

*В.Е. Жильчук
А.Л. Воронцова
И.А. Лисняк
Ю.И. Кудрявец
В.Ф. Чехун*

*Областной онкологический
диспансер, Ровно*

*Институт экспериментальной
патологии, онкологии и
радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого
НАН Украины, Киев, Украина*

Ключевые слова: *рак молочной железы, отсроченные операции, одномоментные операции, регионарные лимфатические узлы, сыворотка крови, рекомбинантный интерферон альфа-2b, адьювантный режим, неоадьювантный режим, лучевая терапия, полихимиотерапия, фактор роста эндотелия сосудов.*

ИНТЕРФЕРОН СНИЖАЕТ РИСК ПРОГРЕССИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ У ПОВТОРНО ОПЕРИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Резюме. *У больных раком молочной железы (РМЖ) после проведения повторной радикальной операции, обусловленной уточнением диагноза, риск прогрессии заболевания в течение полугода возрастает более чем в 2 раза и в значительной степени определяется степенью исходного метастатического поражения регионарных лимфоузлов. Появление рецидивов и метастазов РМЖ у больных происходит на фоне всплеска (в ближайший послеоперационный период) и последующего повышенного уровня фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в сыворотке крови (СК). Включение интерферона (ИФН) в комплексные схемы лечения предотвращает повышение уровня VEGF в СК независимо от характера хирургического лечения (одномоментная или отсроченная радикальная операция) и на 33,4–50,0% увеличивает количество больных, пребывающих в полугодовой ремиссии, несмотря на двухэтапную, отсроченную радикальную мастэктомию. Обсуждается целесообразность включения ИФН в комплексные схемы лечения больных РМЖ в качестве средства, обладающего высокой антиангиогенной активностью и снижающего риск прогрессии заболевания у больных РМЖ, перенесших обычную и, особенно, отсроченную, двухэтапную операцию.*

Предыдущими исследованиями [1] было показано, что включение рекомбинантного интерферона альфа-2b (ИФН) в неоадьювантном и адьювантном режиме в схему комплексного лечения больных раком молочной железы (РМЖ) сопровождается достоверным снижением случаев прогрессии заболевания в течение 36 мес; эффективность комплексного лечения с применением ИФН (36,4–27,2%) зависела при этом от степени метастатического поражения лимфатических узлов (ЛУ) (N0–N2).

Исследование возможных механизмов, опосредующих противорецидивное и антиметастатическое действие ИФН, породило гипотезу о возможной роли в этом эффекте антиангиогенного действия цитокина, свидетельством которого являются данные литературы [2, 3], а также результаты собственных исследований [4]. Высказанная гипотеза была подтверждена вышеупомянутыми клиническими наблюдениями при включении ИФН в схемы комплексного лечения больных РМЖ: было установлено, что предоперационная лучевая терапия (ЛТ), а особенно хирургическое вмешательство, сопровождаются значительным ($p < 0,001$) возрастанием уровня фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в сыворотке крови (СК) больных РМЖ, а применение ИФН в неоадьювантном режиме снижает уровень VEGF в крови больных РМЖ в ходе ЛТ и препятствует его послеоперационному возрастанию. Последующее длительное (6–7 мес) применение ИФН в адьювантном режиме сопровождалось стойким и достоверным снижением уровня VEGF

в СК исследуемых больных по сравнению с таковым в контрольной группе, где уровень VEGF продолжал оставаться высоким до конца наблюдения (180 сут) [4].

Следует заметить, что установленное нами значительное возрастание уровня VEGF в крови больных после хирургического вмешательства выглядит логичным и является нормальной физиологической реакцией, возникающей вследствие послеоперационного воспаления и регенерации тканей. Однако, подобная реакция при возможном наличии опухолевого процесса (в виде «дремлющих» метастазов) является крайне нежелательной. Уместно упомянуть, что одно время длительно дискутировались возможные механизмы феномена активации метастазирования после хирургического удаления первичной опухоли, отмеченного как в экспериментальных исследованиях, так и в клинической практике. Наличие в настоящее время обширной информации о физиологии цитокинов, которые, безусловно, вовлекаются в этот процесс, позволяют заключить, что именно ангиогенные факторы, возможно весь их спектр, включая (кроме VEGF) и фибробластный, и гепатоцитарный, и тромбоцитарный факторы роста, будут вовлечены в процесс активации метастазирования. Они будут функционировать и как позитивные ростовые факторы, стимулирующие пролиферацию опухолевых клеток, и как ангиогенные, и как лимфангиогенные факторы, стимулирующие рост капилляров, обеспечивающих повышенный метаболизм в метастатических

