

НЕКОТОРЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ С БЕВАЦИЗУМАБОМ ПРИ МЕСТНО-РАСПРОСТРАНЕННОМ РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ

Максимов А.Ю.¹, Назаралиева Н.А.¹, Комарова Е.Ф.², Позднякова В.В.¹,
Комарова Е.Ю.³

¹ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: rnioui@list.ru;

²ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, e-mail: katitako@gmail.com;

³ФГБОУ ВО «РостГМУ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: lil_liza777@mail.ru

При иммуногистохимическом исследовании биоптатов плоскоклеточного рака шейки матки T1b2-T2bNxM0 (основная группа (ОГ, n=49) - неoadьювантная химиотерапия (НАХТ) с включением в схему бевацизумаба; контрольная (КГ, n=25) – стандартная НАХТ) показана более низкая пролиферативная активность в ОГ (в 1,4 раза), чем в КГ. Среднее значение ki-67 ниже по сравнению с группой до лечения на 37,6 и 55% в КГ и ОГ соответственно (во всех случаях p<0,01). Экспрессия p53 снижалась после лечения на 55% КГ (p<0,05) и 59% в ОГ (p<0,01), так же как и экспрессия bcl-2 на 45% (КГ) и 65% (ОГ) (во всех случаях p<0,05). Оценка достоверности сопряжения применения НАХТ и экспрессии маркеров апоптоза установила значительную ассоциацию. Выраженный патоморфологический ответ опухоли в основной группе был получен в 65,3% случаев против 36% в контроле. Проведенное исследование показателей биологического поведения местно-распространенного рака шейки матки под влиянием цитостатической терапии и комбинации ее с таргетной выявило достоверное снижение пролиферативной активности опухоли и угнетение экспрессии апоптотических белков, патоморфологический ответ по критериям полного или почти полного регресса опухоли, более выраженное в ОГ. Это дает основание заключить, что примененный метод сочетания неoadьювантного лечения с бевацизумабом у больных местно-распространенным раком шейки матки эффективен для подавления опухолевого роста местно-распространенного рака шейки матки. Примененный лекарственный метод сочетания неoadьювантного лечения с бевацизумабом у больных местно-распространенным раком шейки матки эффективен для подавления опухолевого роста местно-распространенного рака шейки матки, поскольку отмечено достоверное снижение пролиферативной активности опухоли, угнетение экспрессии апоптотических белков.

Ключевые слова: неoadьювантная химиотерапия, бевацизумаб, местно-распространенный рак шейки матки.

SOME MOLECULAR-BIOLOGICAL MECHANISMS OF THE EFFECT OF NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY WITH BEVACIZUMAB IN LOCALLY ADVANCED CERVICAL CANCER

Maksimov A.Y.¹, Nazaraliev N.A.¹, Komarova E.F.², Pozdnyakova V.V.¹,
Komarova E.Y.³

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: rnioui@list.ru;

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, e-mail: katitako@gmail.com;

³The Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, e-mail: lil_liza777@mail.ru

An immunohistochemical study of biopsy samples of squamous cervical cancer of the uterus T1b2-T2bNxM0 (main group (MG, n = 49) - neoadjuvant chemotherapy (NAC) with the inclusion of bevacizumab; control group (CG, n = 25) —standard NAC) was performed lower proliferative activity in the MG (1.4 times) than in the CG. The average value of ki-67 was lower compared to the group before treatment by 37.6 and 55% in the CG and the MG, respectively (in all cases, p <0.01). The expression of p53 decreased after treatment by 55% CG (p <0.05) and 59% in MG (p <0.01), as well as expression of bcl-2 by 45% (CG) and 65% (MG) (in in all cases, p <0.05).). Assessment of the reliability of the conjugation of the use of NAC and expression of apoptosis markers has established a significant association. A pronounced pathomorphological response of the tumor in the main group was obtained in 65.3% of cases against 36% in the control. The study of the indicators of the biological behavior of locally advanced cervical cancer under the influence of cytostatic therapy and its combination with targeted therapy revealed a significant decrease in the proliferative activity of the tumor and inhibition of the expression of apoptotic proteins, a pathomorphological response according to the criteria for complete or almost complete tumor regression, more pronounced in MG. This suggests that the method used to combine neoadjuvant treatment with bevacizumab in patients with locally advanced cervical cancer is effective in suppressing tumor growth in locally advanced cervical cancer.

