УДК: 618.146-006:615.37

С.В. КАМЫШОВ[1], Д.А. ПУЛАТОВ[1], Д.А. НИШАНОВ[1], Н.Ш. ЮЛДАШЕВА[1], Н.Б.ЮСУПОВА[1]

[1]Республиканский онкологический научный центр Министерства здравоохранения РУз, Ташкент, Республика Узбекистан (РОНЦ МЗ РУз)

Значимость оценки молекулярно-биологических онкомаркеров в сопроводительной иммунотерапии при раке шейки матки

Целью работы явилось изучение молекулярно-биологических онкомаркеров в качестве критериев выбора методов сопроводительной экстракорпоральной иммунофармакотерапии (ЭИФТ) у больных раком шейки матки (РШМ) в процессе комплексного лечения. Объектом исследования служили 30 больных РШМ со II-III клиническими стадиями заболевания, из них 12 (40,0%) больных иммунотерапию не получали, 9 (30,0%) получали ЭИФТ без плазмафереза, 9 (30,0%) – ЭИФТ с плазмаферезом. Сравнительная оценка уровня опухолевых маркеров и 5-летней выживаемости больных РШМ показала, что наибольшей прогностической значимостью в отношении эффективности лечения обладают молекулярно-биологические маркеры p53, VEGF и Ki-67, а также уровень пролиферативной активности опухоли. Схема сопроводительной иммунотерапии, включающая ЭИФТ с плазмаферезом, оказывала наибольший эффект в увеличении 5-летней выживаемости больных РШМ. Такой эффект отмечался как при положительных, так и при отрицательных уровнях рассмотренных онкомаркеров.

Ключевые слова: *рак шейки матки, экстракорпоральная иммунофармакотерапия, молекулярно-биологические онкомаркеры, пролиферативная активность опухоли*

Введение. Изучение молекулярно-биологических маркеров в ткани опухоли является одним из современных путей прогнозирования течения онкогинекологических заболеваний и выработки лечебной тактики. Необходимо найти понимание клинической ситуации, когда сравнимые по распространенности и гистологической структуре опухоли различаются по агрессивности течения заболевания. Особое внимание привлекают сведения о нарушениях механизмов пролиферации, апоптоза и ангиогенеза в опухолевых клетках.

Использование в лечении онкогинекологических заболеваний новых возможностей изучения молекулярно-биологических маркеров позволяет спрогнозировать течение заболевания и содействует назначению рационального и эффективного лечения.

Целью работы явилось изучение молекулярно-биологических онкомаркеровв качестве критериев выбора методов сопроводительной экстракорпоральной иммунофармакотерапии (ЭИФТ) у больных раком шейки матки (РШМ) в процессе комплексного лечения.

Материалы и методы исследования. Изучение экспрессии молекулярно-биологических онкомаркеров было проведено у 30 больных РШМ с II-III клиническими стадиями заболевания, проходивших обследование и лечение в отделениях онкогинекологии и химиотерапии РОНЦ МЗ РУз с 2014 по 2016 гг.

Все больные РШМ получали комплексное лечение, включающее полихимиотерапию, операцию и/или химиолучевую терапию или двухэтапную сочетанную лучевую терапию в стандартных схемах. Лучевая терапия и химиотерапия проводилась как в адъювантном, так и в неоадъювантном режиме. Хирургическое лечение выполнялось в виде радикальной операции.

Иммунотерапия у больных РШМ проводилась в до- и послеоперационном периоде. В соответствии с поставленными задачами исследования, были созданы следующие группы больных по методам иммунотерапии в составе комплексного лечения (Таблица 1).

Таблица 1 – Группы больных раком шейки матки

Методы иммунотерапии	Число больных	
	Абс.	%
1. Контрольная группа (без иммунотерапии)	105±10	130±15
2. Группа, получавшая ЭИФТ	70±5	80±5
3. Группа, получавшая ЭИФТ + плазмаферез	75±5	82±8

В 1-й контрольной группе иммунотерапию не проводили.