зачатках. Недавнее исследование этих аспектов метастазирования действительно подтвердило факты стимуляции ангиогенеза и метаболизма в микрометастазах, а также смещение в них баланса между апоптозом и пролиферацией в сторону последней в результате хирургического удаления первичной опухоли. Применение нами ИФН в неoadъювантном и адъювантном режиме по разработанной схеме [4] позволило нивелировать многие негативные, с точки зрения усиления метастазирования, последствия оперативного вмешательства. Ранее этот эффект ИФН был впервые продемонстрирован нами и в эксперименте [5].

Цель настоящей работы — изучение влияния ИФН на уровень VEGF в СК больных РМЖ в условиях вынужденного повторного хирургического вмешательства: речь идет о больных, у которых при анализе биопсийного материала злокачественный процесс не был подтвержден, однако был выявлен в операционном материале.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включены 84 больных РМЖ в стадии T1-2N0-2M0, у которых диагноз не был подтвержден цитоморфологически при проведении пункционной биопсии или же трепан-биопсии опухоли. Естественно, что в такой ситуации первичное лечение этих больных начинали с проведения секторальной резекции молочной железы со срочным гистологическим исследованием опухоли. В случаях, когда диагноз злокачественного характера опухоли был подтвержден, больная, все еще пребывавшая на операционном столе, подвергалась радикальной мастэктомии (или же радикальной органосохраняющей операции); таких больных было 50. У другой части (34 пациентки), у которых диагноз рака при исследовании в режиме *cito* не был подтвержден и опухолевый материал требовал проведения стандартной гистологической обработки и исследования, операция ограничивалась проведенной секторальной резекцией молочной железы. Когда же после гистологического исследования диагноз был уточнен и верифицирован как рак молочной железы, эти больные подверглись повторной операции в объеме радикальной мастэктомии или радикальной органосохраняющей операции; такое хирургическое вмешательство проводилось на 7–9-е сутки после вышеописанной секторальной резекции и трактовалось нами как повторные, или отсроченные операции, в отличие от одномоментных операций, проводившихся при подтверждении диагноза в режиме *cito*.

Все пациентки были разделены на 2 группы — контрольную (одномоментная радикальная операция) и основную (отсроченная операция), каждая из которых в свою очередь состояла из 3 подгрупп, отличавшихся степенью метастатического поражения регионарных ЛУ: подгруппа N0, где ЛУ не были поражены; подгруппа N1, где было

поражено 1–3 ЛУ и подгруппа N2, где поражены были 4–9 ЛУ. Лечение пациенток проводили по традиционным схемам: в послеоперационный период они получали адъювантную полихимиотерапию (ПХТ) по схеме AC и CMF; в случаях экспрессии рецепторов к эстрогенам и прогестерона на опухолевых клетках больным проводили гормонотерапию (тамоксифен, ингибиторы ароматазы); у больных, подвергшихся радикальной секторальной мастэктомии, после ПХТ проводили телегамматерапию на область оперированной молочной железы, равно как и у больных с метастатическим поражением ЛУ (телегамматерапию в этом случае проводили на зону регионарного метастазирования).

С целью исследования влияния ИФН на эффективность комплексного лечения больных РМЖ, перенесших одномоментную или отсроченную операцию, все они были разбиты на 4 подгруппы: больные, перенесшие одномоментную операцию и получавшие (А) или не получавшие (Б) ИФН, и больные, перенесшие отсроченную операцию и получавшие (В) или не получавшие (Г) ИФН. Препарат рекомбинантного интерферона альфа-2b (Лиффербион) вводили больным группы А и В в дренаж для орошения послеоперационной раны и внутримышечно по 6×10^6 МЕ на 2–6-е сутки после операции, то есть все больные этих групп получили суммарную дозу ИФН, равную 60×10^6 МЕ в ближайший послеоперационный период и $180–240 \times 10^6$ МЕ в последующий период одновременно с ПХТ; в этот период цитокин вводили ежедневно внутримышечно в дозе 3×10^6 МЕ на инъекцию, 10-дневными курсами с перерывом 2–3 нед.

