

## ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ VEGF, HER-2/NEU И ЛЕЧЕБНОГО ПАТОМОРФОЗА ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ ОСТЕОСАРКОМой КОСТЕЙ КОНЕЧНОСТЕЙ

Статья посвящена обоснованию целесообразности применения в схемах лечения больных ОС кофеина как модулятора химиопрепаратов и исследованию прогностического значения уровня VEGF в крови и степени лечебного патоморфоза в опухоли.

Установлена достоверная корреляционная связь между уровнем VEGF, степенью лечебного патоморфоза и безрецидивной выживаемостью больных.

Доказано, что наибольшую информацию для оценки эффективности лечения больных ОС и прогноза заболевания можно получить на основании определения уровня VEGF в сыворотке крови, объема остаточной жизнеспособной опухолевой паренхимы после химиотерапии. Выявлена прямая корреляция между уровнем VEGF в крови у больных до лечения и частотой удаленного метастазирования ОС, а также между уровнем VEGF крови и объемом остаточной жизнеспособной опухолевой паренхимы. Таким образом уточнен и обоснованный индивидуальный подход к проведению адъювантной ПХТ по схеме высокого риска в данной категории пациентов.

**Ключевые слова:** остеосаркома, химиотерапия, VEGF, кофеин, объем остаточной жизнеспособной опухолевой паренхимы, прогноз течения заболевания.

### Введение

Остеогенная саркома (ОС) – злокачественная опухоль кости мезенхимальной природы, клетки которой продуцируют остеонид или патологическую незрелую костную ткань и характеризуется агрессивным клиническим течением.

Заболеваемость остеосаркомой в странах Европы составляет 0,3 случая на 100 тысяч населения, а смертность вследствие прогрессирования опухоли – 0,15 случаев на 100 тысяч населения. Пик заболеваемости ОС приходится на подростковый возраст с медианой 16 лет. В 65% случаев опухоль поражает конечности, другие локализации встречаются чаще в более старшем возрасте [1]. Заболеваемость злокачественными новообразованиями костей и суставных хрящей в Украине составляет 1,2 случая на 100 тысяч населения. Специальным лечением охвачено 63% больных, 38% не проживают одного года. Среди злокачественных новообразований костей и суставных хрящей составляет ОС 23-35% [2].

Основной метод лечения больных остеогенной саркомой в странах Европы, США, Японии, России – комбинированный (химиотерапия и

хирургическое вмешательство). Для уменьшения объема опухоли и профилактики рецидива больным проводят неоадъювантную полихимиотерапию (НПХТ) по схеме РА (цисплатин-доксорубицин), или РАМ (цисплатин-доксорубицин-метотрексат), затем – хирургическое лечение и адъювантную химиотерапию (АПХТ) [3,4,5]. Такие редкие формы сарком костей, как фибросаркома, злокачественная фиброзная гистиоцитома, мезенхимальная хондросаркома, ангиосаркома, злокачественная гигантоклеточная опухоль кости, отличаются агрессивным течением, склонностью к раннему быстрому гематогенному метастазированию и чувствительностью к химиотерапии. Поэтому лечение этих опухолей по современным схемам не отличается от схемы лечения ОС [6, 7, 8].

Пятилетняя выживаемость больных до применения химиотерапии при хирургическом лечении составляла 7-20%. В современных схемах лечения больных ОС показатели выживаемости улучшают путем применения цитостатиков. В течении последних 30-лет выявлены основные химиопрепараты к которым чувствительна ОС и их дозы (метотрексат, цисплатин, доксорубицин, ифосфамид) [7]. При комбинации химиотерапии и хирургического лечения пятилетняя выживаемость достигает 55-65%, а количество органосохраняющих операций – 90% [9, 10].

Однако дальнейшее улучшение результатов лечения поставило перед исследователями ряд новых задач. Дальнейшее повышение доз цитостатиков не привело к ожидаемому увеличению выживаемости больных. Одновременно повышается токсичность лечения, количество и тяжесть осложнений. Остается нерешенной проблема низкой выживаемости у 15-25% больных с плохим ответом на химиотерапию [7, 10]. В исследованиях показано, что объем остаточной жизнеспособной опухолевой ткани (ООЖОТ) после химиотерапии является достоверным признаком прогноза. Huvos A. (1982) прогнозирует плохое течение заболевания при остатке более 10% жизнеспособных клеток ОС после НПХТ. Некроз всей опухоли регистрируют лишь у 10-16% больных [9, 10, 11].

