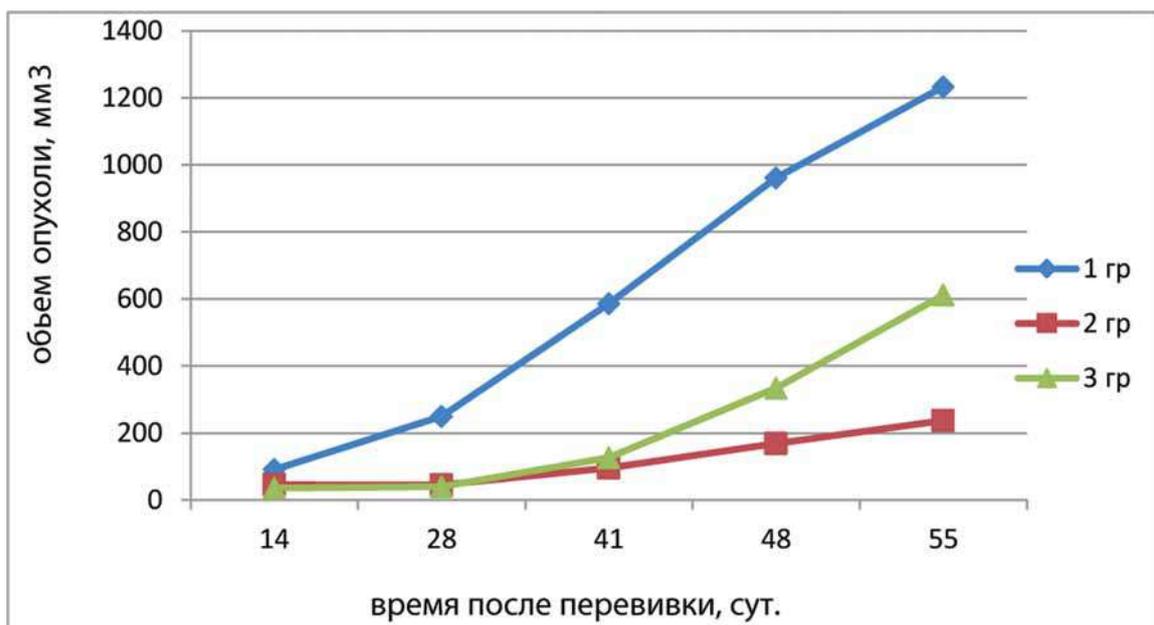


Рис. 4. Динамика роста ксенографтов в изучаемых группах животных (объемы опухолей на этапах эксперимента)



Рис. 5. Подкожный ксенографт рака легкого A549, выросший на титановом скаффолде: а — вид животного основной группы на 55-е сутки после имплантации скаффолда; б — макропрепарат опухоли

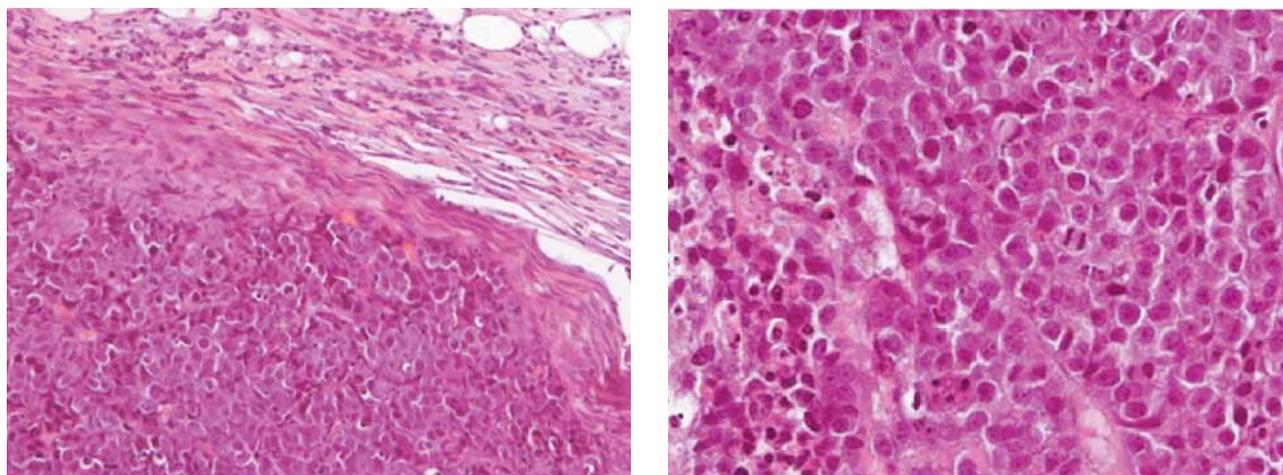


Рис. 6. Микропрепараты подкожных ксенографтов карциномы легкого A549, выросших на скаффолдах (окраска гематоксилином-эозином): а —  $\times 200$ ; б —  $\times 400$

### Обсуждение результатов

Получение животных опухолевых моделей с использованием злокачественных клеток человеческого происхождения является необходимым звеном в обеспечении платформы для экспериментальной онкологии. Разрабатываемые ксеногенные модели *in vivo* должны отвечать задачам конкретного исследования, обеспечивать решение поставленной проблемы. Помимо адекватного моделирования биологии ксеногенной опухоли, важными аспектами являются стабильность и скорость злокачественного роста, включая время выхода опухолевых узлов. Последнее обстоятельство имеет принципиальное значения в планировании сроков эксперимента, что связано с наличием животных необходимого возраста и веса, а также другими экономическими составляющими процесса научного исследования.

Результаты, полученные в ходе нашего исследования, продемонстрировали эффективность перевивки человеческих опухолевых культуральных клеток карциномы легкого на пористом металлическом носителе. Мы полагаем, что предварительная 7-дневная инкубация скаффолда со злокачественными клетками *ex vivo* способствовала сокращению латентного периода выхода опухоли после трансплантации опухолевого материала под кожу животных-доноров. Использование такого подхода к перевивке клеточного материала может позволить быстрее получать опухоли необходимого размера и сокращать сроки проведения исследований.

Помимо значительного уменьшения расхода культуральных злокачественных клеток для эффективной перевивки животным-реципиентам и получения хорошо растущей опухолевой модели, применение металлического пористого скаффолда позволяет обходиться без дорогостоящего, требующего определенных условий использова-

ния матригеля. В свою очередь, механическая прочность и возможность высокотемпературной стерилизации скаффолдов делают возможным их повторное использование, что также способствует снижению расходов на проведение исследований.

Кроме того оказалось, что при подкожной перевивке опухолевых клеток с матригелем в качестве носителя использование их в меньшем от рекомендованной дозы количестве позволяет получить лучший результат. Это выразилось в достижении к 55 дню эксперимента опухолями у животных 3-й группы больших (в 2,5 раза) размеров по сравнению со 2-й группой. Медленный рост ксенографтов во 2 группе животных может быть связан с высокой плотностью злокачественных клеток в ограниченном объеме матригеля [24], следствием которой являлось контактное ингибирование их роста и размножения.

### Заключение

Таким образом, использование металлических пористых скаффолдов, предварительно инкубированных с клетками культуры A549 в исходном количестве  $3 \times 10^6$  и имплантированных подкожно бестимусным мышам Balb c/nude, позволяет получать ксеногенную опухолевую модель, характеризующуюся быстрым экспоненциальным ростом и гистологически подтвержденным соответствием моделируемой опухоли. Применение максимальной прививочной дозы клеток A549 для перевивки с матригелем является нецелесообразным ввиду очевидного отставания роста опухолевых узлов от показателей в группах животных не только с трансплантацией опухолевого материала на скаффолдах, но и с инокуляцией клеток в меньшем на 50% количестве в сочетании с аналогичным носителем.

*Финансирование исследования. Работа выполнена за счет средств ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ. Скаффолды были предоставлены ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет» Министерства образования РФ.*

*Конфликт интересов. Авторы не имеют конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить.*

#### ЛИТЕРАТУРА

- Jung J., Seol H.S., Chang S. The Generation and Application of Patient-Derived Xenograft Model for Cancer Research. *Cancer Res Treat.* 2018;50(1):1-10. doi:10.4143/crt.2017.307.
- Кит О.И., Гончарова А.С., Ткачев С.Ю., Протасова Т.П. Методы моделирования увеальной меланомы. *Вопросы онкологии.* 2019; 65(4): 498-503 [Kit O.I., Goncharova A.S., Tkachev S.Yu., Protasova T.P. Methods of modeling uveal melanoma. *Questions of Oncology.* 2019; 65(4): 498-503 (In Russ.)].
- Spaw M., Anant S., Thomas S.M. Stromal contributions to the carcinogenic process. *Mol Carcinog.* 2017;56(4):1199-1213. doi:10.1002/mc.22583.
- Ravi M., Ramesh A., Pattabhi A. Contributions of 3D Cell Cultures for Cancer Research. *J Cell Physiol.* 2017;232(10):2679-2697. doi:10.1002/jcp.25664.
- Андронов Н.В., Морозова Л.Ф., Сураева Н.М. и др. Способность клеток беспигментной меланомы кожи человека линии mel ibr/braf+ и ее субклона к росту у иммунодефицитных мышей balb/c nude при подкожной имплантации. *Российский биотерапевтический журнал.* 2017; 16(2): 60-65 [Andronova N.V., Morozova L.F., Suraeva N.M. et al. The Ability of human skin cells of the Mel ibr/braf+ line and its subclone to grow in immunodeficient BALB/C nude mice during subcutaneous implantation. *Russian biotherapeutic journal.* 2017; 16(2): 60-65. doi: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-60-65 (In Russ.)].
- Трещалина Е.М. Иммунодефицитные мыши balb/c nude и моделирование различных вариантов опухолевого роста для доклинических исследований. *Российский биотерапевтический журнал.* 2017; 16(2): 6-13 [Treshchalina E.M. Immunodeficiency mice balb/c nude and modeling of various variants of tumor growth for preclinical research. *Russian biotherapeutic journal.* 2017; 16(2): 6-13 (In Russ.)].
- Takai A., Fako V., Dang H. et al. Three-dimensional Organotypic Culture Models of Human Hepatocellular Carcinoma. *Sci Rep.* 2016;6:21174. doi:10.1038/srep21174.
- Fong E.L., Harrington D.A., Farach-Carson M.C., Yu H. Heralding a new paradigm in 3D tumor modeling. *Biomaterials.* 2016;108:197-213. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.08.052.
- Gomez-Roman N., Stevenson K., Gilmour L. et al. A novel 3D human glioblastoma cell culture system for modeling drug and radiation responses. *Neuro Oncol.* 2017;19(2):229-241. doi:10.1093/neuonc/now164.
- Рябая О.О., Прокофьева А.А., Хоченков Д.А. и др. Роль эпителиально-мезенхимального перехода и аутофагии в противоопухолевом ответе клеточных линий меланомы на таргетное ингибирование MEK и mTOR киназ. *Сибирский онкологический журнал.* 2019; 18(3): 54-63. [Ryabaya O.O., Prokofieva A.A., Khochenkov D.A. et al. The Role of epithelial-mesenchymal transition and autophagy in the antitumor response of melanoma cell lines to targeted inhibition of MEK and mTOR kinases. *Siberian cancer journal.* 2019; 18(3): 54-63. doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-3-54-63 (In Russ.)].
- Wang R.M., Johnson T.D., He J. et al. Humanized mouse model for assessing the human immune response to xenogeneic and allogeneic decellularized biomaterials. *Biomaterials.* 2017;129:98-110. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.03.016.
- Lü W.D., Sun R.F., Hu Y.R. et al. Photooxidatively crosslinked acellular tumor extracellular matrices as potential tumor engineering scaffolds. *Acta Biomater.* 2018;71:460-473. doi:10.1016/j.actbio.2018.03.020.
- Dalglish A.J., Parvizi M., Lopera-Higuita M. et al. Graft-specific immune tolerance is determined by residual antigenicity of xenogeneic extracellular matrix scaffolds. *Acta Biomater.* 2018;79:253-264. doi:10.1016/j.actbio.2018.08.016.
- Karuppaiah K., Sinha J. Scaffolds in the management of massive rotator cuff tears: current concepts and literature review. *EFORT Open Rev.* 2019;4(9):557-566. doi:10.1302/2058-5241.4.180040.
- Kuevda E.V., Gubareva E.A., Grigoriev T.E. et al. Application of recellularized non-woven materials from collagen-enriched polylactide for creation of tissue-engineered diaphragm constructs. *Sovremennye tehnologii v medicine. [Modern technologies in medicine].* 2019; 11(2): 35-43. <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.2.05>.
- Решетов И.В., Старцева О.И., Истранов А.Л. и др. Разработка трехмерного биосовместимого матрикса для задач реконструктивной хирургии. *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии.* 2018. (3): 9-23 [Reshetov I.V., Startseva O.I., Istranov A.L. et al. Development of a three-dimensional biocompatible matrix for reconstructive surgery tasks. *Annals of plastic, reconstructive and aesthetic surgery.* 2018. (3): 9-23 (In Russ.)].
- Андронов Н.В., Райхлин Н.Т., Трещалина Е.М. и др. Результаты изучения онкогенных потенциалов медицинских клеточных препаратов на иммунодефицитных мышцах. *Российский биотерапевтический журнал.* 2010; 9(2): 29-33 [Andronova N.V., Raichlin N.T., Treshchalina E.M. et al. Results of studying oncogenic potencies of medical cell preparations on immunodeficient mice. *Russian biotherapeutic journal.* 2010; 9(2): 29-33 (In Russ.)].
- Еманов А.А., Стогов М.В., Кузнецов В.П. и др. Оценка приживаемости и безопасности применения оссеоинтегрированных чрескожных имплантатов из разных сплавов. *Биомедицина.* 2017; (4): 77-82 [Emanov A.A., Stogov M.V., Kuznetsov V.P. et al. Evaluation of survival and safety of osseointegrated percutaneous implants from different alloys. *Biomedicina.* 2017; (4): 77-82 (In Russ.)].
- Большаков О.П. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. ВОЗ, 2000. Рекомендации комитетам по этике, проводящим экспертизу биомедицинских исследований. Качественная клиническая практика. 2002; 9: 1-15 [Bolshakov O.P. Didactic and ethical aspects of research on biomodels and

- laboratory animals. WHO, 2000. Recommendations to ethics committees that review biomedical research. Good clinical practice. 2002; 9: 1–15 (In Russ.)).
20. Workman P, Aboagye E.O., Balkwill F. et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br J Cancer*. 2010;102(11):1555-1577. doi:10.1038/sj.bjc.6605642.
  21. Михайлова Л.М., Меркулова И.Б., Ермакова Н.П. и др. Методические подходы к исследованию опухоленности клеточных линий и биопрепаратов на их основе при доклинической оценке безопасности. *Российский биотерапевтический журнал*. 2010;9(2):13-18 [Mikhailova L.M., Merkulova I.B., Ermakova N.P. et al. Methodological approaches to the study of tumorigenicity of cell lines and biologics based on them in preclinical safety assessment. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal — Russian biotherapeutic journal*. 2010;9(2):13-18 (In Russ.)].
  22. Jiang F, Yu Q., Chu Y. et al. MicroRNA-98-5p inhibits proliferation and metastasis in non-small cell lung cancer by targeting TGFBR1. *Int J Oncol*. 2019;54(1):128-138. doi:10.3892/ijo.2018.4610.
  23. Юркштович Т.Л., Кладиев А.А., Голуб Н.В. и др. Гидрогелевый противоопухолевый препарат. Патент № 2442686. Опубликовано: 20.02.2012. Бюл. № 5. [Yurkshtovich T. L., Kladiev A.A., Golub N.V. et al. Hydrogel antitumor drug. Patent No. 2442686. Published: 20.02.2012. Bull. No. 5 (Russ.)].
  24. Lee G.H., Han S-B., Lee J-H. et al. Cancer Mechanobiology: Microenvironmental Sensing and Metastasis. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, Just Accepted Manuscript. 14 Jan 2019. doi: 10.1021/acsbomaterials.8b01230.

*A.S. Goncharova<sup>1</sup>, T.P. Protasova<sup>1</sup>, E.A. Lukbanova<sup>1</sup>, V.G. Volovik<sup>1</sup>, M.V. Mindar<sup>1</sup>, D.V. Khodakova<sup>1</sup>, A.V. Volkova<sup>1</sup>, E.V. Zaikina<sup>1</sup>, S.V. Chapek<sup>2</sup>, N.S. Karnaukhov<sup>1</sup>, D.S. Potemkin<sup>1</sup>, N.G. Vasilchenko<sup>1</sup>, A.Yu. Maksimov<sup>1</sup>*

### **Development of method for creating tumor xenograft model with porous metal scaffold**

<sup>1</sup>National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don,

<sup>2</sup>Don State Technical University, Rostov-on-Don

Aim of the study — the development of a method for obtaining a tumor xenograft model by a subcutaneous transplantation of a porous metal scaffold populated with cultured human lung carcinoma cells.

