



УДК 618.19-006.6-08:615.28.003.12

DOI: 10.37621/JNAMSU-2021-1-2

«Журнал НАМН України» | 2021 | т. 27 | № 1 | С. 18–26

Оцінка індексу проліферативної активності пухлини PCNA при різноманітних шляхах доставки поліхіміотерапевтичних препаратів у пацієнток з місцево-розповсюдженим раком молочної залози

Ю. В. Думанський¹ , О. В. Бондар²,
Д. Г. Янева³

¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, вул. Васильківська, 45, Київ 03022, Україна

²Одеський національний медичний університет, провулок Валіховський, 2, Одеса 65082, Україна

³Центр реконструктивної та відновної медицини «Клініка медичного університету», вул. Тіниста, 8, Одеса 65062, Україна

Вступ. Рак молочної залози (РМЗ) є одним з найбільш актуальних питань сучасної онкології, так як займає лідируючі позиції серед причин смертності та втрати працездатності у жінок. Особливе місце в структурі даної патології посідають місцево-розповсюджені форми злоякісної пухлини, при яких ефективність використовуваних методів лікування вкрай мала, а прогноз досить несприятливий.

Evaluation of the tumor proliferative activity index PCNA in a variety of routes of delivery of chemotherapeutic drugs in patients with locally advanced breast cancer

Yurii V. Dumanskiy¹ ,
Olexandr V. Bondar², Daria G. Yanieva³

¹Institute of experimental pathology, Oncology and Radiobiology of R. E. Kavetskiy, 45 Vasylykivska Str., Kyiv 03022, Ukraine.

²Odesa National Medical University, 2 Valikhovskiy Lane, Odesa 65082, Ukraine.

³Centre of Reconstructive and Restoration Medicine "The University Clinic", 8 Tinysta Str., Odesa 65062, Ukraine

Introduction. Breast cancer is one of the most live issue of the modern oncology, as it holds the leading position among the causes of female mortality and disability. A special place in the structure of this pathology is occupied by locally advanced forms of malignant tumor in which the effectiveness of the treatments used is unfortunately very low, therefore the prognosis is rather

Це обумовлює актуальність пошуку нових методів діагностики та лікування таких пацієнок. В цьому дослідженні нами була визначена роль неoad'ювантної селективної внутрішньоартеріальної поліхімієтерапії (ПХТ) при первинно неоперабельних формах РМЗ. Для визначення та прогнозування ефективності цього методу лікування ми використали проліферативну активність пухлини. В ході дослідження вивчалася експресія маркера ядерної проліферації (ядерний антиген проліферуючих клітин, PCNA) з метою прогностичної та діагностичної оцінки з огляду на незадовільні літературні дані з цього питання в контексті визначення аналогічних параметрів за іншими критеріями. Рівень PCNA взято за основну дихотомічну точку прогностичної оцінки неoad'ювантної терапії за результатами ретроспективного аналізу ефективності проведеного передопераційного лікування та визначення вірогідної різниці між результатами у підгрупах з більш низьким та більш високим рівнями маркера, що в нашому дослідженні розділені за медіанним значенням імуногістохімічного рівня параметру в загальній вибірці 25 %.

Мета: оцінка ефективності неoad'ювантного лікування із застосуванням системного та селективного внутрішньоартеріального шляхів введення хіміепрепаратів у хворих на місцево-розповсюджений РМЗ з використанням індексу проліферативної активності пухлини на основі маркера PCNA.

Матеріали та методи. Проведено ретроспективний аналіз результатів комплексного лікування пацієнок з первинно неоперабельним місцево-розповсюдженим РМЗ на основі селективних та системних шляхів введення хіміепрепаратів. До дослідження включено 63 пацієнтки. Вибірка розподілена на 2 групи в залежності від виду неoad'ювантної ПХТ: сформована 1-а група – контрольна (на основі системної терапії) і 2-а група – дослідна (з використанням селективного внутрішньоартеріального шляху доставки). Контрольну групу склали 22 пацієнтки, дослідну – 41 пацієнтка. У всіх пацієнок виявлено стадію захворювання IIIb. Відповідно до клінічних проявів в контрольну групу входило 12 пацієнок з cT4bN1M0, 6 пацієнок з cT4aN1M0 і 4 пацієнтки з cT4cN1M0; в дослідну групу – 23 пацієнтки з cT4bN1M0, 7 пацієнок з cT4aN1M0 і 11 пацієнок з cT4cN1M0. Пацієнтки, що включені до дослідження, мали люмінальний тип В. Паралельно з рутинними методами у всіх пацієнок додатково вивчалася динаміка проліферативної активності пухлини за ядерним антигеном PCNA. Це дослідження демонструє рівень маркера PCNA на початку лікування та після закінчення курсу ПХТ. Після проведення ПХТ усім пацієнкам виконали оперативне втручання. З урахуванням патогістологічного дослідження пацієнтки були перерозподілені наступним чином: в контрольній групі 4 пацієнтки мали pT4aN0M0, 2 пацієнтки – pT4aN1M0, 4 пацієнтки – pT4bN0M0, 8 пацієнок – pT4bN1M0, 1 пацієнтка – pT4cN0M0 і 3 пацієнтки – pT4cN1M0; в дослідній групі 3 пацієнтки мали pT4aN1M0, 4 пацієнтки – pT4aN0M0, 15 пацієнок – pT4bN1M0, 8 пацієнок – pT4bN0M0, 6 пацієнок – pT4cN1M0 і 5 пацієнок – pT4cN0M0. Оскільки пацієнтки відносились до групи з люмінальним типом пухлини, кожна з них отримувала гормонотерапію в ад'ювантному режимі. Пацієнкам репродуктивного віку призначали препарати групи антагоністів естрогену, тоді як пацієнкам у постменопаузі – інгібітори ароматази. В дослідженні не використовувалась таргетна терапія. Між групами порівняння був проведений статистичний аналіз; за критичне значення обраний медіанний рівень маркеру у 25 %.

Результати. За ступенем регресії PCNA визначено, що селективна внутрішньо артеріальна ПХТ при РМЗ з низьким індексом проліферативної активності (ІПА) в дослідній групі має вірогідну перевагу за показниками загальної виживаності та середньої тривалості життя у порівнянні з групою контролю ($p < 0,05$).

Висновки. За допомогою показника PCNA можливо оцінювати проліферативну активність пухлини і таким чином прогнозувати ефект неoad'ювантної ПХТ та обирати оптимальну тактику комплексного лікування пацієнок з РМЗ.