Во 2-й группе больным проводили ЭИФТ путем эксфузии 200-250 мл аутокрови в стерильные контейнеры «Гемакон» или «Терумо», инкубацией с иммуномодуляторами: неовир в суммарной дозе 750 мг (за 3 процедуры), циклоферон в суммарной дозе 750 мг (за 3 процедуры) или полиоксидоний в суммарной дозе 36 мг (за 3 процедуры) при 37оС в течение 60-100 мин с последующей реинфузией полученного конъюгата.

В 3-й группе применяли метод ЭИФТ, который являлся расширением возможностей плазмафереза. Осуществляли эксфузию 500-1000 мл аутокрови в стерильные контейнеры «Гемакон» или «Терумо», затем проводили ее центрифугирование при 3000 об/мин в течение 30 мин.

Удаляли 50-80 мл надосадочного слоя плазмы крови, содержащий антитела, циркулирующие иммунные комплексы, цитокины, продукты клеточного метаболизма.

Затем полученную лейкотромбомассу и эритроцитарную массу инкубировали с указанными выше иммуномодуляторами, в суммарной дозе 30 мг (за 3 процедуры) при 37оС в течение 60-100 мин, с последующим возвращением конъюгата в кровеносную систему больных.

Материалом для исследования послужили гистологические препараты операционно-биопсийного материала первичной опухоли больных РШМ, полученные до начала исследования. Образцы опухолевой ткани фиксировали в нейтральном забуференном формалине с обычной стандартной проводкой и заливкой в парафин. Гистологические препараты окрашивали обычными способами и проводили иммуногистохимические исследования.

Парафиновые срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. Для визуализации иммуногистохимической реакции использовали DAB+ систему (DakoCytomation, Дания). Оценку результатов окрашивания проводили с применением светового микроскопа «Leica» (Германия) под увеличением х10; х20; х40. Для маркера оценивали локализацию окрашивания в клетке (ядро, цитоплазма, мембрана). Количество положительных клеток оценивали в зонах, содержащих их максимальное количество.

У больных РШМ в иммуногистохимической оценке экспрессии p53 использовали моноклональные мышиные антитела к p53 (клон DO-7), Bc1-2(клон 124), EGFR (клон E30), VEGF (клон VG1), Ki-67 (клон M1B-1) (DakoCytomation, Дания). У больных РЯ для определения экспрессии p53 использовали моноклональные мышиные антитела к p53 (клон DO-7),VEGF (клон VG1), Ki-67 (клон M1B-1), EGFR (клон E30) и кроличьи антитела к c-erbB-2 (клон pAb) (DakoCytomation, Дания).

Результаты и обсуждение. При изучении экспрессии молекулярно-биологических онкомаркеров у больных РШМ отрицательный уровень p53 был отмечен у 8 (26,7%) пациенток, положительный – у 22 (73,3%). В то же время, при изучении Bcl-2 была обнаружена обратная закономерность: отрицательный уровень маркера определялся у 19 (63,3%), а положительный – у 11 (36,7%) больных. При изучении фактора EGFR он был отрицательным у 21 (70,0%), положительный у 9 (30,0%) пациенток, а VEGF– у 6 (20,0%) и 24 (80,0%) и Ki-67 – у 7 (23,3%) и 23 (76,7%) пациенток, соответственно. Таким образом, у большей части больных РШМ уровень изучаемых онкомаркеров был положительным, за исключением Bcl-2 и EGFR, которые были отрицательными у 63,3 и 70,0% пациенток соответственно.

Наиболее высокие показатели 5-летней выживаемости отмечались в группе больных РШМ, которым проводилась ЭИФТ с плазмаферезом. Так, в контрольной группе больных выживаемость при отрицательном уровне p53 составила 64,4±6,7%, тогда как в группах с ЭИФТ и ЭИФТ+ПФ эти показатели составили 73,2±7,7 (p>0,05) и 77,4±8,4% (p>0,05), соответственно (рисунок 1).