Keywords: neoadjuvial chemotherapy, bevacizumab, locally advanced cervical cancer.

В структуре онкозаболеваемости России у женщин рак шейки матки (РШМ) занимает 5-е ранговое место, а прирост заболеваемости составляет 24,68% за последнее десятилетие [1]. Рост заболеваемости неуклонно растет, и стандартизованные показатели в 2007 г. составляли 12,5, в 2013 г. - 14,2, а в 2017 г. – 15,8 на 100 тыс. населения.

Основным методом лечения при местно-распространенном раке шейки матки (МРРШМ) является лучевая терапия [2]. Так, больные раком шейки матки II стадии в 69,5% подвергаются сочетанной лучевой терапии, а при III стадии - в 96,2% [3]. Применение комбинированного химиолучевого лечения МРРШМ сопряжено с непосредственными или отдаленными побочными эффектами со стороны различных систем организма [4].

Химиотерапевтическое лечение чаще проводится у больных метастатическим и рецидивирующим раком шейки матки, имеющих неблагоприятный прогноз [5]. Однако в исследованиях показано, что включение в схему комплексного лечения химиотерапии значительно улучшает результаты лечения больных МРРШМ, что выражается в уменьшении размеров опухоли и, следовательно, способствует онкологическому радикализму при хирургических вмешательствах и, как следствие, снижает процент рецидивирования и метастазирования РШМ [6]. Благодаря использованию химиотерапии в неoadъювантном варианте у больных МРРШМ возможно в дальнейшем сочетание ее с лучевой терапией и перевод неоперабельных пациентов в резектабельное состояние [7; 8]. Некоторые исследования продемонстрировали положительное влияние применения неoadъювантной химиотерапии МРРШМ на показатели общей и безрецидивной выживаемости [9; 10].

Противоопухолевый эффект бевацизумаба связан с его антиангиогенным воздействием на опухоли. Как известно, представитель семейства васкулоэндотелиальных ростовых факторов VEGF-A играет значительную роль в неопластическом ангиогенезе злокачественных опухолей [11], в том числе и при раке шейки матки [12]. Добавление к химиотерапии бевацизумаба улучшает отдаленные результаты лечения при использовании как платиносодержащих, так и бесплатиновых комбинаций [13]. Некоторые работы показывают, что бевацизумаб может улучшать перфузию и доставку лекарств в опухолевые ткани [14; 15].

Целью явилось изучить влияние неoadъювантной химиотерапии самостоятельно и в сочетании с бевацизумабом на экспрессию маркеров пролиферации и апоптоза в ткани плоскоклеточного местно-распространенного рака шейки матки.

Материал и методы исследования. В исследование были включены 74 больных с диагнозом местно-распространенный рак шейки матки (МРРШМ) T1b2-T2bNxM0,

проходивших обследование и лечение в ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации (2015-2018 гг.). Средний возраст пациенток составил $32,5 \pm 0,8$ года. Критерием включения в исследование был впервые выявленный плоскоклеточный (с ороговением и без) резектабельный рак шейки матки. Диагноз плоскоклеточного рака шейки матки был подтвержден при морфологическом исследовании. Все пациентки находились в репродуктивном периоде и не имели сопутствующей генитальной/соматической патологии. Наличие в анамнезе второй злокачественной опухоли любой локализации, иная гистологическая принадлежность опухоли были причиной исключения больных из исследования.

Всем пациенткам была проведена в неоадьювантном режиме химиотерапия (НАХТ) по схеме: паклитаксел 175 мг/м², в/в 1-й; карбоплатин AUC5 каждые 3 недели (3 курса). Больные были рандомизированы на основную и контрольную группы.

Основная группа (n=49) - пациентки, которым в основную схему включали антиангиогенный таргетный препарат бевацизумаб в дозе 7,5 мг/кг в 1-й день 1 раз в 3 недели.

Контрольная группа (n=25) - пациентки, которым проводили неоадьювантную химиотерапию без дополнения.