Ключові слова: місцево розповсюджений рак молочної залози, індекс проліферативної активності, маркер ядерного антигену пролі-

unfavorable. This determines the relevance of their search for new methods of diagnosis and treatment in such patients. In the context of this research, we identified the role of neoadjuvant selective intra-arterial polychemotherapy in adverse primary inoperable forms of breast cancer. To determine and predict the effectiveness of this treatment, we used tumor proliferative activity. The research examined the expression of a PCNA nuclear proliferation marker for prognostic and diagnostic evaluation in the light of unsatisfactory literature on the subject in the context of determining similar parameters by other criteria. PCNA level was taken as the main dichotomous point of prognostic assessment of neoadjuvant therapy based on the results of retrospective analysis of the efficacy of preoperative treatment and determination of statistically significant difference between the results in the subgroups with lower and higher marker levels, which in our study were divided according to the median value of the immunohistochemical parameter level in the total sample of 25 %.

Objective. Evaluation of the effectiveness of neoadjuvant treatment using systemic and selective intraarterial routes of chemotherapy administration in patients with locally advanced breast cancer using the tumor proliferative index based on the PCNA marker.

Materials and methods. A retrospective analysis of the results of a comprehensive treatment of patients with initially inoperable locally advanced breast cancer based on selective and systemic routes of administration of chemotherapy was performed. The study included 63 patients. The sample was divided into 2 groups depending on the selected type of neoadjuvant polychemotherapy: 1st group – control group were formed (based on systemic therapy) and 2nd group – study group (the selective intraarterial delivery route was used). The control group consisted of 22 patients, the study – 41 patients. All patients revealed stage IIIb of the disease. In accordance with the clinical manifestations, the patients were distributed as follows: control group include 12 patients with cT4bN1M0, 6 patients with cT4aN1M0 and 4 patients with cT4cN1M0; study group include 23 patients with cT4bN1M0, 7 patients with cT4aN1M0 and 11 patients with cT4cN1M0. All patients included in the study had luminal type B. In parallel with routine methods, the dynamics of proliferative activity of the tumor by the PCNA nuclear antigen was additionally studied in all patients. This study demonstrates the level of the PCNA marker at the start of treatment and after the completion of polychemotherapy (PCT). After PCT, all patients underwent surgical intervention. Taking into account the pathological examination, the patients were reassigned as follows: in the control group, 4 patients has pT4aN0M0, 2 patients – pT4aN1M0, 4 patients – pT4bN0M0, 8 patients – pT4bN1M0, 1 patient – pT4cN0M0 and 3 patients – pT4cN1M0; in the study group, 3 patients has pT4aN1M0, 4 patients – pT4aN0M0, 15 patients – pT4bN1M0, 8 patients – pT4bN0M0, 6 patients – pT4cN1M0 and 5 patients – pT4cN0M0. Since the patients belonged to the group with Luminal type of tumor, each of them received hormone therapy in an adjuvant regimen. Patients of reproductive age were treated with the group of estrogen antagonists, while postmenopausal patients received aromatase inhibitors. Targeted therapy was not used in the study. A statistical analysis was performed between the comparison groups; the median marker level in 25 % was taken as the critical value.

Results. According to the degree of PCNA regression, it was determined that selective intra-arterial chemotherapy for breast cancer with a low proliferative activity index has a statistical advantage in overall survival and average life expectancy ($p < 0.05$) compared with control group.

Conclusions. Using the PCNA indicator, one can reliably evaluate the proliferative activity of the tumor, thus predicting the effect of neoadjuvant chemotherapy and choosing the optimal tactics of complex treatment.

Keywords: locally advanced breast cancer, proliferative activity index, marker of nuclear antigen of proliferating cells,

феруючих клітин, системна поліхімієтерапія, селективна внутрішньоартеріальна поліхімієтерапія.

Для цитування: Думанський ЮВ, Бондар ОВ, Янева ДГ. Оцінка індексу проліферативної активності пухлини PCNA при різних варіантах поліхімієтерапії у пацієнток з місцево-розповсюдженим раком молочної залози. Журнал Національної академії медичних наук України. 2021;27(1):18–26. DOI: 10.37621/JNAMSU-2021-1-2.

systemic polychemotherapy, selective intra-arterial polychemotherapy.

For citation: Dumanskiy YV, Bondar OV, Yanieva DG. Evaluation of the proliferative activity index of PCNA tumor in different variants of polychemotherapy administration in patients with locally advanced breast cancer. Journal of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine. 2021;27(1):18–26. DOI: 10.37621/JNAMSU-2021-1-2.

Стаття надійшла до редакції 16.12.2020 року
Направлена на рецензування 19.02.2021 року
Прийнята до друку 24.04.2021 року

The article was received on 16.12.2020
For review, 19.02.2021
Accepted for publication on 24.04.2021



ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

Думанський Юрій Васильович – д. м. н., проф., чл.-кор. НАМН України, провідний науковий співробітник Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, ORCID: 0000-0003-2293-0869;

Бондар Олександр Вадимович – д. м. н., доцент кафедри променевої діагностики, терапії та онкології Одеського національного медичного університету, завідувач циклу онкології, ORCID: 0000-0001-8746-1878;

Янева Дарія Георгіївна – лікар-інтерн хірург Центру реконструктивної та відновної медицини «Клініка медичного університету», ORCID: 0000-0001-9775-309X.



INFORMATION ABOUT AUTHORS

Yurii V. Dumanskiy – Dr. Sci. (Medicine), Prof., Cor. Member of the NAMS of Ukraine, Leading Researcher of the Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of R. E. Kavetskiy, ORCID: 0000-0003-2293-0869;

Olexandr V. Bondar – Dr. Sci. (Medicine), Associate Professor of the Department of Radiation Diagnostic, Therapy and Oncology of the Odesa National Medical University, Head of Oncology Course, ORCID: 0000-0001-8746-1878;

Daria G. Yanieva – Internship Doctor of the Center of Reconstructive and Restoration Medicine "The University Clinic", ORCID: 0000-0001-9775-309X.

