

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

*Ровенский онкологический
диспансер, Ровно*

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

Ключевые слова: *рак молочной железы, комплексное лечение, интерферон альфа-2b, эффективность лечения, фенотип опухолевых клеток.*

ИНТЕРФЕРОНОТЕРАПИЯ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: АНТИМЕТАСТАТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ И МОДИФИКАЦИЯ ФЕНОТИПА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Резюме. *Исследована эффективность использования интерферона (ИФН) в качестве модификатора метастатического процесса у 557 больных раком молочной железы (РМЖ). Установлено, что включение ИФН в комплексные схемы неоадьювантной и адьювантной терапии пациентов с РМЖ сопровождается увеличением средней продолжительности ремиссии на 24 мес и повышением 3-летней выживаемости больных на 19,9%. Изучение влияния ИФН на фенотипические особенности опухолевых клеток, определяющие их метастатический потенциал, показало, что цитокин оказывает ингибирующее влияние на экспрессию фактора роста эндотелия сосудов и одного из основных маркеров высокометастатического фенотипа опухолевых клеток Her2/neu.*

Не подлежит сомнению, что в настоящее время лечение больных онкологического профиля направлено не только на элиминацию первичной опухоли с помощью хирургических, лучевых и медикаментозных воздействий, но и на предотвращение развития метастатического процесса — этого опаснейшего и нередко фатального этапа злокачественных заболеваний. Не удивительно, что изучение патофизиологии метастазирования и поиск средств его предотвращения является предметом пристального внимания со стороны исследователей, работающих в области экспериментальной и клинической онкологии.

Сегодня уже четко установлено, что метастазирование — неслучайный процесс, он скорее является селективным по отношению к потенциально метастатическим субпопуляциям клеток, предсуществующим в исходной опухоли. Как отмечают исследователи [1, 2], эволюция опухолей в направлении появления клонов с высоким метастатическим потенциалом есть последовательное приобретение клетками генетической и/или фенотипической нестабильности, лежащей в основе формирования их высокометастатического фенотипа.

Тем не менее реализация метастатических потенциалов этих клеток, как известно, не бывает беспрепятственной: только небольшое количество отклоненных клеток первичной опухоли может реально инвазировать кровеносные сосуды; еще меньшее — способно сохраниться в циркуляторном русле в условиях воздействия иммунных и неиммун-

ных защитных механизмов организма, достичь органа-мишени, повторно пройти через эндотелий сосудов (экстравазация) в окружающие ткани и дать начало вторичному, метастатическому росту.

В этой ситуации поиск средств, модифицирующих метастатический потенциал опухолевых клеток и метастатический процесс в целом и активирующих контролируемые его механизмы, является первоочередной, хотя и непростой задачей современной онкологии [3]. Вполне естественно, что с этой точки зрения внимание исследователей привлечено полипотентный цитокин — интерферон (ИФН) — этот универсальный регулятор и модулятор многих биологических процессов как на клеточном, так и на системном уровне [4, 5, 6]. В реализации модифицирующего влияния ИФН на метастатический процесс несомненную роль может играть его антипролиферативная активность, конкурентные взаимоотношения с позитивными ростовыми факторами — промоторами роста дремлющих метастазов. Немаловажную роль может играть стимулирующее влияние ИФН на эффекторные клетки антиметастатического иммунного надзора и, наконец, широко описанное влияние ИФН на клеточную поверхность нормальных и опухолевых клеток; именно клеточная поверхность определяет, как известно, характер межклеточных контактов и взаимоотношений опухолевых клеток друг с другом, с эндотелием кровеносных сосудов и с клетками органа-мишени [3, 7]. Если же при этом учесть широко известные данные об антиангиогенном действии ИФН [8] и его стимули-

рующем влиянии на процессы апоптической гибели клеток [9], то включение этого цитокина в комплексные схемы лечения больных онкологического профиля обосновано и целесообразно.