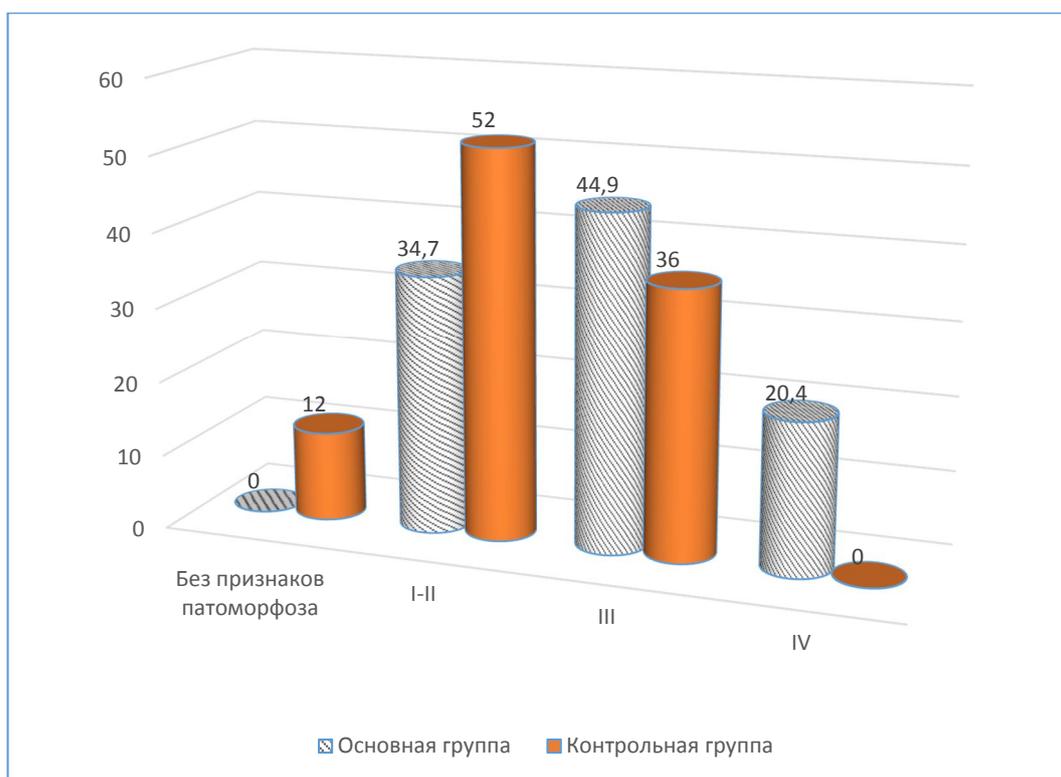
На включение в схему неоадьювантной химиотерапии бевацизумаба было получено разрешение этического комитета ФГБУ «РНИОИ» МЗ РФ, и все больные подписали информированное согласие на проведение лечения. Спустя 3-4 недели после окончания химиотерапии больным проводили оперативное вмешательство в объеме расширенной экстирпации матки с придатками и с верхней третью влагалища с двухсторонней тазовой лимфаденэктомией III типа по классификации River.

Биоптаты опухоли, взятые на этапе обследования и после оперативного лечения для иммуногистохимического исследования, готовили стандартным способом. Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием первичных антител для маркера пролиферации, ядерного белка Ki-67 (Spring Bioscience, Германия), маркеров апоптоза - ядерного белка p53 (ДАКО, Дания) и ингибитора апоптоза bcl-2 (Cell Marque, США). Оценку исследованных маркеров производили подсчетом количества положительно окрашенных клеток на 1000 клеток в 10 репрезентативных полях зрения (при наличии окраски > 25% клеток опухоль считали позитивной по маркеру). Степень пролиферативной активности опухоли оценивали по параметрам: 0–20% – низкая, 21–50% – умеренная, 51–100% – высокая пролиферативная активность. Для определения эффективности примененной НАХТ изучали патоморфологический ответ опухоли на основании анализа характеристик

опухолевых клеток: дистрофии, апоптоза и некроза. Лекарственный патоморфоз был представлен фиброзом и склерозом стромы опухоли с сохранением ее остатков в виде групп разрозненных опухолевых клеток (III степень) или с полным ее отсутствием (IV степень).