Yurii V. Dumanskiy 
ORCID: 0000-0003-2293-0869
oncologdopc@gmail.com

ВСТУП

РМЗ в останні роки займає перше місце у структурі онкологічної захворюваності у жінок, що й обумовлює надзвичайний інтерес вчених-онкологів до успіхів у лікуванні даної категорії пацієнток [1]. Незважаючи на те, що РМЗ належить до «зовнішніх» локалізацій пухлин, кількість пацієнток з місцево розповсюдженими формами захворювання з року в рік продовжує збільшуватись. Поширені форми РМЗ вважаються прогностично несприятливими і лише впровадження сучасних схем хімієгормотерапії з урахуванням індивідуальних особливостей рецепторного статусу пухлини дозволило декілька покращити результати лікування цієї групи пацієнток [2]. Однак виживання і якість життя пацієнток з РМЗ, як і раніше, залишаються одними з найнижчих, що й визначає необхідність подальшої оптимізації методів лікування.

В сучасних наукових публікаціях питанню комплексного лікування місцево-розповсюдженого РМЗ (МРРМЗ)

приділено достатньо мало уваги. Чинні літературні посилання з цієї теми відображують прагнення одних авторів спростити хірургічний підхід у лікуванні цих форм захворювання до циторедуктивних оперативних втручань, а інших – модифікувати відомі схеми системної хімієтерапії на користь того чи іншого хімієтерапевтичного засобу [3].

У зв'язку з цим, особливої актуальності набуває розробка нових персоналізованих методів лікування пацієнток з первинно неоперабельними формами РМЗ, які суттєво б збільшити тривалість та покращили якість життя пацієнток.

Актуальність пошуку нових методик у комплексному лікуванні МРРМЗ і, особливо, при несприятливому біологічному підтипі диктується невтішними результатами лікування цієї категорії пацієнток навіть у рамках найбільших міжнародних досліджень та цифрами захворюваності, що неухильно зростають.

Хірургія РМЗ має широкий спектр втручань. Об'єднаним принципом залишається прагнення хірургів до вико-

нання радикальних операцій. Дискусійним сьогодні є питання про шляхи підведення хімієтерапії до пухлинного осередку з метою переведення з неоперабельного стану пухлини в стан, при якому з'являється можливість виконати радикальний об'єм хірургічного втручання.

Обґрунтованими залишаються думки вчених про значну небезпеку розвитку великої кількості ускладнень у пацієнток з МРРМЗ [4]. Така думка пов'язана з вираженим зниженням імунних реакцій і високим ступенем інтоксикації у пацієнток з МРРМЗ.

МРРМЗ вважається прогностично несприятливим і лише впровадження нових схем хімієгормонотерапії дозволило декілька покращити результати лікування цих пацієнток [5]. Тривалість життя і якість у цій групі залишаються низькими, що і потребує необхідності подальшого пошуку методів лікування.

Прогрес у терапії РМЗ пов'язують з комбінованим і комплексним лікуванням: хірургічним, променевим, хіміо- і гормонотерапією у різних модифікаціях [6].

Поліхімієтерапія в комплексному лікуванні пацієнток з МРРМЗ спрямована на зменшення біологічної активності пухлинних клітин в основному осередку [7].

PCNA є ДНК-зажимом, який діє як фактор процесивності для ДНК-полімерази та відіграє важливу роль в процесі реплікації.

Структурно PCNA є мультимерним комплексом з трьох однакових мономерів, що мають вторинну внутрішню форму та шестигранну зовнішню з локусами зв'язку з ДНК-полімеразою та іншими білками для виконання різних метаболічних процесів ДНК на вершинах.

PCNA має найвищу експресію під час G₁ і S-фаз, а його експресія зменшується в фазах G₂ і M. Цей маркер також присутній на ранній фазі G₀. Референтні значення PCNA корелюють зі ступенем активності проліферації клітин або їх неопластичної трансформації. При використанні разом з іншими маркерами РМЗ, PCNA є корисним для оцінки проліферації клітин та прогнозування їхньої поведінки. Збільшення експресії PCNA також корелює з коротшим періодом без захворювання і загальною виживаністю у пацієнток з РМЗ [8].

Дослідження з використанням двомірного електрофорезу в поліакриламідному гелі (2D PAGE) показало, що PCNA може бути корисним маркером у діагностиці РМЗ. У цьому дослідженні в клітинах РМЗ були виявлені дві ізоформи білка PCNA, тоді як тільки одна ізоформа спостерігалася в нормальних клітинах молочної залози. Ізоформа, що зустрічається тільки в первинних та імуорталізованих клітинах, була позначена як «основна» форма, тоді як інша ізоформа, що спостерігається в клітинних лініях РМЗ, була відзначена як «кисла» форма. При цьому обидві ізоформи відрізняються тільки їх ізоелектричною точкою. Було визначено, що ця різниця в рН обумовлена посттрансляційною модифікацією. На підставі цих знахідок були розроблені поліклональні антитіла до канцерасоційованих PCNA (caPCNA), які можна використовувати як відмінний діагностичний маркер РМЗ [9]. ІПА має різні референтні значення для різних сценаріїв онкологічної патології. На підставі імуногістохімічного діагностичного тесту на PCNA виділяють такі типи: низькоагре-

сивна пухлина з показником < 25 %, агресивна пухлина з показником > 25 %.

В перспективі, дослідження різноманітної панелі специфічних біомаркерів РМЗ та їхня компіляція дозволить комплексно розраховувати ІПА пухлини, що надасть можливість більш точно оцінювати поточний статус новоутворення і прогнозувати ефективність запланованого лікування [10].

Метою дослідження була оцінка ефективності неоад'ювантного лікування із застосуванням системного та селективного внутрішньоартеріального шляхів уведення хімієпрепаратів у пацієнток з МРРМЗ з використанням ІПА пухлини на основі маркера PCNA; визначення ІПА на основі даного показника для прогнозування ефективності лікування, а також розробки адекватної тактики комплексного передопераційного протипухлинного лікування.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

ДОТРИМАННЯ ЕТИЧНИХ АСПЕКТІВ

Дослідження проведене на основі ретроспективного аналізу 63 історій стаціонарних пацієнток з МРРМЗ в стадії cT_{4A-D}N₀₋₂M₀, люмінальний В підтип, які отримували спеціалізоване комплексне неоад'ювантне лікування на базі хірургічного відділення Університетської клініки Одеського національного медичного університету в 2012–2016 рр., та Донецького обласного протипухлинного центру у 2012–2014 рр. Перед включенням пацієнток до протоколу дослідження були отримані особисті письмові добровільні згоди на участь у дослідженні відповідно до Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації (протокол № 117А Засідання Комісії з біоетики Одеського національного медичного університету від 12.05.2017).