В процессе исследований проводили мониторинг уровня VEGF и ТФРβ в СК больных. Образцы последней получали путем забора крови из вены до операции, а затем на 6-, 20-, 60-, 120-е и 180-е сутки от начала лечения и хранили при температуре -20°C до использования. Определение уровня VEGF в СК больных проводили с помощью иммуноферментного метода; главным компонентом в схеме определения был конъюгат поликлональных антител к очищенному опухолевому ангиогенному фактору с пероксидазой, который получали с использованием периодатного метода. Концентрацию VEGF в нг/мл определяли, используя калибровочную кривую при титровании в аналогичных условиях очищенного VEGF [6]. Об уровне ТФРβ подобной активности СК больных судили на основании ингибирования колониеобразования в агаре [7], используя в качестве тест-системы клетки линии A-549 аденокарциномы легкого человека, для которых ТФРβ является специфическим ингибитором пролиферации [1]. Мониторинг уровня VEGF и ТФРβ-активности в СК проводили на протяжении всего курса лечения (6–7 мес). Статистический анализ результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что проведение у больных РМЖ одномоментной радикальной операции и использование вышеописанных традиционных схем лечения, дополненных ИФН, сопровождается полным отсутствием прогрессии заболевания в течение 36 мес наблюдения. Совсем иную картину отмечали у тех больных, которые подверглись отсроченной (в связи с уточнением диагноза), двухэтапной операции. Здесь в течение тех же 36 мес прогрессия заболевания имела место в 37,5; 42,9 и 73,6% случаев в зависимости от степени исходного метастатического поражения ЛУ (N0; N1 и N2) (рис. 1). Более того, из 12 пациенток подгруппы N2 за тот же период наблюдения умерло 7 больных.

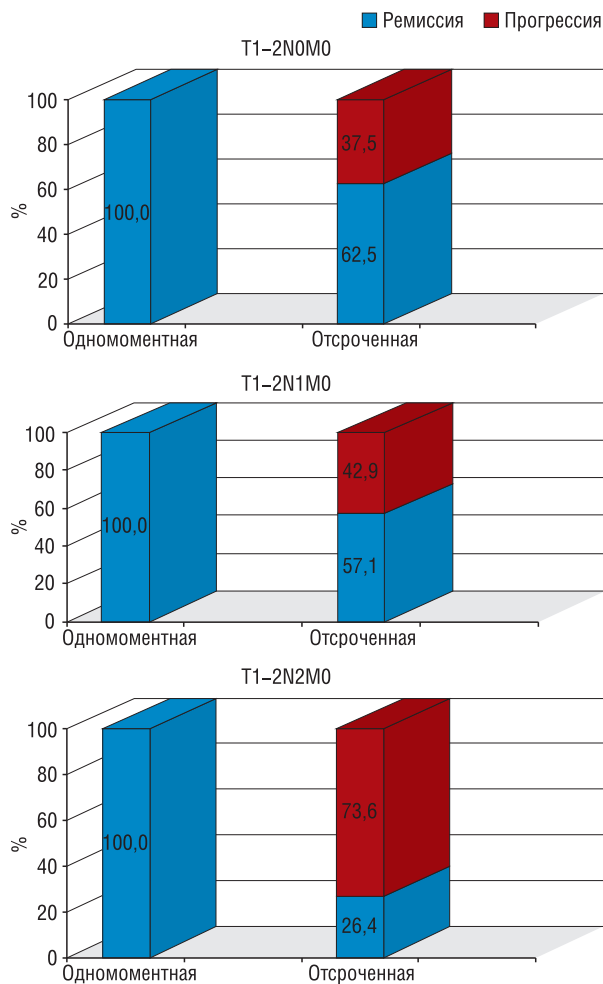


Рис. 1. Эффективность комплексного (включающего ИФН) лечения больных РМЖ в зависимости от варианта хирургического вмешательства — одномоментная и отсроченная радикальная операция (3-летнее наблюдение)

Для выяснения влияния ИФН на эффективность лечения больных РМЖ, подвергшихся отсроченной радикальной операции, были сопоставлены результаты лечения 2 групп пациенток — В (отсроченная операция + ИФН) и Г (отсроченная операция без ИФН). Как видно из рис. 2а, даже в условиях отсроченных операций ИФН оказал положительный эффект на результат лечения: в группе В прогрессия заболевания наступила в 46,6% случаев, в то время как