Именно этой проблеме посвящены наши исследования, направленные на изучение эффективности включения ИФН альфа-2b в комплексные, традиционные схемы лечения больных раком молочной железы (РМЖ). Исследования проведены с включением 736 пациентов, однако в данной работе представлен фрагмент наблюдений эффективности лечения 557 больных с заболеванием III стадии (T1-2N0-2M0, T1-2N1-2M0 и T3-4N0-2M0). По данным отечественных и зарубежных онкологических центров 5-летняя выживаемость этих пациентов не превышает, к сожалению, 50%, а единого взгляда на стандарты их лечения не существует. Тем не менее общепринятый подход к проблеме повышения эффективности лечения больных данной категории связан с комплексным использованием хирургического вмешательства, полихимиотерапии (ПХТ), лучевой терапии (ЛТ), иммуно-, цитокино- и гормонотерапии. Указанный комплекс лечебных воздействий использован и в наших исследованиях.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены с участием 557 больных РМЖ III стадии (T1-2N0-2M0, T1-2N1-2M0 и T3-4N0-2M0), которым проводили стандартную предоперационную ЛТ с последующей послеоперационной ПХТ по схеме CMF. Пациентов разделили на 2 группы — контрольную и основную, каждую из которых на 3 подгруппы, незначительно отличающиеся по показателям TNM. Больные, включенные в основные и контрольные подгруппы, сопоставимы по стадии заболевания, гистологической структуре опухоли и по объему хирургического вмешательства. У пациентов основных подгрупп указанные схемы традиционного лечения дополнили курсами ИФН-терапии; больным в стадии T1-2N0-2M0 (1-я подгруппа) препарат вводили во время проведения предоперационного курса телегамма-терапии по интенсивной программе (внутримышечно ежедневно в течение 5 сут в дозе 6×10^6 МЕ); больным 2-й и 3-й подгруппы (T1-2N1-2M0 и T3-4N0-2M0) ИФН вводили во время проведения телегамма-терапии в течение 30 сут (внутримышечно ежедневно в дозе 1×10^6 МЕ). В послеоперационный период на 5–7-е сутки всем больным основных подгрупп ИФН вводили локально в дренаж для орошения послеоперационной раны; препарат вводили в течение 5–7 сут в дозе 6×10^6 МЕ, предварительно разведя его в 50 мл физиологического раствора. Следующий цикл ИФН-терапии проводили у пациентов основных подгрупп между курсами ПХТ; препарат вводили внутримышечно 10-дневными курсами по 3×10^6 МЕ на инъекцию. Суммарная доза ИФН составила 180–200 $\times 10^6$ МЕ (6–

7 курсов). Критерием эффективности проводимой терапии была продолжительность безрецидивного периода течения заболевания (ремиссии) и 3-летняя выживаемость больных.

Для расширения представлений о механизмах противоопухолевого (антиметастатического) действия ИФН у 56 пациентов основной группы исследовали влияние цитокина на фенотипические свойства (маркеры) опухолевых клеток. С этой целью проводили гистологическое и иммуногистохимическое исследование фенотипических особенностей опухолевых клеток (экспрессия Her2/neu, E-кадгерина, VEGF), полученных от больных, облучавшихся на фоне ИФН-терапии, и сравнивали их с таковыми, выделенными из опухолевого материала больных контрольной группы (25 пациентов). Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах ткани опухоли 56 больных основной и 25 — контрольной группы по общепринятому методу [10] с использованием MkAT соответствующей специфичности производства «Dako Cytomation», Дания и «Chemicon International», Европа.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи математической программы медико-биологической статистики STATISTICA 6.0. Вычисления и сравнения достоверности отличий средних величин проводили с использованием критерия Стьюдента для множественных сравнений. При этом достоверными считали отличия с вероятностью не менее 95% ($p < 0,05$). Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента корреляции (r) Пирсона. Для расширения представлений о кинетике выживания использовали медиану продолжительности жизни. Показатель общей выживаемости определяли с помощью метода Каплана — Майера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты клинических наблюдений показали, что средняя длительность ремиссии в 3 подгруппах больных основной группы, получавших ИФН в неoadьювантном (во время ЛТ) и адьювантном (совместно с ПХТ) режиме, варьировала в достаточно широком диапазоне: ее продолжительность колебалась от $50,1 \pm 2,6$ до $68,1 \pm 2,0$ мес, составляя в среднем 59,9 мес.

В то же время в контрольной группе продолжительность ремиссии колебалась в пределах $19,6 \pm 1,9$ — $43,2 \pm 1,3$ мес, составляя в среднем 35,9 мес (табл. 1).

Таблица 1

Подгруппа	Продолжительность ремиссии (мес)			
	Группа больных			
	Основная		Контрольная	
	Средний показатель	Предел колебаний	Средний показатель	Предел колебаний
1-я	$68,1 \pm 2,0^*$	28,8–89,7	$43,2 \pm 1,3$	19,6–64,5
2-я	$61,7 \pm 1,8^*$	24,8–86,0	$45,1 \pm 1,7$	17,7–62,1
3-я	$50,1 \pm 2,6^*$	22,0–71,4	$36,7 \pm 1,9$	19,6–53,8

* $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

Таким образом с помощью включения ИФН в комплексные схемы лечения больных РМЖ удалось продлить среднюю продолжительность ремиссий на 24 мес. При анализе выживаемости пациентов с РМЖ, получавших курсы ИФН-терапии, также получен позитивный результат: 3-летняя выживаемость в подгруппах основной группы составила $92,3 \pm 5,2\%$, $74,8 \pm 3,8\%$, $67,1 \pm 3,3\%$ (в среднем $78,0\%$), в то время как в контрольных подгруппах — $75,1 \pm 3,95\%$, $61,1 \pm 2,8\%$, $38,3 \pm 2,4\%$ (в среднем $58,1\%$) (табл. 2).