Загальна вибірка сформована та стандартизована за віковими та клінічними показниками. Середній вік пацієнток становив (47,0 ± 6,5) років (діапазон склав 37–76 років). Усі пацієнтки були всебічно обстежені, за необхідності проведені консультації суміжними спеціалістами, адекватно компенсовані за супутніми захворюваннями для проведення багатоетапного процесу спеціалізованого лікування. Індивідуальна програма лікування формувалася консиліумом за участі лікарів хірургів-онкологів, фахівців з хімієтерапевтичного та радіотерапевтичного лікування та базувалася на даних спіральної комп'ютерної томографії, магнітної резонансної томографії, цифрової маммографії, ультразвукового дослідження молочних залоз, результатах мікрморфологічного та імуногістохімічного дослідження.

МЕТОДИ ТА МЕТОДИКИ

У всіх пацієнток окрім рутинних лабораторних і інструментальних аналізів проводилося імуногістохімічне дослідження PCNA у зразках пухлин з використанням моноклональних антитіл проти PCNA (клон PC10, 1:50, «Thermo Fisher Scientific», США). Антитіла розводили в розчиннику з фоновим відновним компонентом. Усі реак-

ції супроводжувалися відповідними контрольними реакціями, в яких специфічні антитіла були заміщені універсальним негативним контролем для комплексу первинних антитіл миші серії N1698 («Thermo Fisher Scientific», США).

Зразки тканини фіксували в 10 % буферизованому формаліні, дегідрували, переносили в парафін для подальшого створення тонких секцій товщиною 4 мкм на rotaційному мікротомі «RM 2135», («Leica BioSystems», Німеччина). Парафінові секції встановлювали на слайдах «Superfrost» («Menzel-Glazer», Німеччина), депарафінували ксилолом і поступово повторно зволожували. Відновлення антигенів здійснювали шляхом нагрівання до 98 % у 0,1 М цитратному буфері (рН 6,0) протягом 10 хв у мікрохвильовій печі «EZ-Retriever System» («BioGenex», Канада) з подальшим охолодженням до кімнатної температури. Активність ендогенної пероксидази блокували 3 % розчином пероксиду водню 3% у фосфатному буфері протягом 30 хв при кімнатній температурі. Надалі секції інкубувалися у відповідних розчинах антитіл при температурі 4 °С протягом 12 год. Вторинна ампліфікація здійснювалася за допомогою HRP (Horseradish peroxidase)-зв'язаних вторинних антитіл. Усі секції були контрастовані гематоксиліном Мейера протягом 20 с. Візуалізація досягалася за допомогою біотинильованих антитіл («Thermo Fisher Scientific», США), стрептавідин-біотинильованого пероксидазного комплексу («Thermo Fisher Scientific», США) та діамінобензидину («Thermo Fisher Scientific», США) та здійснювалася з використанням камери «Nicon Microphot-FX, 3CCD» («Sony Corporation», США) і комп'ютерного програмного забезпечення для аналізу зображень «Optimas 6.5» («CyberMetrics, США) у п'яти рандомних полях зору при збільшенні $\times 300$. Як мінімальну кількість проліферуючих клітин для оцінки було обрано фракцію 1000 пухлинних клітин як мінімальне число для отримання репрезентативних результатів. Значення PCNA було виражене як відсоткова частина клітин з позитивним забарвленням. Більшість пацієнтів в усіх групах (60 %) мали значення PCNA в діапазоні (20–30) %, з медіаною 25 %.

Дослідження проводилося ретроспективно з використанням вже готових постійних біопсійних матеріалів пацієнток, що проходили спеціалізоване неoad'ювантне лікування з приводу первинно неоперабельних форм РМЗ. Для дослідження використовувалися біоптати з центру пухлини. Спочатку зразки фіксували у 50 % розчині етанолу протягом 4–12 год, після чого проводили фіксацію в 10 % розчині формалізованого нейтрального буфера не менше 6 год. Секції депарафінували та регідрували деіонізованою водою, після чого їх нагрівали в цитратному буфері (рН 6,0) з використанням електричної плити при температурі 120 °С і тиску (0,8–1,0) бар протягом 3 хв і охолоджували протягом 10 хв до імунологічного забарвлення. Усі слайди завантажували в автоматизовану систему «Dako Autostainer» («Dako Colorado, Inc.») і піддавали впливу 3 % перекису водню протягом 5 хв, інкубували з первинним антитілом протягом 30 хв, з міченим полімером (Envision[®]) протягом 30 хв, з 3,3'-діамінобензидином як хромогеном протягом 5 хв і гематоксиліном як контрастом протягом 5 хв. Всі інкубаційні етапи проводили

при кімнатній температурі, а між ними промивали сольовим розчином.

Відповідно до методу доставлення хіміепрепаратів до пухлинного осередку в ході неoad'ювантної ПХТ, всі пацієнтки були розподілені на 2 групи. Перед початком лікування були отримані інформовані згоди від пацієнток для проведення внутрішньоартеріальної ПХТ. Контрольну групу склали 22 пацієнтки (35 %) з МРРМЗ, для яких як передопераційний курс ПХТ була обрана внутрішньовенна системна ПХТ (СПХТ): згідно з стандартами NCCN (The National Comprehensive Cancer Network), 3–4 курси за схемами циклофосфамід-доксорубіцин-фторурацил (cyclophosphamide-adriamycin-fluorouracil, CAF), циклофосфамід-метотрексат-фторурацил (cyclophosphamide-methotrexate-fluorouracil, CMF) або циклофосфамід-доксорубіцин-метотрексат-фторурацил (cyclophosphamide-adriamycin-methotrexate-fluorouracil, CAMF) у дозуванні, відповідному до розрахунків площі поверхні тіла (body surface area, BSA) в залежності від відповіді пухлини на лікування. У дослідній групі 41 пацієнтка (65 %) отримала відповідну кількість курсів регіонарної ПХТ шляхом селективної внутрішньоартеріальної ПХТ (СВАПХТ): 3–4 курси за схемами CAF, CMF або CAMF у дозуванні, відповідному до розрахунків BSA (з внутрішньовенним призначенням доксорубіцину). Далі кількість циклів ПХТ доводили до 6 з метою отримання максимальної динамічної дози. Променева терапію отримали усі пацієнтки з разовою осередковою дозою 2–2,5 Гр, сумарною осередковою дозою 40–45 Гр. Враховуючи люмінальний тип пухлин, після проведення основного етапу лікування призначалася гормонотерапія. Цей план лікування активно використовувався у Донецькому обласному протипухлинному центрі в 1995–2014 рр.: було проведено більш ніж 6000 катетеризацій внутрішньої грудної артерії, а отримані результати лікування мали значно кращі результати виживаності.