в группе Г — в 73,6% ($p < 0,001$). Анализ материала под углом зрения связи эффективности лечения со степенью исходного метастатического поражения регионарных ЛУ подтвердил наши предыдущие наблюдения: даже у больных, подвергшихся отсроченной операции, но относящихся к подгруппе N0, включение ИФН в комплексную терапию обеспечило 3-летнюю ремиссию у 100,0% больных, в то время как у больных контрольной группы (N0, но без ИФН) ремиссия в тот же период была в 50,0% случаев (рис. 2б). Следует отметить, что хотя повышение исходной степени метастатического поражения ЛУ у больных, подвергшихся отсроченным операциям, ассоциируется с ослаблением успешности их лечения, его эффективность в группах, получавших ИФН, все же была выше: при N1 среди больных, получавших ИФН, прогрессию отмечали в 22,0% случаев, в то время как среди не получавших ИФН — в 66,6% ($p < 0,001$). При N2 прогрессия заболевания наступила, к сожалению, у 100,0% больных вне зависимости от применения ИФН; правда, из 5 больных группы В за период наблюдения умерли 2 пациентки, а из 7 больных группы Г — 5.

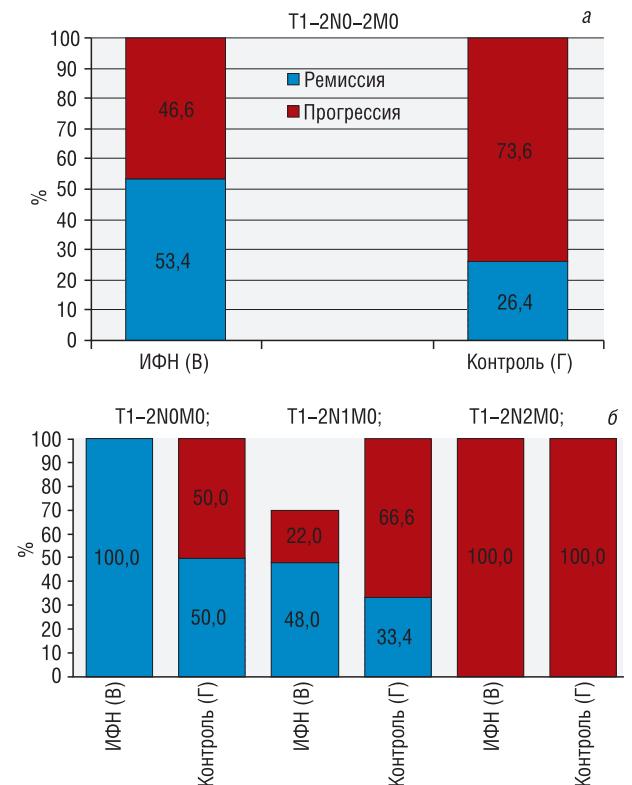


Рис. 2. Влияние ИФН на эффективность лечения больных РМЖ, перенесших отсроченную операцию: все больные (а), распределение больных в зависимости от поражения регионарных ЛУ (б)

Как показали наши предыдущие исследования [4], уровень VEGF в СК всех больных РМЖ четко коррелирует со степенью распространения опухолевого процесса на регионарные ЛУ: максимальным этот уровень был в группе N2, минимальным — N0. Следует отметить, что ни размер опухоли, ни ее гистологическая структура с уровнем VEGF в СК

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

больных не коррелировали. В настоящей работе приводятся данные мониторинга уровня VEGF в СК больных в процессе их лечения. Установлено, в частности, что на 6-е и 20-е сутки уровень данного цитокина достоверно возрастает у всех больных групп Б и Г, то есть у не получавших дополнительную терапию ИФН; характерно, что особенно резкое возрастание уровня VEGF в СК имело место у пациентов, подвергшихся отсроченной операции ($453,6 \pm 36,1$ против $372,9 \pm 27,0$ нг/мл, $p < 0,001$) по сравнению с теми, кто был прооперирован одномоментно (рис. 3). Важно подчеркнуть, что включение ИФН в комплексные схемы лечения предотвратило описанное выше нарастание уровня VEGF в СК, причем этот эффект проявился и у больных, подвергшихся отсроченной операции. В последующий период уровень VEGF в СК больных снижался, однако снижение было более выраженным у больных, подвергшихся одномоментному хирургическому вмешательству по сравнению с больными, перенесшими двухэтапную отсроченную операцию.

