

Министерство здравоохранения
Донецкой Народной Республики
Государственная образовательная организация
высшего профессионального образования
«Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького»

На правах рукописи

Мотрий Алексей Владимирович

**ВЛИЯНИЕ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ
НА ИЗМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ФЕНОТИПА
МЕСТНО-РАСПРОСТРАНЕННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.
ПЕРСОНИФИКАЦИЯ ТАКТИКИ АДЬЮВАНТНОГО ЛЕЧЕНИЯ**

14.01.12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Донецк – 2019

Работа выполнена в Государственной образовательной организации высшего профессионального образования «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького» Министерства здравоохранения Донецкой Народной Республики, г. Донецк.

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Седаков Игорь Евгеньевич

Официальные оппоненты: **Белоненко Геннадий Анатольевич**
доктор медицинских наук,
Донецкое клиническое территориальное
медицинское объединение МЗ ДНР, врач-хирург
хирургического отдела Диагностического
центра;

Бутенко Евгений Викторович
кандидат медицинских наук,
Республиканский онкологический центр им.
проф. Г.В.Бондаря МЗ ДНР, врач-онкохирург
онкохирургического отделения № 2

Ведущая организация: **Институт неотложной и восстановительной
хирургии им. В.К. Гусака Министерства
здравоохранения Донецкой Народной
Республики**

Защита состоится «21» февраля 2020 года в 11.00 часов на заседании диссертационного совета Д 01.011.03 при Государственной образовательной организации высшего профессионального образования «Донецкий национальный медицинский университет им. М.Горького» по адресу: г. Донецк, ул. Полоцкая, 2а, Республиканский онкологический центр им. проф. Г.В. Бондаря.

Тел. (062) 332-70-35, e-mail: spec-sovet-01-011-03@dnmu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке организации по адресу: 283003, г. Донецк, пр. Ильича, 16; dnmu.ru

Автореферат разослан « _____ » _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 01.011.03

С.Э. Золотухин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Рак молочной железы (РМЖ) занимает лидирующие позиции в структуре онкологических заболеваний среди женского населения во всем мире (Лукьянова М.П. и соавт., 2017; Гервас П.А., 2018; Зямилова Д.Р. и соавт., 2018; Kurian A.W. et al., 2017). Статистические данные последних лет свидетельствуют о том, что в экономически развитых странах ежегодно наблюдается рост заболеваемости и смертности от рака этой локализации (Лазарук А.В., 2017; Семиглазов В.Ф., 2017; Голобокова М.О., 2019; Олексенко В.В. и соавт., 2019; Mauri D., 2017), за последние тридцать лет частота случаев рака молочной железы увеличилась более чем на 20% (Торба А.В. и соавт., 2017; Нурманова А. и соавт., 2018; Елизарова А.А., 2019; Martin D. Abeloff, 2008; Antoniou A.C. et al., 2014).

В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями женского населения Донецкой Народной Республики (ДНР) заболеваемость раком молочной железы в 2018 году занимает первое место и составляет 21,2 на 100 тыс. женского населения. Смертность от злокачественных новообразований молочной железы в ДНР в 2018г. составила 32,1 на 100 тыс. женского населения, что превышает данный показатель в России (28,1 на 100 тыс. женского населения) и в Украине (28,3 на 100 тыс. женского населения).

Современные комплексные и комбинированные подходы в лечении РМЖ предусматривают обязательное определение иммуногистохимического статуса опухоли (Калинкин А.И. и соавт., 2018; Подшендялова А.А., 2018; Сторожакова А.Е. и соавт., 2019). Причем, если 10 лет назад доминирующим в определении тактики специального лечения были такие факторы, как размеры опухолевого узла, гистологический тип опухоли, степень гистологической злокачественности, то, на сегодня, без определения биологического статуса РМЖ, тактику лечения сформировать не представляется возможным (Ворошина Н.В., 2017; Полуэктова Я.Л. и соавт., 2018; Ганусевич О.Н. и соавт., 2019; Цыганов М.М. и соавт., 2019). Несмотря на это, определение иммуногистохимического (ИГХ) статуса проводят исключительно перед началом лечения (Бехтерева С.А., 2018; Зикирходжаев А.Д., 2018; Рассказова Е.А. и соавт., 2019). В литературе имеются единичные сообщения об изменении ИГХ статуса РМЖ после проведенного лечения (Грабовой А.Н. и соавт., 2012; Башлык В.О. и соавт., 2018; Косторов В.А. и соавт., 2018; Camprone M., Frenel J., 2014).

По данным Американской ассоциации клинических патологов карцинома молочной железы имеет значительную гетерогенность, особенно это касается опухолей с уровнем экспрессии Her-2/neu 2+ (для ИФА метода). Около 68% случаев имеют отличающийся уровень эпидермального фактора роста при исследовании другого среза или ее метастаза (регионарного или отдаленного) (Hall M.J. et al., 2009; Skalova H. et al., 2011).

Разница между ИГХ статусом первичной опухоли и рецидивных очагов составляет от 15 до 40% (Середа Е.Н. и соавт., 2010; Brennan M.J. et al., 1979); в 7-26% случаев изменяется статус Her-2/neu рецепторов (Yeung I. et al., 2013).

Следует отметить, что С. Liedtke et al. (2011) доказали, что фенотип первичной опухоли и пораженных лимфатических узлов отличается в 75% случаев.

Представляет научный интерес и имеет практическую значимость уточнение влияния неоадьювантной химиотерапии на статус эпидермального фактора роста. Согласно исследованию Н. Skalova et al. (2011), в 30% случаев определялось минимальное изменение экспрессии Her-2/нец, а в 10% – полное изменение с положительного на отрицательный. На наш взгляд, изменения в ИГХ статусе опухоли могут существенно повлиять на адьювантную тактику лечения пациентов РМЖ, чему и посвящено настоящее исследование.

Степень разработанности темы

В литературе имеются единичные сообщения об изменении ИГХ статуса РМЖ после проведенного лечения. Так, немецкими онкологами было проведено исследование группы пациенток с РМЖ, основанное на молекулярно-биологических внутренних подтипах и реакциях химиотерапии в попытке установить связь между pCR и выживаемостью для пациентов каждого из подтипов (Loibl S. et al., 2011; Minckwitz G. et al., 2012). Данный анализ показал, что выявление молекулярно-биологического подтипа является необходимой частью определения тактики терапии, поскольку от этого напрямую зависит связь между pCR и выживаемостью. В исследовании О. Brouckaert et al. (2012) использовались молекулярно-биологические подтипы для определения различных прогностических групп РМЖ.

