

АЛЬ-ХАДЖ Набиль Кассем Мухамед

**ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ
ПРОЛОНГИРОВАННОЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ
ПРИ РАКЕ ПРЯМОЙ КИШКИ**

14.01.12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Ростов-на-Дону – 2020

РАБОТА ВЫПОЛНЕНА В ФЕДЕРАЛЬНОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ БЮДЖЕТНОМ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОМ УЧРЕЖДЕНИИ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОСТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Научный руководитель: доктор медицинских наук,
Снежко Александр Владимирович

Официальный оппонент: **Фролов Сергей Алексеевич** – доктор
медицинских наук, Федеральное государственное
бюджетное учреждение «Государственный научный
центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих»
Министерства здравоохранения Российской
Федерации, заместитель директора по научной работе

Гладышев Дмитрий Владимирович – доктор
медицинских наук, Санкт-Петербургское
государственное бюджетное учреждение
здравоохранения «Городская больница № 40
Курортного района», заместитель главного врача по
хирургии

Ведущая организация: Московский научно-исследовательский
онкологический институт имени П.А. Герцена –
филиал федерального государственного бюджетного
учреждения «Национальный медицинский
исследовательский центр радиологии» Министерства
здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___» _____ 2020 г. в ___ часов
на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций
Д.208.083.02 на базе федерального государственного бюджетного учреждения
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации (344037, г. Ростов-на-
Дону, 14 линия, 63).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте
www.mioi.ru федерального государственного бюджетного учреждения
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь совета по защите
докторских и кандидатских диссертаций,
доктор биологических наук, доцент

Дженкова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

В настоящее время лучевая терапия стала стандартом комбинированного лечения рака прямой кишки (Кит О.И., 2013; Кит О.И. и соавт., 2020). При этом из существующих видов лучевой терапии (пред- и послеоперационная) наибольшее признание и распространение получила именно предоперационная лучевая терапия (Кит О.И. и соавт., 2018). Так, в США с 2004 по 2011 гг. доля больных, получивших неoadъювантную лучевую терапию, повысилась с 57,0 до 75,0%, а доля больных, получивших послеоперационную лучевую терапию, наоборот, снизилась с 39,0 до 18,0% (Abrams M.J., 2016). Такие же тенденции отмечены в странах Европы и в России. Доказано, что неoadъювантная лучевая терапия позволяет снизить 5-летнюю частоту рецидивов при раке прямой кишки с 10,9 до 5,6% (Peeters K.C., Marijnen C.A., 2007, Ferrari L., 2015). В крупных рандомизированных исследованиях SRCSG и SRCT, помимо снижения частоты местных рецидивов, также выявлено увеличение на 10% безрецидивной и общей выживаемости больных (Stockholm Rectal Cancer Study Group, 1990; Swedish Rectal Cancer Trial, 1997). В литературе приводятся данные о том, что лучевая терапия может проявлять не только локальное, но и системное действие (Гладилина И.А., 2011; Кутилин Д.С. и соавт., 2019). В последнее время установлено, что степень регресса опухоли является прогностическим признаком эффективности лучевой терапии. Так, 3-летняя безрецидивная выживаемость при Dworak 4 составляет 95,0%, при Dworak 3 – 82,0%, при Dworak 2 – 64,0%, а при Dworak 1 – лишь 53,0% (McCoey M.J., 2015). Внедрение методик исследования циркулирующей ДНК позволяют оценивать степень регресса опухоли и на молекулярном уровне. В последнее время широко обсуждается роль цитокинов в отношении химио- и радиочувствительности злокачественных опухолей (Свириновский А.И., 2011; Di Maggio F.M. et al., 2015; Centurione L., Aiello F.B., 2016), а также позитивного эффекта применения иммуномодуляторов в ходе комбинированного и комплексного лечения онкологических заболеваний (Антушевич А.А. и соавт., 2013).

Широкое внедрение лучевой терапии требует патогенетических исследований для оптимизации ее применения, вследствие того, что в ряде

случаев отмечается относительная радиорезистентность опухолей прямой кишки к облучению, которая ограничивает эффективность применения данного метода. В связи с этим не вызывает сомнения, что для решения задач повышения эффективности лучевой терапии необходимо учитывать различные механизмы, влияющие на выживаемость раковых клеток после облучения: регулирование репарации радиационных повреждений и гибели клеток, действие на клеточный цикл, ингибирование опухолевого ангиогенеза (Новикова И.А. и соавт., 2020).

Таким образом, обследование больных раком прямой кишки на наличие у них факторов пролиферации, апоптоза, неоангиогенеза, а также исследования ряда иммунологических факторов позволило бы оптимизировать отбор для проведения эффективной неоадьювантной лучевой терапии, а также уточнить механизмы радиорезистентности при раке прямой кишки.

Степень разработанности темы

Ответ опухоли на неоадьювантное лучевое лечение необходимо прогнозировать для обеспечения продолжительной безрецидивной выживаемости (Ерыгин Д.В. и соавт., 2018). Известные на сегодняшний день молекулярно-генетические маркеры ответа опухоли на лучевое лечение (Алтыбаев С.Р. и соавт., 2016) можно разделить на несколько групп: 1) факторы регуляции пролиферативной активности, клеточного цикла и апоптоза; 2) эпидермальные, сосудистые факторы роста и факторы роста фибробластов; 3) показатели эпителиально-мезенхимального перехода и межклеточной адгезии; 4) тимидилатсинтазы (TS); 5) хемокины и хемокиновые рецепторы; 6) микросателитная нестабильность (MSI); 7) KRAS мутация.

Однако на сегодняшний день чувствительность и специфичность определения этих показателей у пациентов не позволяет предлагать их в качестве стандарта для клинического использования. На наш взгляд, необходима разработка новых диагностических методик, основанных на анализе клеточного состава опухоли. При этом определение распределения клеток в соответствии с фазами клеточного цикла в ходе проводимых курсов лучевой терапии и перед ее началом в сравнительном аспекте позволит проводить коррекцию тактики лечения в индивидуальном порядке, минимизируя риск развития раннего рецидива опухоли.

Цель исследования

Улучшение результатов лечения резектабельного местно-распространенного рака прямой кишки.