Material and methods. The study included 14 athymic male Balb c/nude mice aged 8-90 weeks, weighing 20-24 g. All animals received injections with cultured human A549 lung carcinoma cells subcutaneously into the right anterolateral area of the back. In animals of the main group (gr.1, n=4), scaffolds with a pore diameter of 0.5 mm made of titanium-aluminum-vanadium alloy using an industrial 3D printer served as carriers of tumor cells. Scaffolds were seeded with 3 million A549 culture cells, and were implanted into the recipient animals after the 7-day incubation. Results were compared with the results of the tumor culture transplantation with Matrigel (100 mL) in two groups of animals with varying cell suspension dosages: the maximum vaccination dose for in vivo ( $10 \times 10^6$  cells per mouse, gr.2, n=5) and half the maximum dose ( $5 \times 10^6$  respectively, gr.3, n=5). Then, the dynamics of tumor growth in the groups of experimental mice was monitored for 55 days: xenograft volumes were calculated using the Shrek's formula for an ellipsoid. At the end of the experiment, the animals were euthanized by cervical dislocation.

Results. Monitoring of the dynamics of xenograft volumes demonstrated the maximal values in mice with implanted scaffolds. The slowest xenograft growth was registered in animals with the maximum vaccination dose of tumor cells with Matrigel. Histological study showed that tumor material obtained from all animals corresponded to A549 lung carcinoma.

Conclusions. Porous metal scaffolds, previously incubated with A549 culture cells and implanted subcutaneously in athymic Balb c/nude mice, allows obtaining rapidly growing xenografts with histologically confirmed correspondence to the original tumor.

Key words: A549 cell culture; subcutaneous xenografts; athymic mice; tumor model; scaffolds; Matrigel

*Захаренко А.А., Беляев М.А., Багненко С.Ф., Вerveкин И.А., Юкина Г.Ю.,  
Тамазян Н.В., Новикова А.Д., Палтышев И.А.*

## **Сравнительный анализ регионарных методов химиотерапии на экспериментальной модели крысы с карциноматозом брюшины**

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» МЗ РФ, Санкт-Петербург

Канцероматоз брюшины — вариант имплантационного метастазирования опухолей, прорастающих серозную оболочку органа. На данный момент самым эффективным методом лечения этого заболевания является региональная химиотерапия. Системная химиотерапия при этом имеет недостаточную эффективность. Стандартом лечения карциноматоза брюшины стало проведение циторедуктивных вмешательств с последующей открытой или закрытой внутрибрюшинной химиогипертермической перфузией (НПЕС) или аэрозольной химиотерапией (РПАС).

**Цель исследования:** в эксперименте на животных сравнить эффективность и безопасность методов регионарной химиотерапии НПЕС и РПАС

**Материалы и методы:** проведено исследование на 44 крысах самках Wistar. Для моделирования канцероматоза использован штамм асцитной опухоли яичника (ОЯ) из НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова. Анализировались критерии безопасности и эффективности. Безопасность методики оценивалась клинически и на основании лабораторных исследований крови; Эффективность — на основании данных масспектрометрии, патоморфологических данных и продолжительности жизни животных.

**Результаты:** проведенные методики НПЕС (открытая, закрытая) и РПАС показали свою безопасность в эксперименте на лабораторных животных. Наибольшей эффективностью обладает методика закрытой НПЕС. При анализе частоты послеоперационных осложнений продемонстрирована большая агрессивность открытой и закрытой методик по сравнению с более «щадящим» методом РПАС.

**Выводы:** эксперимент показал сравнимую безопасность всех проведенных животных. В силу особенностей проведения техники, метод РПАС можно использовать как вариант многоэтапного лечения в случаях, когда провести ЦРХ и НПЕС не представляется возможным из-за высокого индекса перитонеального кан-

цероматоза, так и в качестве неоадьювантного лечения с целью профилактики перитонеального канцероматоза. В любом случае перспективы применения этого метода требуют дальнейших исследований.

**Ключевые слова:** РПАС, НПЕС, перитонеальный канцероматоз, регионарная химиотерапия, аэрозольная химиотерапия

### **Введение**

Канцероматоз брюшины (КБ) — вариант прогрессирования большинства злокачественных опухолей желудочно-кишечного тракта. Несмотря на то, что системная химиотерапия КБ за последние годы значительно эволюционировала, ее эффективность остается достаточно низкой. Хирургическое лечение КБ является малоэффективным, поскольку во время оперативного вмешательства происходит диссеминация и реимплантация опухолевых клеток, выделяются факторы роста опухоли.

В настоящее время представляется эффективным комбинированный метод лечения КБ, представляющий выполнение циторедуктивной операции (ЦРХ) и региональной химиоперфузии. Цитостатик, введенный внутрибрюшинно, воздействует непосредственно на опухолевые клетки, а гематоперитонеальный барьер ограничивает резорбцию препарата в системный кровоток, что увеличивает эффективность, с одной стороны, с другой — снижает системную токсичность. На данный момент активно применяются следующие методы регионарной химиотерапии: внутрибрюшинная химиотерапия, НПЕС (внутрибрюшинная химиогипертермическая перфузия) и РПАС (внутрибрюшинная аэрозольная химиотерапия под давлением).

НПЕС является стандартом для профилактики КБ у пациентов с высоким риском развития КБ, так же для лечения пациентов с уже развившимся КБ в сочетании с циторедуктивной хирургией (ЦРХ) [2]. ЦРХ и НПЕС — единственные методы лечения, которые могут обеспечить долгосрочную выживаемость для пациентов. Мультицентровое исследование, включавшее 159

пациентов, получавших лечение ЦРХ и НИРЕС, показало, что выживаемость в течение 1, 2 и 5 лет составляет 43%, 18% и 13% соответственно [3, 4]. При этом проведение НИРЕС совместно с ЦРХ обладает большей эффективностью. Рандомизированное контролируемое исследование из Китая, сравнивающее ЦРХ + НИРЕС с одной только ЦРХ, показало, что 3-летняя выживаемость при выполнении ЦРХ + НИРЕС составила 5,9% по сравнению с 0% в случае проведения только ЦРХ. ЦРХ + НИРЕС обеспечивала более высокую медиану выживаемостью по сравнению с только ЦРХ (11 месяцев против 6,5 мес.,  $p = 0,04$ ) [3]. Эффективность профилактического НИРЕС подтверждается данными Yonemura et al., согласно которым у 80% пациентов Су + / Р0 развивается КБ в ближайшие несколько лет после проведения гастрэктомии, по сравнению с 45% пациентов с отрицательными смывами (Су- / Р0) [5]. Koga et al. в 1988 г. впервые сообщили об увеличении эффективности радикального хирургического лечения рака желудка с использованием адьювантного НИРЕС (3-летняя выживаемость 74% с НИРЕС и 53% без НИРЕС,  $p < 0,04$ ). Частота рецидивирования КБ также была снижена [6]. Ряд рандомизированных контролируемых исследований, проведенных в Китае и Японии, доказывает эффективность адьювантного НИРЕС в снижении частоты рецидива КБ и улучшении выживаемости [7 — 12].

Методика аэрозольной внутрибрюшной химиотерапии (PIPAC) позволяет при меньших дозах химиопрепарата и возможностях к повторным процедурам уменьшить диссеминацию перитонеальных очагов, что в дальнейшем может позволить провести циторедуктивную операцию в объеме R0 и НИРЕС. Кроме того, PIPAC обладает и другими положительными качествами, такими как: отсутствие спаечного процесса, меньшее время процедуры, низкая системная токсичность вследствие менее выраженной резорбции цитостатика. В рамках одного из крупных исследований, посвященных PIPAC, выполненного R. Girshally et al. [1]. Проведено 900 сеансов PIPAC 406 пациентам, которым было невозможно выполнить ЦРХ и НИРЕС. По результатам этой работы было сделано несколько достаточно интересных выводов: PIPAC применим в тех случаях, когда ЦРХ и НИРЕС невозможны; регрессирование пе-

ритонеального канцероматоза на фоне повторных сеансов PIPAC, с возможностью дальнейшего выполнения НИРЕС; отсутствие достоверного различия в общей выживаемости среди больных с первично выполненной НИРЕС, и больных которым НИРЕС выполнялось вторично после PIPAC. Авторы сделали вывод, о том, что PIPAC может использоваться как неоадьювантная терапия в лечении КБ с последующим снижением индекса перитонеального канцероматоза и возможностью выполнения ЦРХ и НИРЕС.

Самостоятельное и комбинированное применение каждого из методов и их режимов остается важным и интересным вопросом для дискуссии. В проведенном анализе литературы есть единичные исследования, посвященные сравнению методов НИРЕС, как например, коллектива авторов Г.С. Киреевой, О.А. Беляевой, К.Ю. Сенчик и др., сравнивавших нормотермическую и гипертермическую перфузию [13]. Работы по сравнению эффективности методов НИРЕС и PIPAC до настоящего времени отсутствуют.

Цель исследования: сравнить эффективность и безопасность методик PIPAC и НИРЕС (открытой и закрытой методик) на экспериментальной модели канцероматоза брюшины лабораторного животного.

## Материалы и методы

Исследование проведено в ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова на базе vivария научно-исследовательского центра Университета с соблюдением Европейской конвенции по защите позвоночных животных. Исследование проводилось на 44 крысах самках Wistar в возрасте 3 мес. и массой тела 300±50г. Для моделирования канцероматоза использован штамм асцитной опухоли яичника (ОЯ) из НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова. Предварительно осуществляли пассаж опухолевых клеток крысам, на 7 день после пассажа от одной крысы забирали асцит и перевивали здоровым крысам внутрибрюшинно. Для развития КБ необходимо было перевить  $1 \times 10^7$  опухолевых клеток. Поскольку образцы асцитической жидкости от разных крыс, различались по клеточности — при каждой перевивке производили подсчет необходимого объема асцита, содержащий  $1 \times 10^7$  опухолевых клеток. Подсчет клеток проводили в камере Горяева, аналогично методике подсчета лейкоцитов. Считается, что перитонеальный канцероматоз развивается на 7 сутки от момента перевивки, поэтому по истечении этого срока крысам проводили внутрибрюшинную химиотерапию, предварительно осуществив цитологическое исследование асцитной жидкости с целью подтверждения ее злокачественной природы.

Таблица 1. Распределение крыс по группам

	Контроль (n = 7)	Закрытая НИРЕС (n = 12)	Открытая НИРЕС (n = 14)	PIPAC (n = 11)
Время процедуры (мин.)	-	45	45	2 (распыление) + 30 (экспозиция)
Доза Цисплатина (мг/кг)	-	20	20	20
Температура раствора (°C)	-	42	42	21
Давление карбоксиперитонеума (мм вод. ст.)	-	-	-	8

Животные были рандомизированы методом случайных чисел на 4 группы: группа активного наблюдения и три группы сравнения: открытая HIPEC, закрытая HIPEC и PIPAC (табл. 1).

Доза цитостатика для каждой группы составляла 20 мг/кг. Проведение процедуры сопровождалось мониторингом показателей: температура перфузата в термостате, температура в брюшной полости, ЧД, ЧСС, давление карбоксиперитонеума (для PIPAC). Для проведения химиоперфузии использовался препарат Цисплатин (Фармахеми (Нидерланды)).

День перевивки ОЯ был принят за нулевой, на 7 день проводили сеансы химиоперфузии. Оценивали выживаемость, степень опухолевого регресса (цитологическое и гистологическое исследования до и после процедуры), равномерность распределения цитостатика по брюшине (масс-спектрометрия послеоперационных биоптатов брюшины), равномерность поддержания целевой температуры. В качестве критериев безопасности сравнивались показатели системной токсичности (биопсия печени, почек, клинический анализ крови), сравнение системной резорбции (клинический анализ крови), показатели витальных функций. Время наблюдения за животными составляло 30 дней (рис. 1). Наркотизация осуществлялась стандартно для всех методик: в качестве анальгетика вводился кетопрофен п/к в дозе 5 мг/кг. Через 10 минут крысу вводили в наркоз в/б инъекцией золептила в дозе 50 мг/кг, ксилазина 5 мг/кг. Осуществляли фиксацию животного на подложке.

*Методика выполнения закрытой химиогипертермической перфузии*

Формировалось два разреза передней брюшной стенки. В область правого подреберья устанавливался катетер для притока перфузата и цифровой термометр, в левой подвздошной — катетер для оттока перфузата. Раствором цитостатика заполнялся резервуар термостата, далее подключались магистрали перфузионной системы и заполнялись цитостатиком после достижения им температуры 41° С, затем магистрали соединялись с катетерами для притока и оттока — таким образом формировался замкнутый контур, по которому раствор цитостатика поступал из резервуара термостата в брюшную полость по магистрали притока и возвращался обратно по магистрали оттока, совершая полный круг. Длительность перфузии составляла 45 минут. Перед проведением методики брюшная полость ушивалась наглухо (рис. 2а).

По окончании химиоперфузии снимали швы, освобождали брюшную полость от раствора цитостатика и магистралей. Производили биопсию брюшины для масс-спектрометрического исследования, внутрибрюшинно вводили цефтриаксон в дозировке 100мг/кг, брюшную стенку в местах разрезов ушивали узловыми швами, рана обрабатывалась растворами антисептиков.

*Методика выполнения открытой химиогипертермической перфузии*

Выполнялась срединная лапаротомия, длина разреза — 3-4 см. В лапаротомную рану устанавливался цилиндрический ранорасширитель, герметично подшиваемый к краям лапаротомной раны. Дренажи для притока и оттока раствора цитостатика опускались в пространство, ограниченное ранорасширителем. Подготовка к химиоперфузии и ее проведение осуществлялись по описанной выше методике (рис. 2б).

*Методика выполнения внутрибрюшинной аэрозольной химиотерапии под давлением*

В брюшную полость устанавливался один 10-ти мм троакар в эпигастральную область и один 5-ти мм троакар в левую подвздошную область. Нагнетался карбоксиперитонеум 7 — 8 мм рт. ст. Троакар в левой подвздошной области использовался для контроля и снижения давления карбоксиперитонеума. В первый троакар помещался распылитель, соединённый с помощью системы магистралей высокого давления с инжектором (20 бар), в него устанавли-

вали помпу с цисплатином в дозировке 20 мг/кг. В течение 1 минуты работы инжектора под высоким давлением создавался аэрозоль, который равномерно распределялся по брюшной полости животного путем манипулирования направлением струи распылителя. После 30-ти минутной экспозиции остатки газовой смеси и жидкий цитостатик эвакуировали из брюшной полости. Последующие действия аналогичны вышеописанным (рис. 2в).

*Статистический анализ*

Полученные результаты подвергали статистическому анализу на персональном компьютере с использованием программы Microsoft Excel. Построение кривых выживаемости проводили по методу Каплана-Мейера, анализ кривых выживаемости — по тесту Мантела-Кокса (Log-rank test). Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ . Результаты анализа крови животных статистически обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты

*Макроскопическая характеристика опухоли*

Перевиваемость составила 100%. Опухоль быстро прогрессировала, приводя к образованию геморагического асцита на 7-ой день и гибели крыс к 11-20 дню от момента перевивки (рис. 3). На аутопсии регистрировался опухолевый асцит объемом 15-25 мл, опухолевые узлы размером 1-3 мм на брыжейке, париетальной брюшине и большом сальнике.

*Микроскопическая характеристика опухоли*

Цитологически асцитная жидкость состояла из крупных, округлых, гиперхромных с резко базофильной цитоплазмой и оптически плотным ядром, и большим количеством вакуолей опухолевых клеток, заполнявших все поля зрения, между которыми находилось множество эритроцитов. Опухолевые клетки образовывали конгломераты, что является характерным признаком для аденокарциномы (рис. 4). При гистологическом исследовании биоптатов брюшины выявлены имплантированные в сальник опухолевые клетки, имеющие солидный тип роста и образующие экзофитные узлы, покрытые соединительнотканной капсулой. В опухолевых узлах клетки расположены группами, окружены тонкими соединительнотканными прослойками (рис. 5). Опухолевые клетки имеют округлую и овальную форму с центрально или эксцентрично расположенным крупным гиперхромным ядром. Цитоплазма клеток вакуолизирована вплоть до образования перстневидных клеток.

*Структура и частота послеоперационных осложнений*

Ранней послеоперационной гибели животных (до 3 дней) отмечено не было. Осложнения различных видов региональной химиоперфузии представлены в табл. 2. Все животные погибли от прогрессирования основного заболевания, но на более ранних сроках, чем животные без осложнений лечения.