В некоторых исследованиях речь идет о том, что не все пациенты имеют одинаковую реакцию на неоадьювантную терапию, результат варьируется в зависимости от биологической характеристики опухоли и от данных иммуногистохимии на основе молекулярного подтипа. Так, в мета-анализе, проведенном D. Mauri et al. (2005), доказано, что в базально-подобных опухолях достижение полного патологического ответа наблюдается у 45% (95% ДИ: 24-68), HER2+ – у 45% (95% ДИ: 23-68) и «Люминальный А» – у 6% (95% ДИ: 1-21). В исследовании F.M. Robertson et al. (2010) предполагается, что pCR может быть суррогатным маркером для общей выживаемости (ОВ), особенно в подгруппах «трижды негативный» и HER2, при этом HER2+ / гормон-рецептор (HR) – отрицательный представляет более высокую частоту ОВ, чем пациенты HER2+ / HR+. Несмотря на то, что pCR постоянно ассоциируется с превосходной выживаемостью, это не единственный прогностический фактор, как в случаях менее агрессивных опухолей, таких как «Люминальный А». Так, в исследованиях, проведенных А.І. Goldhirsch et al. (2011) и І. Meattini et al. (2017), достижение pCR во время операции было связано с благоприятным прогнозом. В исследовании S. Loibl et al. (2011) отсутствие pCR показало худшие результаты при тройном отрицании и опухолях HER2+, хотя эта прогностическая корреляция не наблюдалась в опухолях HR+.

Связь работы с научными программами, планами, темами

Работа является фрагментом совместной плановой НИР кафедр онкологии и онкологии и радиологии факультета интернатуры и последипломного образования Донецкого национального медицинского университета

им. М. Горького «Разработать эффективные способы первично-восстановительных органосохраняющих и органозамещающих радикальных и паллиативных операций, повысить эффективность комбинированного, комплексного и паллиативного лечения опухолей основных локализаций» (шифр работы УН 16.03.23). Соискателем в рамках данной НИР проведено изучение стандартного лечения пациенток с раком молочной железы; соискатель принимал участие в диагностике, в определении тактики лечения, в хирургическом лечении данной категории больных в составе хирургических бригад, был ответственным за выполнение комбинированного и комплексного лечения больных с раком молочной железы.

Цель исследования: персонифицировать программу адъювантного лечения у больных с местно-распространенным раком молочной железы на основании изменения молекулярно-биологических свойств опухоли в процессе неoadъювантной терапии.

Для реализации поставленной цели были сформулированы следующие **задачи:**

1. Изучить причины неудовлетворительных результатов лечения местно-распространенного рака молочной железы в РОЦ им. Г.В. Бондаря.
2. Изучить динамику изменений биологических свойств опухоли молочной железы на фоне проведенной неoadъювантной химиотерапии.
3. Модифицировать протокол адъювантного лечения больных раком молочной железы на основании изменения иммуногистохимического статуса опухоли.
4. Представить сравнительную оценку отдаленных результатов стандартного и персонифицированного лечения.

Объект исследования: рак молочной железы T4N0-2M0.

Предмет исследования: изменения ИГХ статуса РМЖ T4N0-2M0 после проведенного неoadъювантного лечения.

Научная новизна исследования

Впервые изучена динамика изменений биологических подтипов опухоли молочной железы на фоне проведенной неoadъювантной химиотерапии. На основании изменения ИГХ статуса опухоли модифицирован протокол лечения больных РМЖ.

Теоретическая и практическая значимость работы

На основании выполненного исследования доказано, что проведение неoadъювантного лечения приводит к изменению ИГХ-статуса опухоли у пациенток, что, в свою очередь, изменяет стратегию дальнейшей адъювантной терапии, тем самым улучшает ближайшие и отдаленные результаты лечения больных РМЖ.

Материалы диссертационной работы внедрены в практику Республиканского онкологического центра им. проф. Г.В.Бондаря (акт внедрения от 01.11.2019), Городского онкологического диспансера г. Донецка (акт внедрения от 02.10.2019), ГУ ЛНР «Луганский республиканский клинический онкологический диспансер»(акт внедрения от 24.10.2019).

Личный вклад соискателя

Автором самостоятельно проведен информационно-патентный поиск, обоснована актуальность и необходимость проведения исследования, сформулированы его цель и задачи, определена программа работы. Диссертантом выполнен отбор и формирование групп наблюдения, клиническое обследование с оценкой результатов, оценка лабораторных и инструментальных данных, результатов патогистологических исследований. Автором самостоятельно проведена статистическая обработка полученных в ходе исследования данных, проанализированы результаты исследования, сформулированы выводы и рекомендации. Подготовлены данные для публикаций и выступлений на конференциях, оформлена диссертационная работа и автореферат. В работах, выполненных в соавторстве, реализованы идеи соискателя. В процессе выполнения работы не использованы идеи и разработки соавторов.

Методология и методы исследования

При проведении работы использованы клинические методы (сбор анамнеза, физикальный осмотр); лабораторно-диагностические клиничко-лабораторные (общий анализ крови и мочи, биохимический анализ крови, коагулограмма); инструментальные (ультразвуковое исследование, маммография, рентгенография, мультисрезовая компьютерная томография, сцинтиграфия); патогистологические (патогистологические, иммуногистохимические); статистические (программа RStudio версия 1.2.1335 © 2009-2019 RStudio, Inc., GPL).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Фенотип опухоли на разных стадиях ее генеза отличается, в связи с чем представляет научный интерес и имеет практическую значимость повторное изучение послеоперационного материала, полученного после проведения неoadъювантного лечения.

2. Определение молекулярно-биологических подтипов рака молочной железы на основе иммуногистохимической оценки экспрессии ER, PR и Her2/neu является достаточно информативным и упрощенным методом диагностики.

3. Проведенное неoadъювантное лечение привело к изменению биологических свойств опухоли молочной железы у 81 (44,5%) пациентки, что послужило основанием для модификации протокола лечения больных: в 10% случаях «трижды негативного» подтипа РМЖ, учитывая высокую чувствительность данной опухоли к препаратам таксанового ряда, режим адъювантной химиотерапии требует применения инфузии паклитаксела; в 5% случаях HER2 позитивного РМЖ в лечебную схему включены анти-HER2 препараты; в 4% случаях выявления люминального РМЖ адъювантное лечение осуществлялось с применением гормональной терапии.