Таблица 2

3-летняя выживаемость больных (%)

Подгруппа	Группа	
	Основная	Контрольная
1-я	$92,3 \pm 5,2^*$	$75,1 \pm 3,9$
2-я	$74,8 \pm 3,8^*$	$61,1 \pm 2,8$
3-я	$67,1 \pm 3,3^*$	$38,3 \pm 2,4$

* $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

Как отмечали выше, важная задача данных исследований — изучение влияния ИФН на фенотипические особенности опухолевых клеток, определяющие их метастатический потенциал, характер взаимоотношений с сосудистым эпителием и клетками органа-мишени.

Известно, что неоангиогенез является необходимым условием роста опухоли и ее инвазивности [11] и что именно он играет важную роль в процессе развития метастазов [12]. При этом главным регулятором роста новых кровеносных сосудов является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), секреция которого опухолевыми клетками приводит к стимуляции роста эндотелиальных клеток и повышению проницаемости капилляров. В свою очередь повышение проницаемости сосудов ведет к инфльтрации плазматических белков, далее — к изменению межклеточного матрикса и, наконец, — к образованию новых кровеносных сосудов [13]. В наших исследованиях экспрессия VEGF выявлена лишь в 5—10% клеток опухолей и только у 4 из 56 исследуемых больных основной группы, получавших ИФН-терапию (рисунок а). Следует отметить, что в контрольной группе экспрессию данного маркера в злокачественных клетках отмечали в 18 из 25 исследуемых опухолей (рисунок б). Полученные данные свидетельствуют об ингибирующем действии ИФН на ангиогенез в опухолевой ткани молочной железы и коррелируют с более высокой безрецидивной выживаемостью больных. Установленный авторами феномен подтверждается рядом исследователей, показавших, что повышенная экспрессия VEGF является неблагоприятным прогностическим маркером [14].

Известно, что к неблагоприятным прогностическим маркерам, определяющим высокий метастатический потенциал клеток РМЖ и агрессивность протекания заболевания, относится и Her2/neu [15]. Так, установлено, что гиперэкспрессия Her2/neu сопровождается резким снижением апоптоза и уровня экспрессии рецепторов стероидных гормонов в опухолевых клетках [16], что определило инте-

рес к исследованию модифицирующего влияния ИФН на экспрессию Her2/neu в опухолевых клетках больных с РМЖ. Согласно полученным данным экспрессия Her2/neu выявлена у 21 из 25 пациентов контрольной группы, причем процент клеток, экспрессирующих данный белок, довольно высокий и составляет 60—80% (рисунок в); в основной группе экспрессия данного маркера присутствовала в небольшом количестве злокачественных клеток (10—20%) и только у 6 из 56 больных (рисунок г). Полученные данные свидетельствуют, что модифицирующее влияние ИФН проявляется в значительном снижении экспрессии Her2/neu, что является благоприятным фактором с точки зрения прогноза развития заболевания.

В заключение следует отметить, что чрезвычайно важным звеном реализации метастатического потенциала опухолевой клетки является ее адгезивность, которая согласно современным представлениям, определяется экспрессией молекул адгезии — E-кадгерина и играет немаловажную роль в процессах инвазии и метастазирования [17]. Согласно полученным данным включение ИФН в схему лечения больных с РМЖ сопровождается снижением экспрессии E-кадгерина на поверхности опухолевых клеток (рисунок д). На опухолевых клетках пациентов контрольной группы экспрессию данного маркера отмечали в подавляющем большинстве случаев (23 больных из 25) (рисунок е). Поскольку согласно представленным выше результатам клинических наблюдений использование ИФН альфа-2b в комплексном лечении пациентов с РМЖ способствовало увеличению продолжительности ремиссии, полученные нами данные могут свидетельствовать о неоднозначной роли экспрессии E-кадгерина. В свете же представлений о многоступенчатости метастатического процесса можно полагать, что адгезивная активность опухолевых клеток, маркером которых является экспрессия E-кадгерина, играет определяющую роль на начальном этапе метастазирования и инвазии [18]; на завершающем этапе — этапе экстравазации опухолевых клеток — снижение адгезивности может препятствовать прикреплению опухолевой клетки к сосудистому эндотелию.