Поставленная цель достигалась решением следующих **задач**:

1. Изучить ДНК-цитометрические параметры опухоли (индекс ДНК, плоидность, пролиферативная активность) на диагностическом этапе, во время и после проведения лучевой терапии по поводу рака прямой кишки.
2. Изучить сравнительную характеристику клеточных (CD3+, CD4+, CD8+, CD4+CD25+CD127dim, CD19+, CD16/56+) и цитокиновых (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ) показателей системного и локального иммунитета в комплексном лечении рака прямой кишки.
3. Изучить лечебный патоморфоз в опухолях прямой кишки после неoadъювантного лучевого воздействия.
4. Разработать способ определения резистентности опухоли к проводимой лучевой терапии на основании ДНК-цитометрических параметров и доказать его эффективность.
5. Разработать способ определения срока выполнения хирургического вмешательства после предшествующей лучевой терапии у больных раком прямой кишки на основании ДНК-цитометрических параметров и доказать его эффективность.

Научная новизна исследования

Впервые на основании комплексного изучения иммунологических, ДНК-цитометрических характеристик опухоли и ее окружения изучена возможность прогнозирования эффективности предоперационной лучевой терапии у больных раком прямой кишки и выбраны его наиболее информативные критерии.

Впервые проведен сравнительный анализ динамики изменения показателей клеточного цикла диплоидных и анеуплоидных опухолей в сравнительном аспекте в ходе пролонгированной лучевой терапии.

Впервые на клиническом материале с помощью ДНК-цитометрии проведена оценка распределения клеток в соответствии с фазами клеточного цикла в ходе проводимых курсов лучевой терапии и перед ее началом в сравнительном аспекте.

Впервые дана оценка состояния локального иммунитета опухолей прямой кишки после проведения пролонгированного курса лучевой терапии.

Теоретическая и практическая значимость

Впервые на основании изученных параметров разработан способ прогнозирования эффективности пролонгированной лучевой терапии у больных раком прямой кишки, включающий исследование индекса пролиферации опухолевых клеток до начала и после 10 сеанса лучевой терапии (патент на изобретение №2639253 «Способ прогнозирования эффективности пролонгированной лучевой терапии при раке прямой кишки»).

Впервые на основании изученных параметров ДНК-цитометрии до начала курса пролонгированной лучевой терапии и через 4 недели после его окончания разработана методика определения оптимального срока выполнения оперативного вмешательства (патент на изобретение №2639392 «Способ определения оптимального срока выполнения оперативного вмешательства после пролонгированной лучевой терапии при раке прямой кишки»).

Методология и методы диссертационного исследования

Методологической основой диссертационной работы явилось последовательное применение методов научного познания. Работа выполнена в дизайне открытого сравнительного проспективного исследования с использованием анамнестических, общеклинических, лабораторных, статистических методов исследования.

Внедрение результатов исследования в практику здравоохранения

Результаты данного исследования используются в повседневной практике отделения лучевой терапии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Основное положение, выносимое на защиту

Определение в динамике комбинированного лечения резектабельного местнораспространенного рака прямой кишки показателей пролиферации клеток опухоли методом ДНК-цитометрии позволяет контролировать эффективность лучевой терапии и является средством персонализации.

Степень достоверности темы

Определяется достаточным количеством обследованных больных в процессе исследования, формированием сопоставимых групп сравнения, адекватными методами исследования, корректными методами статистической обработки. Сформированные в диссертации выводы, положение и практические рекомендации аргументированы и логически вытекают из системного анализа результатов выполненных исследований.

Публикации

Материалы исследования опубликованы в 5 печатных работах, из них 2 – в изданиях, рецензируемых ВАК при Минобрнауки России, получено 2 патента на изобретение по теме исследования.

Объем и структура научного доклада (диссертации)

Диссертационная работа изложена на 115 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, характеристики материала и методов, 3 глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 136 источников, из них 33 отечественных и 103 зарубежных. Работа иллюстрирована 31 рисунком и 28 таблицами.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют пункту 2 «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)» паспорта специальности 14.01.12-«онкология».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика материала и методов исследования

В исследование были включены 60 больных раком прямой кишки, проходившие лечение в клиниках ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России. Когорта больных была разделена на 2 группы: основную и контрольную. Всем больным проводили курс пролонгированной лучевой терапии (разовая очаговая доза 1,8–2 Гр, суммарная очаговая доза 50–54 Гр на первичную опухоль и 46–50 Гр на зону регионального метастазирования с модуляцией интенсивности

пучка излучения на линейном ускорителе 6 мэВ фирмы Varian). До начала курса пролонгированной лучевой терапии и после 10 сеанса лучевой терапии больным выполняли ректороманоскопию или фиброколоноскопию для взятия биопсийного материала опухоли. Далее проводился ДНК-цитометрический тест. При снижении индекса пролиферации в 1,5 раза и более прогнозировалась эффективность проводимой лучевой терапии, сеансы ее продолжали в полном объеме, таких больных относили к основной группе. При снижении индекса пролиферации опухоли менее чем в 1,5 раза прогнозировалась недостаточная эффективность лучевой терапии. Данные пациенты были определены в контрольную группу.

В основной группе через 4 недели после окончания курса предоперационной пролонгированной лучевой терапии повторяли ДНК-цитометрический анализ и определяли индекс пролиферации опухоли. Отличие индексов пролиферации в 1,3 раза и менее являлось показанием для окончания перерыва в лечении и выполнения операции (подгруппа 1). Отличие индексов пролиферации более чем в 1,3 раза являлось показанием для продления перерыва в лечении и выполнения операции через 6–8 недель после окончания курса лучевой терапии (подгруппа 2) (рисунок 1).

После проведения курса лучевой терапии всем пациентам обеих групп выполнялись передневерхние резекции прямой кишки открытым (в основной группе 12 больных, в контрольной – 14) либо лапароскопическим (в основной группе 18 больных, в контрольной – 16) способами с формированием анастомоза «конец – в бок» с помощью циркулярного сшивающего аппарата. Для профилактики развития несостоятельности анастомоза всем больным накладывалась превентивная илеостома.

Послеоперационной летальности в контрольной и основной группах не наблюдалось. Характер послеоперационных осложнений представлен в таблице 1. Поскольку послеоперационные осложнения не привели к летальным исходам, они не повлияли на отдаленную выживаемость. Достоверных различий в частоте развития осложнений в основной и контрольной группах не было. В связи с тем, что эти осложнения были единичными, и они не влияли на отдаленные результаты лечения, подробный анализ причин их развития не проводился.