Таблица 2. Осложнения различных видов региональной химиоперфузии

Группа	Перитонит	Спайки	Некроз брыжейки	Кровоизлияние в брюшную полость	Кол-во крыс с осложнениями, (%)
HIPEC закрытая	0	2	0	1	3 (25%)
HIPEC открытая	2	1	1	1	5 (35,7%)
PIPAC	0	0	0	1	(9%)

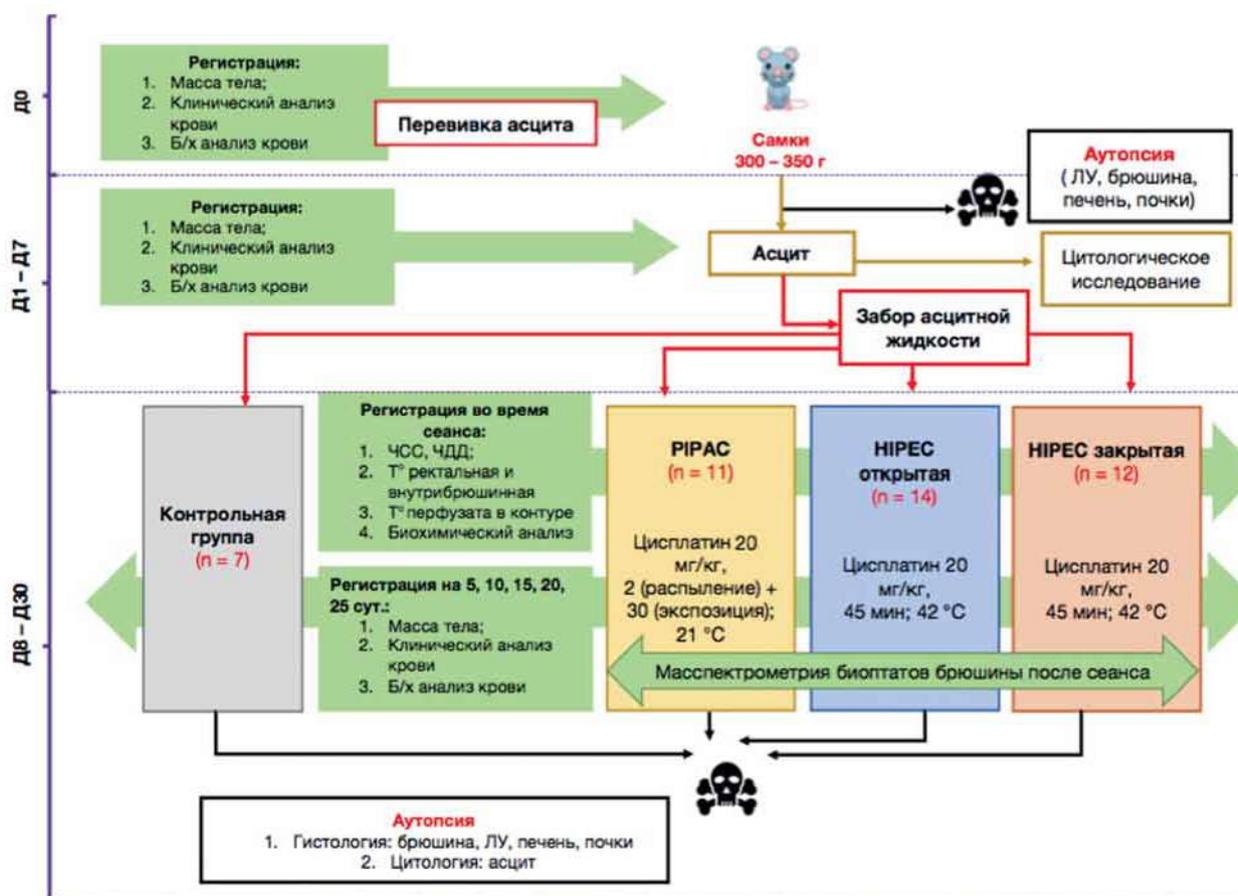


Рис. 1. Дизайн исследования

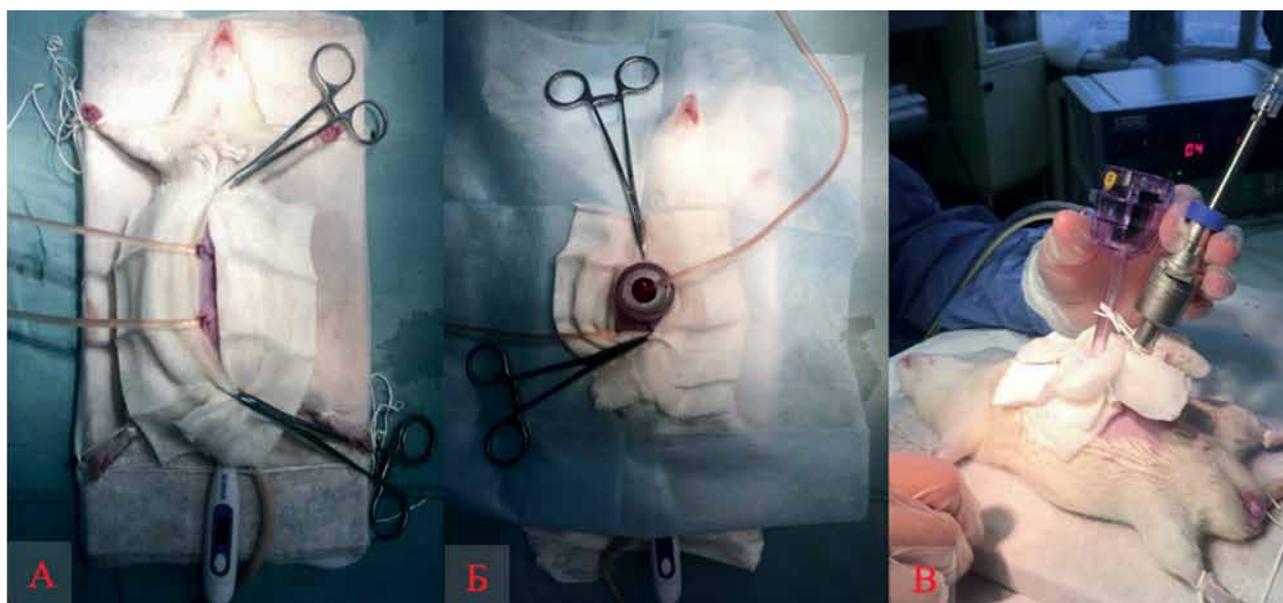


Рис. 2а. Методика проведения открытой HIPEC. Рис. 2б. Методика проведения закрытой HIPEC. Рис. 2 в. Методика проведения PIPAC

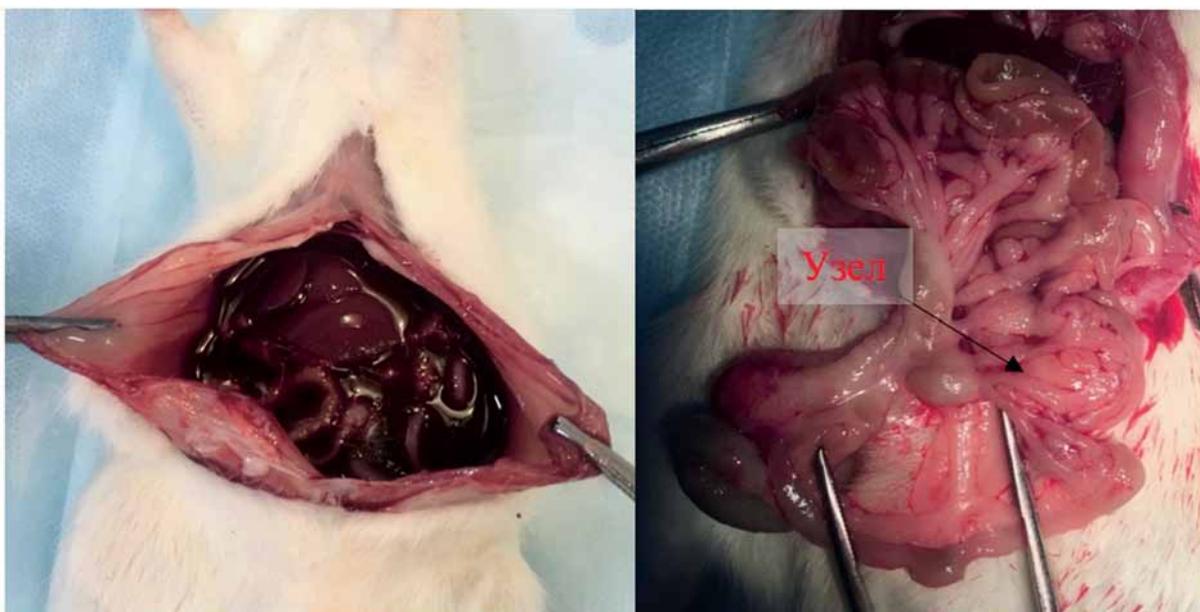


Рис. 3. Макроскопический вид опухоли

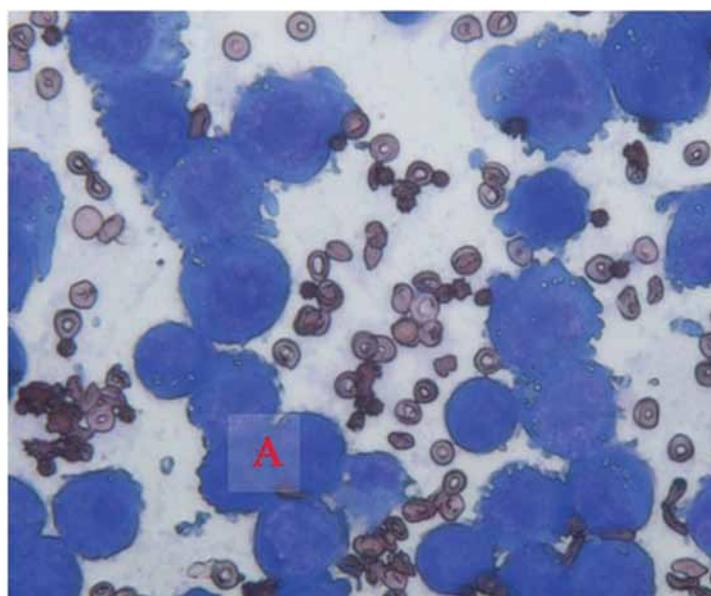


Рис. 4. Микроскопический вид опухоли (А — конгломерат опухолевых клеток)

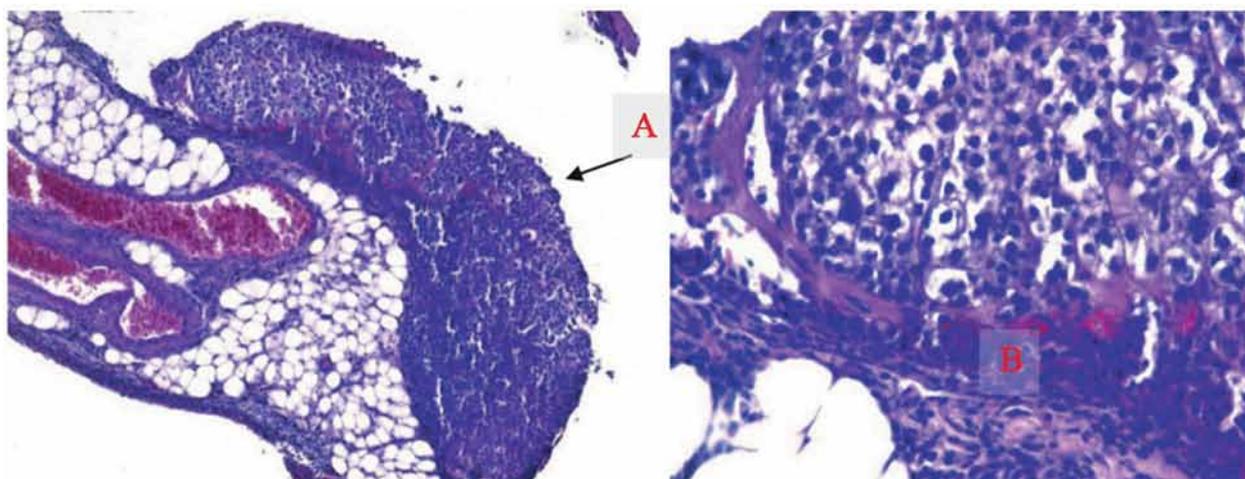


Рис. 5. Микроскопический вид опухоли (А — экзофитный узел; Б — соединительнотканная прослойка)