ДОСТОВІРНІСТЬ ДАНИХ ТА СТАТИСТИЧНИЙ АНАЛІЗ

Для аналізу отриманих даних використовувалася статистика динамічних рядів. Для оцінки значущості цих змін було застосовано параметричний тест Манна-Уїтні. Для оцінки статистичних даних як програмним забезпеченням було застосовано SPSS Statistics. Для розрахунку загальної виживаності використали метод Каплана-Майєра.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

На першому етапі нами проведений однофакторний статистичний аналіз результатів регресії рівня біомаркера у групах порівняння в залежності від використаного методу введення неoad'ювантної ПХТ (рис. 1).

У контрольній групі до проведення ПХТ референтні значення PCNA становили: [$< 25\%$] у 9 пацієнток (41 %) – (20,6 \pm 1,5) %; [$> 25\%$] у 13 пацієнток (59 %) – (39,3 \pm 5,8) %. В результаті проведення неoad'ювантної СПХТ частка пацієнток з низьким рівнем PCNA збільшилася на 33 % (з 9 до 12 осіб) при загальному зниженні показника до (18,2 \pm 1,6) % ($p > 0,05$). Середні значення у 10 пацієнток, у

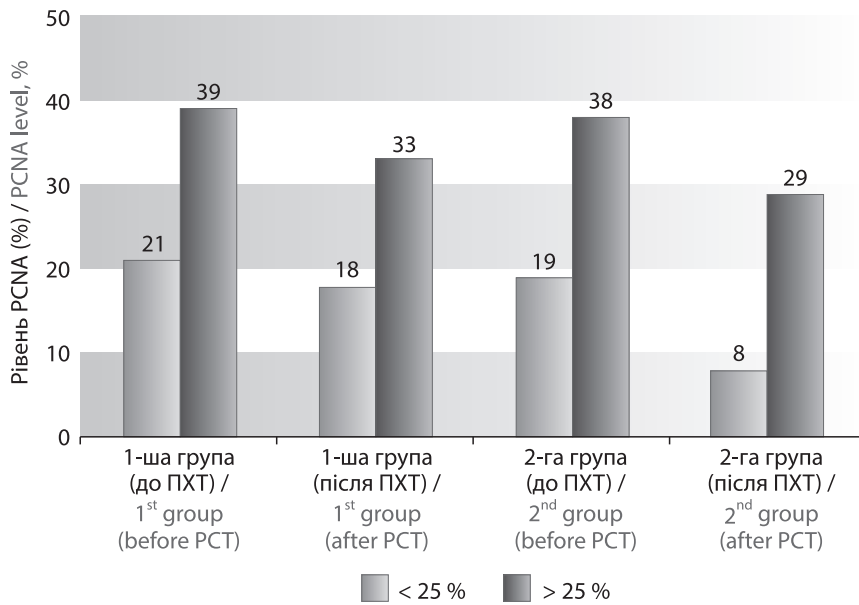


Рис. 1 / Fig. 1. Аналіз якісного порівняння груп до і після неoad'ювантної ПХТ за експресією PCNA / Analysis of qualitative comparison of groups before and after neoadjuvant polychemotherapy for proliferating cell nuclear antigen expression.

Примітка / Note: 1-ша група – пацієнтки, для яких як передопераційний курс ПХТ була обрана внутрішньовенна СПХТ, 2-га група – пацієнтки, для яких як передопераційний курс ПХТ була обрана СВАПХТ, <25 % і >25 % – референтні значення PCNA / 1st group – patients for whom intravenous systemic polychemotherapy was administered as a preoperative course of polychemotherapy, 2nd group – patients for whom selective intra-arterial polychemotherapy was administered as a preoperative course of polychemotherapy, PCT – polychemotherapy, PCNA – proliferating cell nuclear antigen, <25 % і >25 % – PCNA reference values.

яких рівень PCNA залишився вище за критичний, склало (33,4 ± 4,8) % ($p > 0,05$).

У дослідній групі до проведення ПХТ контрольні значення PCNA у зразках біопсійного матеріалу були: [< 25 %] у 22 пацієнток (63 %) – (19,4 ± 2,0) %; [> 25 %] у 19 пацієнток (37 %) – (37,5 ± 5,7) %. В результаті проведення неoad'ювантної СВАПХТ загальна кількість пацієнток з низьким рівнем PCNA збільшилася на 8 осіб (36 %) зі зниженням ІПА за PCNA до (8,6 ± 1,2) % ($p < 0,05$). Середній рівень PCNA у 11 пацієнток з високим рівнем контрольованого показника склав (28,6 ± 1,9) % ($p > 0,05$).

За U-критерієм Мана-Уїтні є вірогідна ($p < 0,01$) перевага в результатах лікування у пацієнток дослідної групи за динамікою зниження значення PCNA у підгрупах з низьким рівнем у порівнянні з контрольною групою (рис. 2).

Серед пацієнток контрольної групи середня тривалість життя з моменту встановлення діагнозу становила (2,61 ± 0,9) років, при цьому загальна однорічна виживаність – 89 % (20 пацієнток), дворічна – 72,4 % (16 пацієнток) і трирічна – 54,5 % (12 пацієнток). Серед пацієнток

дослідної групи середня тривалість життя з моменту встановлення діагнозу становила (3,8 ± 0,7) років, при цьому загальна однорічна виживаність – 95,1 % (39 пацієнток), дворічна – 84,2 % (34 пацієнтки) і трирічна – 73,2 % (30 пацієнток).

За фактом досягнення резектабельного статусу пухлини з'ясовані наступні співвідношення: контрольна група – 12 пацієнток з низьким ІПА, дослідна група – 30 пацієнток з підпороговим ІПА.

Був проведений аналіз загальної виживаності для обох груп за методом Каплана-Майєра (рис. 3, 4).

Для підгрупи з низьким рівнем [PCNA < 25 %] середня тривалість життя з моменту встановлення діагнозу становила у першій групі (3,43 ± 0,40) років (трирічна виживаність – 54,5 %); у другій групі (4,24 ± 0,40) років (трирічна виживаність – 73,2 %). У підгрупі з високим рівнем [PCNA > 25 %] середня тривалість життя з моменту встановлення діагнозу у першій групі становила (1,67 ± 0,20) років (трирічна виживаність – 0 %); у другій групі – (2,61 ± 0,30) років (трирічна виживаність – 0 %) (рис. 5).