4. Маркировка опухоли танталовыми скобами до начала неoadъювантной терапии и установка локализационного «гарпуна» непосредственно перед операцией позволяют избежать позитивного края резекции и выполнить прицельное морфологическое исследование ложа опухоли в случае ее полной патоморфологической регрессии.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов, изложенных в диссертационной работе, обусловлена достаточным объемом репрезентативного клинического материала, использованием современных средств и методов исследований, адекватных цели и задачам работы, выбором современных методов статистического анализа полученных данных.

Положения, изложенные в диссертации, базируются на полученных данных и соответствуют материалу, представленному в публикациях.

Апробация работы состоялась 08.11.2019 г. на заседании кафедры онкологии и радиологии ФИПО им. акад. Г.В.Бондаря Государственной образовательной организации высшего профессионального образования «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького».

Основные положения диссертационной работы докладывались и обсуждались на II Петербургском онкологическом форуме «Белые ночи» (г. Санкт-Петербург, 22-24 июня 2016 г.), 9-м съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (г. Минск, 2016 г.) Международном медицинском форуме Донбасса «Наука побеждать... болезнь» (г. Донецк, 2017, 2018, 2019 гг.).

Публикации

Результаты диссертационной работы полностью изложены в 6 печатных работах, из них 3 статьи – в изданиях, рекомендованных ВАК МОН ДНР, 1 патент Украины на полезную модель.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на русском языке на 126 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, 3 разделов собственных исследований, анализа и обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 17 таблицами на 9 страницах и 37 рисунками на 21 странице. Список использованной литературы содержит 244 научные публикации, из них 161 изложена кириллицей, 83 – латиницей и занимает 28 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Диссертация выполнена на основании проспективного наблюдения 345 пациенток от 26 до 84 лет (средний возраст 57 ± 10 лет) с местно-распространенным раком молочной железы T4N0-2M0. Диагноз подтвержден цитологически и гистологически. Исследование проведено с 2013 по 2019 годы в Республиканском онкологическом центре им. Г.В.Бондаря. Исследование отвечало всем этическим требованиям, предъявляемым к научным работам, на что было получено разрешение этического комитета ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО.

Пациентки были разделены на исследуемую группу (182 пациентки) и группу сравнения (163 пациентки) и были классифицированы на 5 подтипов: люминальный А (высокодифференцированные раки ER+PR+HER2-Ki67<20%), люминальный В HER2-негативный (низкодифференцированные раки

ER+PR+HER2-Ki67>20%), люминальный В HER2-позитивный (ER+PR±HER2+Ki67 любой), тройной негативный рак – трипл-негативный (ER-PR-HER2-Ki67 любой), нелюминальный HER2-позитивный (ER-PR-HER2+Ki67 любой), определяемые по статусу иммуногистохимического исследования образцов опухоли. Всем больным была проведена неоадьювантная химиотерапия и РМЭ по Маддену.

Все пациентки получали неоадьювантную химиотерапию, а именно – внутривенную ПХТ по схеме CMF (циклофосфамид, метотрексат, фторурацил), AC (доксорубин, циклофосфамид), FAC (фторурацил, доксорубин, циклофосфамид), AP (доксорубин, цисплатин). Количество курсов определяли, исходя из оценки эффективности лечения, общего состояния пациенток, наличия и степени выраженности местных и системных осложнений в зависимости от ИГХ фенотипа опухоли в расчетных дозах, 2-4 цикла.

В группу сравнения вошли 163 пациентки стадии T4N0-2M0, которым на первом этапе выполнялось определение ИГХ статуса опухоли, после чего проводилась неоадьювантная химиотерапия, затем выполнялась РМЭ по Маддену и адьювантная терапия назначалась с учетом ранее определенного ИГХ статуса РМЖ. Исследуемую группу составили 182 пациентки, которым на первом этапе также выполнялось определение ИГХ статуса опухоли, затем проводилась неоадьювантная химиотерапия и выполнялась РМЭ по Маддену, но адьювантное лечение назначалось с учетом повторно определяемого после лечения ИГХ статуса опухоли. Обе группы были сопоставимы по всем основным показателям: возраст, стадия заболевания, гистологическая форма опухоли, схемы, методы и количество курсов химиотерапии, объем выполненных операций. В случаях изменения биологического подтипа опухоли проводилось изменение схем адьювантного лечения.

Решение о тактике проведения адьювантной системной терапии базировалось на предсказании чувствительности к конкретному виду лечения, пользы от его применения и индивидуальном риске рецидива. Окончательное решение основывалось на представлении о молекулярно-генетическом фенотипе рака молочной железы. Медиана числа курсов адьювантной химиотерапии составила 4 (4-6). Все случаи люминального РМЖ (определяется как $\geq 1\%$ клеток инвазивного рака с экспрессией рецепторов эстрогенов) подвергались лечению с применением эндокринотерапии. У пременопаузальных пациенток рекомендовали прием тамоксифена в дозе 20 мг/день в течение 5-10 лет как стандарт терапии. Подавление функции яичников проводилось при помощи аналогов агонистов гонадотропин-релизинг-гормона. У пациентов, достигающих менопаузального статуса в течение 5 лет гормонотерапии тамоксифеном, осуществляли переход на терапию ингибиторами ароматазы. Для лечения пациентов высокого риска и особенно тех, которым противопоказан тамоксифен, использовали комбинации агонистов гонадотропин-релизинг-гормонов и ингибиторов ароматазы. К факторам, свидетельствующим в пользу высокого риска, относили: метастатическое поражение 4-х и более лимфатических узлов, возраст 35 лет и моложе, 3-я степень гистологической злокачественности или

неблагоприятные результаты мультипараметрических молекулярных маркеров (высокий индекс Ki-67 и HER2-позитивный статус опухоли).

Рак молочной железы, категоризируемый как HER2-позитивный, подлежит химиотерапевтическому лечению и таргетной терапии трастузумабом в дозе 6 мг/кг (нагрузочная доза 8 мг/кг) в/в в 1-й день 1 раз в 3 недели. Введение анти-HER2 препаратов начиналось одновременно с безантрациклиновым и таксан-содержащим режимом. При использовании рекомендуемых режимов, предусматривающих введение трастузумаба одновременно с таксанами, минимальным объемом адъювантной анти-HER2 терапии является введение трастузумаба в течение 6 месяцев, оптимальным – в течение 12 месяцев.