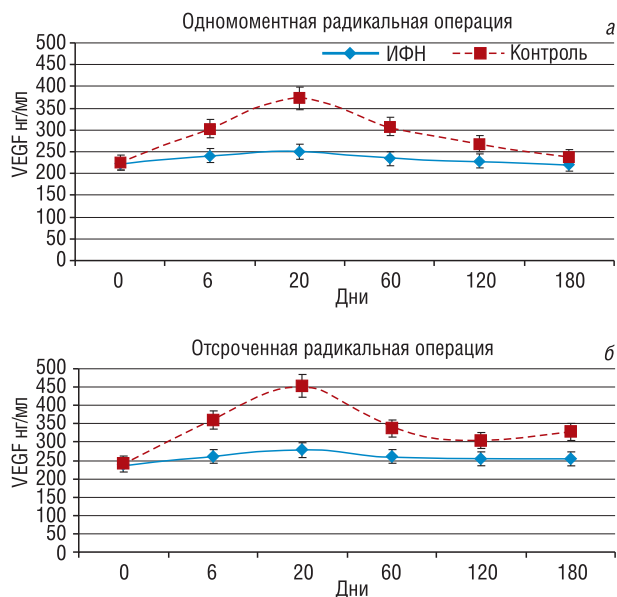


Рис. 3. Динамика уровня VEGF в СК больных РМЖ, перенесших одномоментную (а) и отсроченную (б) операцию

Таким образом, включение ИФН в комплексные схемы лечения больных РМЖ, независимо от варианта хирургического вмешательства, способствовало удержанию уровня VEGF в СК на постоянном, практически исходном уровне в течение всего периода наблюдения (180 сут). Создается впечатление, что именно антиангиогенное действие ИФН, выявленное в процессе описанных исследований, внесло существенный вклад в эффективность лечения.

Не меньший интерес представлял проведенный в рамках данного исследования мониторинг уровня ТФРβ в СК, которой при одномоментной операции практически не менялся на протяжении всего периода наблюдения: колебания его в группе без ИФН наблюдали в пределах $42,6 \pm 4,8$ – $48,5 \pm 4,2$ нг/мл ($p > 0,05$) (рис. 4); включение последнего в комплексные схе-

мы лечения несколько повысило уровень ТФРβ в СК ($38,3 \pm 2,4$ – $58,2 \pm 6,1$ нг/мл, $p < 0,01$), что, как показали наши предыдущие исследования, ассоциируется с благоприятным течением заболевания [1].

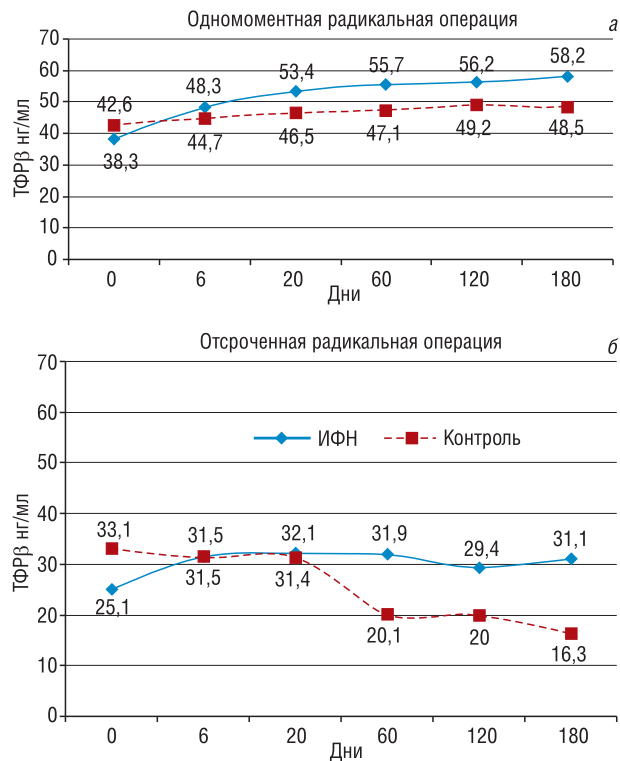


Рис. 4. Динамика уровня ТФРβ в СК больных РМЖ, перенесших одномоментную (а) и отсроченную (б) радикальную операцию

Что касается больных, перенесших отсроченную операцию, то при отсутствии ИФН-терапии имело место резкое падение уровня ТФРβ в СК (от $33,1 \pm 0,5$ до $16,3 \pm 2,4$, $p < 0,001$), при применении ИФН уровень ТФРβ в СК даже несколько возрос (от $25,1 \pm 1,7$ до $31,1 \pm 0,8$, $p < 0,01$). Сопоставление уровня ТФРβ в СК больных всех 4 групп с клиническим статусом последних продемонстрировало, что более высокий уровень ТФРβ в СК четко ассоциируется с более благоприятным клиническим протеканием болезни.