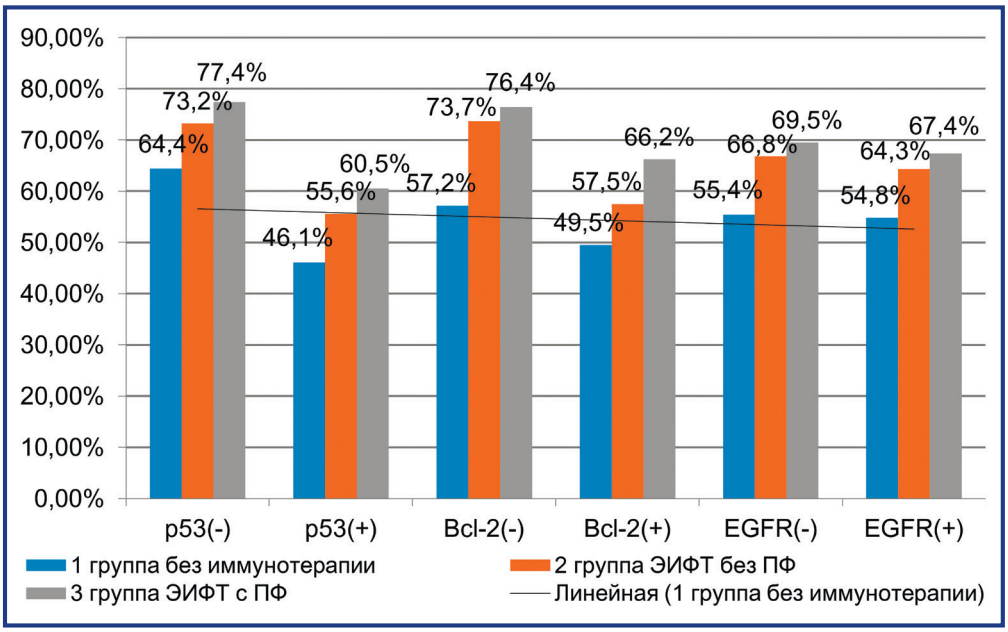

Рисунок 1 - 5-летняя выживаемость больных раком шейки матки в зависимости от вида иммунотерапии и экспрессии молекулярно-биологических онкомаркеров p53, Bcl-2, EGFR.

При положительном уровне p53, 5-летняя выживаемость составила 46,1±5,1% для контрольной группы без иммунотерапии и 55,6±4,9 (p<0,05) и 60,5±6,4% (p<0,05) для групп с применением методов иммунотерапии, соответственно.

Ген-супрессор p53 кодирует ядерный белок, который модулирует экспрессию генов и отвечает за репарацию ДНК, деление клеток и апоптоз. На сегодняшний день, в литературе нет единого мнения относительно динамики экспрессии p53 при прогрессировании РШМ, согласно данным ряда авторов, он может, как повышаться, так и снижаться. Частота накопления mut-p53 увеличивается с ростом злокачественности опухолей, в то время как при доброкачественных опухолях накопления mut-p53 не встречается, а в злокачественных опухолях частота накопления увеличивается до 46% [1].

Белку Bcl-2 принадлежит важная роль в регуляции апоптоза. По данным ряда авторов [1, 2, 3], высокая степень экспрессии опухолевой клетки Bid (белка из семейства Bcl, который играет важную роль в регуляции апоптоза и интегрирует сигналы для митохондрий) коррелирует с неблагоприятным прогнозом при РШМ.

Так, отмечается усиление экспрессии Bcl-2 по сравнению с начальными стадиями при локализованных формах РШМ и снижение уровня экспрессии при местнораспространенных процессах.

Показатели 5-летней выживаемости в контрольной группе больных РШМ при рассмотрении маркера Bcl-2 в контрольной группе составили 57,2±5,0% при отрицательном его уровне и 49,5±5,6% – при его положительном значении (Рис.19). Соответственно, в группах с иммунотерапией данный показатель составил 73,7±7,2% (p<0,05) и 76,4±7,0% (p>0,05) при отрицательном уровне и 57,5±5,4% (p>0,05) и 66,2±7,4% (p>0,05) – при его положительном значении.

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) является трансмембранным гликопротеином, локализующимся на хромосоме 7p12. EGFR функционирует через димеризацию, активируя тирозинкиназу, участвуя в регуляции нормальной и неопластической клеточной пролиферации. EGFR присутствует во многих нормальных тканях и выраженная экспрессия наблюдается в солидных опухолях, включая РШМ. Согласно литературным данным, экспрессия EGFR наблюдается примерно в 40% злокачественных опухолей ЖКТ, легкого, яичника, матки. При этом, роль EGFR как прогностического маркера при РШМ окончательно не определена [4].

При рассмотрении маркера EGFR было показано, что при его отрицательном значении у больных РШМ в группе без иммунотерапии 5-летняя выживаемость составила 55,4±5,3, а при положительном – 54,8±5,8% (Рис.33). В группе с ЭИФТ соответствующие показатели составили 66,8±7,0 (p<0,05) и 64,3±6,9% (p>0,05), а в группе с ЭИФТ + ПФ – 69,5±6,3 (p>0,05) и 67,4±6,8% (p>0,05).

Основным активатором ангиогенеза считают фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), ответственный за пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, а также имеющий непосредственное отношение к инвазии и метастазированию опухоли. Накоплены данные, подтверждающих участие VEGF и EGFRв построении сосудистого русла, росте и прогрессии злокачественных новообразований [5].

При отрицательном значении уровня VEGF в контрольной группе 5-летняя выживаемость пациенток составила 64,3±7,2 и при положительном – 53,0±6,0% (рисунок 2). В группах больных, в которых применялась сопроводительная иммунотерапия, соответствующие значения при отрицательном значении VEGF составили 73,4±6,8 (p>0,05) и 75,2±7,4% (p>0,05), при положительном уровне данного онкомаркера – 60,7±5,6 (p<0,05) и 67,4±6,8% (p<0,05).

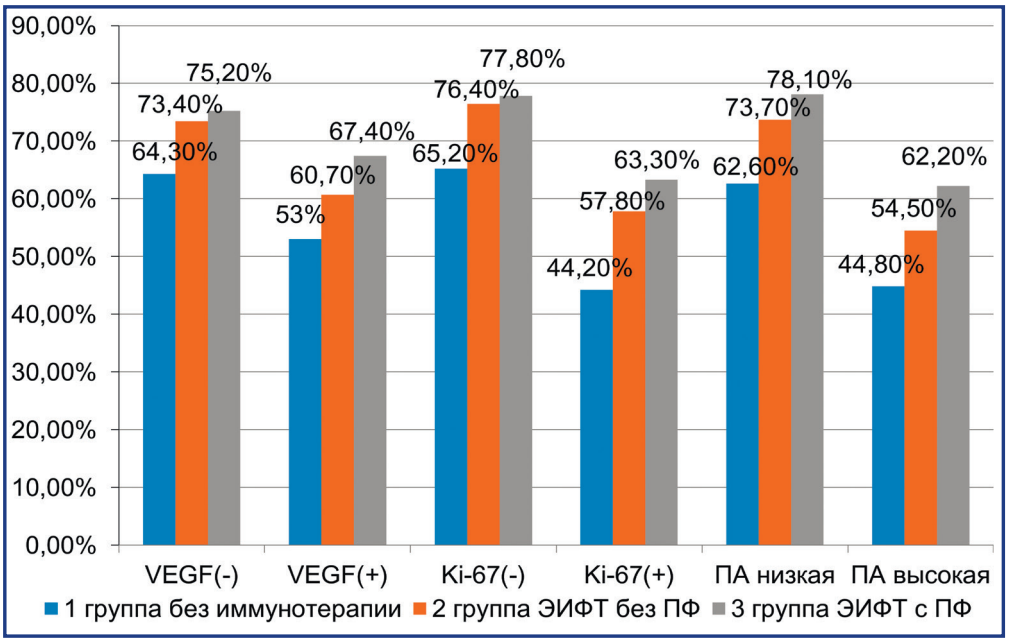

Рисунок 2 - 5-летняя выживаемость больных РШМ в зависимости от вида иммунотерапии и экспрессии молекулярно-биологических маркеров VEGF, Ki-67, а также пролиферативной активности опухоли.