В случае выявления трижды негативного РМЖ добавление таксанов повышает эффективность химиотерапии. В рамках данного исследования использовалась инфузия паклитаксела 135 мг/м² длительностью 3 часа каждые 3 недели. В связи с отсутствием убедительных данных об увеличении выживаемости больных тройным негативным РМЖ при добавлении производных платины к таксанам, в нашем исследовании включение этих препаратов (производных платины) в режиме адъювантной химиотерапии не использовалось.

Диагностику опухолевого процесса у пациенток, включенных в настоящее исследование, проводили на основании общепринятых методов. Наряду с данными объективного обследования (осмотр, маммография, ультразвуковое обследование и пр.) диагноз верифицировали с использованием цитологического и морфологического методов. Диагностику отдаленного метастазирования осуществляли с обязательным использованием рентгенографии или рентгеномографии легких и органов средостения, ультразвукового или компьютерного обследования органов брюшной полости, малого таза и забрюшинного пространства, остеосцинтиграфии. Обязательным компонентом дообследования являлось изучение состояния эндокринной и репродуктивной функций – консультация эндокринолога и гинеколога с определением типа вагинального мазка.

Маркировка опухоли танталовыми скобами до начала неоадъювантной терапии и установка локализационного «гарпуна» непосредственно перед операцией позволяют избежать позитивного края резекции и выполнить прицельное морфологическое исследование ложа опухоли в случае ее полной патоморфологической регрессии.

При проведении CORE биопсии (биопсии режущей иглой) опухоли молочной железы соблюдались все правила асептики и антисептики, анестезия не применялась. Непрерывный ультразвуковой контроль на протяжении всего вмешательства обеспечивал его результативность и безопасность.

При обследовании пациентов на дооперационном этапе цитологические исследования проводились для верификации первичного очага в ткани молочной железы, вторичных процессов в регионарных лимфоузлах и отдаленных органах с целью определения стадийности заболевания и определения распространенности опухолевого процесса.

Интра- и постоперационно цитологические методы исследования использовались для оценки степени дифференцировки клеток опухоли молочной железы и для определения клеточной диссеминации опухоли.

Материалом для цитологических исследований служили пунктаты опухолевидных образований и отделяемое сосков молочной железы, отпечатки и соскобы с эрозированных поверхностей опухоли и соскобы с разрезов удаленных опухолей и тканей молочной железы и регионарных лимфоузлов, а также смывы с операционной раны и дренажная жидкость.

Весь полученный материал наносился на предварительно обработанные предметные стекла и высушивался на воздухе. Смывы и дренажная жидкость центрифугировались, из осадка приготавливались препараты для исследования.

Для окрашивания цитологических препаратов использовались общепринятые методы окраски по Романовскому-Гимзе, Май-Грюнвальду, Лейшману азур-эозиновыми смесями с предварительной фиксацией спиртосодержащими красителями, а также интраоперационные экспресс-методы окраски по Астраханцеву, Алексееву и Нечаевой.

Для морфометрического исследования отобрано 345 наблюдений долькового инвазивного рака молочной железы различной степени злокачественности, из них высокодифференцированных карцином (G1) было 35, умереннодифференцированных карцином (G2) – 125, низкодифференцированных (G3) – 134 и недифференцированных (G4) – 51 наблюдение. Для морфологического и морфометрического изучения были взяты кусочки опухоли из центра и периферии.

Количественно определяли ряд параметров тканевой структуры опухоли, уровень стереохимической организации коллагеновых волокон, показатели пролиферативной активности опухолевых клеток, качественные и количественные характеристики клеточных инфильтратов стромы. При выполнении морфометрических исследований руководствовались основными принципами проведения количественных морфологических исследований.

Кусочки ткани фиксировали в растворе ИHC ZincFixative (PharMingen, USA), заливали в парафин и изготавливали серийные парафиновые срезы толщиной 5,1 мкм, которые затем окрашивали гематоксилином и эозином, по ванн Гизону, по Вергоффу, толуидиновым синим при pH 2.6 и 5.3, ставили ШИК-реакцию с обработкой контрольных срезов амилазой. Часть серийных гистологических срезов, депарафинированных по стандартной методике, обрабатывали моноклональными антителами к поверхностным антигенам p53, Ki67 и EDFR – протеазы, к цитокератинам, виментину, а также антигенам эпителиальных мембран (Phar Mingen, USA).

Иммуногистохимическое исследование исходно проведено всем женщинам на операционном материале. У обследованных первой группы после неoadьювантного лечения было проведено повторное изучение послеоперационного материала в соответствии с целью исследования.

Метод иммуногистохимического определения гормонального статуса опухолей молочной железы основан на использовании меченного стрептавидин-

биотина, конъюгированного с моноклональными антителами к рецепторам и ферментам пероксидазы хрена. Реакция производилась укомплектованным набором реактивов фирмы «Дакко» (Дания) и «Новокастра» (Великобритания) и одновременно позволяла определять в каждой опухоли наличие рецепторов к эстрогену и прогестерону.

Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) проводилось в ручном режиме набором реактивов, готовых к употреблению – DAKO Hercept Test.

Математическая обработка данных. Статистический анализ был проведен в программе RStudio версия 1.2.1335 © 2009-2019 RStudio, Inc., GPL. Количественные переменные представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения, т.к. все данные были распределены нормально (тест Шапиро-Уилка). Номинальные и порядковые переменные представлены в виде процентов. При проведении унивариантного анализа для сравнения двух независимых групп с количественными переменными был использован t-критерий Стьюдента. Для сравнения номинальных шкал применялся критерий Пирсона, если не более 20% ожидаемых частот было меньше 5, в противном случае применялся точный критерий Фишера.

При анализе выживаемости в первой группе было 12 (6,6%) центрированных больных, во второй – 33 (20,2%). Анализ выживаемости был выполнен при помощи построения кривых выживания по методу Капана-Мейера. На первом этапе была создана функция выживания (наличие или отсутствие исхода в зависимости от времени), построены кривые для общей и безрецидивной выживаемости. Далее проводился унивариантный анализ сравнения кривых выживания в зависимости от различных факторов, которые сравнивались с помощью log-rank теста. Затем проводился мультивариантный анализ (построение моделей прогнозирования) с помощью регрессии Кокса (метод – Efron). На первом этапе в модель включались факторы, которые могли повлиять на функцию выживания, далее с помощью методики «backward» производилось определение факторов, которые в наибольшей мере влияли на функцию выживания. После этого производилась оценка теста отношения правдоподобия и интерпретация коэффициентов.