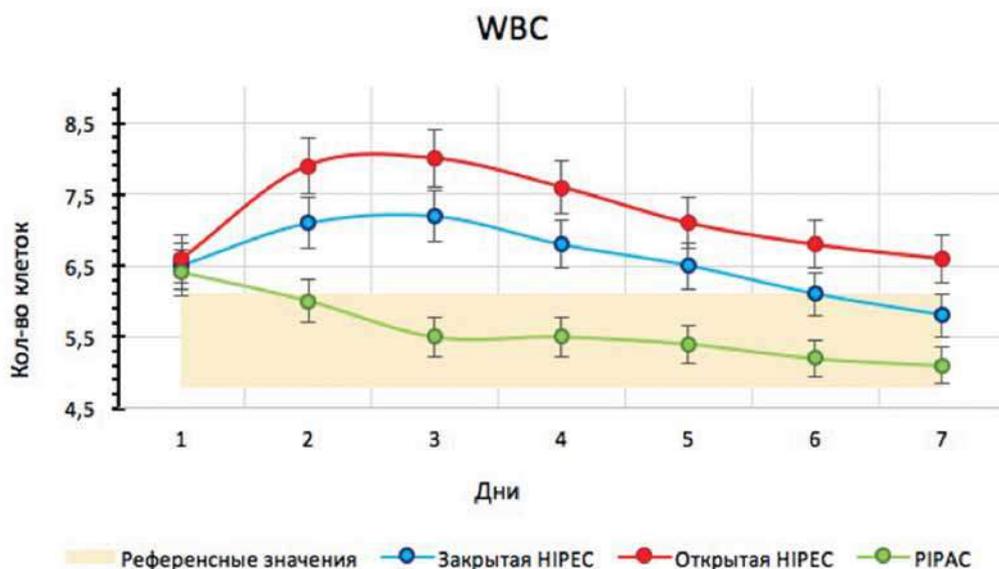


Рис. 6. Динамика уровня лейкоцитов в послеоперационном периоде

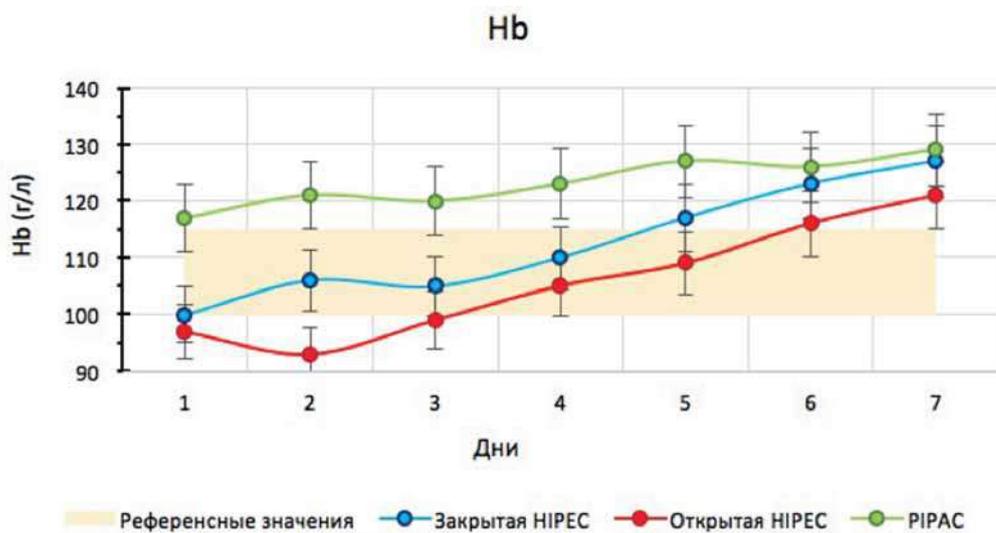


Рис. 7. Динамика уровня гемоглобина в послеоперационном периоде

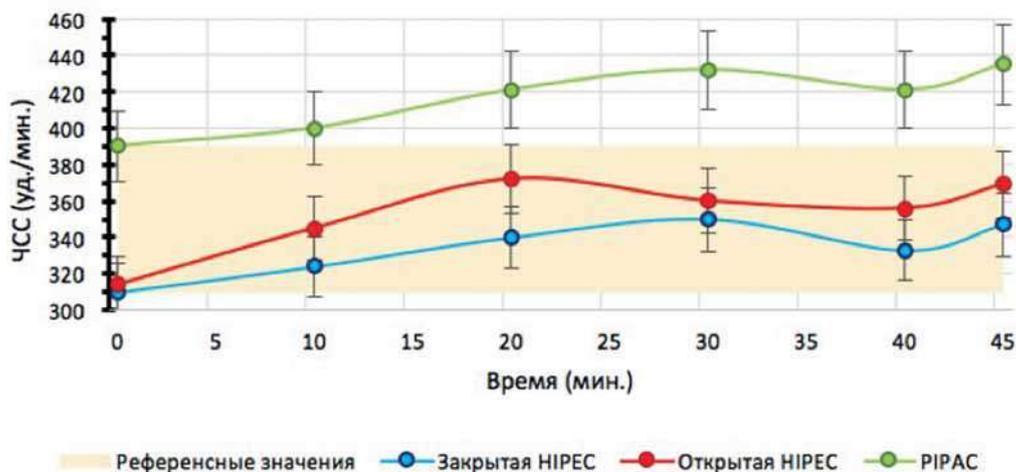


Рис. 8. Динамика изменения ЧСС во время процедуры

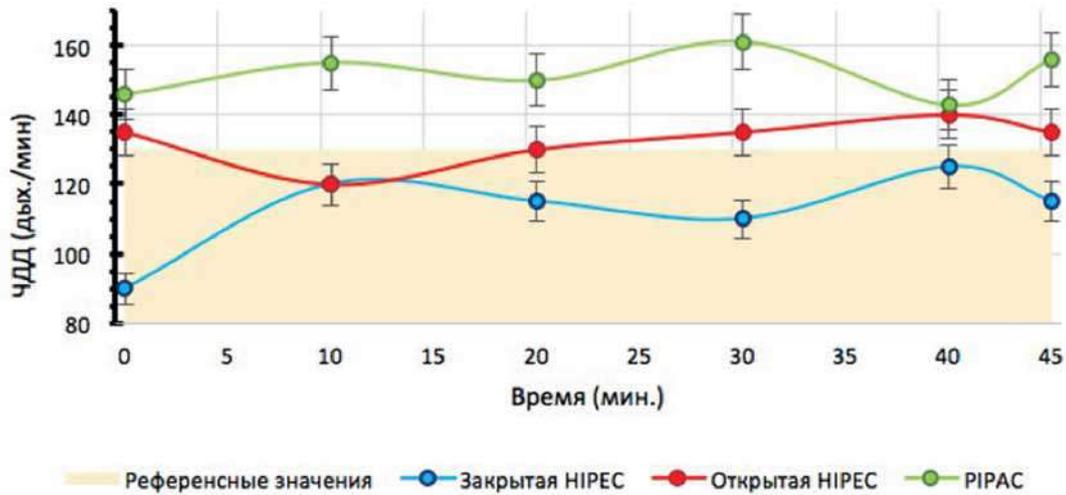


Рис. 9. Динамика изменения ЧДД во время процедуры

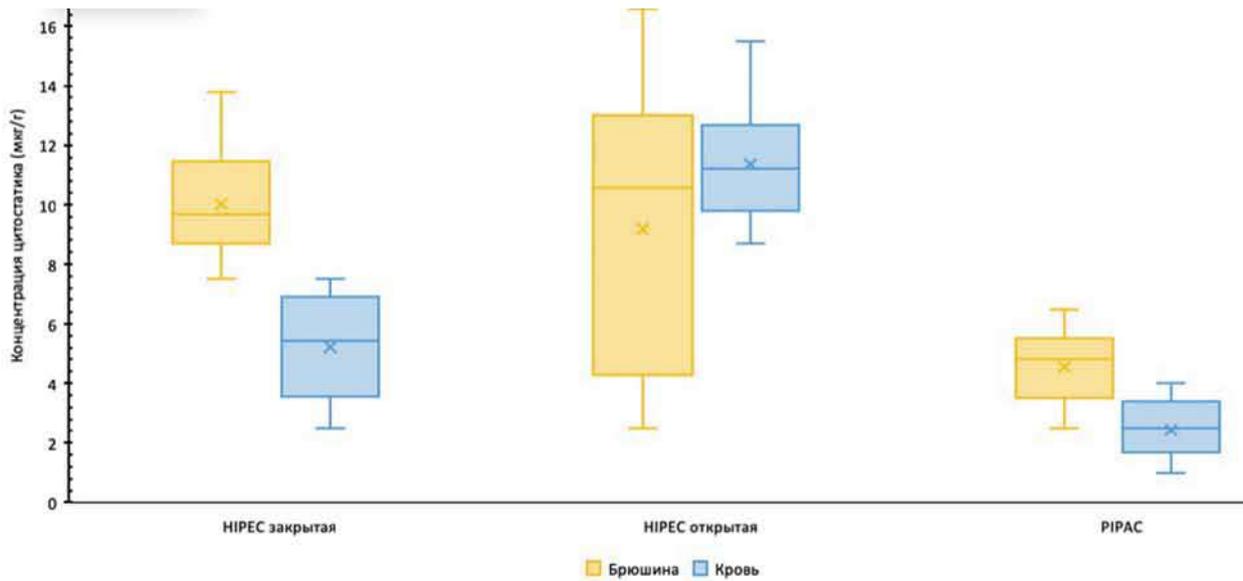


Рис. 10. Концентрация цитостатика в брюшине и в крови

*Результаты лабораторный анализов в послеоперационный период*

В течение послеоперационного периода (в первые 7 дней) проводилась ежедневная оценка уровня лейкоцитов в крови и Hb. Воспалительный ответ протекал достоверно активнее и дольше при использовании более инвазивных и травматических методик (открытой и закрытой HIPEC, по сравнению с RIRAS ( $p = 0,012$ )), что подтверждено графиком. Необходимо отметить, что только использование RIRAS достоверно не сопровождалось повышением числа лейкоцитов крови ( $p = 0,034$ ). Кроме того, и степень кровопотери, а как следствие и Hb, был ниже у особей, получавших более агрессивное лечение (HIPEC) по сравнению с RIRAS ( $p = 0,041$ ), при котором значения Hb в течение всего послеоперационного периода находились в пределах референсных значений (рис. 6, 7).

*Интраоперационное мониторингирование*

Во время каждой процедуры обязательно проводилось мониторингирование витальных функций, для оценки влияния особенностей каждого вида процедуры на дыхательную и сердечно-сосудистую систему. Так, по его результатам при использовании методики RIRAS ЧСС была достоверно выше по сравнению с открытой и закрытой HIPEC ( $p=0,023$ ;  $p=0,019$ ), ЧД была так же достоверно выше ( $p=0,032$ ;  $p=0,014$ ) (рис. 8, 9).

*Оценка равномерности распределения цитостатика и его изолированного накопления в брюшине*

По результатам поведения масс-спектрометрии послеоперационных биоптатов брюшины, взятых из 2 случайных точек брюшины и образцов крови, можно говорить о том, что Max значения концентрации ци-

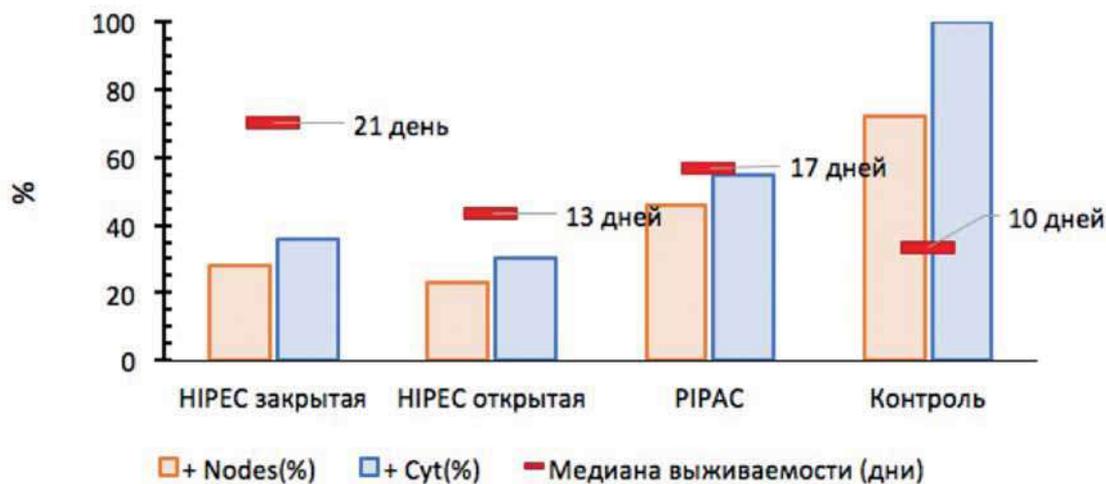


Рис. 11. Степень патоморфологического регресса опухоли

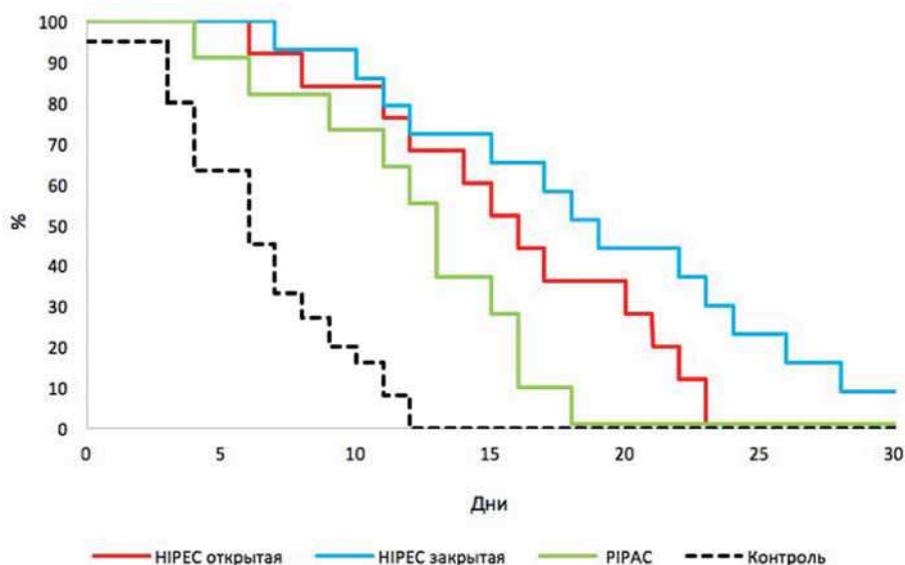


Рис. 12. Кривая выживаемости крыс

тостатика в брюшине были достигнуты при использовании открытой HIPEC (16,4 мкг/г), однако также достигнуто и Min среди всех исследуемых образцов (2,5 мкг/г), при среднем значении в  $9,1 \pm 0,3$  мкг/г, что оказалось ниже средней концентрации для закрытой HIPEC ( $10,1 \pm 0,2$  мкг/г), при которой диапазон колебаний между max и min значениями вариант выборки был значительно меньше (13,8 и 7,5 мкг/г соответственно). Самая меньшая концентрация цитостатика была достигнута при использовании PIPAC (среднее значение —  $4,5 \pm 0,1$  мкг/г). Кроме того, анализировалось системное накопление цитостатика в кровеносном русле. Наибольшее его накопление выявлено при использовании открытой HIPEC, в гораздо меньшей степени было выражено при закрытой HIPEC и PIPAC (средние значения —  $11,3 \pm 0,3$ ;  $5,2 \pm 0,1$  и  $2,4 \pm 0,2$  мкг/г

соответственно). Кроме того, обращает на себя внимание большее накопление цитостатика в крови по сравнению с брюшиной при использовании открытой HIPEC (11,3 и 9,1 мкг/г), при вдвое меньшем накоплении в случае закрытой HIPEC и PIPAC ( $5,2 \pm 0,1$  и  $10,1 \pm 0,2$  мкг/г;  $2,4 \pm 0,2$  и  $4,5 \pm 0,1$  мкг/г) (рис. 10).

*Оценка степени патоморфологического регресса опухоли*

По результатам аутопсии гистологически и цитологически максимальный опухолевый регресс был достигнут при использовании открытой HIPEC: опухолевые узлы сохранялись у 23%, что было достоверно ниже, чем у группы закрытой HIPEC (28%,  $p=0,034$ ) и PIPAC (46%,  $p=0,021$ ); асцит сохранялся у 20%, что так же было достоверно ниже, чем при использовании закрытой HIPEC (36%,  $p=0,019$ ) и PIPAC (55%,  $p=0,011$ ) (рис. 11).

*Выживаемость крыс после лечения различными методиками*

Выживаемость оценивалась в течение 30 дней, после этого животные выводились из эксперимента. При использовании закрытой НИРЕС выживаемость составляла 21 день, и была достоверно выше выживаемости при открытой НИРЕС (13 дней,  $p=0,032$ ) и РІРАС (17 дней,  $p=0,037$ ) (рис. 12).

### Выводы

1. Противоопухолевые лечебные и токсические эффекты цисплатина зависят от вида используемого лечения, что определяется эффективностью проникновения препарата в ткань брюшины, его избирательным накоплением и количеством препарата, преодолевшим гематоперитонеальный барьер, кроме того, на результаты лечения оказывает влияние и вид хирургического доступа для последующей перфузии.

2. Более равномерное распределение цитостатика по брюшной полости по результатам масс-спектрометрии было достигнуто при использовании закрытой НИРЕС. Кроме того, методика позволяет изолированно создавать высокую концентрацию препарата в тканях брюшины без значительного системного накопления. Это также подтверждается результатами выживаемости животных, оценкой патоморфологического регресса опухоли и меньшим числом послеоперационных осложнений, результатами лабораторных исследований.

3. Большую эффективность показала методика закрытой НИРЕС. В отношении безопасности обе методики НИРЕС, как закрытая, так и открытая, оказались «агрессивными», что проявлялось в развитии более высокого лейкоцитоза и анемии в послеоперационном периоде, большей частотой послеоперационных осложнений по сравнению с методикой РІРАС. РІРАС оказался незначительно менее эффективным, однако более «щадящим» методом перфузии, что позволяет предположить возможность его неоднократного применения, в чередовании с циклами системной химиотерапии.

4. В силу своих особенностей, метод РІРАС можно использовать как вариант многоэтапного лечения в случаях, когда провести ЦРХ и НИРЕС не представляется возможным из-за высокого индекса перитонеального канцероматоза с целью снижения площади пораженной поверхности, с последующим применением ЦРХ и НИРЕС, так и в качестве неoadъювантного лечения при Т4 опухолях с целью профилактики перитонеального канцероматоза. В любом случае перспективы применения этого метода требуют дальнейших исследований.

*Конфликт интересов между авторами отсутствует. Работа выполнена в рамках темы государственного задания, № госрегистрации АААА-А18-118112890037-9.*

### ЛИТЕРАТУРА

1. Sadeghi B., Arvieux C., Glehen O. et al. Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies results of the EVO-CAPE 1 multicentric prospective study. *Cancer*. 2000;88:358-363. doi: 10.1002/(sici)1097-0142(2000115)88:2.
2. Seshadri R.A., Glehen O. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2016;22:1114-1130. doi: 10.3748/wjg.v22.i3.1114.
3. Yang X.J., Huang C.Q., Suo T. et al. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy improves survival of patients with peritoneal metastasis from gastric cancer: final results of a phase III randomized clinical trial. *Ann Surg Oncol*. 2011;18:1575-1581. doi: 10.1007/s13277-012-0571-4.
4. Yonemura Y., Elnemr A., Endou Y. et al. Multidisciplinary therapy for treatment of patients with peritoneal carcinomatosis from gastric cancer. *World J Gastrointest Oncol*. 2010; 2 :85-97. doi: 10.4251/wjgo.v2.i2.85.
5. Koga S., Hamazoe R., Maeta M. et al. Prophylactic cancer therapy for peritoneal recurrence of gastric by continuous hyperthermic peritoneal perfusion with mitomycin C. *Cancer*. 1988;61:232-237. doi: 10.1002/1097-0142(19880115)61:2.
6. Hamazoe R., Maeta M., Kaibara N. Intraperitoneal thermotherapy for prevention of peritoneal recurrence of gastric cancer — final results of a randomised controlled study. *Cancer*. 1994; 73:2048-2052. doi: 10.1002/1097-0142(19940415).
7. Fujimura T., Yonemura Y., Muraoka K. et al. Continuous hyperthermic peritoneal perfusion for the prevention of peritoneal recurrence of gastric cancer: randomized controlled study. *World J Surg*. 1994;18:150-155. doi: 10.1007/BF00348209.
8. Ikeguchi M., Kondou A., Oka A. et al. Effects of continuous hyperthermic peritoneal perfusion on prognosis of gastric cancer with serosal invasion. *Eur J Surg*. 1995;161: 581-586. doi: 10.4236/jct.2013.41A014.
9. Fujimoto S., Takahashi M., Mutou T. et al. Successful intraperitoneal hyperthermic chemoperfusion for the prevention of postoperative peritoneal recurrence in patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer*. 1999; 85:529-534. doi: 10.4236/jct.2013.49A1002.
10. Hirose K., Katayama K., Iida A. et al. Efficacy of continuous hyperthermic peritoneal perfusion for the prophylaxis and treatment of peritoneal metastasis of advanced gastric cancer: evaluation by multivariate regression analysis. *Oncology*. 1999;57:106-114. doi: 10.1159/000012016.
11. Yonemura Y., De Aretxabala X., Fujimura T. et al. Intraoperative chemohyperthermic peritoneal perfusion as an adjuvant to gastric cancer: final results of a randomised controlled study. *Hepatogastroenterology*. 2001;48:1776-1782. doi: 10.4236/jct.2013.49A1002.
12. Kim J.Y., Bae H.S. A controlled clinical study of serosal-invasive gastric carcinoma patients who underwent surgery plus intraperitoneal hyperthermo-chemoperfusion (IHCP). *Gastric Cancer*. 2001;4:27-33. doi: 10.1007/s101200100013.

13. Kireeva G.S., Belyaeva O.A., Senchik K.Yu. et al. 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.

Поступила в редакцию 22.04.2020 г.

*A.A.Zakharenko, M.A. Beliaev, S.F. Bagnenko,  
I.V. Vervekin, G.U. Iukina, N.V. Tamazian,  
A.D. Novikova, I.A. Paltyshev*

### **Comparative analysis of regional chemotherapy methods on an experimental rat model with peritoneal carcinomatosis**

Pavlov First Saint Petersburg State Medical University,  
St. Petersburg

Peritoneal carcinomatosis is a variant of implantation metastasis of tumors sprouting the serous membrane of an organ. At the moment, the most effective treatment for this disease is regional chemotherapy. Systemic chemotherapy is not effective enough. The standard for the treatment of peritoneal carcinomatosis was cytoreductive interventions followed by open or closed hypertermic intraperitoneal chemoperfusion (HIPEC) or pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC).

Purpose of the study: in an animal experiment to compare the efficacy and safety of regional chemotherapy methods HIPEC and PIPAC

Materials and methods: the study was conducted on 44 rats of Wistar females. To simulate carcinomatosis, a strain of ascites ovarian tumor (OA) from the Russian Oncology Cancer Research Center N.N. Petrova. was used. The safety of the technique was evaluated clinically and based on laboratory blood tests. Efficiency — based on mass spectrometry, pathomorphological data and in assessing the life expectancy of animals.

Results: the conducted methods HIPEC (open, closed) and PIPAC have shown their safety in experiments on laboratory animals. The closed HIPEC technique is most effective. The analysis of the incidence of postoperative complications demonstrated a greater aggressiveness of open and closed techniques compared to the more “sparing” PIPAC method.

Conclusions: the experiment showed comparable safety of all animals tested. Due to the peculiarities of the technique, the PIPAC method can be used as an option for multi-stage treatment in cases where CPC and HIPEC are not possible due to a high index of peritoneal carcinomatosis, and as a neoadjuvant treatment to prevent peritoneal carcinomatosis. In any case, the prospects for using this method require further research.

Key words: PIPAC, HIPEC, peritoneal carcinomatosis, regional chemotherapy, aerosol chemotherapy

*Н.А. Костеников, В.Ф. Дубровская, Е.Г. Кованько, О.Ю. Миролюбова, М.С. Мухина,  
Ю.Р. Илющенко, А.А. Станжевский, Д.Н. Майстренко*

## **Динамика изменений структурных параметров периваскулярной инвазии глиомы С6 (экспериментальное исследование)**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова» МЗ РФ), Санкт-Петербург

Проведено сравнительное изучение структурных характеристик микрососудов с периваскулярным расположением опухолевых клеток и микрососудов обычного строения в перитуморальных зонах интракраниально имплантированной глиобластомы («глиома С6»). Работа была выполнена на крысах. Морфометрическим методом определяли площади, внутренний диаметр и длину микрососудов на протяжении 21 суток после введения опухолевых клеток в головной мозг крысам. Зарегистрировано сохранение изменений в структуре микрососудов с клетками глиобластомы на протяжении всего срока наблюдения. Рассматривается активная роль периваскулярно расположенных опухолевых клеток в преобразовании структуры и свойств микрососудов, участвующих в процессе инвазии глиобластомы в ткань головного мозга.

**Ключевые слова:** глиобластома, микрососуды, морфометрия, перитуморальные зоны

### **Введение**

Поиск новых методов и подходов к лечению глиобластомы (ГБ) головного мозга остаётся актуальной проблемой современной нейроонкологии. В комплексе противоопухолевого лечения антиангиогенная терапия обладает рядом значительных преимуществ перед традиционной цитотоксической [1]. Данное направление наиболее целесообразно для профилактики вторичного опухолевого роста, представляющего собой либо рецидив первичного очага, либо отдалённое распространение новообразования [2]. Однако изучение и использование целого ряда факторов ангиогенеза и применение как прямых, так и непрямых ингибиторов данного процесса [3, 4, 5, 6] до настоящего времени не привело к существенному замедлению роста опухоли и ее вторичных очагов [7, 8, 9]. Отсутствие клинически значимых результатов обуславливает необходимость дальнейшего выяснения роли взаимоотношений клеток опухоли и микрососудов в

увеличении объёма, инвазии и метастазировании ГБ в головном мозге.

Целью данной экспериментальной работы явилось сравнительное изучение структурных характеристик микрососудов с периваскулярным расположением опухолевых клеток (МК) и микрососудов обычного строения (МО) в перитуморальных зонах в динамике роста и инвазии глиобластомы («глиома С6»).

### **Материал и методы**

В исследование было включено 27 белых беспородных крыс-самцов массой 200-220 г. Исследования проводились в соответствии с требованиями и условиями, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава РФ № 199н от 01.04.2016 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Перед имплантацией опухоли животных наркотизировали внутримышечным введением препаратов «Золетил-100» в дозе 40-50 мг/кг массы и «Рометар» (0,02-0,04 мл), после чего животных фиксировали в стереотаксическом адаптере. Шприцем Гамильтона в глубокую структуру ГМ (скорлупа) справа имплантировали 5,0 мкл культуры клеток глиомы С6 (глиобластомы) [10] с концентрацией клеток  $50 \times 10^6$  на мл. Сразу после операции и далее в течение 3 дней крысам 1 раз в день производили внутримышечную инъекцию дексаметазона в дозе 0,2-0,4 мл.

На 3, 7, 14, 18 и 21 сутки животных выводили из опыта внутримышечным введением двойной дозы «Золетила-100» с добавлением 0,2-0,5 мл 10% раствора лидокаина. Материал фиксировали в 15% формалине и заливали в парафин. Срезы толщиной 6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а также по Нисслю и исследовали в микроскопе «Olympus VX-50» (Япония).

Проведено сравнительное изучение двух видов капилляров в перитуморальных зонах: микрососудов с периваскулярным расположением опухолевых клеток и микрососудов обычного строения. Измерения всех показателей проводили морфометрическим методом у 4-5 животных на каждый срок постимплантационного периода с помощью программы для анализа изображений «CellSens» («Olympus»). Измеряли площади всех МК и МО, расположенных в перитуморальной зоне, на площади ткани мозга размером от 2,5 до 2,7 мм<sup>2</sup> на каждый срок наблюдения. Измеряли длину и внутренний диаметр всех МК и МО в перитуморальной зоне по периметру опухоли на расстоянии 500 мкм от её края. Каждая из сравниваемых групп была представлена от 90 до 130 значениями на каждый из указанных сроков наблюдения. Характер и направленность изменений анализируемых показателей у всех животных была идентичной.

Исследование препаратов с использованием иммуногистохимического метода проводили на парафиновых срезах толщиной 3 мкм с моноклональными кроличьими антителами Ki-67 (клон SP6) с рабочим разведением 1:200. Система визуализации EtVision™ Flex (Dako). Демаскировка антигенов проведена путём нагревания срезов в трис-ЭДТА буфере (pH=9,0) при температуре 95°C [11].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 10.0. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего. В силу небольшого объема исследованной выборки значимость различий между независимыми выборками оценивали с помощью непараметрического u-критерия Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

### Результаты

Изучена динамика изменений средних величин площадей ткани мозга, приходящихся на МК и МО на протяжении 21 суток после имплантации клеток ГБ. Через 3 суток среди слаборазвитой капиллярной сети по периметру опухоли наблюдались лишь единичные микрососуды с клетками ГБ. К 7 суткам (рис. 1) при незначительном увеличении размеров ГБ площадь ткани, приходящаяся на МК, была достоверно меньшей по сравнению с аналогичным показателем для МО.

По мере роста объёма ГБ возрастала и средняя площадь микрососудов с периваскулярно расположенными клетками опухоли, которая становилась максимальной к 18 суткам после

имплантации опухолевых клеток с последующим снижением ее размеров к 21 суткам.

Для выяснения структурных характеристик микрососудов перитуморальной зоны было проведено сравнительное морфометрическое исследование показателей длины и диаметра капилляров в группах МК и МО на протяжении 21 суток постимплантационного периода.

Через 3 суток опухолевый узел был представлен мелкими анапластическими элементами с ядерным полиморфизмом. По периметру ГБ регистрировались единичные свободно расположенные опухолевые клетки, которые оказались вне опухолевого конгломерата в результате пассивного отделения в момент имплантации культуры клеток ГБ. Часть из них, по-видимому, обладала высокой миграционной активностью и направленным движением к микрососудам [10;12;13]. Морфологическая картина опухоли и капиллярной системы перитуморальных зон свидетельствовали о включении механизмов ангиогенеза уже с первых суток после имплантации клеток ГБ. Несмотря на небольшой размер опухоли, единичные микрососуды с широкими просветами уже регистрировались как внутри самой опухоли, так и в прилежающих тканях мозга (рис. 2 а, б). Отдельные микрососуды разветвлялись, достигая длины 100-120 мкм с диапазоном диаметра от 6 до 15 мкм.

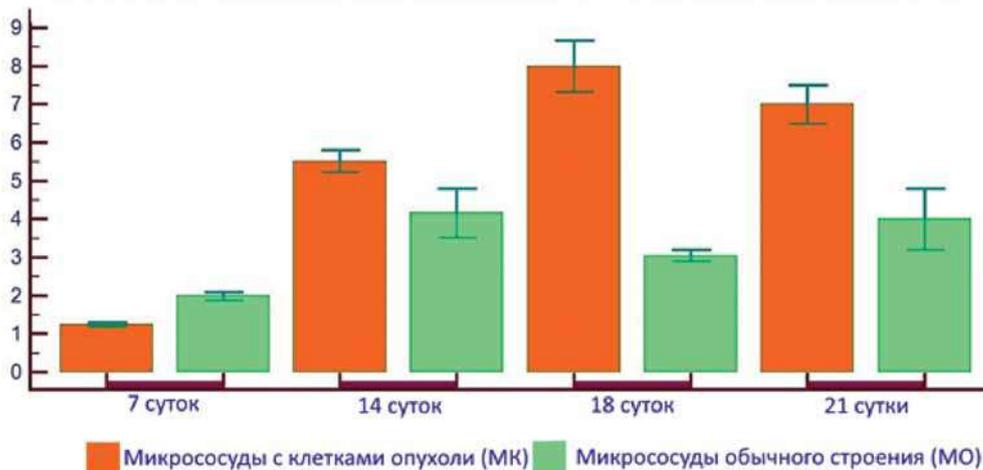


Рис. 1. Динамика изменений средних значений площадей микрососудов с клетками опухоли (МК), и микрососудов обычного строения (МО) в перитуморальной зоне мозга. По оси абсцисс: время после имплантации (сутки). По оси ординат: средние значения площадей микрососудов каждого вида в 1 мм<sup>2</sup> ткани мозга (M±m)

Таблица 1. Динамика изменений структурных параметров микрососудов с клетками опухоли (МК) и микрососудов обычного строения (МО)

Время после имплантации (сутки)	Длина сосудов (мкм) M±m		Диаметр сосудов (мкм) M±m	
	МК	МО	МК	МО
7	75±5,1	44±2,3	4,8±0,13	4,7±0,11
14	76±5,0	49±3,8	4,3±0,12	3,2±0,10
18	60±4,0	42±3,1	4,3±0,14	3,2±0,08
21	47±2,5	32±2,1	3,7±0,12	2,9±0,09

Примечание: при сравнении значений структурных параметров МК и МО во всех случаях различия оказались достоверными ( $p < 0,01$ ), за исключением диаметра сосудов на 7 сутки ( $p > 0,05$ )

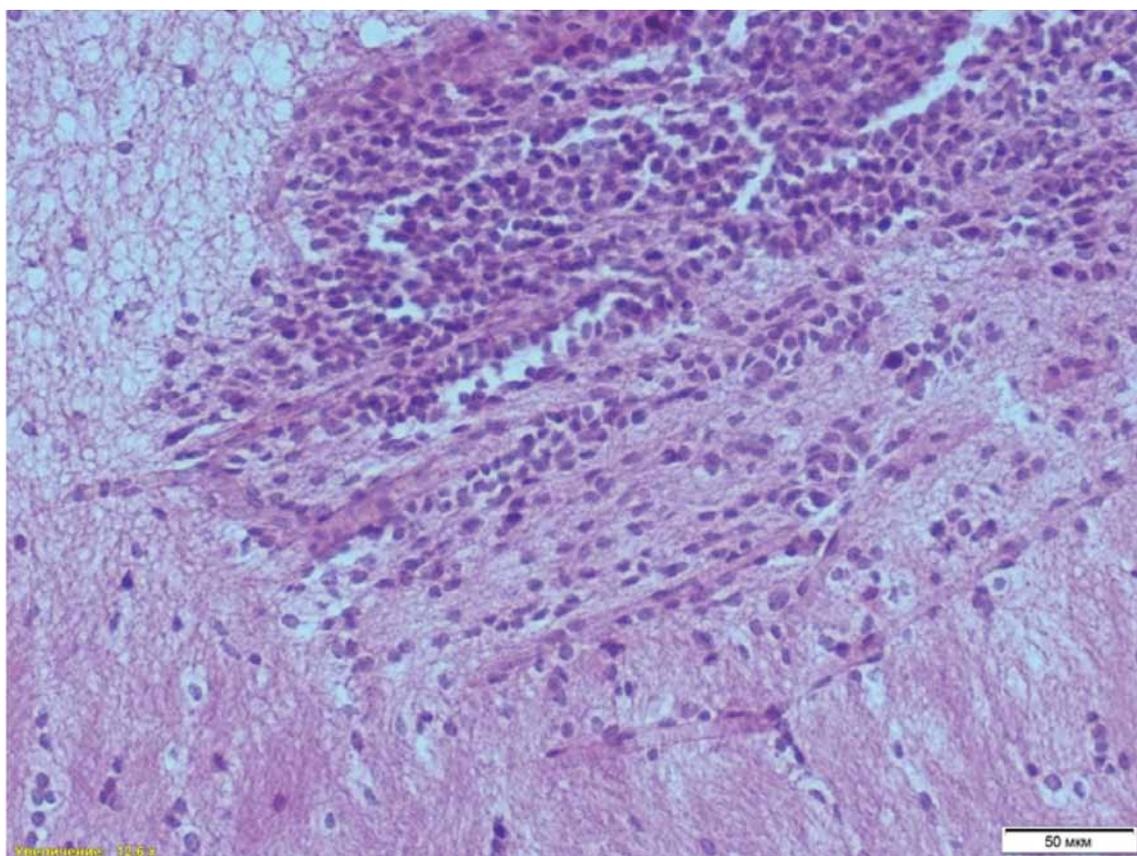


Рис. 2. Микрососуды с клетками глиобластомы (ГБ) через 3 суток после имплантации опухоли: (а) в ткани опухоли, (б) в перитуморальной зоне. Гематоксилин-эозин.  $\times 220$

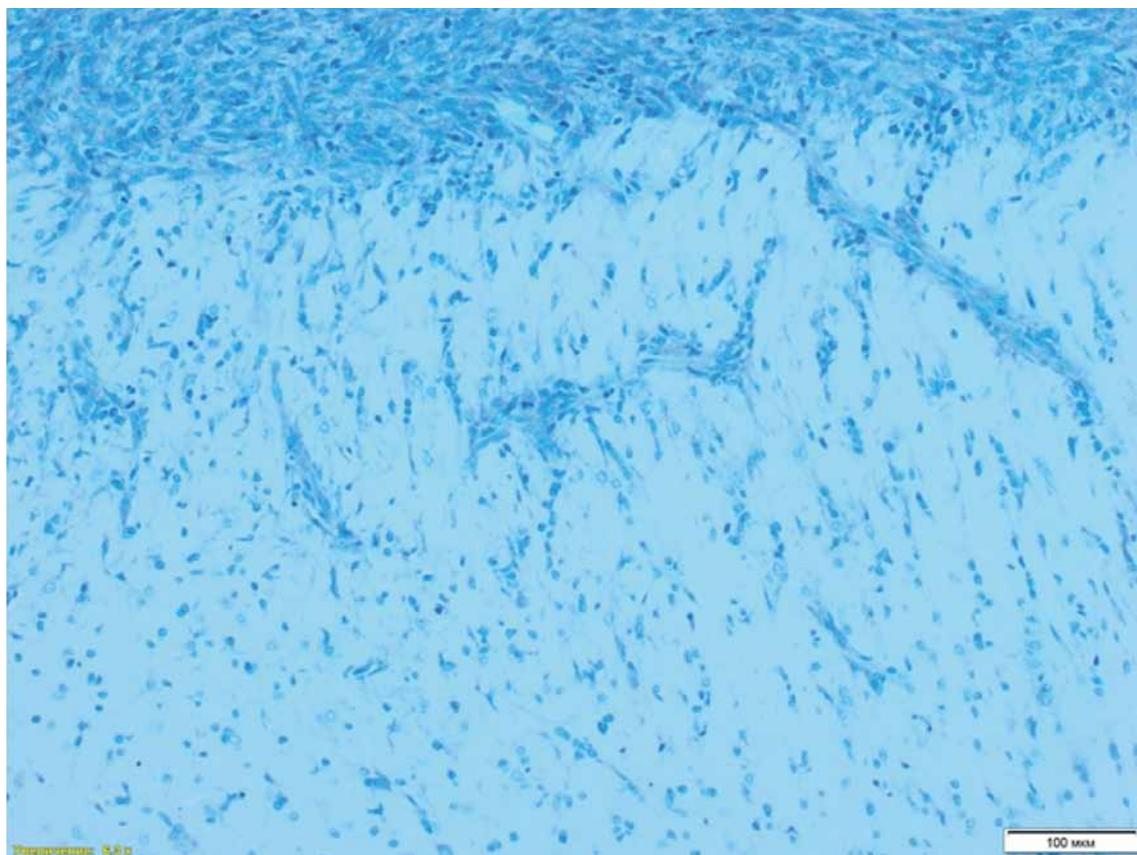


Рис. 3. Микрососуды с периваскулярным распространением клеток глиобластомы (ГБ) в перитуморальной зоне через 14 суток после имплантации. Окраска по Нислю.  $\times 110$