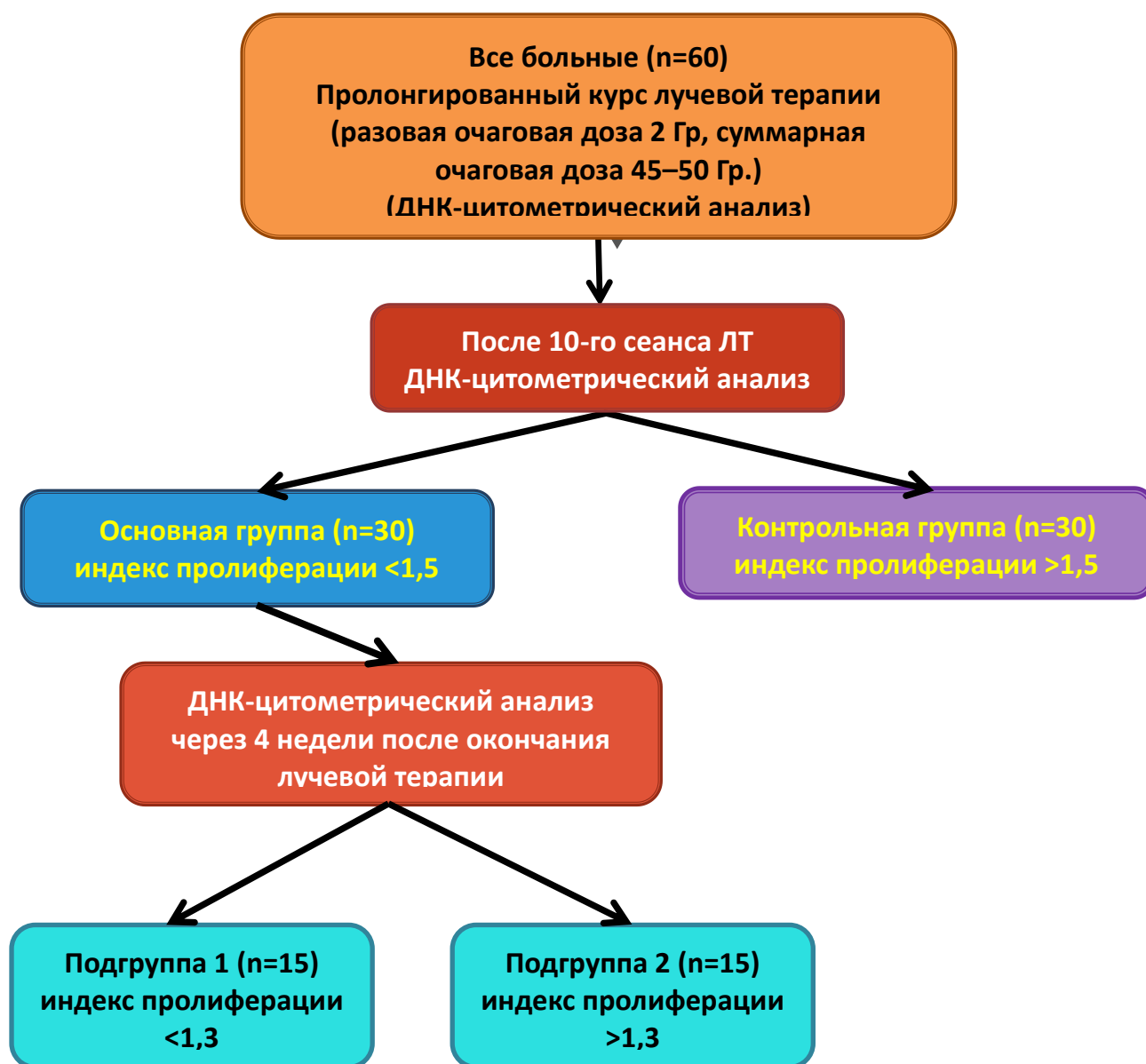


Рисунок 1. Распределение больных в зависимости от группы исследования

Таблица 1 – Структура послеоперационных осложнений у больных исследуемых групп

Показатель	Основная группа, n=30		Контрольная группа, n=30	
	абс. ч.	%	абс. ч.	%
Пневмония	2	6,67	3	10
Тромбозы глубоких вен	1	3,33	2	6,67
Инфекционные раневые осложнения в месте вмешательства	4	13,33	5	16,67
Острая ранняя спаечная кишечная непроходимость	1	3,33	0	-
Внутрибрюшное кровотечение	0	-	1	3,33
Перитонит, связанный с несостоятельностью анастомозов	3	10	2	6,67
Релапаротомия	1	3,33	1	3,33

Общая и бессобытийная выживаемость изучена у всех 60 больных с местно-распространенными формами рака прямой кишки T₃₋₄N₀₋₂M₀ основной и контрольной группы.

Объектом исследования являлись: ткань опухоли прямой кишки, неизменная слизистая оболочка кишки в зоне предполагаемой линии резекции, периферическая кровь больных резектабельным раком прямой кишки на этапе до начала проведения лучевой терапии, в ходе лучевой терапии и после оперативного вмешательства.

В крови и ткани больных данной группы были исследованы иммунологические, морфологические и ДНК-цитометрические параметры.

Критерии включения пациентов в исследование:

1. Местнораспространенный рак средне- и нижеампулярного отделов прямой кишки II–III стадий при выполнении хирургического пособия с формированием колоректального анастомоза.
2. Отсутствие осложнений в ходе проведения предоперационной лучевой терапии.
3. Добровольное письменное согласие пациента на участие в исследовании и передачу биологического материала для его выполнения.
4. Возраст – старше 18 лет.
5. Отсутствие декомпенсации коморбидной патологии.
6. Возможность контроля за состоянием здоровья пациента после окончания лечения.

Критерии исключения пациентов из исследования:

1. Развитие осложнений в ходе лучевого лечения.
2. Невозможность завершить программу лечения в полном объеме (отказ пациента от хирургического лечения либо невозможность его выполнения по иным показаниям в установленные сроки).
3. Отзыв пациентом согласия на участие в исследовании.
4. Невозможность забора биологического материала в ходе исследования.

В таблице 2 показано распределение больных по полу в основной и контрольной группах исследования, из которой следует, что в основной группе исследования преобладали мужчины (57%), как и в контрольной группе (63%).