Статистический анализ результатов исследования проводился с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США), MedCalc (версия 9.3.5.0). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. При исследовании лекарственного патоморфоза опухоли после примененного НАХТ в различных группах пациенток получены результаты, представленные на рисунке. Нами выявлены межгрупповые различия патоморфологического ответа опухоли у пациенток МРРШМ. Так, показано, что в основной группе патоморфоз опухоли III–IV степени отмечался у пациенток в 65,3% наблюдений, тогда как в контрольной группе патоморфологический ответ такой степени выраженности встречался в 36% случаев.



Степень опухолевого патоморфоза (%) пациенток МРРШМ основной и контрольной групп

Полный регресс опухоли наблюдался у 20,4% больных основной группы на фоне отсутствия такого ответа в контроле. У 12% больных контрольной группы, которым применялось НАХТ без дополнения, признаков морфологического ответа опухоли на лечение не было выявлено.

Оценка экспрессии Ki-67 в образцах опухолевой ткани, полученной до лечения,

выявила превалирование умеренной пролиферативной активности опухолевых клеток, что превышало долю высокой пролиферативной активности в 1,9 раза и низкой – в 4,3 раза (табл. 1). Различия в группах имели статистическую значимость при $p < 0,05$.

Анализ пролиферативной активности клеток рака шейки матки обнаружил различия в группах пациенток после лечения (табл. 1). В основной группе наиболее часто встречалась пролиферативная активность низкой степени, а опухолевые клетки с высоким уровнем пролиферативной активности вообще отсутствовали. В контрольной группе пациенток низкая ПА встречалась в 1,4 раза реже, чем в основной группе ($p < 0,05$), однако также являлась преобладающей. При сравнении с показателями в тканях опухоли до лечения показано превышение доли опухолей пролиферативной активностью низкой степени в 5,4 раза ($p < 0,05$) и 3,8 раза ($p < 0,01$) в основной и контрольной группах соответственно. Умеренная ПА чаще наблюдалась в группе пациенток до лечения и была выше в 1,9 раза ($p < 0,05$), чем в основной группе пациенток, и в 1,4 раза ($p < 0,05$) в сравнении с контрольной группой.

Таблица 1

Распределение пролиферативной активности (ПА) рака шейки матки в зависимости от лечения

Группы	ПА				
		Низкая	Умеренная	Высокая	Всего
До лечения	Абс.	4	17	9	30
	%	13,3	56,7	30	100
Контрольная	Абс.	13	10	2	25
	%	50	41	9	100
Основная	Абс.	34	25	-	49
	%	70	30	-	100

Оценка уровня экспрессии изученных нами маркеров пролиферации и апоптоза представлена в таблице 2.

Среднее значение показателя пролиферации ki-67 было статистически значимо ниже по сравнению с группой до лечения на 37,6 и 55% в контрольной и основной группах соответственно (во всех случаях $p < 0,01$). Для экспрессии p53 опухолевых клеток были также характерны сниженные показатели в группах после лечения на 55% в контрольной ($p < 0,05$) и 59% в основной группах ($p < 0,01$). Однако межгрупповые различия экспрессии p53 при лечении МРРШМ не достигли статистической значимости.

Экспрессия bcl-2 была также ниже в группах с лечением на 45% (контрольная) и 65%

(основная) в сравнении с интактной опухолью (во всех случаях $p < 0,05$). Уровень bcl-2 между группами «контрольная – основная» достоверно не различался.

Таблица 2

Экспрессия маркеров пролиферации и апоптоза опухолевыми клетками больных раком шейки матки в зависимости от лечения

Исследуемые показатели	Группы	n	Уровень экспрессии, $M \pm m$	p
Ki-67	До лечения	30	41,8±5,6	
	Контрольная	25	26,1±2,9	$p_1 < 0,001$
	Основная	49	18,8±2,1	$p_2 < 0,001, p_3 < 0,001$
p53	До лечения	30	18,4±4,1	
	Контрольная	25	8,3±2,4	$p_1 < 0,001$
	Основная	49	7,6±1,2	$p_2 < 0,001$
bcl-2	До лечения	30	36,3±4,1	
	Контрольная	25	19,8±5,7	$p_1 < 0,001$
	Основная	49	12,7±3,8	$p_2 < 0,001$

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости по показателю Ki-67 до лечения и после неоадьювантной химиотерапии; p_2 – уровень статистической значимости по показателю Ki-67 до лечения и после неоадьювантной химиотерапии и бевацизумаба; p_3 – уровень статистической значимости по показателю Ki-67 между основной и контрольной группами.

Характеристика экспрессии маркеров апоптоза в опухолях местно-распространенного рака шейки матки после примененного лечения представлена в таблицах 3 и 4.

Таблица 3

Характеристика экспрессии p53 в опухолевой ткани больных МРРШМ в зависимости от лечения

Группы	Кол-во пациентов	Положительная реакция		Отрицательная реакция	
		Абс.	%	Абс.	%
До лечения	30	18	60	12	40
Контрольная	25	8	25	17	75
p (χ^2)		$p < 0,001 (\chi^2 = 9,9)$			
Основная	49	3	6	46	94
p (χ^2)		$p < 0,001 (\chi^2 = 28,5)$			

Положительная экспрессия маркера апоптоза p53 в ядрах клеток опухоли у больных

после лечения обнаруживалась значительно реже по сравнению с группой пациенток до лечения: в основной группе - в 2,4 раза и в контрольной группе – в 2,2 раза ($p < 0,05$) (табл. 3).

Оценка достоверности сопряжения применения неoadъювантной химиотерапии (для обеих групп) и экспрессии маркера p53 установила значительную ассоциацию (табл. 4). Критерий сопряжения Хи квадрат Пирсона для контрольной группы составил 9,9 при $p < 0,001$, а для основной - 28,5 при $p < 0,001$, что свидетельствует о достоверном угнетении экспрессии ингибиторов апоптоза и проапоптотическом действии применяемой терапии. Положительная реакция bcl-2 цитоплазмы клеток опухоли у больных МРРШМ после лечения наблюдалась реже относительно показателя в опухолевой ткани до лечения в 2,9 раза в основной и в 1,8 раза в контрольной группах ($p < 0,05$) (табл. 4).

Таблица 4

Характеристика экспрессии bcl-2 в опухолевой ткани больных МРРШМ в зависимости от лечения

Группы	Кол-во пациентов	Положительная реакция		Отрицательная реакция	
		Абс.	%	Абс.	%
До лечения	30	21	70	9	30
Контрольная	25	10	40	15	60
p (χ^2)	p=0,0001 ($\chi^2=9,2$)				
Основная	49	9	40	40	80
p (χ^2)	p<0,001 ($\chi^2=19,7$)				

Таким образом, иммуногистохимическое исследование показателей биологического поведения местно-распространенного рака шейки матки под влиянием применения в неoadъювантном режиме традиционно используемой цитостатической терапии и комбинации ее с таргетной (дополнение бевацизумабом) показало преобладание доли опухолей с низкой пролиферативной активностью и снижение уровня экспрессии Ki-67, а также снижение экспрессии опухолевыми клетками ядерного белка p53 и ингибитора апоптоза bcl-2. Причем более выраженное уменьшение пролиферативного потенциала и повышение апоптотической активности опухолевых клеток отмечено в группе пациенток, которым применяли цитостатическую терапию в сочетании с бевацизумабом. Возможно, полученный эффект от сочетания химиотерапии с бевацизумабом связан не столько с его антиангиогенными свойствами, сколько с его способностью повышать биодоступность цитостатических препаратов для опухолевых тканей [14; 15]. Кроме того, полученные результаты позволяют рассмотреть возможность использования иммуногистохимического

исследования экспрессии p53 и Ki-67 в тканях рака шейки матки как биомаркеров для оценки эффективности проводимого лечения [16]. Патоморфоз опухоли III–IV степени наблюдался у пациенток МРРШМ при сочетании НАХТ с бевацизумабом почти в 2 раза чаще, а также у части этой группы пациенток отмечен полный регресс опухоли, который не был обнаружен у пациенток, которым применяли НАХТ без дополнения бевацизумабом.

Выводы

1. При сочетании неoadъювантной химиотерапии с бевацизумабом у больных местно-распространенным раком шейки матки выявлено достоверное снижение пролиферативной активности опухоли и угнетение экспрессии апоптотических белков.

2. При морфологическом исследовании показано достоверное улучшение результатов лечения по критериям полного или почти полного регресса опухоли при сочетании неoadъювантной химиотерапии с бевацизумабом у больных местно-распространенным раком шейки матки.

3. Примененный лекарственный метод сочетания неoadъювантного лечения с бевацизумабом у больных местно-распространенным раком шейки матки эффективен для подавления опухолевого роста данной нозологии.

Список литературы

1. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2018. 250 с.
2. Коломиец Л.А., Чернышова А.Л., Чуруксаева О.Н., Виллерт А.Б., Молчанов С.В. Оптимизация современных подходов в лечении гинекологического рака основных локализаций // Злокачественные опухоли. 2017. Т. 7. № 3. С. 66-72.
3. Аксель Е.М. Состояние онкологической помощи населению России и стран СНГ в 2007 г. // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина. 2009. Т. 20. № 3.1. С. 8-51.
4. Duenas-Gonzales A., Cetina L., Coronel J. The safety of drug treatments for cervical cancer. Expert Opinion Drug Safety. 2016. Vol. 15. No 2. P. 169-180.
5. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний / Под ред. Н.И. Переводчиковой, В.А. Горбуновой. М.: Практическая медицина, 2018. 688 с.
6. Osman M. The role of neoadjuvant chemotherapy in the management of locally advanced cervix cancer: a systematic review. Oncol Review. 2014. Vol. 8. No 2. P. 250.
7. Zhou J., Li X., Huang K., Yao J. Young cervical cancer patients may be more responsive than older patients to neoadjuvant chemotherapy followed by radical surgery. PloS One. 2016. Vol. 11.

No 2. e0149534.

8. De la Torre M. Neoadjuvant chemotherapy in woman with early or locally advanced cervical cancer. *Rep. Pract. Oncol. Radiother.* 2018. Vol. 23. No 6. P. 528-532.
9. Tewari K.S., Sill M.W., Long H.J. 3rd, Penson R.T., Huang H., Ramondetta L.M., Landrum L.M., Oaknin A., Reid T.J., Leitao M.M., Michael H.E., Monk B.J. Improved survival with bevacizumab in advanced cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 2014. Vol. 370. P. 734-743.
10. Mallmann P., Mallmann C. Neoadjuvant and Adjuvant Chemotherapy of Cervical Cancer. *Oncol. Res. Treat.* 2016. Vol. 39. No 9. P. 522-524.
11. Кит О.И., Гуськова Н.К., Вереникина Е.В., Розенко Л.Я., Мягкова Т.Ю., Гуськова Е.А., Могушкова Х.А., Целищева И.В., Абакумова С.В. Прогностическая значимость VEGF-A при раке шейки матки // *Лабораторная служба.* 2018. Т. 7. № 3-2. С. 78.
12. Кит О.И., Франциянц Е.М., Никипелова Е.А., Комарова Е.Ф. Некоторые показатели неопластического ангиогенеза в ткани образований прямой кишки различной морфологической структуры // *Российский онкологический журнал.* 2015. Т. 20. № 2. С. 12-18.
13. Хохлова С.В., Деньгина Н.В., Коломиец Л.А., Кравец О.А., Морхов К.Ю., Нечушкина В.М., Новикова Е.Г., Тюляндина А.С., Урманчеева А.Ф. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака шейки матки. Практические рекомендации. Версия 2017. RUSSCO. 2017. С.158-167. DOI: 10.18027 / 2224-5057-2017-7-3s2-158-167.
14. Jain R.K. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. *J. Clin. Oncol.* 2013. Vol. 31. P. 2205-2218.
15. Liu W., Zhang J., Yao X., Jiang C., Ni P., Cheng L., Liu J., Ni S., Chen Q., Li Q., Zhou K., Wang G., Zhou F. Bevacizumab-enhanced antitumor effect of 5-fluorouracil via upregulation of thymidine phosphorylase through vascular endothelial growth factor A/vascular endothelial growth factor receptor 2-specificity protein 1 pathway. *Cancer Sci.* 2018. Vol. 109. No 10. P. 3294-3304.
16. Silva D.C., Gonçalves A.K., Cobucci R.N., Mendonça R.C., Lima P.H., Cavalcanti G Júnior Immunohistochemical expression of p16, Ki-67 and p53 in cervical lesions - A systematic review. *Pathol. Res. Pract.* 2017. Vol. 213. No 7. P. 723-729.