ВЫВОДЫ

1. Включение ИФН альфа-2b в комплексные схемы лечения (неoadъювантная и адъювантная терапия) больных с РМЖ сопровождается увеличением средней продолжительности ремиссии на 24 мес и повышением 3-летней выживаемости — на 19,9%.

2. Показана способность ИФН модифицировать фенотип опухолевых клеток пациентов с РМЖ: цитокин оказывает ингибирующее влияние на экспрессию VEGF и на экспрессию одного из основных маркеров высокометастатического фенотипа опухолевых клеток Her2/neu.

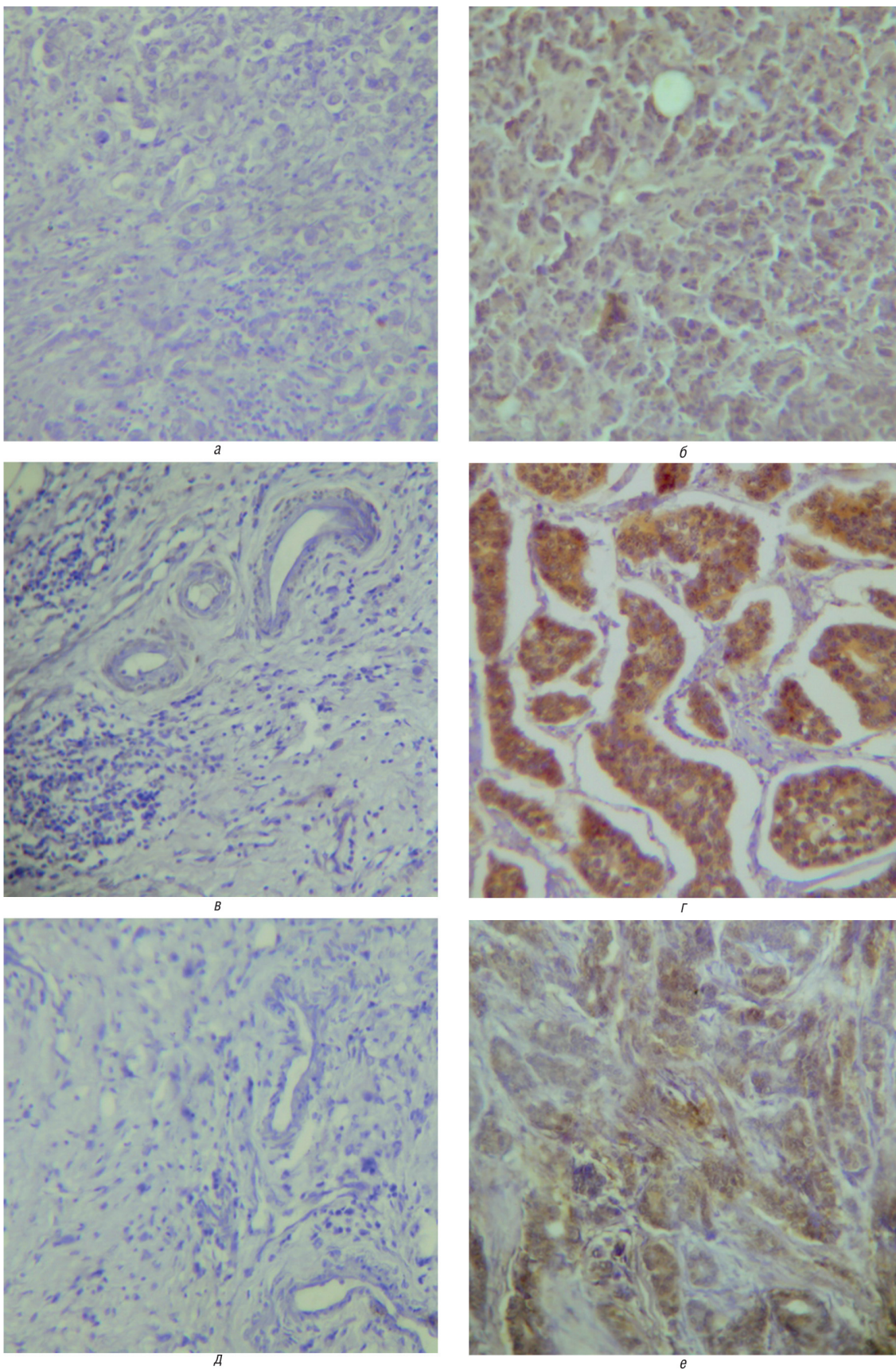


Рисунок. Влияние ИФН альфа-2b на экспрессию ряда прогностических маркеров в клетках РМЖ (гематоксилин ув. x 200): отсутствие экспрессии VEGF в опухолевых клетках больных основной группы, получавших ИФН (a); экспрессия VEGF в опухолевых клетках больных контрольной группы (б); экспрессия Her2/neu в опухолевых клетках основной (в) и контрольной (г) групп; экспрессия E-кадгерина в опухолевых клетках больных основной (д) и контрольной (е) групп