Таблица 2 – Распределение больных в группах исследования по полу

Группа исследования	Женщины		Мужчины	
	абс. ч.	%	абс. ч.	%
Основная (n=30)	13	43	17	57
Контрольная (n=30)	11	37	19	63

Большинство пациентов в обеих группах находилось в возрасте 60 лет и старше, некоторые наблюдаемые возрастные расхождения пациентов в одной и другой группах были не существенными.

В таблице 3 продемонстрировано распределение больных по возрасту в основной и контрольной группе.

Таблица 3 – Распределение больных в группах исследования по возрасту

Возраст больных, лет	Основная группа (n=30)		Контрольная группа (n=30)	
	абс. ч.	%	абс. ч.	%
30–39	7	24	5	17
40–49	3	10	6	20
50–59	4	13	3	10
60 и старше	16	53	16	53

По данным результатов морфологических исследований удаленного опухолевого материала, было выявлено, что у всех больных имела место аденокарцинома различной степени дифференцировки. В обеих исследованных группах преобладали пациенты с G3 аденокарциномой (таблица 4).

Таблица 4 – Распределение больных в группах исследования по верификации онкологического процесса

Гистологическая верификация рака прямой кишки	Основная группа (n=30)		Контрольная группа (n=30)	
	абс. ч.	%	абс. ч.	%
G 1 аденокарцинома	3	10	2	7
G 2 аденокарцинома	6	20	10	33
G 3 аденокарцинома	21	70	18	60
ВСЕГО	30	100	30	100

Для определения стадии заболевания у больных исследуемой группы использовалось 8-е издание Международной классификации злокачественных

опухолей по системе TNM (разработанной европейской организацией Union Internationale Contre Cancer), в редакции 2018 года, где параметр Т характеризует первичную опухоль, N – метастазирование в региональные лимфатические узлы, M – наличие отдалённого метастазирования.

Пациенты как основной, так и контрольной групп находились во II и III стадиях онкологического процесса. Больные основной группы по TNM классификации разделились следующим образом: большинству пациентов было присвоено T3-N1c-M0 (40%), одинаковое количество людей с T3-N2b-M0 и T3-N2a-M0 – по 20%. Распределение по T3-N0-M0 составило 13%, и всего 2 случая отнесли к T4-N2b-M0 (6%). В контрольной группе больные по TNM распределились практически поровну. Так, наблюдалось 30% с T3-N2b-M0, 27% с T3-N1c-M0, пациентов с T3-N2a-M0 было 23%, а также 20% больных с T3-N0-M0 (таблица 5).

Таблица 5 – Распределение больных в исследуемых группах по TNM классификации рака прямой кишки

TNM	Основная группа		Контрольная группа	
	абс. ч.	%	абс. ч.	%
T3-N2b-M0 IIIc	6	20	9	30
T3-N2a-M0 IIIb	6	20	7	23
T3-N0-M0 IIa	4	13	6	20
T3-N1c-M0 IIIb	12	40	8	27
T4-N2b-M0 IIIc	2	6	0	0
Всего	30	100	30	100

Для анализа результатов иммунологического исследования нами использовались данные иммунограмм здоровых лиц (30 человек). В качестве доноров выступали сотрудники института, подписавшие добровольное согласие на участие в исследовании.

Статистическая обработка полученных данных проводилась на персональном компьютере типа IBMPC/AT с использованием электронных таблиц Excel 2003 и пакета прикладных программ Statistica 6,0 (Боровиков В.П., 2001). В ходе описательной статистики проверялось соответствие изучаемых данных нормальному распределению по критерию Колмогорова-Смирнова. При сравнении групп согласно критерию Левена

проверялось равенство дисперсий в сравниваемых группах. В случае положительного решения этих двух проблем для определения значимости статистических различий количественных показателей в сформированных группах применялся t-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение параметров клеточного цикла опухолей прямой кишки выявило преобладание анеуплоидных опухолей с некоторым снижением их доли после 10 сеанса лучевой терапии. По окончании проведения 10 сеанса пролонгированной лучевой терапии показано снижение темпов деления клеток анеуплоидных опухолей в 1,3 раза в сравнении с параметрами опухоли до начала терапии. Это подтверждается содержанием клеток в S-фазе клеточного цикла, где таких в анеуплоидных опухолях по окончании 10 сеанса лучевой терапии выявлено $14,8 \pm 1,2\%$, тогда как до начала терапии – $19,5 \pm 1,7\%$. Разница показателей достоверна по отношению к параметрам опухолей до начала терапии ($p \leq 0,05$). Доля диплоидных клеток в фазе синтеза ДНК после окончания 10 сеанса пролонгированной лучевой терапии также была в 1,4 раза меньше, чем до начала проведения терапии (разница показателей достоверна по отношению к параметрам опухоли до начала терапии, $p \leq 0,05$).

Оценка индекса ДНК до начала терапии и по завершению 10 сеанса показала отсутствие опухолей с индексом ДНК меньше 1,0. На обоих этапах исследования встречались опухоли с индексом ДНК от 1,1 до 1,9. При этом средние значения этого показателя до начала терапии составляли $1,5 \pm 0,2$, тогда как после проведения 10 сеанса лучевой терапии для анеуплоидных опухолей этот показатель был несколько ниже и составил $1,3 \pm 0,1$. После проведения 10 сеанса лучевой терапии отмечено повышение опухолей с индексом ДНК до 1,5 (56,7% до начала терапии в сравнении с 83,7% после 10 сеанса). При этом опухолей с индексом ДНК свыше 1,5 до начала терапии выявлено больше, чем после окончания 10 сеанса лучевой терапии (43,1 против 16,3%).

ДНК-цитометрическое исследование опухолевой ткани больных раком прямой кишки до начала проведения пролонгированного курса лучевой терапии и через 4 недели после ее окончания в основной группе показало снижение доли клеток в G2+M-фазе клеточного цикла и темпов пролиферации опухоли в 1,8 и 2,2 раза, соответственно, после ее окончания. При этом доля

клеток в G0/G1-фазе клеточного цикла после окончания лучевой терапии незначительно превосходила аналогичный показатель до начала терапии.

Пролиферативная активность, определяемая по индексу пролиферации (ИП) – сумме клеток, находящихся в синтетической и постсинтетической фазах цикла и митозе, т.е. S+G2+M, играет важную роль в механизмах трансформации нормальных клеток в злокачественные, а также определяет биологическое поведение уже возникшей опухоли. При анализе данного показателя выявлено снижение пролиферативной активности после окончания 10 сеанса лучевой терапии. Были установлены достоверно значимые отличия индекса пролиферации опухоли до начала пролонгированной лучевой терапии и через 4 недели после ее окончания. Так, по окончании терапии ИП в 2,1 раза снижался в сравнении с показателем до проведения терапии, с $12,6 \pm 2,4$ до $6,1 \pm 1,4$ (разница показателей достоверна по отношению к параметрам опухоли до начала терапии ($p \leq 0,05$)).

На основе полученных данных разработан способ прогнозирования эффективности пролонгированной лучевой терапии у больных раком прямой кишки, включающий исследование индекса пролиферации опухолевых клеток до начала и после 10 сеанса лучевой терапии. При снижении индекса пролиферации в 1,5 и более раз прогнозируют эффективность проводимой лучевой терапии, сеансы ее продолжают в полном объеме. При снижении ИП менее чем в 1,5 раза прогнозируют недостаточную эффективность лучевой терапии (патент на изобретение №2639253 «Способ прогнозирования эффективности пролонгированной лучевой терапии при раке прямой кишки»).

Результатом первого этапа исследования явилось формирование основной группы ($n=30$), в которой снижение ИП выявлено в 1,5 раза и больше, и контрольной группы ($n=30$) при снижении ИП менее чем в 1,5 раза.

В настоящее время клиническими рекомендациями определены сроки оперативного вмешательства после окончания предоперационной пролонгированной лучевой терапии в 6–8 недель, однако существует необходимость их патогенетически обоснованной оптимизации.

Нами были установлены параметры клеточного цикла, позволяющие определить оптимальный срок оперативного вмешательства. Так, при отличии индекса пролиферации опухоли в 1,3 раза и менее до начала курса

продолжительной лучевой терапии и через 4 недели после его окончания, показано возобновление пролиферативной активности и роста опухоли, что является основанием для окончания перерыва в лечении и выполнения следующего этапа – операции; при отличии индексов пролиферации более чем в 1,3 раза, определяется снижение пролиферативной активности опухоли, что является показанием для продления перерыва в лечении и выполнения оперативного вмешательства через 6–8 недель после окончания курса лучевой терапии (патент на изобретение №2639392 «Способ определения оптимального срока выполнения оперативного вмешательства после продолжительной лучевой терапии при раке прямой кишки»). Применение данного способа позволяет определить оптимальный срок выполнения операции после окончания курса лучевой терапии, индивидуализировать тактику лечения, а также определить биологическое поведение опухоли.

Проведенный нами детальный анализ результатов морфологического исследования показал, что степень лучевого воздействия на опухоль характеризовалась развитием очагов дистрофических изменений, степень которых колебалась в интервале от 50,0 до 70,7% площади исследованного материала. Площадь некроза в основной группе составила $38,5 \pm 4,2\%$, а в контроле – $31,1 \pm 4,2\%$. У большинства больных отмечался лечебный патоморфоз III степени, который был выявлен у 76,7% больных контрольной группы и 96,7% – основной.

Оценка степени ответа опухоли на лечение проводилась с использованием классификации А.М. Mandard et al. (1994). У большинства больных отмечалась II степень регрессии опухоли (76,7% больных в контрольной и 96,7% в основной группе).

Динамика показателей клеточного иммунитета в крови у больных сравниваемых групп была разнонаправленной. В частности, у больных контрольной группы, у которых лучевая терапия не продемонстрировала эффекта, отмечено статистически достоверное снижение процентного содержания общего количества Т-лимфоцитов (CD3+) и их основных субпопуляций (CD3+CD4+ и CD3+CD8+ клеток); при этом наблюдалось повышение уровня В-лимфоцитов (CD19+), а процент НК-клеток и Т-regs не менялся по сравнению с исходными показателями. Напротив, у больных

подгруппы 2, развивалось повышение уровня NK-клеток, а содержание основных показателей Т-клеточного звена (CD3+, CD3+CD4+ и CD3+CD8+ клеток) было статистически достоверно выше, чем у больных вышеописанной подгруппы (для всех показателей $p < 0,05$).

В ткани опухоли у больных сравниваемых групп были отмечены некоторые различия по содержанию лимфоцитов исследованных субпопуляций. Проведение лучевой терапии способствовало статистически значимому повышению локального уровня Т-лимфоцитов по сравнению с исходным фоном у больных обеих подгрупп. При этом у больных контрольной группы установлен более низкий по сравнению с исходным показателем уровень NK-клеток. Больные основной группы характеризовались иным характером изменений локального иммунитета, а именно, у них выявлено повышение уровней CD3+CD4+, CD3+CD8+ клеток и снижение CD19+; уровни DN-клеток были ниже, а CD3+CD4+ выше, чем в группе, получавшей лечение 4 недели.

Итак, сопоставление динамики клеточных факторов системного и локального иммунитета у больных раком прямой кишки после неoadьювантного лучевого лечения показало его преимущество у больных основной группы в сравнении с больными контрольной группы.

Содержание исследованных цитокинов у больных сравниваемых групп было разнонаправленным. Так, проведение лечения у больных контрольной группы вызывало повышение локального уровня по сравнению с исходным IL-1 β в 1,3 раза, IL-6 в 4,7 раза, IL-8 – в 3,6 раза, IL-10 – в 1,1 раз, а IFN γ – в 2,1 раза; при этом уровень IL-2 снизился в 4,5 раза. Статистически значимыми оказались различия только по содержанию IL-6, IL-8 (возрастание) и IL-2 (снижение). Наблюдались статистически достоверные различия между сравниваемыми группами после окончания лечения по содержанию большинства исследованных цитокинов: IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IFN γ . Количество IL-1 β , IL-6 и IL-10 было ниже, особенно значительно (в 16,3 раз) для IL-6, а IL-2 и IFN γ – выше в опухолях больных основной группы, что говорит об их более благоприятном локальном цитокиновом статусе.

Итак, у больных основной группы снижение пролиферативной активности опухоли, установленное методом ДНК-цитометрии, после

окончания курса пролонгированной лучевой терапии обеспечивает развитие на этом фоне более благоприятного микроокружения опухоли, иммунологического и цитокинового. У этих больных происходило повышение 4-х параметров, все из которых относятся к Т-клеточному звену, и снижение 4-х (уровня В-клеток и провоспалительных цитокинов), а у больных контрольной группы отмечено повышение 3-х и снижение 3-х параметров. В последнем случае происходит снижение локальных уровней CD16/56+, IL-2 и IFN γ , что, по всей видимости, связано с угнетением звена, обеспечивающего врожденную цитотоксичность и, таким образом, показана благоприятная иммунологическая динамика, включая системные и локальные клеточные и цитокиновые факторы, у больных с позитивными морфологическими и ДНК-цитометрическими изменениями в опухоли.

Общая и бессобытийная выживаемость изучена у 60 больных с местнораспространенными формами РПК T₃₋₄N₀₋₂M₀. Среди всех 60 больных за три года наблюдения число летальных исходов было 16 (26,7%). Выживаемость составила 73,3% (n=44). Трехлетняя выживаемость в 1 подгруппе составила 80%, во 2 подгруппе 73,3%, в основной группе в целом 76,7%, в контрольной группе 70%. В основной группе через 3 года после операции умерли 7 (23,3%) пациентов, а в контрольной группе 9 (30%) человек.

В основной группе выживаемость пациентов, начиная с 17 и до 30 мес. наблюдения была выше, чем в контрольной группе. Сравнительный анализ общей выживаемости с применением log-Rank теста и критерия Gehan позволил установить тенденцию повышения показателя в основной группе (p=0,09). Медиана общей выживаемости в основной группе составила 30 мес., а в контрольной группе 27,2 мес. В среднем период продолжительности между операцией и летальным исходом в основной группе составил 28,9 $\pm$ 1,37 мес., а в контрольной группе этот временной параметр был короче – 25,2 $\pm$ 1,5 мес.

Следующим этапом оценивали общую выживаемости больных РПК 1-й и 2-й подгрупп основной группы. В 1-й подгруппе через 3 года после операции умерли 3 (20%), а во 2-й подгруппе – 4 (26,7%) пациентов. В 1-й и 2-й подгруппах различия общей выживаемости отсутствовали как по критерию log-Rank теста (p=0,078), так и по тесту Gehan (p=0,72). Медиана общей

выживаемости в 1-й и 2-й подгруппах составила 30 мес. В среднем период продолжительности между операцией и летальным исходом составил в 1-й подгруппе $30,1 \pm 1,7$ мес., а во 2-й подгруппе данный временной параметр был продолжительнее – $32,3 \pm 1,6$ мес. (рисунок 2).

Таким образом, высокая эффективность неоадьювантной лучевой терапии, снижение пролиферативного потенциала опухолевых клеток, ограничение объема и снижение размеров опухоли в основной группе сопровождалось благоприятной тенденцией к повышению выживаемости пациентов с РПК по сравнению с контрольной группой.

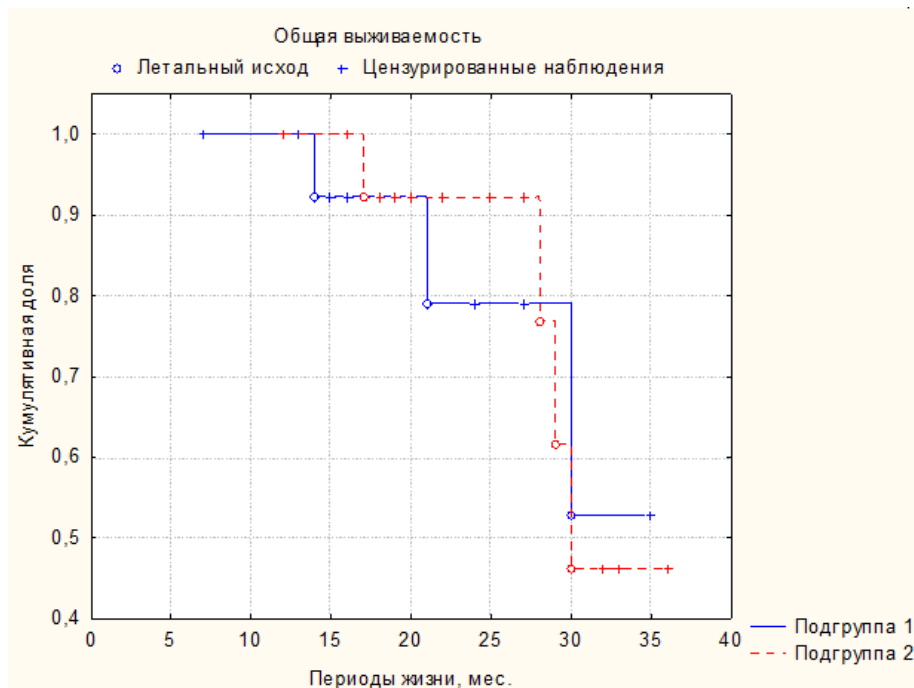


Рисунок 2. Кривые Каплана-Мейера общей выживаемости больных раком прямой кишки 1-й и 2-й подгрупп основной группы

Тенденция к различию общей выживаемости между основной и контрольной группой была обусловлена повышением выживаемости именно во 2 подгруппе. Высокая эффективность лучевой терапии, выраженный опухолевый ответ, выдержанный период перерыва, необходимый для сокращения в объеме ткани опухоли после лучевого воздействия, привел к повышению радикальности хирургического лечения во 2 подгруппе. Следовательно, тактика комбинированного лечения больных местно-распространенным РПК была наиболее эффективной во 2 подгруппе.

Изучение сопряжения между продолжительностью и эффективностью неоадьювантной лучевой терапии и числом рецидивов у больных РПК

основной и контрольной групп показало отсутствие статистической значимости.

Кумулятивная доля бессобытийной выживаемости после операции, определенная по методу построения таблиц времен жизни, снижалась с высоким градиентом, что свидетельствовало о постоянном накоплении числа пациентов с рецидивом заболевания. Через 21,8 мес. после операции бессобытийная выживаемость достигла 0,38 и мало изменялась.

Кумулятивная доля появления рецидивов и летальных исходов плавно накапливалась, бессобытийная выживаемость снижалась практически до 0,35 за 20 мес. после операции. Медиана бессобытийной выживаемости составила 18 мес., нижний квартиль – 14,1 мес., а верхний квартиль 29,3 мес. В среднем период от проведения операции до появления негативного события у больных с местно-распространенным РПК в целом по группе составил $17,2 \pm 1,2$ мес. (рисунок 3).

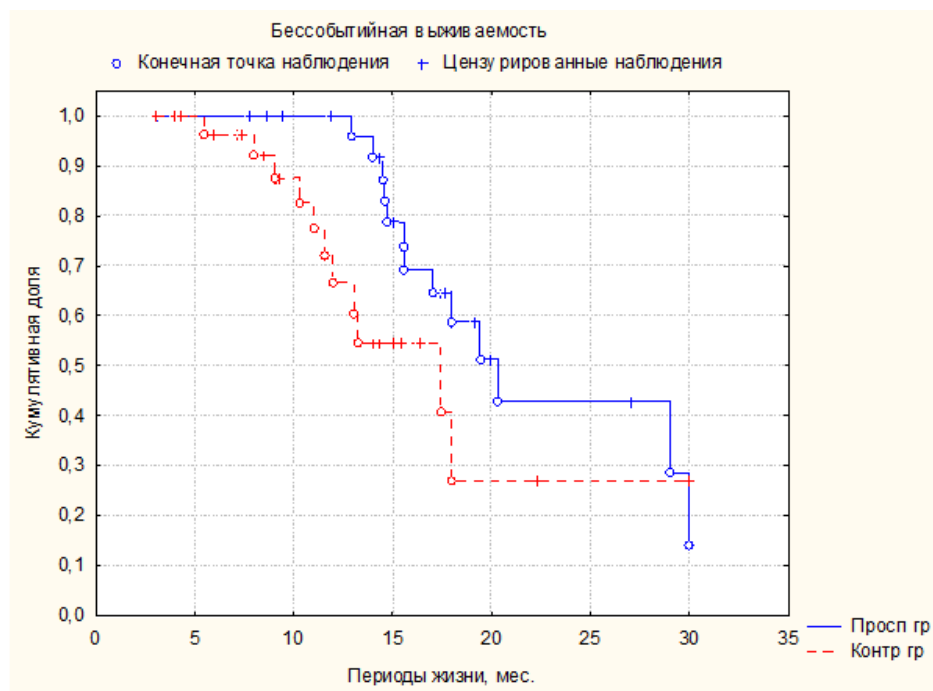


Рисунок 3. Кривые Каплана-Мейера бессобытийной выживаемости больных раком прямой кишки основной и контрольной группы

В основной группе бессобытийная выживаемость была выше по сравнению с контрольной группой. Особенно выраженным это различие было между 10 и 15 мес. наблюдения. После 15 мес. кривые Каплана-Мейера бессобытийной выживаемости больных РПК основной и контрольной группы практически стали параллельными.

Сравнительный анализ бессобытийной выживаемости с применением log-Rank теста позволил установить статистически значимое отличие между показателями ($p=0,01$). Медиана бессобытийной выживаемости в основной группе составила 20,9 мес., а в контрольной группе – 18,3 мес. В среднем период продолжительности между операцией и развитием рецидива, летального исхода в основной группе составил $19,8 \pm 1,2$ мес., а в контрольной группе этот временной параметр был короче – $16,4 \pm 1,1$ мес.

Наиболее благоприятная динамика бессобытийной выживаемости складывалась во 2 подгруппе, а наименее благоприятная – в контрольной группе. Проведение сравнительного анализа между группами по log-Rank тесту позволило установить статистически значимое различие между 2 подгруппой и контрольной группой ($p=0,02$).

В последнее время введение стандартов в работу практических врачей во многом упростило задачу получения положительных результатов в лечении больных раком прямой кишки. Стандарт четко определяет критерии назначения лучевой терапии в зависимости от распространенности опухоли и наличия метастазов в лимфоузлах, а также сроки выполнения операции после окончания курса неoadъювантного лечения. На первый взгляд все ясно. Есть четкие критерии, должны быть получены ожидаемые результаты. Однако на практике не все так однозначно. В одних случаях результаты, действительно, обнадеживают, в других – регресса опухоли не происходит, бессобытийная выживаемость остается низкой. В связи с этим в своем исследовании мы попытались разработать критерии, основанные на биологии опухолевых клеток (ДНК-цитометрия), позволяющие контролировать этапы неoadъювантного лечения. Выделение страты больных, у которых лучевая терапия должным образом не влияет на опухолевый рост, позволит во время изменить программу лечения. И здесь возникает два возможных пути последующего воздействия на опухоль: курсы неoadъювантной химиотерапии с последующим оперативным лечением, что, с нашей точки зрения, более выигрышно, либо сразу хирургическое лечение.

Чем можно объяснить неэффективность лучевой терапии? Здесь следует обратиться к результатам иммунологического исследования, особенно в части локального иммунитета. Состояние цитокинового статуса в основной группе

подтверждает наше предположение.

Индивидуализация в лечении пациентов раком прямой кишки должна затрагивать и сроки выполнения оперативного лечения после эффективного неoadъювантного лучевого воздействия. Здесь также следует основываться на ДНК-цитометрических параметрах, которые, с нашей точки зрения, наиболее точны в определении протекающих в опухоли процессах лучевого патоморфоза. Назначение сроков оперативного лечения, таким образом, становится более понятным, зависящим от конкретных критериев.

Таким образом, разработанная технология контроля эффективности проведения комбинированного лечения РПК с помощью оценки результативности неoadъювантной лучевой терапии с помощью ДНК-цитометрических параметров, оказался перспективным. Ограниченное количество больных в исследовании привело к применению специальных методов оценки событийной вероятности. Метод исследования общей и бессобытийной выживаемости с применением log-rank теста оказался более чувствительным при выявлении различий между группами и позволил доказать эффективность разработанного способа определения тактики лечения больных раком прямой кишки.

ВЫВОДЫ

1. После десяти сеансов лучевой терапии по поводу рака прямой кишки отмечено повышение числа опухолей с индексом ДНК до 1,5 (56,7% до начала терапии в сравнении с 83,7% после десятого сеанса). При этом опухолей с индексом ДНК свыше 1,5 до начала терапии выявлено в 2,6 раза больше, чем после окончания десятого сеанса лечения (43,1 против 16,3%). Наименьшая скорость пролиферации среди диплоидных опухолей выявлена после окончания десятого сеанса пролонгированной лучевой терапии, где доля клеток в фазе синтеза ДНК была в 1,4 раза меньше, чем до начала ее проведения ($p \leq 0,05$).