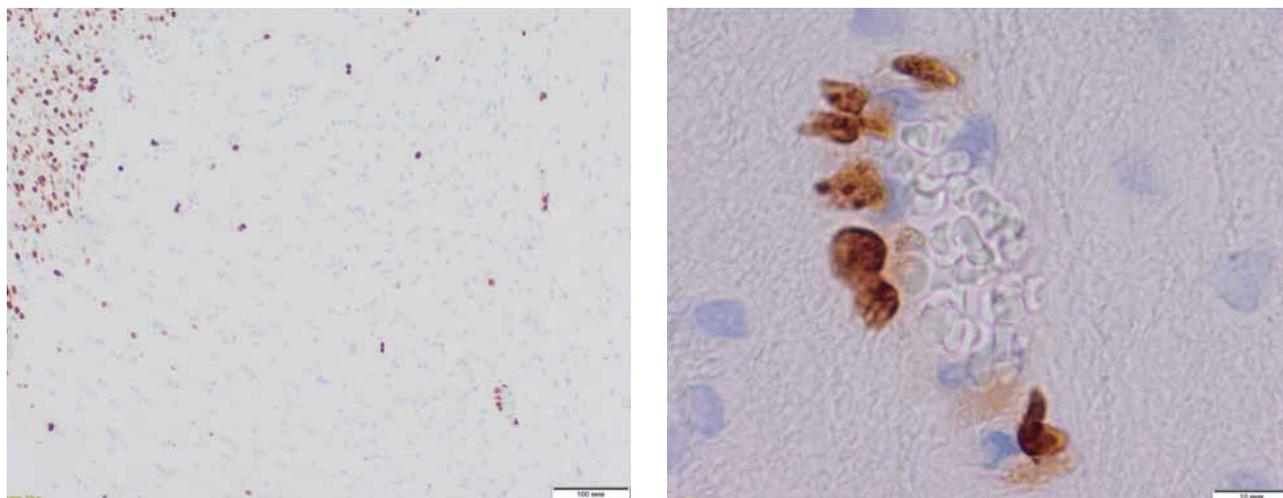


Рис. 4 (а, б). Отдельные опухолевые клетки в ткани мозга через 18 суток после имплантации глиобластомы (ГБ): (а) микрососуд с клетками опухоли, находящийся за пределами перитуморальной зоны.  $\times 110$ ; (б) тот же микрососуд.  $\times 1100$ . Окраска антителами к Ki-67

К 7 суткам отмечалась тенденция к незначительному увеличению размеров опухолевого узла, тогда как микрососудистая сеть перитуморальных областей претерпевала существенные изменения. Сравнительное изучение структурных характеристик МК и МО позволило выявить ряд особенностей в динамике их преобразований по мере увеличения размера глиобластомы. Около 30% как предсуществующих микрососудов хозяина, так и вновь образованных микрососудов вследствие активации ангиогенеза были представлены МК. Длина таких микрососудов возрастала и превосходила аналогичные значения для МО (табл. 1).

Вместе с тем, капилляры всей микрососудистой сети перитуморальных областей на данный срок были расширены вследствие сохраняющегося реактивного ответа тканей на манипуляцию имплантации ГБ, сопровождавшуюся отёком, клеточной инфильтрацией (лимфоциты, макрофаги), диапедезом эритроцитов как в опухолевом узле, так и в окружающих тканях головного мозга.

К 14 суткам наряду с увеличением размеров глиобластомы интенсифицировались и инвазивные процессы в перитуморальных зонах (рис. 3).

Значительная доля капиллярной сети по периметру ГБ была представлена МК, средние показатели длины и диаметра микрокапилляров которых достоверно превосходили показатели для МО.

К 18 суткам размер опухоли еще более возрастал с сохранением эффектов удлинения и расширения просветов МК, в то время как диаметр МО не отличался от значений интактного контроля ( $3,2 \pm 0,08$  и  $2,8 \pm 0,07$  мкм соответственно, при  $p > 0,05$ ). По сравнению с предыдущими сроками в ткани мозга увеличивалось число

свободно расположенных опухолевых клеток, их мелких комплексов, а также МК, которые располагались за пределами перитуморальной зоны (рис. 4 а, б).

Нередко извитые с широкими просветами МК регистрировались на большом удалении от границ опухолевого узла.

К 21 суткам в центральных областях опухоли, занимавшей около трети объема правой половины мозга, находились различные по размеру очаги некроза с кровоизлияниями и расширением микрососудов по краям ГБ. Значения исследуемых параметров для МК и МО в этот период несколько снижались, продолжая, однако, достоверно отличаться между собой с сохранением превосходящих величин для МК по сравнению с МО. В ткани мозга находились многочисленные клетки ГБ в виде небольших скоплений, либо расположенные периваскулярно в капиллярной сети.

### Обсуждение

В проведенном исследовании в перитуморальных зонах ГБ выявлен ряд особенностей структуры микрососудов с периваскулярным расположением опухолевых клеток. В начальном периоде развития опухоли диаметр микрососудов всей капиллярной сети был увеличен по сравнению с показателями интактных животных, главным образом, вследствие реактивных процессов в ответ на интракраниальное введение клеток ГБ. Однако в дальнейшем вплоть до 21 суток наблюдения только МК сохраняли широкий просвет в сочетании с увеличением их длины. Динамика изменений совокупности данных параметров соответствовала росту показателей площадей МК на протяжении постимплантационного периода. Опухоли,

имплантированные в хорошо васкуляризированные ткани, первоначально растут, задействуя существующие сосуды хозяина и экспрессируют ангиогенные факторы на самых ранних стадиях своего развития [13]. Результаты исследования микропрепаратов и иллюстрация полученных данных через 3 суток после интратранскариального введения клеток ГБ свидетельствовали о наличии микрососудов с широким просветом как в ткани формирующейся опухоли, так и в перитуморальных областях ГМ. При этом на всем протяжении сосудов в их периваскулярных зонах располагались опухолевые клетки. Согласно данным ряда авторов [14], в экспериментальной ГБ («Глиома Сб») от 60% до 96% клеток являются стволовыми клетками. Будучи неоднородной по своим характеристикам, определенная часть данной популяции представлена опухолевыми стволовыми клетками. Возможно, именно эти клетки в составе клеток ГБ, мигрируя вдоль микрососудов, активно участвуют в перестройке микрососудистой сети с образованием «почек», удлинении, разветвлении и изменении ряда структурно-функциональных показателей сосудов с последующим их использованием в процессе инвазии опухоли в ткань мозга.

### Заключение

Зарегистрированный рост площадей МК на протяжении постимплантационного периода сочетался с их стабильно увеличенной длиной и шириной просвета по сравнению со значениями для МО. Анализ представленных данных и наблюдения о постепенно увеличивающейся доле МК в капиллярной сети свидетельствуют о возрастании их численности и усилении интенсивности инвазии по мере роста глиобластомы. Микрососуды с опухолевыми клетками, имевшие аналогичные характеристики длины и диаметра, располагались и на значительном расстоянии от границ опухолевого узла. По-видимому, как предсуществующие микрососуды хозяина, так и вновь образованные вследствие индукции ангиогенеза магистраль, служат не только «трассами» для внедрения клеток глиобластомы в окружающие ткани [12, 13], но и сами являются объектом различных преобразований со стороны контактирующих клеток опухоли с последующим использованием таких микрососудов в инвазии и метастазировании глиобластомы в ткань мозга.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.*

### ЛИТЕРАТУРА

- Lombardi G., Pambuku A., Bellu L. et al. Effectiveness of antiangiogenic drugs in glioblastoma patients: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2017;111:94-102. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.01.018.
- Бывальцев В.А., Степанов И.А., Белых Е.Г. и др. Молекулярные аспекты ангиогенеза в глиобластомах головного мозга. *Вопросы онкологии*. 2017;63(1):19-27 [Byvaltsev V.A., Stepanov I.A., Belykh E.G. et al. Molecular aspects of angiogenesis in brain glioblastomas. *Vopr. Onkol.* 2017;63(1):19-27 (In Russ.)].
- Чертюк В.М., Захарчук Н.В., Чертюк А.Г. Клеточно-молекулярные механизмы регуляции ангиогенеза в головном мозге. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски*. 2017; 117(8):43-55. doi: 10.17116/jnevro20171178243-55 [Chertok V.M., Zakharchuk N.V., Chertok A.G. The cellular and molecular mechanisms of angiogenesis regulation in the brain S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry. *Zhurnal nevrologii i psikhiiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2017;117(8): 43-55. doi: 10.17116/jnevro20171178243-55 (In Russ.)].
- Darland D.C., Massingham L.J., Smith S.R. et al. Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Developmental biology*. 2003;264(1):275-88. doi: 10.1016/j.ydbio.2003.08.015.
- Staton C.A., Reed M.W., Brown N.J. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *International journal of experimental pathology*. 2009;90(3):195-221. doi: 10.1111/j.1365-2613.2008.00633.x.
- Майбородин И.В., Красильников С.Э., Козяков А.Е. и др. Целесообразность изучения опухолевого ангиогенеза, как прогностического фактора развития рака. *Новости хирургии*. 2015; 23 (3):339-347 [Maiborodin I.V., Krasilnikov S.E., Kozjakov A.E. et al. The Feasibility of Tumor-Related Angiogenesis Study as a Prognostic Factor for Cancer Development. *Novosti Khirurgii*. 2015; 23 (3):339-347 (In Russ.)].
- Бывальцев В.А., Степанов И.А., Шамеева М.А. и др. Эффективность применения ингибиторов фактора роста эндотелия сосудов в лечении глиобластомы: систематический обзор и метаанализ. *Вопросы онкологии*. 2019; 65(4):546-555 [Byvaltsev V.A., Stepanov I.A., Shameeva M.A. et al. Effectiveness of vascular endothelial growth factor inhibitors in the treatment of glioblastoma: a systematic review and meta-analysis. *Vopr. Onkol.* 2019; 65(4):546-555.
- Lacroix M., Abi-Said D., Fourny D.R. et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *Journal of neurosurgery*. 2001;95(2):190-8. doi: 10.3171/jns.2001.95.2.0190.
- Gilbert M.R., Dignam J.J., Armstrong T.S. et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2014;370(8):699-708. doi: 10.1056/NEJMoa1308573.
- Grobben B., De Deyn P., Slegers H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell and tissue research*. 2002;310(3):257-70. doi: 10.1007/s00441-002-0651-7.
- Петров С.В., Райхлин Н.Т., Ахметов Т.Р. и др. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Казань: DESIGNstudio» RED», 2012:624

- [Petrov S.V., Raikhlin N.T., Akhmetov T.R. et al. Manual on immunohistochemical diagnostics of human tumors. Kazan: DESIGNstudio» RED», 2012:624 (In Russ.)].
12. Vajkoczy P., Farhadi M., Gaumann A. et al. Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(6):777-85. doi: 10.1172/JCI14105.
  13. Vajkoczy P., Schilling L., Ullrich A. et al. Characterization of Angiogenesis and Microcirculation of High-Grade Glioma: An Intravital Multifluorescence Microscopic Approach in the Athymic Nude Mouse. *The Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1998;18(5):510-20. doi: 10.1097/00004647-199805000-00006.
  14. Брюховецкий И.С., Брюховецкий А.С., Кумейко В.В. и др. Стволовые клетки в канцерогенезе мультиформной глиобластомы. *Гены и клетки*. 2013; 8(2):13-19 [Bryukhovetskiy I.S., Bryukhovetskiy A.S., Kumeiko V.V. et al. Stem cells in carcinogenesis of glioblastoma multiforme. *Genes and Cells*. 2013; 8(2):13-19 (In Russ.)].

Поступила в редакцию 09.06.2020 г.

*N.A. Kostenikov, V.F. Dubrovskaya, E.G. Kovan'ko,  
O.Yu. Mirolyubova, M.S. Mukhina, Yu.R. Ilyushchenko,  
A.A. Stanzhevsky, D.N. Maistrenko*

**Glioma C6 perivascular changes of invasion structural parameters variation (research study)**

«Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies» («Granov RRCRST», Russian Federation Ministry of Health), St. Petersburg

A comparative study of the structural characteristics of microvessels with a perivascular arrangement of tumor cells and microvessels with normal structure located in the peritumoral zones of an intracranially implanted glioblastoma («glioma C6») was conducted. The study was performed on rats. Morphometric method was used to determine the area, internal diameter and length of microvessels for 21 days after the introduction of tumor cells into the brain of rats. Changes in the structure of microvessels with glioblastoma cells were registered throughout the entire observation period. The active role of perivascularly located tumor cells in the transformation of the structure and properties of microvessels involved in the process of glioblastoma invasion into brain tissue is considered.

Key words: glioblastoma, microvessels, morphometry, peritumoral zones

*О.В. Корытов<sup>1</sup>, С.Д. Иванов<sup>2</sup>, Л.И. Корытова<sup>1</sup>, А.Л. Семенов<sup>2</sup>, Г.В. Точильников<sup>2</sup>,  
И.Н. Васильева<sup>2</sup>, В.Г. Беспалов<sup>2</sup>, А.Р. Ахтемзянов<sup>1</sup>*

## Экспериментальная терапия кроликов с лучевым циститом

<sup>1</sup>ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова» Минздрава России, Санкт-Петербург,  
<sup>2</sup>ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

На новой модели индукции лучевого цистита (ЛЦ) у кроликов оценивали эффективность лечения животных при внутрипузырном введении биодеградируемого лекарственного средства — геля, содержащего соли альгиновой и гиалуроновой кислот, а также диоксидин и лидокаин (АГДЛ). Работа была проведена на самках кроликов породы «Шиншилла». Фракционное облучение мочевого пузыря кроликов осуществляли на линейном ускорителе фотонов: разовая доза за фракцию составляла 6 Гр, которая подводилась ежедневно в течение 5 дней до суммарной очаговой дозы 30 Гр. В результате облучения мочевого пузыря у животных развивался ЛЦ. Гель АГДЛ вводили внутрипузырно с помощью специального катетера в дозе 2500 мг/кг массы тела 3 раза в день ежедневно, начиная с 1 месяца после облучения, в течение 2 месяцев. Препарат оказывал выраженное лечебное действие на кроликов с ЛЦ — снижались величины клинических и лабораторных показателей цистита в моче и крови, происходила регрессия морфологических проявлений воспаления слизистой оболочки мочевого пузыря.

**Ключевые слова:** мочевого пузырь, лучевой цистит, гель АГДЛ, внутрипузырное введение

### Введение

В общей структуре онкологической заболеваемости злокачественные новообразования малого таза составляют в совокупности более 25%, и примерно четвертая часть таких больных нуждается в лучевой терапии в дозах от 70 до 100 Гр, что приводит к возникновению лучевого цистита (ЛЦ) [4, 6, 8, 12-14]. Такое осложнение является одним из самых частых при проведении радиологами лечения больных злокачественными новообразованиями предстательной железы, мочевого пузыря, прямой кишки, шейки матки, при этом частота ЛЦ по данным разных авторов составляет от 20 до 80%. В случае проведения лучевой терапии пациентам в суммарных дозах до 30 Гр не наблюдалось уродинамических изменений, тогда как при более высоких суммар-

ных очаговых дозах развивалось недержание мочи, гематурия, которая могла длиться до четырнадцати лет после лучевой терапии.