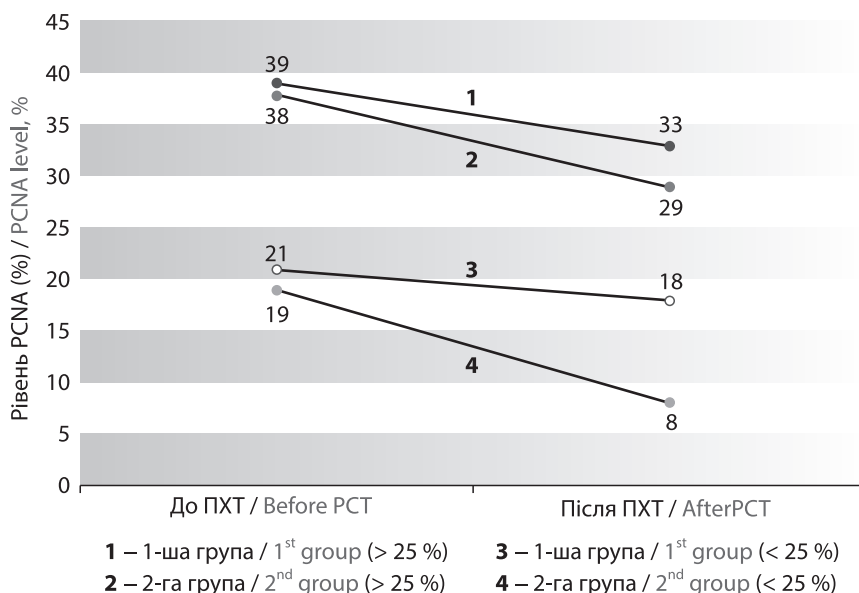


Рис. 2 / Fig. 2. Динаміка середнього значення PCNA до і після неoad'ювантної поліхіміотерапії (НПХТ) / Dynamics of the average value PCNA before and after NPHT.

Примітки / Notes: 1-ша група – пацієнтки, для яких як передопераційний курс ПХТ була обрана внутрішньовенна СПХТ, 2-га група – пацієнтки, для яких як передопераційний курс ПХТ була обрана СВАПХТ, < 25 % і > 25 % – референтні значення PCNA / 1st group – patients for whom intravenous systemic polychemotherapy was administered as a preoperative course of polychemotherapy, 2nd group – patients for whom selective intra-arterial polychemotherapy was administered as a preoperative course of polychemotherapy, PCT – polychemotherapy, PCNA – Proliferating cell nuclear antigen, < 25 % і > 25 % – PCNA reference values.

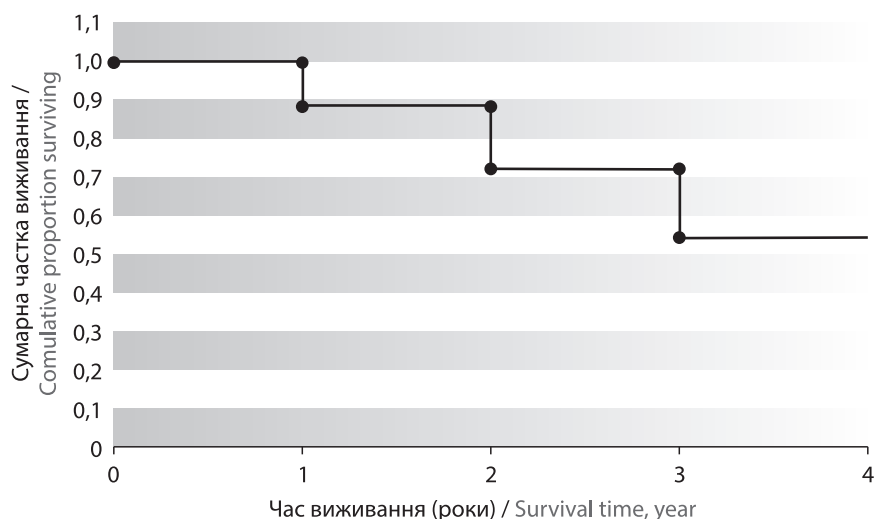


Рис. 3 / Fig. 3. Загальна виживаність хворих контрольної групи (за Капланом–Майером) / The overall survival of patients in the control group (according to Kaplan–Mayer).

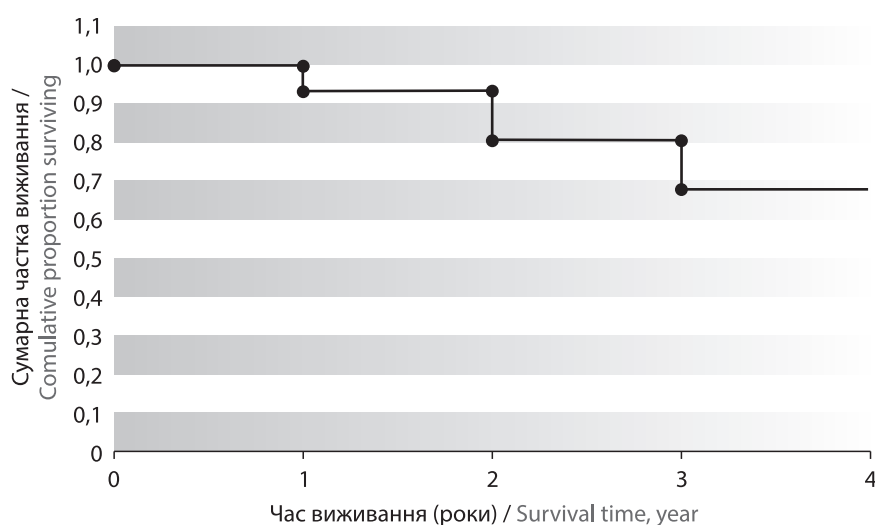


Рис. 4 / Fig. 4. Загальна виживаність хворих досліджуваної групи (за Капланом–Майером) / The overall survival of patients in the study group (according to Kaplan–Mayer).

Оцінка ефективності лікування проводилася за Response evaluation criteria in solid tumors (RECIST): у контрольній групі повна відповідь пухлини досягнута у 1 пацієнтки (6 %), часткова – у 21 пацієнтки (94 %); у дослідній групі повна відповідь досягнута у 9 пацієнток

(24 %), часткова – у 32 пацієнток (76 %). Пацієнтки, у яких протягом лікування спостерігалась стабілізація чи прогресія захворювання, вибували з дослідження.