ВЫВОДЫ

1. У больных РМЖ при проведении повторной (отсроченной) радикальной операции, обусловленной уточнением диагноза, риск прогрессии заболевания в течение полугода возрастает более чем в 2 раза и в значительной мере определяется степенью исходного метастатического поражения регионарных ЛУ.

2. Включение ИФН в комплексные схемы лечения больных РМЖ, подвергшихся отсроченным радикальным операциям, снижает частоту случаев прогрессии заболевания на 27,0%.

3. Хирургическое вмешательство у всех больных РМЖ, перенесших как одномоментные, так и отсроченные операции, сопровождается значительным возрастанием ($p < 0,001$) уровня VEGF в СК, причем такое возрастание особенно ярко выраже-

*V.E. Zhil'chuk, A.L. Vorontsova, I.A. Lisnyak,
Y.I. Kudryavets, V.F. Chekhun*

но у больных, перенесших отсроченную операцию, а также у больных, имеющих обширное метастатическое поражение регионарных ЛУ (> 4 ЛУ).

4. Включение ИФН в комплексные схемы лечения больных РМЖ предотвращает послеоперационный всплеск уровня VEGF в СК независимо от характера хирургического лечения и на 33,4–50,0% увеличивает количество больных, пребывающих в полугодовой ремиссии, несмотря на перенесенную отсроченную радикальную операцию.

5. Мониторинг ТФРβ в СК больных РМЖ показал незначительное нарастание ($p > 0,05$) уровня этого цитокина в СК больных, перенесших одномоментную радикальную операцию, и достоверное его снижение ($p < 0,001$) в СК больных, перенесших отсроченную радикальную операцию; дополнение схем лечения ИФН воспрепятствовало такому падению, что четко соответствовало более благоприятному клиническому статусу больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жильчук ВЕ, Воронцова АЛ, Ключевська О та ін. Прогностичне значення рівня трансформуючого фактора росту бета у сироватці крові хворих на рак молочної залози в умовах інтерферонотерапії. Онкологія 2007; **9** (4): 337–41.

2. **Giovanna Tosato.** Interferon- α is implicated in the transcription regulation of vascular endothelial growth factor. J Nat Cancer Inst 2003; **95** (6): 420–1.

3. **Marschall Z, Scholz A, Cramer T, et al.** Effects of Interferon alpha on vascular endothelial growth gene transcription and tumor angiogenesis. J Nat Cancer Inst 2003; **95** (6): 437–48.

4. Жильчук ВЕ, Лисняк ИА, Воронцова АЛ и др. Ингибирующее влияние интерферона-альфа на уровень фактора роста эндотелия сосудов в сыворотке крови больных раком молочной железы при комплексном лечении. Онкология 2008; **10** (3): 321–6.

5. Балицкий КП, Воронцова АЛ, Лисняк ИА и др. Метастазирование опухолей. Патогенетические аспекты. Киев: Наук думка, 1991. 198 с.

6. **Gotzmann J, Huber H, Thallinger C, et al.** Hepatocytes convert to fibroblastoid phenotype through the cooperation of RGF- β 1 and Ha-Ras: steps towards invasiveness. J Cell Sci 2002: 1189–202.

Summary. *In patients with breast cancer (BC) who underwent repeated operation due to refined diagnosis, the risk of progression within the first six months increases more than twice and depends considerably on the status of metastatic involvement of regional lymph nodes. BC relapses and metastases appear in the presence of a burst (in the immediate post-surgery period) and maintenance of an increased serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF). Interferon (IF) included in the combined treatment regimes prevents the increase in the serum VEGF levels regardless of the modality of surgery (single-step or delayed radical operation) and increases by 33.4% to 50.0% the number of patients who achieved six-month remission despite two-step, delayed radical mastectomy. It is suggested that IF should be included in combined therapy regimes for BC patients as a highly antiangiogenic agent that decreases the risk of progression in BC patients after traditional and especially delayed, two-step operation.*

Key Words: breast cancer, delayed operation, one-step operation, regional lymph nodes, blood serum, recombinant alpha-2b interferon, adjuvant regime, neoadjuvant regime, radiation therapy, polychemotherapy, vascular endothelial growth factor.

Адрес для переписки:

Воронцова А.Л.
03022, Киев, ул. Васильковская, 45
Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины