

МОЛЕКУЛЯРНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ПРОЛОНГИРОВАННОЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ПРИ РАКЕ ПРЯМОЙ КИШКИ

Новикова И.А.¹, Дженкова Е.А.¹, Шапошников А.В.¹, Гусарева М.А.¹, Харагезов Д.А.¹, Дурицкий М.Н.¹, Дашков А.В.¹, Колесников В.Е.¹, Снежко А.В.¹, Каймакчи Д.О.¹, Мирзоян Э.А.¹, Полуэктов С.И.¹, Донцов В.А.¹, Статешный О.Н.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: ellada-mirzoyan@yandex.ru

Цель исследования: выявить молекулярные и морфологические эффекты предоперационной лучевой терапии при раке прямой кишки. В структуре нашего исследования проанализированы данные о 45 больных, которым в периоперационном периоде была проведена лучевая терапия. В ткани удаленной интраоперационно опухоли проводили анализ ДНК в опухолевых клетках (CycleTESTTMPLUS DNA ReagentKit), а также определяли лечебный патоморфоз и изменение размеров опухоли под действием предоперационной лучевой терапии. Нами были выявлены увеличение частоты опухолей с индексом ДНК до 1,5 в 1,5 раза, снижение частоты опухолей с индексом ДНК выше 1,5 в 2,6 раза, лечебный патоморфоз III степени в 70% случаев. Протяженность опухоли уменьшилась в 1,5 раза, а расстояние от ануса до нижнего края опухоли увеличилось в 1,2 раза ($p < 0,05$). Молекулярно-морфологическим эффектом проводимой лучевой терапии рака прямой кишки было уменьшение потенциала злокачественности опухоли, проявляющееся лечебным патоморфозом различной степени. Пролонгированная лучевая терапия при раке прямой кишки снижает злокачественный потенциал опухоли и, несомненно, требует соблюдения сроков выполнения оперативного вмешательства.

Ключевые слова: онкология, рак прямой кишки, лучевая терапия, ДНК.

MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL EFFECTS OF PROLONGED RADIOTHERAPY IN RECTAL CANCER

Novikova I.A.¹, Dzhenkova E.A.¹, Shaposhnikov A.V.¹, Gusareva M.A.¹, Kharagezov D.A.¹, Duritskiy M.N.¹, Dashkov A.V.¹, Kolesnikov V.E.¹, Snezhko A.V.¹, Kaymakchi D.O.¹, Mirzoyan E.A.¹, Poluektov S.I.¹, Dontsov V.A.¹, Stateshny O.N.¹

¹ Federal State Budgetary Institution «National medical research centre for oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Rostov-on-Don, e-mail: ellada-mirzoyan@yandex.ru

The study of molecular and morphological effects of prolonged preoperative radiotherapy for resectable rectal cancer. The data on 45 patients receiving preoperative radiotherapy with the Teratron system and the VarianUnique low-energy linear accelerator were studied. DNAs in tumor cells (CycleTESTTMPLUS DNA ReagentKit), therapeutic pathomorphosis and changes in the tumor sizes were analyzed in tumor tissues removed during surgery. The rate of tumors with the DNA index < 1.5 increased by 1.5 times, the rate of tumors with the DNA index > 1.5 decreased by 2.6 times, grade III therapeutic pathomorphosis was observed in 70% of cases. Tumor extension reduced by 1.5 times, the distance from the anus to the lower edge of tumor increased by 1.2 times ($p < 0.05$). Molecular and morphological effects of prolonged preoperative radiotherapy for rectal cancer include the reduction of the malignant potential of tumors which was manifested in grade III therapeutic pathomorphosis in 70% of cases, an increased rate of tumors with the DNA index < 1.5 by 1.5 times and a decreased rate of tumors with the DNA index > 1.5 by 2.6 times. Prolonged radiotherapy for rectal cancer inhibits the malignant potential of tumors and requires compliance with surgery timing.

Keywords: oncology, rectal cancer, radiation therapy, DNA.

Современная онкология достигла значительных успехов в лечении колоректального рака [1–3], а лучевая терапия давно входит в состав комбинированного лечения рака прямой кишки [4, 5]. Многие исследования доказывают важную роль предоперационной лучевой терапии в комплексном лечении рака прямой кишки. Так, в США с 2004 по 2011 гг. доля больных, получивших неoadъювантную лучевую терапию, повысилась с 57% до 75%, а доля больных,

получивших послеоперационную лучевую терапию, наоборот, снизилась с 39% до 18% [6, 7]. Такие же тенденции отмечены в странах Европы и в России.

По данным авторов, применение предоперационной лучевой терапии приводит к снижению в 2 раза 5-летней частоты безрецидивной выживаемости при раке прямой кишки – с 10,9% до 5,6% [8–10]. В последнее время установлено, что основным прогностическим признаком эффективности лучевой терапии при злокачественных опухолях является степень регресса опухоли. Так, 3-летняя безрецидивная выживаемость при Dworak 4 составляет 95%, при Dworak 3 – 82%, при Dworak 2 – 64%, а при Dworak 1 – лишь 53% [11]. Достижения фундаментальной онкологии последних лет позволяют оценить степень регресса опухоли как на тканевом и клеточном уровнях, так и на молекулярном.

Цель исследования: выявление молекулярно-морфологических эффектов периоперационной лучевой терапии при раке прямой кишки.

Материал и методы исследования. Нами были проанализированы данные о 45 пациентах с раком прямой кишки T3-4N0-1M0, которым было проведено лечение в условиях клиники ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» МЗ РФ. У всех больных опухоль характеризовалась как аденокарцинома (чаще встречалась умеренно дифференцированная (75%)). В основную группу вошли 20 пациентов, которым был проведен курс неоадьювантной лучевой терапии на опухоль, а также на пути метастазирования (19 сеансов 5 раз в неделю с разовой очаговой дозой 2,4 Гр до суммарной очаговой дозы 50 изоГр). В дни проведения терапии осуществлялась радиомодификация капецитабином 1600 мг²/сутки. Спустя 7–8 недель после лучевой терапии проводилось хирургическое лечение. Контрольная группа – 25 больных, которые имели противопоказания к лучевой терапии на первом этапе, а также отказались от лечения. Послеоперационный материал опухоли отправлялся на патоморфологическое исследование. Степень лечебного патоморфоза опухоли определялась по Г.А. Лавниковой. Для анализа ДНК в ткани использовали CycleTESTTMPLUS DNA ReagentKit (кат. № 340242, BectonDickinson). Полученные данные были статистически обработаны с помощью программы ModFit LT. Данная программа позволяет анализировать плоидность и распределение клеток опухоли по фазам клеточного цикла. Также вычислялся процент клеток с различным содержанием ДНК. Индекс пролиферации (ИП) мы определяли как суммарное число клеток опухоли, находящихся в S- и (G2+M)-фазах клеточного цикла. При обработке данных использовался t-критерий Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение. Результаты морфологического исследования показали, что изменения в опухолях после лучевой терапии характеризовались развитием деструктивных очагов. В основной группе площадь некроза составила 36,4±4,2%, а признаки необратимых форм дистрофии варьировались от 24% до 68%. В нашем исследовании

не был выявлен лечебный патоморфоз I и IV степени, II степени определялся у 25% больных, III степени – у 70% пациентов. Он проявлялся отсутствием опухолевых клеток, выраженным фиброзом и гиалинозом соединительной ткани, наличием очаговых кальцинатов и гигантских многоядерных клеток типа инородных тел. Посредством использования проточной цитометрии были изучены количество ДНК в опухолевых клетках, а также их распределение по фазам клеточного цикла и пролиферативная активность опухолевой ткани под влиянием курса неoadъювантной лучевой терапии. На сегодняшний день доказано, что содержание ДНК в нормальной клетке непостоянно. Известным является и то, что опухоль гетерогенна. Рост опухоли обеспечивается активно пролиферирующей фракцией клеток. Менее чувствительны к радиационному действию клетки в фазе синтеза (S) и пресинтетической фазе (G1), а наиболее чувствительны – в фазе митоза (M) и премитоза (G2).

Действие препаратов различно: так, многие алкилирующие препараты действуют на клетки в синтетической фазе, фазе премитоза, цитостатики растительного происхождения – в фазе митоза, ингибиторы синтеза белка – в пресинтетической фазе и фазе премитоза, а действие препаратов группы антиметаболитов отмечается в синтетической и пресинтетической фазах. Изучение ДНК-цитометрических параметров ректальных опухолей под влиянием лучевой терапии выявило преобладание анеуплоидных опухолей, доля которых составила 60%, а диплоидных – 40%. Доля опухолей с индексом ДНК свыше 1,5 составила 16,7%. В контрольной группе доля анеуплоидных опухолей составила 64%. Большинство опухолей гетерогенны, т.е. они содержат как анеуплоидные, так и диплоидные клетки. Основным фактором, определяющим биологическое поведение опухоли, является характеристика среднего содержания анеуплоидных клеток в опухоли. Проведя анализ, мы не выявили достоверных различий в содержании анеуплоидных клеток в опухоли ($51,9 \pm 4,7\%$ и $51,4 \pm 5,3\%$ соответственно). Анеуплоидия не только связана с изменением содержания ДНК в клетках, но и сопряжена с изменением в геноме. Для ее характеристики используется индекс ДНК, который характеризуется отношением интенсивности флуоресценции пика анеуплоидных клеток к диплоидному. Результаты анализа индекса в группах показали, что опухолей с индексом ДНК менее 1,0 не встречались, он находился в диапазоне от 1,1 до 1,9.

Средний показатель в контрольной группе составил $1,5 \pm 0,08$, а в основной – $1,2 \pm 0,07$. Также в основной группе опухоли с индексом больше 1,5 определялись лишь в 16,7% случаев ($p < 0,05$).

В таблице 1 отражено распределение опухолевых клеток в зависимости от фаз клеточного цикла. Мы установили, что в основной группе значительная масса опухолевых клеток находилась в G0/1-фазе клеточного цикла – $86,2 \pm 3,7\%$, в G2+M-фазе – $2,7 \pm 0,6\%$. Скорость пролиферации клеток составила $11,2 \pm 3,2\%$, в то время как пролиферативная

активность – $13,5 \pm 3,2\%$. В контрольной группе наблюдалось примерно такое же распределение: наибольшая доля клеток находилась в G0/1-фазе – $87,96 \pm 2,18\%$, в S-фазе – $9,98 \pm 1,6\%$, а доля клеток в G2+M-фазе – $2,12 \pm 0,4\%$.

Таблица 1

Распределение клеток по фазам клеточного цикла (%)

Группы	G0/G1-фаза	G2+M	S-фаза
Основная группа	$86,2 \pm 3,7$	$2,7 \pm 0,6$	$11,2 \pm 3,2$
Контрольная группа	$87,96 \pm 2,18$	$2,12 \pm 0,4$	$9,98 \pm 1,6$

Анализ пролиферативной активности показал практически одинаковое значение индекса в обеих группах больных: $13,5 \pm 3,2\%$ и $12,1 \pm 1,4\%$ соответственно. Нами также был проведен анализ соотношения клеток диплоидных и анеуплоидных опухолей, результат которого представлен в таблице 2.

Таблица 2

Соотношение клеток по фазам клеточного цикла диплоидных и анеуплоидных опухолей толстой кишки (%)

Тип опухоли	G0/G1-фаза	G2+M-фаза	S-фаза	Индекс пролиферации
Диплоидные	$86,3 \pm 4,3$	$0,11 \pm 0,008 \downarrow^*$	$13,7 \pm 4,3$	$14,4 \pm 3,4$
Анеуплоидные	$86,2 \pm 5$	$3,5 \pm 0,9$	$10,4 \pm 2,1$	$13,9 \pm 3,4$

Примечания: * – отличия показателей достоверны по отношению к анеуплоидным опухолям ($p \leq 0,05$).

При диплоидных и анеуплоидных опухолях прямой кишки определяется преобладание клеток, которые находятся в G0/1-фазе клеточного цикла. В ходе работы нами выявлены достоверно значимые отличия диплоидных опухолей от анеуплоидных ($p \leq 0,05$): в 32 раза ниже доля клеток в M-фазе и в G2-фазе при диплоидных опухолях.

Скорость пролиферации диплоидных опухолей превышала подобный показатель анеуплоидных.

Индекс пролиферации (как диплоидных, так и анеуплоидных опухолей) был на равном уровне.

На рисунках 1–4 представлены гистограммы соотношения опухолевых клеток в исследуемых группах.

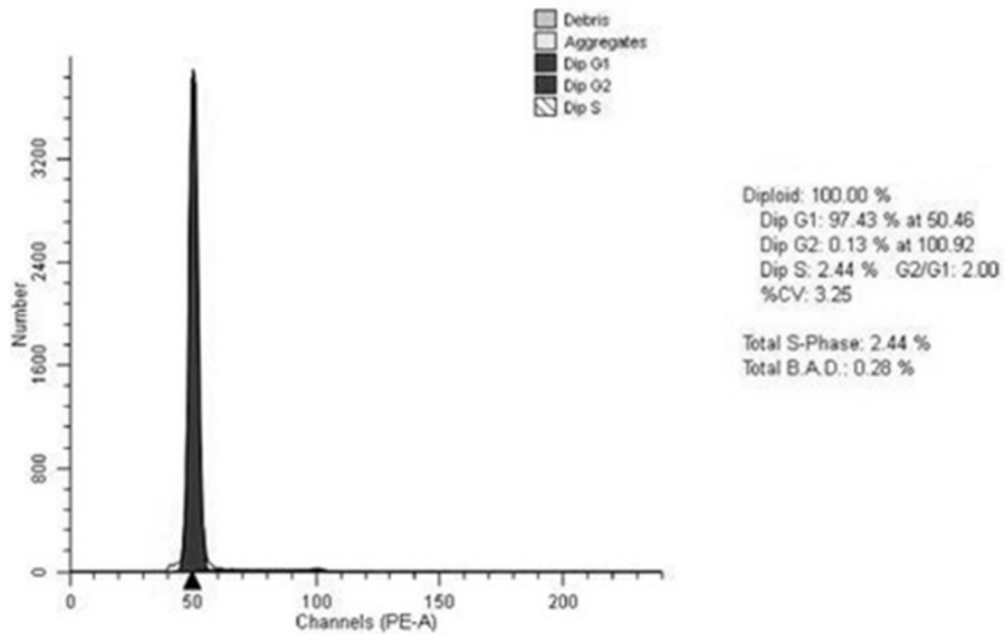


Рис. 1. Гистограмма распределения клеток по фазам клеточного цикла диплоидной опухоли прямой кишки основной группы. Больная М., 62 года, гистологически – G2 аденокарцинома