РМЗ займає провідні позиції серед причин смертності у жінок, а також істотно впливає на якість їх життя. Особ-

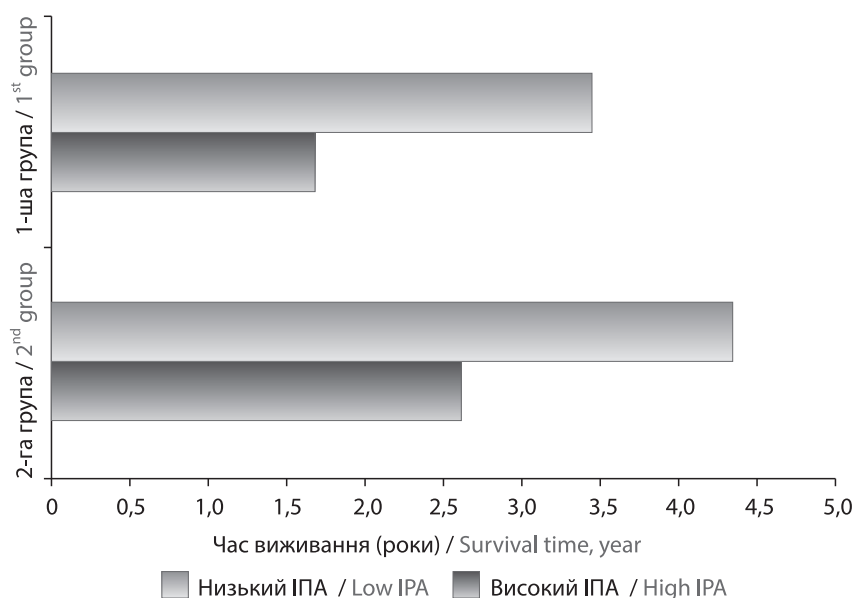


Рис. 5 / Fig. 5. Динаміка показника загальної виживаності серед пацієнток з низьким та високим ІПА за РСНА / Dynamics of overall survival among patients with low and high proliferative activity index (PAI) by PCNA.

Примітки / Notes: 1-ша група – пацієнтки, для яких як передопераційний курс ПХТ була обрана внутрішньовенна СПХТ, 2-га група – пацієнтки, для яких як передопераційний курс ПХТ була обрана СВАПХТ, ІПА – індекс проліферативної активності / 1st group – patients for whom intravenous systemic polychimotherapy was administered as a preoperative course of polychimotherapy, 2nd group – patients for whom selective intra-arterial polychimotherapy was administered as a preoperative course of polychimotherapy, PI – proliferative index.

ливе місце в структурі даної патології посідають різні форми МРРМЗ, при яких ефективність використовуваних методів лікування вкрай мала, а прогноз досить несприятливий. Це обумовлює актуальність пошуку нових методів діагностики та лікування таких пацієнток. Пошук шляхів поліпшення переносності спеціального лікування з підвищенням безпеки методу лікування без погіршення онкологічних результатів є одним із пріоритетів сучасної онкології та онкомамології.

Вибір шляху доставляння та кількість крусів ПХТ істотно впливає на переносність неоад'ювантної терапії й, відповідно, на якість життя цих пацієнток під час проведення терапії.

За допомогою показника PCNA можна надійно оцінювати проліферативну активність пухлини й прогнозувати ефект неоад'ювантної ПХТ, а також обирати оптимальну тактику комплексного лікування. За оцінкою динаміки PCNA метод СВАПХТ є більш ефективним способом неоад'ювантного лікування хворих з первинними неоперабельними формами РМЗ і має кращі результати з точки зору інгібування та реверсії прогресії пухлини у порівнянні з системним підходом.

За результатами цього дослідження автори пропонують проводити аналіз регресії проліферативної активності пухлини на підставі змін рівня PCNA для визначення ефективності проведеного лікування. Цей спосіб може бути ефективно використаний для оцінки біологічних властивостей пухлини, прогнозування перебігу захворювання (сприятливого або несприятливого) і вибору оптимальної тактики неоад'ювантної ПХТ (регіонарної або системної) в рамках комплексної протипухлинної терапії.

ВИСНОВКИ

1 PCNA є перспективним маркером для оцінки проліферативної активності пухлини при розробці спеціалізованих онкологічних програм з урахуванням індивідуальних особливостей організму пацієнтки та біохімічного профілю пухлини з метою уникнення неефективних уніфікованих методів лікування на основі емпіричного підходу.

2 При референтних значеннях рівня білка PCNA < 25 %, метод СВАПХТ є більш ефективним методом неоад'ювантного лікування пацієнток з МРРМЗ і має кращі результати інгібування і реверсії прогресування росту пухлини.



СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ / REFERENCES

- Greenlee H, DuPont-Reyes MJ, Balneaves LG, Carlson LE, Cohen MR, Deng G et al. Clinical practice guidelines on the evidence-based use of integrative therapies during and after breast cancer treatment. *CA Cancer J Clin.* 2017 May 6;67(3):194-232. DOI: 10.3322/caac.21397.
- Viale G, Regan MM, Mastropasqua MG, Maffini F, Maiorano E, Colleoni M et al; International Breast Cancer Study Group. Predictive value of tumor Ki-67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Feb 6;100(3):207-12. DOI: 10.1093/jnci/djm289.
- Strzalka W, Ziemienowicz A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Ann Bot.* 2011 May;107(7):1127-40. DOI: 10.1093/aob/mcq243.
- DeSantis CE, Ma J, Goding Sauer A, Newman LA, Jemal A. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state. *CA Cancer J Clin.* 2017 Nov;67(6):439-448. DOI: 10.3322/caac.21412.
- Soria G, Gottifredi V. PCNA-coupled p21 degradation after DNA damage: The exception that confirms the rule? *DNA Repair (Amst).* 2010 Apr 4;9(4):358-64. DOI: 10.1016/j.dnarep.2009.12.003.
- Strzalka W, Oyama T, Tori K, Morikawa K. Crystal structures of the Arabidopsis thaliana proliferating cell nuclear antigen 1 and 2 proteins complexed with the human p21 C-terminal segment. *Protein Sci.* 2009 May;18(5):1072-80. DOI: 10.1002/pro.117.
- McCahill LE, Single RM, Aiello Bowles EJ, Feigelson HS, James TA, Barney T et al. Variability in reexcision following breast conservation surgery. *JAMA.* 2012 Feb 1;307(5):467-75. DOI: 10.1001/jama.2012.43.
- Landercasper J, Bailey L, Buras R, Clifford E, Deqnim AC, Thanasoulis L et al. The American Society of Breast Surgeons and Quality Payment Programs: Ranking, Defining, and Benchmarking More Than 1 Million Patient Quality Measure Encounters. *Ann Surg Oncol.* 2017 Oct;24(10):3093-3106. DOI: 10.1245/s10434-017-5940-1.
- McNally R, Bowman GD, Goedken ER, O'Donnell M, Kuriyan J. Analysis of the role of PCNA-DNA contacts during clamp loading. *BMC Struct Biol.* 2010 Jan 30;10:3. DOI: 10.1186/1472-6807-10-3.
- Picon-Ruiz M, Morata-Tarifa C, Valle-Goffin JJ, Friedman ER, Slingerland JM. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. *CA Cancer J Clin.* 2017 Sep;67(5):378-397. DOI: 10.3322/caac.21405.