В клинике ЛЦ у пациентов развивается обычно через 3-6 недель после облучения малого таза и представляет собой тяжелое воспалительное состояние мочевого пузыря, которое состоит из трех фаз. Первоначальный острый воспалительный ответ обычно длится несколько недель после лучевой терапии. За этой фазой следует бессимптомная фаза, которая может продолжаться от нескольких месяцев до нескольких лет. Третья — необратимая хроническая фаза проявляется рядом клинических симптомов воспалительного процесса мочевого пузыря, у которых нет стандартного течения [16, 18]. Средняя длительность ЛЦ составляет 31,8 мес. после лучевой терапии; поздние реакции мочевого пузыря могут появляться спустя годы после облучения [13].

Лечение больных ЛЦ представляет значительные трудности в связи с наличием глубоких деструктивных изменений в стенке мочевого пузыря, которые обусловлены склерозом сосудов, атрофией нервных окончаний, значительным угнетением репаративных и регенераторных способностей тканей, присоединением вторичной инфекции, снижением общей сопротивляемости организма. Методы консервативного лечения, которые являются доминирующими, не всегда эффективны и не позволяют добиться полного выздоровления [6, 8]. В лечении пациентов с ЛЦ применяют системную, в том числе пероральную терапию, внутрипузырное введение препаратов, интервенционно-радиологические вмешательства, хирургические меры. Вследствие отсутствия рандомизированных исследований, рекомендации по лечению больных ЛЦ делать сложно. Большинство пациентов лечатся симптоматически или разнопланово.

Ограниченные успехи современных видов лечения больных ЛЦ обусловлены отчасти отсутствием соответствующих доклинических моделей, которые адекватно имитируют заболевание человека. В настоящее время стандартных моделей лучевого цистита не существует. В мировой литературе имеются единичные публикации по

моделированию ЛЦ у лабораторных животных: мышей, крыс или кроликов [5, 6, 10, 11, 12, 17, 25]. При этом выявлены различия в системах подведения радиации к мишени, в дозах облучения, а также распределении дозы в телах мелких лабораторных животных, использованных в этих различных по существу исследованиях, что, как показали результаты, не всегда было адекватно патологическому процессу, происходящему у людей [16]. Для индукции лучевого цистита у животных используется однократное или фракционное ионизирующее облучение зоны мочевого пузыря в дозах от 20 до 40 Гр [10, 11, 24, 25]. В работе М. Kohler et al. [11] для индукции ЛЦ у кроликов облучали или весь мочевой пузырь, или только краниальную или каудальную его части; качестве источника ионизирующей радиации было применено локальное воздействие рентгеновским излучением в дозах 33, 36 или 39 Гр; через 3-4 мес. после облучения у животных были выявлены гистологические признаки ЛЦ. Вместе с тем следует заметить, что в настоящее время рентгеновское излучение в лечении больных злокачественными новообразованиями опухолей малого таза не используется.

Задачей настоящей работы явилась оценка эффективности лечения ЛЦ на новой модели у кроликов путём внутривезикулярного введения биодеградируемого лекарственного средства в виде геля на основе природных полимеров, включающего соли альгиновой и гиалуроновой кислот, а также анестетика — лидокаина и антибактериального препарата — диоксида.

### Материалы и методы

Работа проведена на 18 кроликах самках породы «Шиншилла» из Федерального государственного унитарного предприятия «Питомник лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область). Кролики с начальной массой тела 1,75 — 2,25 кг содержались в специальных клетках и вольерах по 1 особи в клетке. Животные ежедневно получали стандартный полнорационный брикетированный комбикорм производства компании «Лабораторкорм» (Москва, Россия). Корм и водопроводную воду в качестве питьевой кролики получали без ограничений. Все манипуляции с животным проводились в соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принята в Страсбурге 18.03.1986 и подтверждена 15.06.2006) и по правилам ГОСТ 33216–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами».

В каждую группу подопытных животных в 3-х сериях было набрано по 6 самок. Перед облучением кроликов наркотизировали путем в/б введения 0,2 — 0,3 мл раствора, включающего медетомедин и телитамин-золазепам. Облучение проводили на линейном ускорителе фотонов с энергией квантов 6 МэВ «Elekta Precise» (фирмы «Elekta» Швеция) [Корытов и соавт., 2018]. Для определения местоположения мишени предварительно была

проведена компьютерная томография тела животного с контрастированием. Поле облучения (40 x 40 мм<sup>2</sup>) было определено коллиматором с наведением его на центр мочевого пузыря. Разовая доза за фракцию составляла 6 Гр, которая подводилась ежедневно в течение 5 дней до суммарной очаговой дозы 30 Гр. В контрольной группе кроликов не подвергали ионизирующему облучению; эти животные получали аналогичный наркоз, в дальнейшем у них проводились анализы по тем же протоколам, что и в группах облученных особей.

В качестве испытуемого препарата использовали биодеградируемое лекарственное средство (гель АГДЛ) производства ООО «Колетекс», Москва, на основе природных полимеров [1]. Оно представляет собой альгинатно-гиалуронатную систему, компонентами которой являются также антисептик диоксидин и анестетик лидокаин. Качественный и количественный состав лекарственного средства в 100 г: активные вещества — натриевая соль альгиновой кислоты 2,0 г и гиалуроновой кислоты 1,0 г; вспомогательные вещества — лидокаин гидрохлорид — 2,0 г, диоксидин — 0,9 г. Лекарственная форма — гель, предназначенный для внутривезикулярного введения.

Через 1 мес. после облучения кролики рандомизировались (группа 2). Затем в подопытных группах животных (группы 4 и 6) вводили внутривезикулярно с помощью катетера гель АГДЛ в дозе — 2500 мг/кг массы тела в день (объем геля для кролика массой тела 2 кг составлял 5 мл) 3 раза в неделю в течение 2-х месяцев. В контрольно облученных группах (группы 3 и 5) животным вводили внутривезикулярно с помощью специального катетера физиологический раствор по 5 мл на кролика массой тела 2 кг в течение 2 мес. 3 раза в неделю.

В течение 3 мес. эксперимента кроликов всех групп взвешивали 1 раз в неделю с помощью электронных весов фирмы «ОКАУС» (США). 1 раз в неделю у кроликов измеряли ректальную температуру с помощью медицинского электротермометра ТПЭМ-1 (Россия). Перед началом эксперимента и затем 1 раз в месяц у всех кроликов брали кровь из ушной вены и проводили клинический анализ крови на ветеринарном гематологическом анализаторе «Mindray BC-2800Vet» (Mindray, China). Через 2 мес. лечения гелем АГДЛ или внутривезикулярного введения физиологического раствора (в контрольных группах) кролики всех групп забивались передозировкой паров хлороформа и подвергались полной аутопсии. Проводилась оценка макроскопического состояния мочевого пузыря, его слизистой оболочки. Затем мочевой пузырь каждого кролика подвергался стандартной гистологической обработке и морфологическому анализу. Окраску препаратов проводили с использованием гематоксилин-К (Карацци) (БиоВитрум, Россия) и водно-спиртового раствора еозина (БиоВитрум, Россия). Окрашенные срезы фиксировали с помощью синтетической среды БиоМаунт (BioOpticaMilano, Италия). Морфологические исследования препаратов осуществляли с помощью световой микроскопии (микроскоп «ORTHOPLAN», Германия).

Оценка эффективности лечения животных с ЛЦ была проведена на основании вышеперечисленных цитологических и биохимических показателей мочи и крови, измеренных через 1 и 2 мес. после начала проведения терапии, а также в соответствии с морфологическими изменениями ткани облученного мочевого пузыря.

Статистическую обработку данных производили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку

среднего (m). Для статистического анализа использовали *t*-критерий Стьюдента и *U*-непараметрический критерий Вилкоксона-Манна-Уитни. За значимый уровень принимали  $p < 0,05$ .

### Результаты

Клинические и лабораторные показатели у подопытных кроликов представлены в таблице (табл. 1). Как можно видеть из полученных данных по сравнению с показателями группы необлученных кроликов (группа 1), у облученных животных (группа 2) выявлялось закисление мочи, повышение её плотности, увеличения в ней содержания числа лейкоцитов, а также появление белка и крови; в крови наблюдалась тенденция к увеличению абсолютного количества лейкоцитов и гранулоцитов; можно отметить также тенденцию к потере массы тела и к повышению ректальной температуры. Через 1 мес. после внутрипузырного введения физиологического раствора (группа 3) или внутрипузырного лечения гелем АГДЛ облученным кроликам (группа 4) измерявшиеся показатели достоверно не отличались от параметров у животных, определенных через мес. после облучения (группа 2), кроме снижения количества лейкоцитов в моче у кроликов, которым вводили АГДЛ. Через 2 мес. внутрипузырного лечения гелем АГДЛ (группа 6) у облученных кроликов было отмечено воз-

растание массы тела, а также снижение общего числа лейкоцитов и гранулоцитов крови в сравнении с животными, которым вводили физраствор и являвшимися облученным контролем (группа 5).

Такие показатели как уровни протеинурии и гематурии в результате их гетерогенности не позволили сделать достоверного заключения о практической значимости этих параметров в отношении развития ЛЦ и лечения контрольно облученных кроликов.

Результаты аутопсии в конце эксперимента показали, что у кроликов из групп необлученного контроля (группа 1) слизистая оболочка мочевого пузыря макроскопически была светло-розового цвета с легкой складчатой структурой без признаков воспалительных изменений, гиперплазии, атрофии (рис. 1, А). Практически у всех кроликов из контрольно облученных групп с введением физиологического раствора (группы 3 и 5) слизистая оболочка мочевого пузыря имела выраженные признаки воспаления: гиперемия, гиперплазия, полипы, участки атрофии (рис. 1, Б). Почти у всех кроликов из групп с лечением гелем АГДЛ в течение 2 мес. (группы 4 и 6) слизистая оболочка мочевого пузыря была близка к норме, у части кроликов сохранялись остаточные проявления воспаления в виде участков гиперемии и гиперплазии (рис. 1, В).

Таблица. Клинические и лабораторные показатели кроликов через 1 месяц после облучения и 2-х мес. лечения гелем АГДЛ

Группа кроликов (n — число животных)	Показатели в группах								
	Масса тела, г	Ректальная температура тела, °С	Удельная плотность мочи	pH мочи	Белок мочи, мг/дл	Кровь мочи, баллы	Лейкоциты мочи, баллы	Число лейкоцитов крови, × 10-9/л	Число гранулоцитов крови, × 10-9/л
1. Необлученный контроль (n=6)	3000 ± 250	38,2 ± 0,4	1,004 ± 0,002	8,2 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,1	11,55 ± 2,65	6,7 ± 2,1
2. Облученные кролики при рандомизации (n=12)	2806 ± 97	39,0 ± 0,3	1,018 # ± 0,006	6,1 # ± 0,6	34,0 ± 17,5	0,3 ± 0,2	0,8 # ± 0,1	16,22 ± 1,51	9,1 ± 1,06
3. Облученные кролики через 1 мес. введения физиологического раствора (n=6)	2867 ± 136	38,4 ± 0,6	1,011 ± 0,006	7,7 ± 0,7	26,0 ± 18,6	0,2 ± 0,2	0,5 ± 0,2	15,10 ± 1,48	7,1 ± 1,3
4. Облученные кролики через 1 мес. лечения гелем АГДЛ (n=6)	2817 ± 101	38,3 ± 0,5	1,011 ± 0,003	7,2 ± 0,6	6,0 ± 6,0	0,0 ± 0,0	0,3 * ± 0,1	16,05 ± 0,88	7,3 ± 0,64
5. Облученные кролики через 2 мес. введения физиологического раствора (n=6)	3300 ± 76	38,1 ± 0,7	1,009 ± 0,004	8,0 ± 0,4	30,0 ± 18,2	0,4 ± 0,4	0,5 ± 0,2	16,20 ± 3,04	6,0 ± 0,7
6. Облученные кролики через 2 мес. лечения гелем АГДЛ (n=6)	3892 & ± 124	38,2 ± 0,7	1,008 ± 0,005	7,6 ± 0,7	10,0 ± 5,5	0,1 ± 0,1	0,2* ± 0,1	7,97* & ± 1,73	3,48 * ± 1,01

Примечания: # —  $p < 0,05$  по сравнению с группой кроликов необлученного контроля; \* —  $p < 0,05$  по сравнению с группой облученных кроликов при рандомизации; & —  $p < 0,05$  по сравнению с группой облученных кроликов, которым вводили физиологический раствор

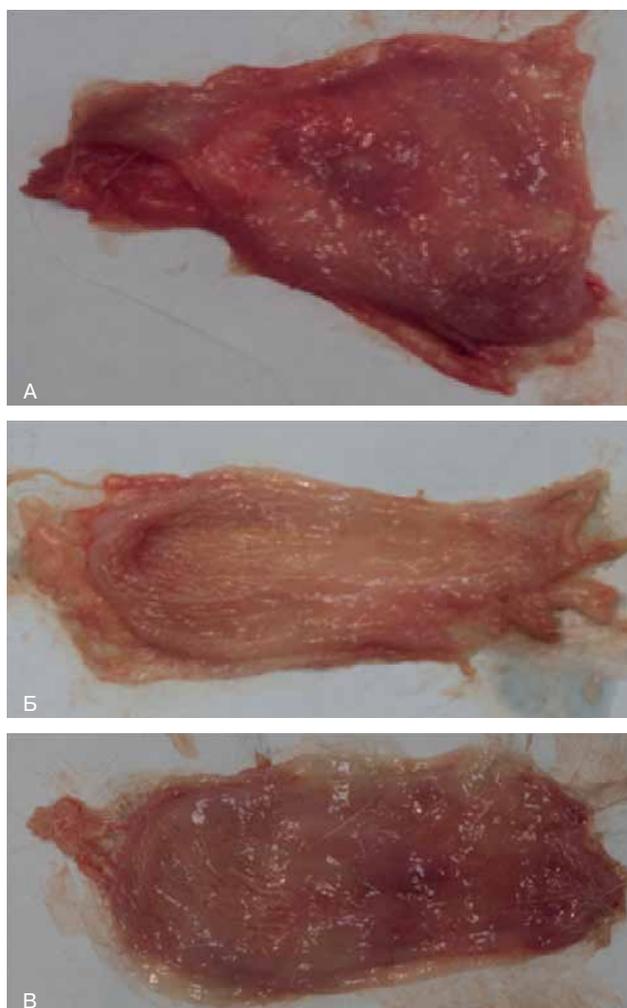


Рис. 1. Макроскопический вид слизистой оболочки мочевого пузыря у кролика.  
 А — из группы необлученного контроля; Б — из контрольно облученной группы с введением физиологического раствора: выраженная гиперемия, выраженная гиперплазия, два полипа, участки атрофии; В — из группы с лечением гелем АГДЛ (в течение 2 мес.): сохраняются участки гиперемии и гиперплазии, часть слизистой имеет нормальный вид

При гистологическом исследовании у всех кроликов из групп необлученного контроля уротелий, подслизистый слой и слой гладких мышц были без патологических изменений (рис. 2, А), в контрольно облученных группах с введением физиологического раствора (группы 3 и 5) выявлены выраженные признаки лучевого цистита: гиперплазия уротелия, клеточная воспалительная инфильтрация и отек подслизистого слоя (рис. 2, Б), в группах с введением геля АГДЛ в течение 2 мес. (группы 4 и 6) наблюдали регрессию морфологических проявлений ЛТ: восстановление уротелиального слоя, уменьшение клеточной воспалительной инфильтрации и отека подслизистого слоя (рис. 2, В).