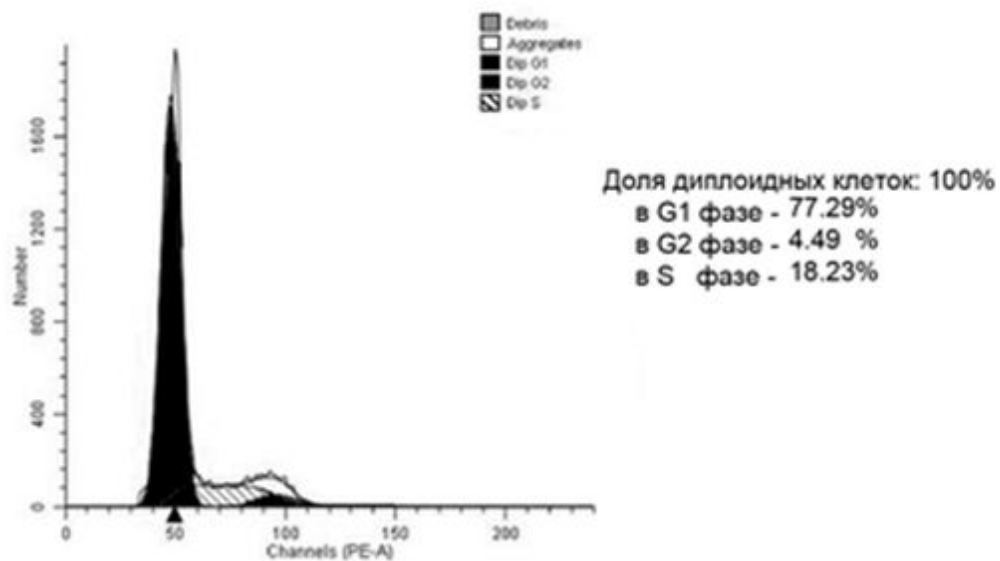


Рис. 2. Гистограмма распределения клеток по фазам клеточного цикла диплоидной опухоли прямой кишки контрольной группы. Больной М., 61 года, гистологически – G2 аденокарцинома

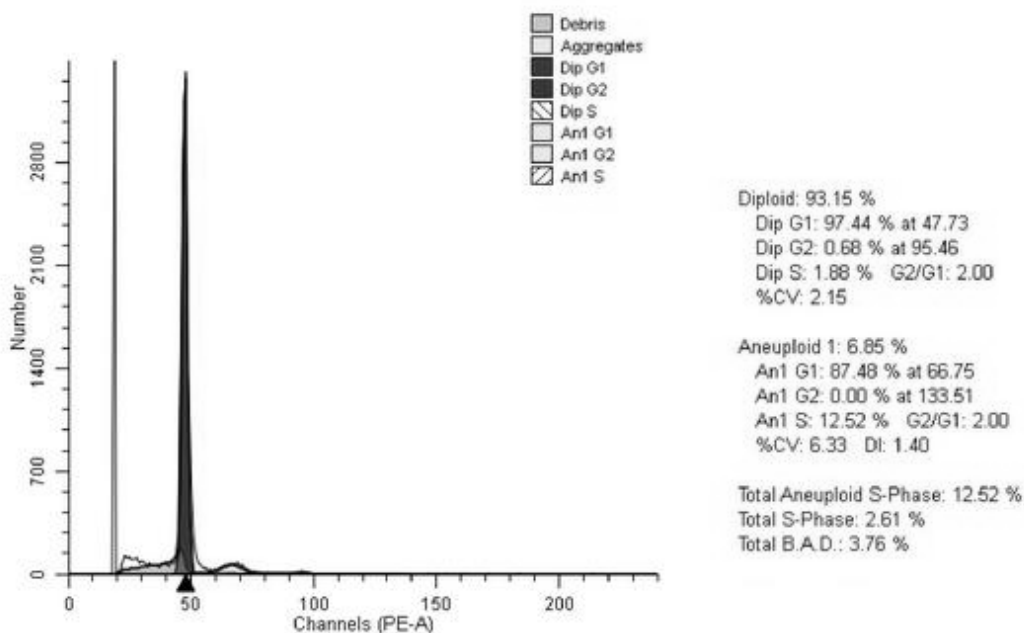


Рис. 3. Гистограмма распределения клеток анеуплоидной опухоли прямой кишки основной группы по фазам клеточного цикла. Больной К., 55 лет, гистологически – G2 аденокарцинома