Результаты исследования и их обсуждение. По результатам проведенного нами исследования у всех 182 женщин исследуемой группы диагностирована IIIb стадия заболевания. У 126 (69,2±3,4%) пациенток опухолевый рост сопровождался наличием вторичного отека молочной железы, прорастанием в кожу или сателитными метастатическими узлами на коже в зоне опухоли. У 44 (24,2±3,2%) женщин опухолевый процесс распространялся на анатомические структуры передней грудной стенки. У 5 (2,7±1,2%) пациенток перечисленные симптомы опухолевого роста сочетались между собой, а у 7 (3,8±1,4%) женщин диагностирована воспалительная форма рака.

У всех 163 женщин группы сравнения диагностирована IIIb стадия заболевания. У 114 (69,9±3,6%) пациенток опухолевый рост сопровождался наличием вторичного отека молочной железы, прорастанием в кожу или сателитными метастатическими узлами на коже в зоне опухоли. У 34 (20,9±3,2%)

женщин опухолевый процесс распространялся на анатомические структуры передней грудной стенки. У 4 (2,5±1,2%) пациенток перечисленные симптомы опухолевого роста сочетались между собой, а у 11 (6,7±2,0%) женщин диагностирована воспалительная форма рака.

Уровень гистопатологической дифференцировки опухолевой ткани нами оценивался по результатам микроскопического исследования согласно критериям С.W.Elston, I.O.Ellis (1991) и дополненное Р.Hermanek et al. (1999) и регистрировался как GX – в тех случаях, когда уровень дифференцировки опухолевых клеток нельзя оценить, G1 – высокодифференцированный, G2 – умеренно дифференцированный, G3 – низкодифференцированный и G4 – недифференцированный. Определенной закономерности между степенью злокачественности (G1-G4) и гистологической структурой опухоли нами не установлено.

Высокодифференцированные опухоли молочной железы (G1) выявлены у 35 (10,1%) пациенток, умереннодифференцированные (G2) – у 125 (36,2%) женщин, низкодифференцированные (G3) – у 134 (38,8%) больных, недифференцированные (G4) – у 51 (14,8%) пациентки, не имея статистически значимых различий между группами (p-value = 0,9092).

Опухолевые клетки паренхимы умеренно дифференцированной инвазивной протоковой карциномы (G2) имели полигональную форму, светлую эозинфильную, реже базофильную цитоплазму, содержали мелкие вакуоли.

Клетки паренхимы низкодифференцированной инвазивной протоковой карциномы (G3) до лечения широко варьировали по величине и форме. По периферии опухолевых комплексов преобладали полигональные клетки со светлой, слабо эозинфильной цитоплазмой, содержащие овоидные ядра с неравномерным распределением хроматина, преимущественно конденсирующегося в периферических отделах, ближе к ядерной мембране. Соотношение ядра и цитоплазмы в таких клетках при визуальной оценке примерно равно. Для части опухолевых комплексов, располагающихся вблизи базальной мембраны, характерны гиперхромные ядра, занимающие почти весь объем клетки. Эти ядра окружены узким ободком базофильной цитоплазмы. Выявлялось большое число патологических форм митозов.

Клетки паренхимы недифференцированной инвазивной протоковой карциномы (G4) до лечения отличались резко выраженной катаплазией, полиморфизмом и дисконкомплексацией опухолевых клеток. Ядра крупные полиморфные, гиперхромные с крупнодисперсным распределением хроматина, содержали несколько хорошо контурируемых ядрышек. Соотношение стромы и паренхимы variabelно, на отдельных участках выраженное преобладание стромы было обусловлено отеком и разрыхлением волокнистой соединительной ткани.

С наименьшей частотой в обеих группах регистрировался подтип люминальный А. Это эстроген-зависимая опухоль, наименее агрессивна, характеризуются лучшим прогнозом по сравнению с рецептор-негативным раком.

РМЖ люминального В+ подтипа с одинаковой частотой регистрировали в исследуемой группе и группе сравнения. HER2-позитивный РМЖ относится к эстроген-независимым агрессивным опухолям с высоким пролиферативным индексом. Характерны низкая дифференцировка, большой размер опухоли, вовлечение лимфатических узлов, высокая вероятность негативного исхода заболевания.

Люминальный В- подтип с одинаковой частотой регистрировали у пациенток исследуемой группы и группы сравнения. РМЖ люминального В- подтипа относят к эстроген-зависимым агрессивным опухолям. Для данного подтипа были характерны ранний возраст на момент постановки диагноза, низкая степень дифференцировки, высокий пролиферативный индекс, большой размер опухоли, вовлечение лимфатических узлов. Опухоли этого подтипа характеризовались значительно худшим прогнозом и большей вероятностью рецидивов по сравнению с другими рецептор-позитивными опухолями.

Трипл-негативный РМЖ, являющийся эстроген-независимой агрессивной опухолью, с одинаковой частотой регистрировали у пациенток исследуемой группы и группы сравнения. Для больных с данным подтипом РМЖ были характерны ранний возраст установления диагноза, протоковый или метастатический гистологический тип, низкая степень дифференцировки, высокий пролиферативный индекс, большой размер опухоли, вовлечение лимфатических узлов. Трипл-негативный РМЖ отличается высокой агрессивностью, большой вероятностью развития местно-распространённых и метастатических форм. Согласно результатам исследования J.S. Parker (2009), прогноз при данном подтипе РМЖ неблагоприятный, независимо от поражения лимфатических узлов, выживаемость в этой группе ниже, чем при РМЖ других молекулярных подтипов, включая Her2-позитивный рак.

По результатам нашего исследования после изучения ИГХ-статуса у пациенток в исследуемой группе было выявлено изменение молекулярно-биологического подтипа РМЖ, в 22,53% случаях (41 пациентка) была изменена схема лечения, в 9,34% случаях (17 пациенток) отмечен полный патоморфологический ответ опухоли на проводимую неоадьювантную терапию.

В подгруппах «Люминальный А» и «Люминальный В-» подтипов опухоли получены следующие результаты: в 5,94% случаях (10 пациенток) изменился генетический фенотип РМЖ и стал трижды негативным, в 1,65% случаях (3 пациентки) статус опухоли изменился на «Люминальный В+», в одном случае (0,55%) перешел в «Нелюминальный Her2/neu+», в 0,55% (1 пациентка) отмечен полный патоморфологический ответ опухоли на проводимое лечение, в остальных 16,48% случаях (30 пациенток) генетический фенотип РМЖ не изменился.