Таким образом, у облученных кроликов в контрольных группах с внутривезикулярным введением физиологического раствора на аутопсии и при гистологическом исследовании были выявлены выраженные макроскопические

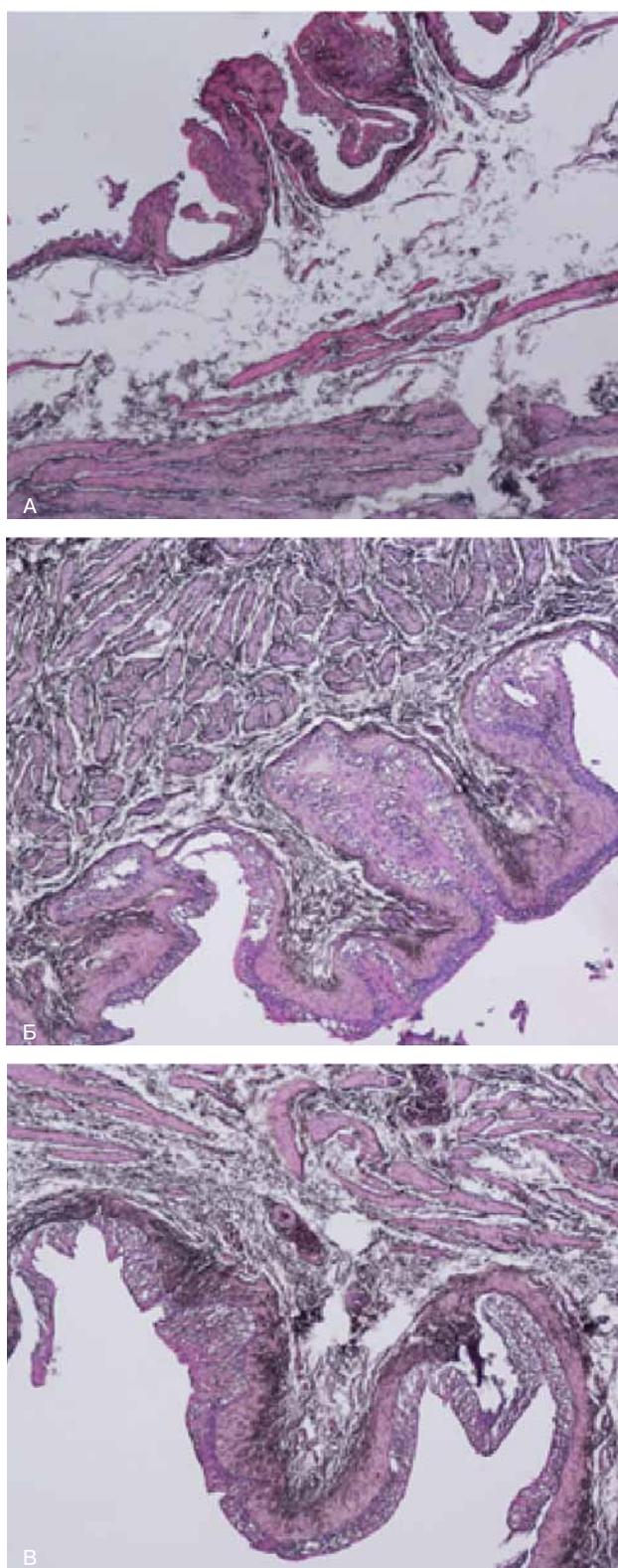


Рис. 2. Гистологическая микрофотография стенок мочевого пузыря кролика.  
 А — из группы интактного контроля (уротелий, подслизистый слой и слой гладких мышц без патологических изменений), Б — подвергнутого облучению и получавшего внутривезикулярные инстилляции физиологического раствора (признаки лучевого цистита: гиперплазия уротелия, клеточная воспалительная инфильтрация и отек подслизистого слоя), В — подвергнутого облучению и прошедшего лечение внутривезикулярными инстилляциями гелем АГДЛ (восстановление уротелиального слоя, регрессия клеточной воспалительной инфильтрации и отека подслизистого слоя). Увеличение x 100. Окраска гематоксилин-эозином

и гистологические признаки ЛЦ, тогда как в группе облученных кроликов с лечением внутрипузырными инстилляциями гелем АГДЛ морфологические признаки ЛЦ были менее выражены или полностью отсутствовали. Гель АГДЛ при внутрипузырном введении в течение 2 мес. кроликам самкам, подвергнутых облучению мочевого пузыря, оказывал выраженное лечебное действие, приводя в первую очередь к снижению числа лейкоцитов в моче, а затем редуцировалось общее количество лейкоцитов и гранулоцитов в крови.

### Обсуждение

ЛЦ является изнурительным состоянием, и если его не лечить на ранних стадиях, то он способен оказать существенное влияние на качество жизни пациента и может привести к тяжелым кровотечениям и даже смерти [24]. Современные методы лечения направлены, в основном, на прекращение кровоизлияний в мочевой пузырь, но ни один из них не способен облегчить другие урологические симптомы, связанные с циститом, такими как увеличения в моче числа лейкоцитов и концентрации белка, а также возрастания в крови лейкоцитов [3]. Существует настоятельная необходимость в углубленном исследовании с использованием доклинических моделей ЛЦ, чтобы лучше понять основу прогрессирования заболевания и протестировать новые методы терапии. Внутрипузырные введения препаратов позволяют доставлять лекарства с высокой активностью непосредственно в мочевой пузырь и могут обеспечить быстрое облегчение симптомов, высокую скорость реагирования, смягчение системных побочных эффектов, а также проведение процедуры амбулаторно. Показано, например, что еженедельные закапывания гиалуроната натрия в сочетании с облучением или брахитерапией позволяют снизить заболеваемость острыми ЛЦ [7, 9]. Такие процедуры, как правило, хорошо переносятся и способствуют предотвращению возникновения радиационно-индуцированного цистита. Показано также, что у больных ЛЦ при внутрипузырном лечении гиалуроново́й кислотой ослаблялась тазовая боль и дизурия [23].

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы по индукции ЛЦ у кроликов, опубликованные ранее другими исследователями при использовании рентгеновского излучения [11]. Через 3 мес. после облучения у кроликов эти авторы идентифицировали гистологические изменения в мочевом пузыре, которые были охарактеризованы как воспалительные. Наблюдались они во

всех слоях стенки мочевого пузыря; дефекты эпителия включали атрофию, потерю эпителия и гиперплазию, эрозию и даже язвенные формирования. В настоящей работе мы также наблюдали в мочевом пузыре гиперплазию уротелия, клеточную воспалительную инфильтрацию, отек подслизистого слоя, и тенденцию возрастания в крови числа гранулоцитов, что, как известно, отражает наличие воспалительных процессов, происходящих в организме больного ЛЦ. Всё это свидетельствует об адекватности разработанной нами модели ЛЦ на кроликах, но уже с использованием в качестве повреждающего фактора фотонов — излучения современной радиотерапевтической установки, применяемой для лечения больных в клинке [2]. Вместе с тем, представляется возможность использования этой модели для изучения механизмов действия фармпрепаратов, которые способны повысить эффективность лучевой терапии путём предотвращения негативных последствий такого лечения в радиологической практике.

У больных ЛЦ ранее проводилась противовоспалительная, гемостатическая, обезболивающая, терапия с использованием гидрогелевых композиций на основе альгината натрия с диоксидином и лидокаином, системная антибактериальная терапия. У всех пациентов, за исключением больных, у которых сформировался везикоректальный свищ, наблюдалась положительная клиническая динамика, что подтверждалось данными цистоскопии [4].

В отношении примененных в настоящей работе компонентов фармпрепарата — геля АГДЛ можно отметить следующее:

- альгинат натрия представляет собой соль альгиновой кислоты — вязкого полисахарида, который извлекается из бурых водорослей или ламинарии японской; натрия альгинат ускоряет процесс заживления ран; соли альгиновой кислоты применяются в медицине, в частности, в связи со своими кровоостанавливающими свойствами — лечат кровоточащие раны; при местной аппликации они эффективно способствуют остановке кровотечений, устранению воспалительных реакций и ускорению процессов заживления;

- диоксидин — отечественный антибактериальный препарат широкого спектра действия из группы хиноксалина;

- лидокаина гидрохлорид — местно анестезирующее лекарственное средство, предназначенное для проведения терминальной, инфильтрационной и проводниковой анестезии; по химической структуре лидокаин относится к производным ацетанилида; обладает выраженным местноанестезирующим действием.

В дополнение к вышеперечисленным в состав геля АГДЛ входит гиалуроновая кислота, которая состоит из повторяющихся дисахаридов N-ацетилглюкозамина и глюкуроновой кислоты. Будучи компонентом всех тканей организма и весьма значимым элементом межклеточного матрикса, она является важной составляющей гликозаминогликанового уротелия мочевого пузыря и уретры. Этот уротелий, в свою очередь, защищает эпителий от раздражающих агентов [9]. К настоящему времени гиалуроновая кислота лицензирована для применения при интерстициальном цистите/болевым синдроме мочевого пузыря [6].

Таким образом, механизмы действия геля АГДЛ связаны с комплексом активностей компонентов, входящих в состав препарата в органе-мишени — гликозаминогликановом слое мочевого пузыря: анальгетическим, гемостатическим, репаративным. Компоненты геля АГДЛ способны проникать в уротелий и микроколонии патогенных бактерий (вызывающих воспаление), купировать болевой синдром и восстанавливать гликозаминогликановый слой мочевого пузыря, ускорять регенерацию слизистой мочевого пузыря [9, 20].

Вместе с тем в настоящей работе повышение эффективности лечения и снижение вероятности возникновения рецидивов, достигнутое за счет введения терапевтически активных препаратов в виде геля, было также обеспечено увеличением их адгезии к стенкам уротелия [1].

### Заключение

Фракционное облучение мочевого пузыря самок кроликов на стандартном линейном ускорителе фотонов (разовая доза за фракцию 6 Гр, ежедневно в течение 5 дней до суммарной очаговой дозы 30 Гр) позволяет адекватно имитировать ЛЦ, развивающийся у онкологических больных при облучении малого таза в процессе лучевой терапии. По сравнению с описанными в литературе, разработанная модель позволяет сократить сроки облучения и более быстро индуцировать ЛЦ.

Биодеградируемое лекарственное средство (гель АГДЛ) на основе природных полимеров, включающее соли альгиновой и гиалуроновой кислот, лидокаин и диоксидин, при внутривезикулярном введении в течение 2-х мес. оказывает выраженное лечебное действие на самок кроликов с ЛЦ. Применение АГДЛ геля уменьшает негативные клинические и лабораторные показатели в моче и крови, отражающие развитие цистита, как осложнения при лучевой терапии, и вызывает регрессию морфологических проявлений воспаления слизистой оболочки мочевого пузыря.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Коровина М.А., Олтаржевская Н.Д., Миркин Я.Б. и др. Способ лечения лучевого и интерстициального цистита. Пат. на изобретение. 2015; № 2557944 [Korovina M.A., Oltarzhenskaya ND, Mirkin Ya.B., Khlystova T.S. Method for the treatment of radiation and interstitial cystitis. Pat. for invention. 2015; No. 2557944 (In Russ.)].
2. Корытов О.В. Корытова Л.И., Беспалов В.Г. и др. Способ моделирования лучевого цистита. Пат. на изобретение. 2019; №2676431 [Korytov O.V., Korytova L.I., Bepalov V.G. et al. Method for modeling radiation cystitis. Pat. for invention. 2019; No. 2676431 (In Russ.)].
3. Миркин Я.Б., Хлыстова Т.С., Олтаржевская Н.Д. и др. Способ лечения цистита. Пат. на изобретение. 2014; № 2537031 [Mirkin Ya.B., Khlystova T.S., Oltarzhenskaya N.D. et al. Method for the treatment of cystitis. Pat. for invention. 2014; № 2537031 (In Russ.)].
4. Сычева И.В., Пасов В.В., Курпешева А.К. Консервативные методы лечения местных лучевых повреждений, сформировавшихся в результате сочетанной лучевой терапии и брахитерапии рака предстательной железы. Сиб. онкол. журнал. 2012; 5 (53):57-60 [Sycheva I.V., Pasov V.V., Kurpesheva A.K. Conservative treatment of local radiation-induced injuries caused by combined brachitherapy and external radiation therapy for prostate cancer. Siberian Oncol. J. 2012.5(53): 57-60 (In Russ.)].
5. Alesawi A.M., El-Hakim A., Zorn K.C., Saad F. Radiation-induced hemorrhagic cystitis. Curr. Opin. Support. Palliat Care. 2014; 8: 235-240. doi: 10.1097 / SPC.000000000000073.
6. Browne C., Davis N. F., Mac Craith E. et al. A narrative review on the pathophysiology and management for radiation cystitis. Adv. Urology. 2015; 2015: Article ID 346812. doi: 10.1155 / 2015/346812.
7. Delgado J.M., Samper P., Garrido J. Hyaluronic acid in the prevention of radiation-induced cystitis (Abstr.) Proc Am Soc Clin Oncol. 2003;22:752.
8. Denton A.S., Clarke N.W., Maher E.J. Non-surgical interventions for late radiation cystitis in patients who have received radical radiotherapy to the pelvis. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2002; 3: Article ID CD001773. doi: 10.1002 / 14651858.CD001773.
9. Gacci M., Saleh O., Giannesi C. et al. Bladder instillation therapy with hyaluronic acid and chondroitin sulfate improves symptoms of postradiation cystitis: Prospective pilot study. Clin Genitourin. Cancer. 2016; 14(5): 444-449. doi: 10.1016 / j.clgc.2016.01.016.
10. Jaal J., Dorr W. Radiation induced late damage to the barrier function of small blood vessels in mouse bladder. J. Urol. 2006; 176(6): 2696-2700. doi: 10.1016 / j.juro.2006.07.138.
11. Kohler M., Michael C., Zimmermann A. Histological changes after fractionated whole or partial irradiation of the rabbit urinary bladder. Acta Oncol. (Madr). 1995; 24: 199-204.
12. Lazzeri M. New horizons for GAG therapy in the management of urothelial damage. Urologia. 2015; 82(Suppl. 3):10-14. doi: 10.5301 / uro.5000146.
13. Mallick S., Madan R., Julka P.K. et al. Radiation induced cystitis and proctitis — prediction, assessment and management. Asian Pac. J. Cancer Prev. 2015; 16(14): 5589-5594. doi:10.7314 / apjcp.2015.16.14.5589.
14. Muhlstadt S., Mohammed N., Weigand K. et al. Radiogen bedingte Zystitis. Pathophysiologie und Therapie. Urologe A. 2017; 56: 301-305.

15. Pavlidakey P.G., MacLennan G.T. Radiation cystitis. *J. Urol.* 2009;182(3): 1172–1173. doi: 10.1016/j.juro.2009.06.034.
16. Rajagopathy B.R., Janicki J.J., Levanovich P. et al. Intravesical liposomal tacrolimus protects against radiation cystitis induced by 3-beam targeted bladder radiation. *J. Urol.* 2015; 194(2): 578-584. doi: 10.1016/j.juro.2015.03.108.
17. Rapariz-Gonzalez M., Castro-Diaz D., Mejia-Rendon D. Evaluation of the impact of urinary symptoms on quality of life of patients with painful bladder syndrome/chronic pelvic pain and radiation cystitis: EURCIS study. *Acta Urologica Espanolas.* 2014; 38(4):224-231. doi: 10.1016/j.acuro.2013.09.016.
18. Samper O.P.M., Lopez C.C., Rodriguez A. et al. Vesical instillations of hyaluronic acid to reduce the acute vesical toxicity caused by high-dose brachytherapy do not affect the survival: a five-year follow-up study. *Clin Transl Oncol.* 2009;11(12): 828-834. doi: 10.1007/s12094-009-0451-6.
19. Shao Y., Lu G.L., Shen Z.J. et al. Comparison of intravesical hyaluronic acid instillation and hyperbaric oxygen in the treatment of radiation-induced hemorrhagic cystitis. *BJU Int.* 2012; 109(5): 691-694. doi: 10.1111 / j.1464-410X.2011.10550x.
20. Sommariva M.L., Sandri S.D., Geriani V. Efficacy of sodium hyaluronate in the management of chemical and radiation cystitis. *Minerva Urol. Nefrol.* 2010; 62(2): 145-150.
21. Zwaans B.M., Chancellor M.D., Lamb I.E. Modeling and treatment of radiation cystitis. *Urology.* 2016;88(1): 14-21. doi:10.1016/ j.urol.2015.11.001.
22. Zwaans B.M.M., Krueger S., Bartolone S.N. et al. Modeling of radiation-induced cystitis in mice. *Adv. Radiat. Oncology.* 2016; 1(4): 333-343. doi: 10.1016 / j.adro.2016.07.004.

*O.V. Korytov<sup>1</sup>, S.D. Ivanov<sup>2</sup>, L.I. Korytova<sup>1</sup>,  
A.L. Semenov<sup>2</sup>, G.V. Tochilnikov<sup>2</sup>, I.N. Vasilyeva<sup>2</sup>,  
V.G. Bepalov<sup>2</sup>, A.R. Akhtemzyanov<sup>1</sup>*

### **Experimental therapy for rabbits with radiation cystitis**

*<sup>1</sup>A.M. Granov «Russian Research Centre for Radiology and Surgical Technologies»  
<sup>2</sup>N.N. Petrov National Medical Research Centre for Oncology,  
St. Petersburg*

Using a new model of the induction of radiation cystitis (RC) in rabbits, the treatment effectiveness of animals with intravesical administration of a biodegradable drug — a gel containing salts of alginic and hyaluronic acids, as well as dioxidine and lidocaine (AHDL) was assessed. The work was performed on female rabbits of the “Chinchilla” breed. Fractional irradiation of the rabbit urinary bladder was carried out by a linear photon accelerator: a single dose per fraction was 6 Gy administered daily for 5 days to a total focal dose of 30 Gy. As a result of irradiation of the bladder, the animals developed RC. AHDL-gel was injected intravesically using a catheter at a dose of 2500 mg / kg of body weight 3 times a day weekly for 2 months, starting from 1 month after irradiation. The drug had a pronounced therapeutic effect on the rabbits with RC: the values of clinical and laboratory indicators of cystitis in urea and blood were reduced, it was observed regression of morphological manifestations of inflammation in the bladder mucosa.

Key words: bladder, radiation cystitis, AGDL gel, intravesical administration

Поступила в редакцию 14.09.2020 г.