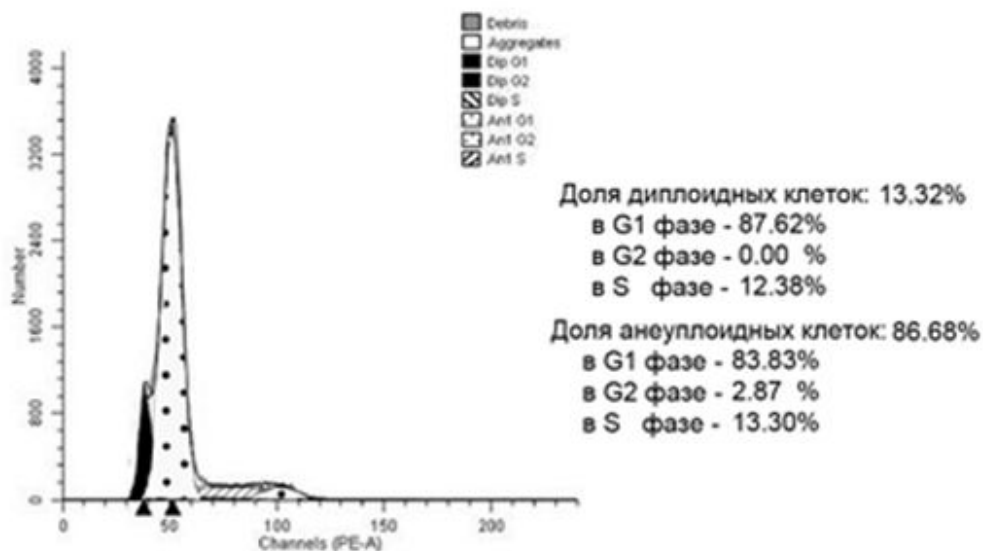


Рис. 4. Гистограмма распределения клеток анеуплоидной опухоли прямой кишки контрольной группы по фазам клеточного цикла. Больная Ш., 47 лет, гистологически – G2 аденокарцинома

Исходя из того фактора, что основной целью проведения предоперационной лучевой терапии при колоректальном раке является в первую очередь уменьшение размеров первичной опухоли, нами также была осуществлена и оценка клинической эффективности проводимой лучевой терапии (табл. 3).

Было выявлено, что в группе больных, которым проводилась пролонгированная лучевая терапия, опухоль уменьшилась с $6,8 \pm 0,6$ см до $4,5 \pm 0,5$ см ($p < 0,05$), а расстояние от ануса до нижнего края опухоли увеличилось с $6,3 \pm 0,6$ см до $7,6 \pm 0,6$ см ($p < 0,05$).

Таблица 3

Характеристика опухоли прямой кишки после курса лучевой терапии

Характеристики опухоли	Основная группа	Контрольная группа
Протяженность опухоли: до после	$6,8 \pm 0,6$ см $4,5 \pm 0,5$ см*	$6,0 \pm 0,9$ см
Расстояние от ануса до опухоли: до после	$6,3 \pm 0,6$ см $7,6 \pm 0,6$ см*	$7,8 \pm 0,8$ см

Примечание: * – различия в группе достоверны ($p < 0,05$).

Итак, нами выявлен клиничко-морфологический эффект проведения предоперационной пролонгированной лучевой терапии при раке прямой кишки. Так, клиническая эффективность терапии проявлялась уменьшением протяженности опухоли прямой кишки в 1,5 раза и увеличением расстояния от ануса до нижнего края опухоли в 1,2 раза ($p < 0,05$). Морфологически эти данные были подтверждены развитием лечебного патоморфоза III степени у 70% больных. Исследование на более тонком, молекулярном уровне выявило значительные изменения содержания ДНК в клетках опухоли прямой кишки под влиянием лучевой терапии: преобладание в 1,5 раза опухолей с индексом ДНК до 1,5 и снижение в 2,6 раза опухолей с индексом ДНК свыше 1,5 в основной группе больных. Также достоверно выявлено снижение индекса ДНК с $1,5 \pm 0,08$ в контрольной группе до $1,2 \pm 0,07$ в основной группе ($p \leq 0,05$). Достоверно значимых различий по доле клеток в различных фазах клеточного цикла в опухолях основной и контрольной групп нами выявлено не было. Тем не менее проведение лучевой терапии привело к достоверно значимым отличиям диплоидных опухолей от анеуплоидных по доле клеток в фазе митоза (M) и премитотической (G2) клеточного цикла, которых при диплоидных опухолях выявлено в 32 раза меньше, чем при анеуплоидных ($p \leq 0,05$). Проведение

предоперационной лучевой терапии при раке прямой кишки в основной группе больных не выявило достоверно значимых отличий по доле анеуплоидных опухолей и среднему содержанию анеуплоидных клеток в опухоли в сравнении с контрольной группой. Для анеуплоидных опухолей основной и контрольной групп характерным оказалось отсутствие опухолей с индексом ДНК до 1,0. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что через 6–8 недель после проведения пролонгированной лучевой терапии наблюдается выраженный клинико-морфологический эффект, а изменения на молекулярном уровне в этот срок по многим параметрам уже соответствуют необлученной опухоли. Следовательно, превышение периода между окончанием курса лучевой терапии и оперативным вмешательством может привести к возобновлению роста опухоли и нивелированию эффекта неoadъювантной терапии. Этот факт следует учитывать при планировании комбинированного лечения у больных раком прямой кишки.