Оценка индекса пролиферативной активности опухоли PCNA при разнообразных путях доставки полихимиотерапевтических препаратов у пациенток с местно-распространенным раком молочной железы

Ю. В. Думанский¹, А. В. Бондарь², Д. Г. Янева³

¹Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, ул. Васильковская, 45, Киев 03022, Украина

²Одесский национальный медицинский университет, переулок Валиховский, 2, Одесса 65082, Украина

³Центр реконструктивной и восстановительной медицины «Клиника медицинского университета», ул. Тенистая, 8, Одесса 65062, Украина.

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) является одним из наиболее актуальных вопросов современной онкологии, так как занимает лидирующие позиции среди причин смертности и потери трудоспособности у женщин. Особое место в структуре данной патологии занимают местно-распространенные формы злокачественной опухоли при которых эффективность используемых методов лечения крайне мала, а прогноз достаточно неблагоприятный. Это обуславливает актуальность поиска новых методов диагностики и лечения таких пациенток. В этом исследовании нами была определена роль неоадьювантной селективной внутриартериальной полихимиотерапии при первично неоперабельных формах РМЖ. Для определения и прогнозирования эффективности данного метода лечения мы использовали пролиферативную активность опухоли. В ходе исследования изучалась экспрессия маркера ядерной пролиферации (ядерный антиген пролиферирующих клеток, PCNA) с целью прогностической и диагностической оценки с учетом неудовлетворительных литературных данных по этому вопросу в контексте определения аналогичных параметров по другим критериям. Уровень PCNA принят как основная дихотомическая точка прогностической оценки неоадьювантной терапии по результатам ретроспективного анализа эффективности проведенного предоперационного лечения и определения достоверной разницы между результатами в подгруппах с более низким и более высоким уровнем маркера, которые в нашем исследовании разделены по медианному значению иммуногистохимического уровня параметра в общей выборке 25 %.

Цель: оценка эффективности неоадьювантного лечения с применением системного и селективного внутриартериального путей введения химиопрепаратов у больных с местно-распространенным РМЖ с использованием индекса пролиферативной активности опухоли на основании маркера PCNA.

Материалы и методы. Проведен ретроспективный анализ результатов комплексного лечения пациенток с первично неоперабельным местно-распространенным РМЖ на основе селективных и системных путей введения химиопрепаратов. В ис-

следование включено 63 пациентки. Выборка разделена на 2 группы в зависимости от вида неоадьювантной полихимиотерапии; сформировано 1-я группа – контрольная (на основе системной терапии) и 2-я группа – исследуемая (с использованием селективного внутриартериального пути доставки). Контрольную группу составили 22 пациентки, исследуемую – 41 пациентка. У всех пациенток выявлено стадию заболевания IIIb. В соответствии с клиническими проявлениями в контрольную группу входило 12 пациенток с cT4bN1M0, 6 пациенток с cT4aN1M0 и 4 пациентки с cT4cN1M0; в опытную группу – 23 пациентки с cT4bN1M0, 7 пациенток с cT4aN1M0 и 11 пациенток с cT4cN1M0. Пациентки, которые включены в исследование, имели люминальный тип В. Параллельно с рутинными методами у всех пациенток дополнительно изучалась динамика пролиферативной активности опухоли по ядерному антигену PCNA. Это исследование показывает уровень индекса PCNA в начале лечения и после окончания полихимиотерапии (ПХТ). После проведения ПХТ всем пациенткам выполнили оперативное вмешательство. С учетом патогистологического исследования пациентки были перераспределены следующим образом: в контрольной группе 4 пациентки имели pT4aN0M0, 2 пациентки – pT4aN1M0, 4 пациентки – pT4bN0M0, 8 пациенток – pT4bN1M0, 1 пациентка – pT4cN0M0, и 3 пациентки – pT4cN1M0; в опытной группе 3 пациентки имели pT4aN1M0, 4 пациентки – pT4aN0M0, 15 пациенток – pT4bN1M0, 8 пациенток – pT4bN0M0, 6 пациенток – pT4cN1M0 и 5 пациенток – pT4cN0M0. Поскольку пациентки относились к группе с люминальным типом опухоли, каждая из них получала гормонотерапию в адьювантном режиме. Пациенткам репродуктивного возраста назначали препараты группы антагонистов эстрогена, тогда как пациенткам в постменопаузе – ингибиторы ароматазы. В исследовании не применялась таргетная терапия. Между группами сравнения был проведен статистический анализ; за критическое значение выбран медианный уровень маркера в 25 %.

Результаты. По степени регрессии PCNA определено, что селективная внутриартериальная ПХТ при РМЖ с низким индексом пролиферативной активности в опытной группе имеет статистически значимое преимущество по показателям общей выживаемости и средней продолжительности жизни в сравнении с группой контроля ($p < 0,05$).

Выводы. С помощью показателя PCNA возможно оценивать пролиферативную активность опухоли и таким образом прогнозировать эффект неоадьювантной ПХТ и выбирать оптимальную тактику комплексного лечения пациенток с РМЖ.

Ключевые слова: местно-распространенный рак молочной железы, индекс пролиферативной активности, маркер ядерного антигена пролиферирующих клеток, системная полихимиотерапия, селективная внутриартериальная полихимиотерапия.

Для цитирования: Думанский ЮВ, Бондарь АВ, Янева ДГ. Оценка индекса пролиферативной активности опухоли PCNA при разных вариантах полихимиотерапии у пациенток с местно-распространенным раком молочной железы. Журнал Национальной академии медицинских наук Украины. 2021;27(1):18–26. DOI: 10.37621/JNAMSU-2021-1-2.

Статья поступила в редакцию 16.12.2020 | Направлена на рецензирование 19.02.2021 | Принята в печать 24.04.2021