Антиген Ki-67 - это ядерный белок, экспрессия которого отмечается в активную фазу клеточного цикла, включая митоз. Согласно данным литературы, экспрессия Ki-67 повышается при поражении шейки матки. Пролиферативный индекс Ki-67 рассматривается как независимый прогностический показатель возникновения рецидива, общей и безрецидивной выживаемости, предсказательный фактор для определения чувствительности к химиотерапии и лучевой терапии. Индекс Ki-67 позволяет оценить степень злокачественности опухоли и прогнозировать течение заболевания в совокупности с другими факторами. Показано, что высокий уровень индекса Ki-67 сопряжен с неблагоприятным прогнозом [2, 3, 6].

Онкомаркер Ki-67 не обнаруживался в опухолях 7 больных РШМ, у которых в контрольной группе 5-летняя выживаемость составила 65,2±5,8% (рисунок 2). При его положительном уровне, в группе без иммунотерапии данный показатель составил 44,2±6,1%. В группах с проведением ЭИФИ и ЭИФТ + ПФ при отрицательном Ki-67, показатели выживаемости составили 76,4±7,9 (p>0,05) и 77,8±6,7% (p>0,05) соответственно, а при положительном – 57,8±5,9 (p<0,05) и 63,3±7,4% (p<0,05).

При низком уровне индекса ПА, который высчитывали по Ki-67, 5-летняя выживаемость у больных РШМ в группе без иммунотерапии составила 62,6±5,8, при высоком его уровне – 44,8±5,1% (Рис.34). В группах с применением имммунотерапевтических методов, 5-лет-

няя выживаемость при низком индексе ПА составила 73,7±8,2 (p>0,05) и 78,1±7,7% (p>0,05), при высоком индексе – 54,5±5,4 (p>0,05) и 62,2±6,4% (p<0,05).

Выводы. Таким образом, у большей части больных РШМ (у 73,3, 80,0 и 76,7%, соответственно) присутствовали молекулярно-биологические маркеры p53, VEGF и Ki-67. В то же время, маркеры Bcl-2 и EGFR обнаруживались у 36,7 и 30,0% пациенток, соответственно.

Сравнительная оценка уровня опухолевых маркеров и 5-летней выживаемости больных РШМ показала, что наибольшей прогностической значимостью в отношении эффективности лечения обладают молекулярно-биологические маркеры p53, VEGF и Ki-67, а также уровень пролиферативной активности опухоли. Проведённый анализ корреляции уровня онкомаркеров и 5-летней выживаемости больных, позволяет сделать вывод о том, что положительный уровень p53, VEGF и Ki-67 у больных РШМ наряду с высокой пролиферативной активностью опухоли может служить основанием для назначения данной категории пациенток сопроводительной иммунотерапии с ЭИФТ. В случае положительных значений всех рассмотренных молекулярно-биологических факторов, мы рекомендуем проведение сопроводительной ЭИФТ с плазмаферезом, что может существенно увеличить эффективность стандартных схем противоопухолевого лечения.

Список использованных источников

1. Кондриков Н.И., Шамаракова М.В., Горбачева Ю.В. Значение иммуногистохимического определения биомаркеров плоскоклеточных интраэпителиальных поражений шейки матки //Акушерство и гинекология. – 2010. – №6. – С. 44-48.

2. Stoenescu T.M., Ivan L.D., Stoenescu N., Azoicai D. Assessment tumor markers by immunohistochemistry (Ki67, p53 and Bcl-2) on a cohort of patients with cervical cancer in various stages of evolution // Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. – 2011. – V.115. – №2. – P. 485-492.

3. Sylvia M.T., Kumar S., Dasari P. The expression of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, Her-2-neu, p53 and Ki-67 in epithelial ovarian tumors and its correlation with clinicopathologic variables // Pathology & Microbiology. – 2012. – Vol. 55. – №1. –P. 33–37.

4. Шаназаров Н.А., Сабиров А.Х., Сироткина С.М. Роль эпидермального фактора роста и его рецептора в канцерогенезе: молекулярные механизмы их действия // Росс. Биотерапевт. журнал. – 2009. – Т. 8. – №4. – С. 85-90.