Выводы

1. Снижение потенциала злокачественности рака прямой кишки стало главным молекулярно-морфологическим эффектом периоперационной лучевой терапии. Он проявился в лечебном патоморфозе III степени (70%), а также в увеличении частоты опухолей с индексом ДНК до 1,5 в 1,5 раза.

2. Клиническая эффективность предоперационной лучевой терапии проявлялась в уменьшении протяженности опухоли прямой кишки в 1,5 раза, а также в увеличении расстояния от ануса до нижнего края опухоли в 1,2 раза ($p < 0,05$).

Список литературы

1. Кит О.И., Геворкян Ю.А., Солдаткина Н.В., Колесников Е.Н., Колесников В.Е., Кожушко М.А. и др. Комбинированные оперативные вмешательства при местно-распространенном колоректальном раке // Хирургия. Журнал имени Н.И. Пирогова. 2016. № 11. С. 42-47.
2. Kit O.I., Vodolazhskiy D.I., Gevorkyan Y.A., Soldatkina N.V. KRAS Gene Mutations and Gender Differences in Colorectal Cancer. International Journal of Bio Medicine. 2015. vol.5. no.1. P.11-15.
3. Кит О.И., Геворкян Ю.А., Солдаткина Н.В., Водолажский Д.И. Частота и спектр мутаций гена KRAS при распространенном колоректальном раке. Клинико-морфологические особенности // Молекулярная медицина. 2015. № 5. С.26-29.
4. Ferrari L. Neoadjuvant chemoradiation therapy and pathological complete response in rectal cancer. Gastroenterol Rep (Oxf). 2015. vol.3. no.4. P. 277-288.

5. Abrams M.J., Koffer P.P., Leonard K.L. et al. The emerging non-operative management of non-metastatic rectal cancer: A population analysis. *Anticancer Res.* 2016. vol.36. no.4. P.1699-1702.
6. Gahagan J.V., Whealon M.D., Phelan M.J., Mills S., Jafari M.D., Carmichael J.C., Stamos M.J., Zell J.A., Pigazzi A. Improved survival with adjuvant chemotherapy in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiation regardless of pathologic response. *Surgical Oncology.* 2020. vol 32. P. 35-40.
7. Kreis M.E., Ruppert R., Kube R., Strassburg J., Lewin A., Baral J., Maurer C.A., Sauer J., Winde G., Thomasmeyer R., Stelzner S., Bambauer C., Scheunemann S., Faedrich A., Junginger T., Hermanek P., Merkel S. MRI-Based Use of Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Rectal Carcinoma: Surgical Quality and Histopathological Outcome of the OCUM Trial. *Annals of Surgical Oncology.* 2020. 27. P. 417-427.
8. Maas M., Dijkhoff R.A.P., Beets-Tan R. Rectal Cancer: Assessing Response to Neoadjuvant Therapy. *Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America.* 2020. Vol. 28. P.117-126.
9. Maeda K., Shibutani M., Tachimori A., Nishii T., Aomatsu N., Fukuoka T., Nagahar H., Otani H., Inoue T., Ohira M. Prognostic significance of neoadjuvant rectal score and indication for postoperative adjuvant therapy in rectal cancer patients after neoadjuvant chemoradiotherapy. *In Vivo.* 2020. vol. 34. P. 283-289.
10. Taylor F.G. Preoperative magnetic resonance imaging of circumferential resection margin predicts disease-free survival and local recurrence: 5-year follow-up results of the MERCURY study. *J. Clin. Oncol.* 2014. vol. 32. no.1. P. 34-43.
11. McCoy M.J. Neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer: how important is tumor regression? *ANZ. J. Surg.* 2015. vol.5. P. 23-29.