ЛИТЕРАТУРА

1. Weiss L. Principles of metastasis. London: Acad Press 1985. 425 p.
2. Балицкий КП, Воронцова АЛ, Лисняк ИА и др. Метастазирование опухолей. Патогенетические аспекты. К, Наукова думка 1991. 199 с.
3. Чехун ВФ. Функциональный онкоген — основа часної діагностики та нової стратегії протипухлинної терапії. Онкологія 2006; **8** (2): 96–101.
4. Воронцова АЛ, Кудрявец ЮИ, Жильчук ВЕ. Интерфероны и их применение в клинической онкологии. Здоровье женщины 2003; **4** (16): 8–13.
5. Gutterman JU. Cytokine therapeutic lessons from interferon alpha. Proc Nat Acad Sci USA 1994; (91): 1198–205.
6. Воронцова АЛ. Роль интерферона в противоопухолевой резистентности. Эксперим онкология 1989; **11** (6): 49–54.
7. Ровенский ЮА, Васильев ЮМ. Межклеточные контактные взаимодействия и их нарушения при неопластической трансформации. Канцерогенез. М, Научный Мир 2000: 278–83.
8. De Bouard S, Guillamo J, Christov C, *et al.* Antiangiogenic therapy against experimental glioblastoma using genetically engineered cells producing interferon- α , angiostatin, or endostatin. Hum Gene Ther 2003; **14** (9): 883–95.
9. Кудрявец ЮИ. Интерферон-альфа усиливает развитие апоптозу, индуцированного различными факторами в опухолевых клетках *in vitro*. Экспер онкол 2001; **23** (4): 267–73.
10. Лукьянова NYu, Kulik GI, Yurchenko OV, *et al.* Expression of p53 and bcl-2 proteins in epithelial ovarian carcinoma with different grade of differentiation. Exp oncol 2000; **22**: 91–5.
11. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat Med 1995; **1**: 27–31.
12. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. J Nat Cancer Inst 2002; **94**: 883–93.
13. Burstein P, Parker LM, Savoie J, *et al.* Phase I trial of the anti-VEGF antibody bevacizumab in combination with vinorelbine for refractory advanced breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2002; **76** (suppl): S115.
14. Ruohola T, Valve EM, Karkkainen M, *et al.* Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells. Mol Cell Endocrinol 1999; **149**: 29–40.
15. Konecny GE, Meng YG, Untch M, *et al.* Association between HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients. Clin Cancer Res 2004; **10** (5): 1706–16.
16. Pegram MD, Reese DM. Combined biological therapy of breast cancer using monoclonal antibodies directed against HER2/neu protein and vascular endothelial growth factor. Semin Oncol 2002; **29** (suppl): 29–37.
17. Madhavan M, Srinivas P, Abraham E, *et al.* Cadherins as predictive markers of nodal metastasis in breast cancer. Mod Pathol 2001; **14** (5): 423–7.
18. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D. Prognostic Factors in Breast Cancer. Arch Pathol Lab Med 2000; **124** (7): 966–78.

INTERFERON THERAPY IN COMBINED TREATMENT OF BREAST CANCER: ANTIMETASTATIC EFFECT AND PHENOTYPE MODIFICATION OF TUMOR CELLS

V.E. Zhilchuk, N.Y. Lukjanova, A.L. Vorontsova, Y.I. Kudrjavets, V.F. Chekhun

Summary. *The efficacy of interferon (IFN) as a modifier of the metastatic process is assessed in 557 breast cancer (BC) patients. It is shown that introduction of IFN in combined adjuvant and neoadjuvant therapy schemes is accompanied by a 24-month increase in the duration of remission and a 19.9% increase in the 3-year survival rate. IFN effects on tumor cells' phenotypic pattern which defines their metastatic capacity were assessed and it was shown that the cytokine inhibits the expression of vascular endothelium growth factor and Her2/neu, which is one of the main markers of a highly metastatic phenotype of tumor cells.*

Key Words: breast cancer, combined treatment, interferon alpha-2b, treatment efficacy, tumor cell phenotype.