В подгруппе «Люминального В+» подтипа опухоли получены следующие результаты: в 3,84% случаях (7 пациенток) – стал «трижды негативным», в 2,74% случаях (5 пациенток) перешел в подтип «Нелюминальный Her2/neu+», в 2,74% случаях (5 пациенток) отмечен полный патоморфологический ответ опухоли на

проводимое лечение, в 12,64% случаях (23 пациентки) биологический подтип не изменился.

В подгруппе «Нелюминальный Her2/neu+» получены следующие результаты: в 0,55% случаях (1 пациентка) изменился генетический фенотип опухоли и перешел в «Люминальный В-» подтип, также в 0,55% случаях (1 пациентка) – стал «трижды негативным», в 2,2% случаях (4 пациентки) – стал «Люминальным В+», в 2,75% случаях (5 пациенток) отмечен полный патоморфологический ответ опухоли на проводимое лечение, в остальных случаях – 14,8% (27 пациенток) – биологический подтип опухоли не изменился.

В подгруппе «трижды негативного» подтипа опухоли получены следующие результаты: в 1,1% случаях (2 пациентки) изменился биологический подтип опухоли, который перешел в «Люминальный В-» подтип, в 3,3% случаях (6 пациенток) отмечен полный патоморфологический ответ опухоли на проводимое лечение, в остальных 17,03% случаях (31 пациентка) – биологический подтип опухоли не изменился.

В связи с тем, что в исследуемой группе у 81 пациентки наблюдалось изменение молекулярно-биологического подтипа опухоли рака молочной железы, была произведена коррекция в схемах проведения тактики лечения у 41 пациентки. С учетом полученных изменений, сформировалось три подгруппы пациентов с изменением режимов адъювантной лекарственной терапии:

1. Группа «трижды негативного» подтипа РМЖ, (10,33% случаев). Учитывая высокую чувствительность данной опухоли к препаратам таксанового ряда, режим адъювантной химиотерапии был продолжен с применением инфузии паклитаксела 135 мг/м² длительностью 3 часа каждые 3 недели.

2. Группа HER2 позитивного РМЖ (4,93% случаев). Обязательным условием продолжения адъювантного лекарственного лечения было включение в лечебную схему анти-HER2 препаратов (трастузумаб в дозе 6 мг/кг (нагрузочная доза 8 мг/кг) в/в в 1-й день 1 раз в 3 недели), которые применялись с химиотерапией таксан-содержащими режимами, учитывая высокий риск кардиотоксичности при одновременном введении антрациклинов и анти-HER2 терапии. Начало таргетного лечения осуществлялось с адъювантными курсами полихимиотерапии, после окончания которых терапия продолжалась в стандартном режиме до 12 месяцев.

3. Группа с выявлением люминального РМЖ (3,85% случаев). Все пациентки данной группы достигли менопаузального статуса на момент исследования и имели неблагоприятные результаты мультипараметрических молекулярных маркеров (HER2 позитивный статус опухоли и/или высокий индекс Ki67). Адъювантное лечение в данной группе осуществлялось с применением гормональной терапии – ингибитором ароматазы (летрозол) 2,5 мг в сутки внутрь. Планируемая продолжительность гормонального лечения составляла 5 лет.

В исследуемой группе 5-ти летняя безрецидивная выживаемость составила 63,9% (95% ДИ 57,2-71,4) (116 пациенток), тогда как в группе сравнения этот

показатель не превысил 45,8% (95% ДИ 37,6-55,8) (83 пациентки) (p=0,0071) (рис. 1, 2).

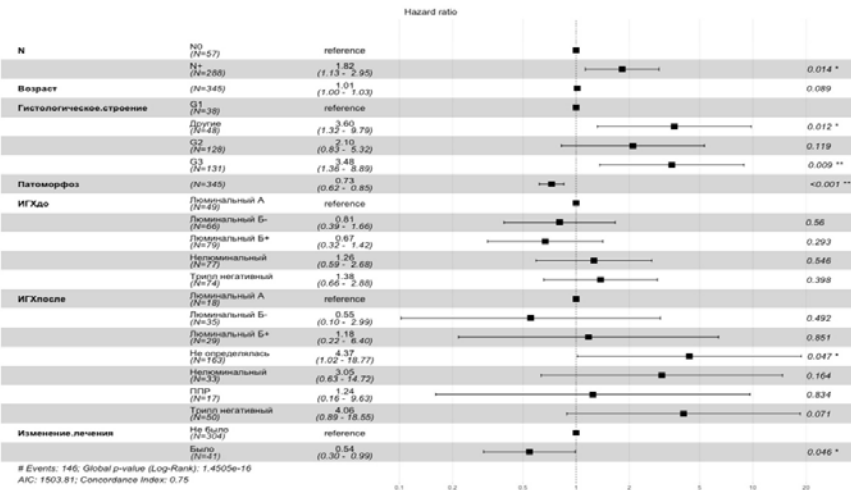


Рисунок 1. Анализ 5-ти летней безрецидивной выживаемости пациентов в исследуемой группе (пропорциональная модель Кокса)

Примечание: N – Количество пациенток; ИГХ до – иммуногистохимический фенотип опухоли до начала лечения; ИГХ после – иммуногистохимический фенотип опухоли, определяемый на операционном материале после проведения неоадьювантного лечения и мастэктомии;

*– данные являются статистически значимыми на уровне значимости p<0,05;

**– данные являются статистически значимыми на уровне значимости p<0,01;

***– данные являются статистически значимыми на уровне значимости p<0,001.

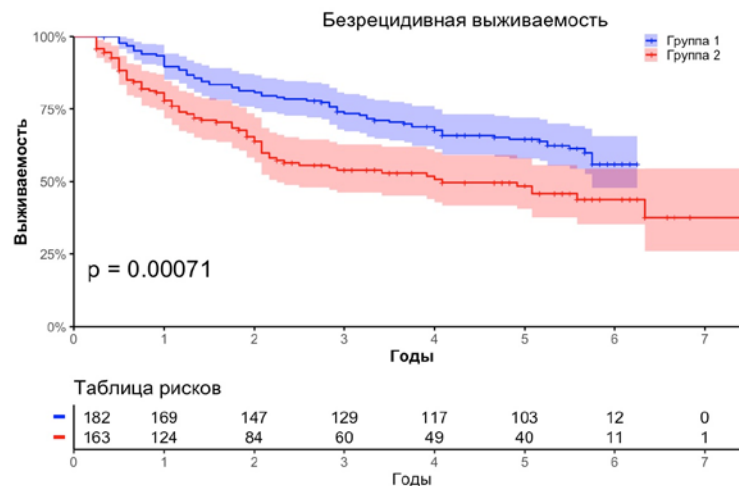


Рисунок 2. Анализ 5-ти летней безрецидивной выживаемости пациентов исследуемой и контрольной групп (p=0,00071)