5. Ribatti D. History of research on tumor angiogenesis. – Springer Science+Business Media B.V. – 2009. – 125 p.

6. Антонеева И.И., Сидоренко Е.Г., Абакумова Т.В., Пирмамедова С.С. Экспрессия белков, ассоциированных с опухолевой прогрессией в злокачественных новообразованиях шейки матки // Мед. науки. – 2012. – №7. – С. 269-272.

ТҰЖЫРЫМ

С.В. Камышов[1], Д.А. Пулатов[1], Д.А. Нишанов[1], Н.Ш. Юлдашева[1], Н.Б. Юсупова[1]

[1]Өзбекстан Республикасы, Ташкент қ., Денсаулық сақтау министрлігінің Республикалық онкологиялық ғылыми орталығы

Жатыр мойын қатерлі ісігі кезінде қосымша иммунотерапиясындағы молекулалық-биологиялық онкомаркерлерін бағалау маңыздылығы

Жұмыстың мақсаты кешенді емдеу барасында жатыр мойын қатерлі ісігі бар науқастарда (ЖМҚІ) қосымша экстракорпоральды иммунофармакотерапиясының (ЭИФТ) әдістерінің тандау өлшемдер ретінде молекулалық-биологиялық онкомаркерлерін зерттеу болып табылады. Зерттеудің обьектісі аурудың II-III сатысы бар 30 жатыр мойыны қатерлі ісігімен ауыратын науқастар алынды. Жатыр мойыны қатерлі ісігімен ауырған науқастардың барлығы біріктірілген және кешенді емдеу алды. 12 (40,0%) науқастарға иммунотерапиясы жүргізілген жоқ, 9 (30,0%) науқастарға ЭИФТ және 9 (30,0%) – ЭИФТ плазмаферезбен жүргізілді. p53, VEGF және Ki-67 молекулалық-биологиялық маркерлері емдеудің тиімділігіне қатысты және ісіктер пролиферативті белсенділік деңгейінің ең болжамды маңыздылығын ісіктер маркерлердің салыстырмала бағалауы мен жатыр мойын қатерлі ісігімен ауыратын науқастарда 5 жылдық өміршеңдігін көрсетті. Жатыр мойын қатерлі ісігімен ауыратын науқастардың 5 жылдық өмір сүру көрсеткішінде иммунотерапия, ЭИФТ және плазмоферез жоғары эффект көрсетті, бұл әдіс көрсетілген онкомаркерлердің оң және теріс деңгейінде белгіленді.

Түйінді сөздер: *жатыр мойын қатерлі ісігі, экстракорпоральды иммунофармакотерапия (ЭИФТ), молекулалық-биологиялық ісік маркерлері: p53, Bcl-2, EGFR, Ki-67, VEGF, пролиферативті ісік белсенділігі.*

SUMMARY

S.V. Kamyshov[1], D.A. Pulatov[1], D.A. Nishanov[1], N.Sh. Yuldasheva[1], N.B. Yusupova[1]

[1]Republican Cancer Research Center of the Ministry of Health of Uzbekistan, Tashkent, the Republic of Uzbekistan

The significance of assessment of molecular biological markers of tumor in cervical cancer conductive immunotherapy

The work was aimed to study the molecular-biological tumor markers as the criteria for choosing methods of accompanying extracorporeal immune pharmacotherapy (EIPT) in patients with cervical cancer in the course of complex treatment. The subject of the study was 30 patients with II-III clinical stages of cervical cancer, of them, 12 (40.0%) did not receive immunotherapy, 9 (30.0%) received EIPT, and 9 (30.0%) received EIPT with plasmapheresis. Comparative evaluation of the level of tumor markers and 5-year survival rate showed that the markers p53, VEGF and Ki-67 as well as the level of proliferative tumor activity had the highest prognostic value for the effectiveness of treatment. Scheme of accompanying immunotherapy which combined EIPT with plasmapheresis had the greatest positive effect on the increase of 5-year survival rate. Such an effect was manifested both at positive and negative levels of the cancer markers under consideration.

Keywords: *cervical cancer, extracorporeal immunopharmacotherapy, molecular-biological tumor markers, tumor proliferative activity.*