2. Динамика показателей клеточного иммунитета в крови у больных сравниваемых групп после лучевого лечения была не однонаправленной: в основной группе повышался уровень НК-клеток, а содержание Т-лимфоцитов (CD3+, CD4+ и CD8+) было выше, чем у больных контрольной группы, в которой происходило снижение процентного содержания Т-клеток данных субпопуляций на фоне повышения уровня В(CD19+)-лимфоцитов (для всех

показателей $p < 0,05$). Локальные уровни CD3+, CD4+ и CD8+ клеток были выше у больных основной группы в 1,4 раза по сравнению с контрольной ($p < 0,05$).

3. Тканевые уровни цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-8 и IL-10 были ниже у больных основной группы в 2,2, 16,3, 2,3, 3,1 раза соответственно, а уровни IL-2 и IFN γ – выше в 3,2 и 2,5 раз соответственно, что говорит о более благоприятном цитокиновом микроокружении опухоли после лучевой терапии у больных основной группы.

4. Морфологическое исследование удаленных во время операции опухолей показало, что изменения в опухолях прямой кишки в результате лучевого воздействия характеризовались развитием участков дистрофических изменений, площадь которых достигала 70,7% исследованного материала. В среднем площадь некроза в основной группе больных составила $38,5 \pm 4,2\%$, в контрольной – $30,1 \pm 4,2\%$, при этом ответ опухоли на терапию TRG2 по A. Mandard в основной группе был выявлен у 96,7%, а в контрольной группе – у 76,7% больных.

5. Сравнительный анализ бессобытийной выживаемости с применением log-Rank теста позволил установить статистически значимое отличие между показателями ($p = 0,01$). Медиана бессобытийной выживаемости в основной группе составила 20,9 мес., а в контрольной группе 18,3 мес. В среднем период продолжительности между операцией и развитием рецидива и(или) летального исхода в основной группе составил $19,8 \pm 1,2$ мес., а в контрольной группе этот временной параметр был короче – $16,4 \pm 1,1$ мес. Показатели выживаемости доказывают, что снижение индекса пролиферации в 1,5 и более раз (до начала и после десятого сеанса облучения) прогнозирует эффективность проводимой лучевой терапии.

6. Выявлена тенденция повышения бессобытийной выживаемости во 2-й подгруппе основной группы (тест Gehan, $p = 0,09$). Медиана бессобытийной выживаемости в 1-й подгруппе составила 16,5 мес., а во 2-й – 27,7 мес. В среднем период между операцией и развитием рецидива и(или) летального исхода составил в 1-й подгруппе основной группы $15,4 \pm 1,3$ мес., а во 2-й – $25,2 \pm 1,1$ мес. Таким образом, выявленный нами прогностический признак – отличие индекса пролиферации опухоли в 1,3 раза и менее до начала курса пролонгированной лучевой терапии и через 4 недели после его окончания

действительно является неблагоприятным прогностическим фактором и свидетельствует о сохраняющейся пролиферативной активности в облученной опухоли.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для оценки ответа опухоли на неоадьювантное лучевое лечение рекомендуем использовать метод проточной цитометрии:

- отличие индекса пролиферации опухоли в 1,3 раза и менее до начала курса предоперационной пролонгированной лучевой терапии и через 4 недели после его окончания является неблагоприятным прогностическим признаком и основанием для окончания перерыва и выполнения операции;
- снижение индекса пролиферации опухоли в 1,5 и более раз на 10-й день после начала облучения по сравнению с исходным прогнозирует эффективность проводимой лучевой терапии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Комбинированное лечение рака прямой кишки с использованием предоперационной лучевой терапии / О.И. Кит, Е.Н. Колесников, А.Ю. Максимов, А.В. Снежко, А.Б. Сагакянц, Н.К.М. Аль-хадж, М.А. Аверкин, Е.Ю. Златник, А.О. Ситковская // Современные проблемы науки и образования. 25.06.2018 № 4 URL <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=27675>
2. Пат. 2639253 Российская Федерация, МПК G01N. Способ прогнозирования эффективности пролонгированной лучевой терапии при раке прямой кишки [текст] / Кит О.И., Геворкян Ю.А., Солдаткина Н.В. Новикова И.А., Гусарева М.А., Петров Д.С., Донцов В.А., Снежко А.В., Каймакчи Д.О. Аль-Хадж Н.К.М. заявитель и патентообладатель ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU). - №2016152780; заявл. 30.12.2016; опубл. 20.12.2017, Бюл. №35.
3. Пат. 2639392 Российская Федерация, МПК G01N, A61N. Способ определения оптимального срока выполнения оперативного вмешательства после пролонгированной лучевой терапии при раке прямой кишки [текст] / Кит О.И., Геворкян Ю.А., Солдаткина Н.В., Новикова И.А., Гусарева М.А., Петров Д.С., Снежко А.В., Каймакчи Д.О.

Аль-Хадж Н.К.М. заявитель и патентообладатель **ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU).** - №2016152781; заявл. 30.12.2016; опубл. 21.12.2017, Бюл. №36.

4. Дифференцированный подход к проведению пролонгированной неoadьювантной химиолучевой терапии в комбинированном лечении рака прямой кишки / О.И. Кит, Н.В. Солдаткина, И.А. Новикова, М.А. Гусарева, Н.К.М. Аль-хадж, А.В. Снежко, М.А. Аверкин // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2020. – Т.15, №1. – С. 91-93.

5. Factors of local immunity in patients with rectal cancer after prolonged radiotherapy / O.I. Kit, A.V. Snezhko, E.Yu. Zlatnik, I.A. Novikova, N. Al-haj et al. // J. Clin. Oncol. 2019. 37, (suppl; abstr e 15164).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

KPP	– колоректальный рак
РПК	– рак прямой кишки
ФКС	– фиброколоноскопия
ИЛ (IL)	– интерлейкин
CD	– кластер дифференцировки лимфоцитов
ИДНК	– индекс ДНК
ИП	– индекс пролиферации
TRG	– степень регрессии опухоли
T regs	– Т-регуляторные лимфоциты
NK	– натуральные киллеры
IFN	– интерферон
SRCSG	– Stockholm Rectal Cancer Study Group, 1990
SRCT	– Swedish Rectal Cancer Trial, 1997.