При анализе показателей общей выживаемости отмечено статистически значимое улучшение результатов лечения в основной группе по сравнению с группой сравнения. Общая 5-ти летняя выживаемость в исследуемой группе составила 65,6% (95% ДИ 59-73) (119 пациенток) в сравнении с 53,8% (95% ДИ 57,0-78,8) (62 пациентки) в группе сравнения (p=0,0021)(рис. 3, 4).

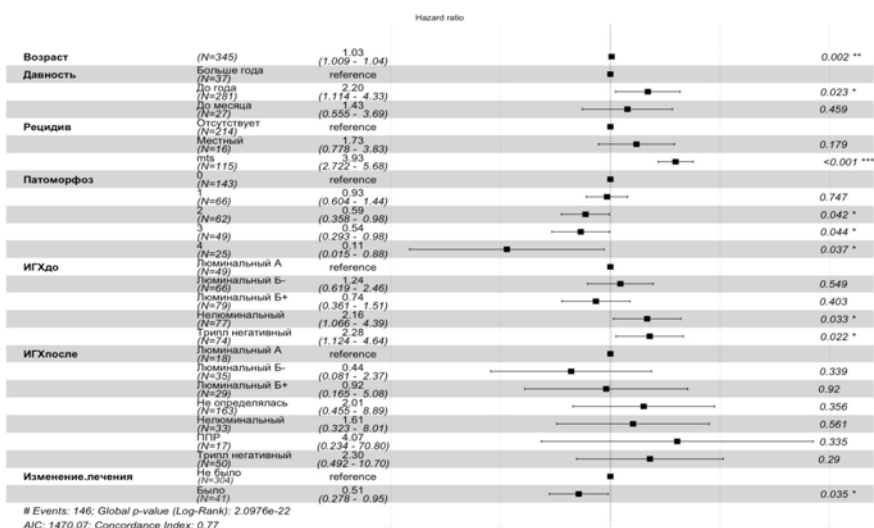


Рисунок 3. Анализ 5-ти летней общей выживаемости в исследуемой группе (пропорциональная модель Кокса)

Примечание: N – Количество пациенток; ИГХдо – иммуногистохимический фенотип опухоли до начала лечения; ИГХпосле – иммуногистохимический фенотип опухоли, определяемый на операционном материале после проведения неoadьювантного лечения и мастэктомии;

- * – данные являются статистически значимыми на уровне значимости $p < 0,05$;
- ** – данные являются статистически значимыми на уровне значимости $p < 0,01$;
- *** – данные являются статистически значимыми на уровне значимости $p < 0,001$.

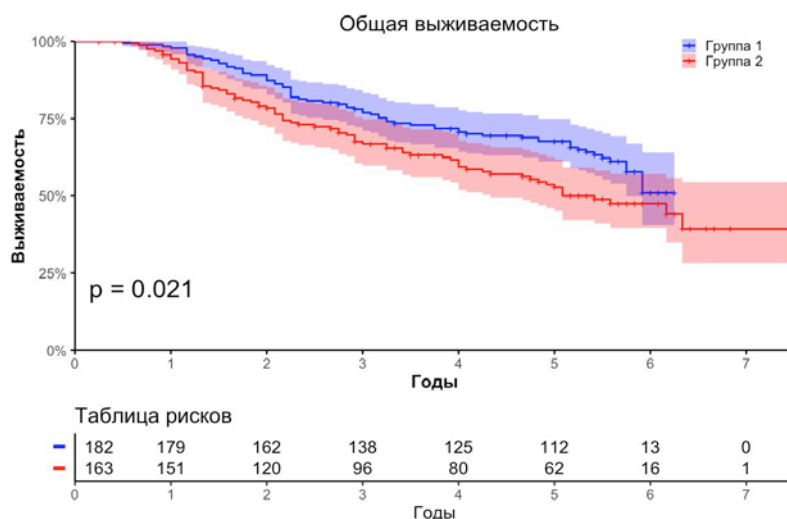


Рисунок 4. Анализ 5-ти летней общей выживаемости в исследуемой и контрольной группах ($p=0,021$)

Полная патологическая регрессия опухоли была достигнута у 9,34% (17 пациенток). В исследуемой группе рецидивы не наблюдались в 147 случаях (80,8% (95% ДИ 74,3-87,9), $p=0,034$), тогда как в группе сравнения этот показатель не превышал 66,2% (95% ДИ 55,8-78,5, $p=0,034$) (120 пациенток). Статистически значимой достоверности различий в местных и отдаленных рецидивах между исследуемыми группами не выявлено, что свидетельствует об однородном распределении пациенток в группах по данному критерию.

Результаты проведенного нами исследования свидетельствуют о том, что определение молекулярно-биологических типов РМЖ на основе иммуногистохимической оценки экспрессии ER, PR и Her2/neu является достаточно информативным и упрощенным методом диагностики.

В данном исследовании отчетливо продемонстрирована необходимость изучения ИГХ-статуса после проведения неоадьювантной терапии для выявления изменений молекулярно-биологических подтипов РМЖ. Изучение закономерностей изменений в каждом молекулярно-биологическом подтипе представляет важную прогностическую информацию, поскольку определение тактики дальнейшего лечения рака молочной железы становится более персонафицированным.

ВЫВОДЫ

В диссертации дано теоретическое обоснование и новое научное решение актуальной задачи современной онкомамологии, заключающееся в улучшении ближайших и отдаленных результатов комплексного лечения больных местно-распространенным раком молочной железы путем персонафикации лечебной тактики в зависимости от молекулярно-биологического подтипа рака.

1. Причиной неудовлетворительных результатов лечения пациенток с местно-распространенным раком молочной железы явилось отсутствие повторной иммуногистохимической оценки экспрессии ER, PR и Her2/neu и Ki-67 при назначении адьювантной терапии. В группе сравнения 5-ти летняя безрецидивная выживаемость составила 45,8% (95% ДИ 37,6-55,8), общая 5-ти летняя выживаемость – 53,8% (95% ДИ 57,0-78,8).

2. У пациенток с местно-распространенным раком молочной железы проведенная неоадьювантная химиотерапия привела к изменению биологических свойств опухоли молочной железы. В исследуемой группе у 81 (44,5%) пациентки поменялся ИГХ подтип рака молочной железы. До лечения Люминальный А подтип установлен у 30 (16,5%) пациенток, Люминальный В+ у 40 (22%) пациенток, Люминальный В- у 35 (19,2 %) пациенток, нелюминальный HER2new положительный у 38 (20,9%) пациенток, трипл-негативный рак у 39 (21,4%) пациенток. После лечения получены следующие результаты: Люминальный А подтип у 15 (8,3%) пациенток, Люминальный В+ у 22 (12,1%) пациенток, Люминальный В- у 33 (18,1%) пациенток, нелюминальный HER2new положительный 27 (14,8%) пациенток, трипл-негативный рак у 45 (24,7%) пациенток.

3. На основании изменений иммуногистохимического статуса опухоли модифицирован протокол адьювантного лечения: в 10% случаях «трижды негативного» подтипа РМЖ, учитывая высокую чувствительность данной опухоли к препаратам таксанового ряда, режим адьювантной химиотерапии требует применения инфузии паклитаксела; в 5% случаях HER2 позитивного РМЖ в лечебную схему включены анти-HER2 препараты; в 4% случаях

выявления люминального РМЖ адъювантное лечение осуществлялось с применением гормональной терапии.

4. При анализе показателей общей и безрецидивной 5-ти летней выживаемости отмечено статистически значимое улучшение результатов лечения в исследуемой группе: 5-ти летняя безрецидивная выживаемость улучшилась на 18,1% ($p=0,0071$), общая 5-ти летняя выживаемость улучшилась на 11,8% ($p=0,0021$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Маркировка опухоли танталовыми скобами до начала неoadъювантной терапии и установка локализационного «гарпуна» непосредственно перед операцией позволяют избежать позитивного края резекции и выполнить прицельное морфологическое исследование ложа опухоли в случае ее полной патоморфологической регрессии.

2. Результаты исследования позволяют обеспечить целенаправленное определение объема адъювантной терапии путем определения иммуногистохимического статуса рака молочной железы после проведенного неoadъювантного лечения.

3. Целесообразно определение молекулярно-биологических подтипов рака молочной железы на основе иммуногистохимической оценки экспрессии ER, PR и Her2/neu с последующей персонификацией лечебной тактики в зависимости от молекулярно-биологического подтипа рака.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Изменение биологических свойств опухоли местно-распространенного рака молочной железы на фоне проведения неoadъювантного лечения [Текст] / И. Е. Седаков, Д. В. Поминчук, В. Н. Смирнов, А. В. Мотрий, Т. Л. Скочиляс, Н. В. Волкова, Р. В. Старушко, М. О. Мотрий // Новообразование. – 2016. – № 2 (15). – С. 50 – 53. Соискатель проведен набор материала, оценены первые результаты проводимого исследования.

2. Многоликий рак молочной железы: от внутриопухолевой гетерогенности до изменения иммунофенотипа опухоли [Текст] / И. Е. Седаков, В. Н. Смирнов, А. В. Мотрий, Т. Л. Скочиляс, Я. В. Садрицкая, М. О. Мотрий // Новообразование. – 2019. – Т. 11, № 2 (25). – С. 58 – 62. Соискатель провел набор литературных данных.

3. Персонификация адъювантного лечения местно-распространенного рака молочной железы, на фоне изменения иммуно-гистохимического подтипа опухоли [Текст] / И. Е. Седаков, А. В. Мотрий, В. Н. Смирнов, Т. Л. Скочиляс, Л. П. Резниченко, М. О. Мотрий, О.В.Колычева, А. В. Башеев// Новообразование. – 2019. – Т. 11, № 4 (27). – С. 141– 146. Соискателем посчитана безрецидивная и 5-летняя выживаемость, сделаны выводы проводимого исследования.

4. Спосіб комбінованого лікування місцево розповсюдженого раку молочної залози [Текст] : пат. 131904 Україна : МПК (2018.01) А61В 17/00, А 61N 5/00, G01N 33/50 (2006.01) / Седаков І. Є. UA, Смирнов В. М.UA, Мотрій О. В.UA; заявник та патентовласник Седаков І. Є. – № у 2018 07122 ; заявл. 25.06.2018 ; опубл. 11.02.2019, Бюл. №3. – 4 с.

5. Применение стереотаксических и ультразвуковых методов в диагностике и лечении рака молочной железы [Текст] / И. Е. Седаков, Д. В. Поминчук, А. В. Мотрий, Р. В. Старушко, Е. В. Поршнева // II Петербургский онкологический форум «Белые Ночи» (22-24 июня 2016 г.) : Сборник тезисов. – М., 2016. – С. 397.

6. Изменение генетического фенотипа РМЖ после селективной внутриартериальной полихимиотерапии в сочетании с лучевой терапией в неоадьювантном режиме [Текст] / И. Е. Седаков, Д. В. Поминчук, А. В. Мотрий, Н. В. Волкова, Т. Л. Скочиляс, А. В. Бондарь // Евразийский онкологический журнал. – 2016. – Т. 4, № 2. – С. 303 – 304.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- БРВ – безрецидивная выживаемость;
 ИГХ – иммуногистохимия;
 ИГХ-статус – иммуногистохимический статус;
 НПХТ – неоадьювантная полихимиотерапия;
 ОВ – общая выживаемость;
 ПХТ – полихимиотерапия;
 РМЖ – рак молочной железы;
 РМЭ – радикальная мастэктомия;
 РОЦ – Республиканский онкологический центр им. Г.В. Бондаря;
 РП – рецепторы прогестерона;
 РПХТ – регионарная полихимиотерапия;
 РЭ – рецепторы эстрогенов;
 ХТ – химиотерапия;
 ЭЛПХТ – эндолимфатическая полихимиотерапия;
 АС – схема полихимиотерапии, включающая: Доксорубицин, Циклофосфан;
 СМФ – схема полихимиотерапии, включающая: Циклофосфан, Метатрексат, Фторурацил;
 ФАС – схема полихимиотерапии, включающая: Фторурацил, Доксорубицин, Циклофосфан;
 рСР – полный патологический ответ.