Также остро стоит проблема сохранения пораженной конечности, её функции, замещения больших дефектов кости после удаления при различной локализации, распространенности опухоли и необходимости продолжения химиотерапии. По данным исследователей 15-50% больным с данной патологией проводят ампутацию конечности, что значительно ухудшает качество их жизни [7, 10]. В связи с риском развития рецидива обсуждаются подходы к целесообразности выполнения органосохраняющих операций. Изучение качества жизни больных на фоне комбинированного лечения на наш взгляд должно расставить приоритеты в этом вопросе.

В единичных исследованиях на экспериментальной модели ОС продемонстрировано возможность увеличения количества индуцированных некрозов клеток опухоли после применения кофеина. Эффект кофеина состоит в подавлении репарации ДНК в опухолевых клетках, поврежденных химиопрепаратом [12]. В литературе имеются сообщения о достижении 100% некроза опухолевых клеток в небольшой группе больных ОС, получавших кофеин при проведении НПХТ. Авторы считают необходимым дальнейшее изучение ДНК-ингибирующего влияния кофеина при химиотерапии больных ОС [13].

Изучение влияния биологических факторов на течение опухолевого процесса может иметь теоретическое и практическое значение при разработке новых схем лечения и при контроле за его эффективностью. При ОС перспективны на наш взгляд исследования ингибиторов остеоскелета – бисфосфонатов [21, 22, 23], ингибиторов циклооксигеназы-2 [24], активация естественных киллерных клеток и макрофагов интерфероном, лечение с применением ингибиторов рецептора инсулинового фактора роста (IGF-1R) [25].

По данным литературы гиперэкспрессия Her-2/neu в клетках ОС свидетельствует о неблагоприятном течении заболевания и коррелирует с низкой продолжительностью жизни больных ОС [14, 15].

Некоторые исследователи повышение частоты метастазирования и скорости роста хондросаркомы [16], остеосаркомы [17, 18], саркомы Юинга [19] связывают с фактором роста эндотелия сосудов (VEGF). Оценка уровня VEGF в крови может дать новую, более точную информацию относительно прогноза метастазирования ОС [20]. Отдельные исследования VEGF свидетельствуют о повышении его концентрации в сыворотке крови больных ОС, но полученные результаты не всегда достоверны [19].

Таким образом, усовершенствование схемы комбинированного лечения больных ОС с индукцией НПХТ кофеином, коррекцией АПХТ в зависимости от уровня VEGF в сыворотке крови, лечебного патоморфоза и экспрессии Her-2/neu опухолевыми клетками, является актуальной задачей.

## Материалы и методы исследования

В работе проведен анализ историй болезни, амбулаторных карт, протоколов операций и патоморфологических заключений 62 больных на ОС II стадии (G3-4T1-2N0M0), находившихся на стационарном лечении в отделении онкоортопедии Национального института рака МЗ Украины в период с 1990 по 2008 годы. После верификации диагноза всем больным проводили полихимиотерапию и оперативное вмешательство в зависимости от распространенности опухоли – резекцию кости с замещением ее дефекта или ампутацию.

Контрольная группа насчитывала 30 больных, получивших внутриартериальную НПХТ по схеме РА: цисплатин – 120 мг/м<sup>2</sup> и доксорубицин – 70 мг/м<sup>2</sup>. Основная группа насчитывала 32 больных, получивших НПХТ по схеме РАС по усовершенствованной методике: цисплатин – 120 мг/м<sup>2</sup>, доксорубицин – 70 мг/м<sup>2</sup>, кофеин – 1 г/сут [26].

Хирургическое вмешательство всем больным проводили после 3-х курсов неоадьювантной ПХТ, адьювантную ПХТ больные получали по схеме РАМ: цисплатин – 150 мг/м<sup>2</sup> и доксорубицин – 90 мг/м<sup>2</sup>, метотрексат – 12 г/м<sup>2</sup>. Интервалы между курсами лечения составлял 3 недели [27].

Объем остаточной жизнеспособной опухолевой ткани (ООЖОТ), отражавший эффективность НПХТ, изучали в послеоперационном материале при увеличении микроскопа х 280 на 7-10 срезах препарата в 100 полях зрения с помощью окулярной тест-сетки Автандилова. Рассчитывали процент жизнеспособных опухолевых клеток среди всех опухолевых клеток. Полученный результат оценивали по четырем степеням лечебного патоморфоза, предложенные Huvos A.

Экспрессию белка Her-2/neu проводили с помощью иммуногистохимического метода на парафиновых срезах ткани ОС. Результаты иммуногистохимической реакции оценивали по наличию или отсутствию экспрессии Her-2/neu.

## Результаты и их обсуждение

**Изучение токсичности и эффективности усовершенствованной методики проведения курса НПХТ (цисплатин, доксорубицин, кофеин) у больных ОС.**

Введение кофеина вызывало у части больных побочные реакции в виде нарушения сна (12%),

повышение частоты сердцебиения (7%) и возбуждения (4%), которые соответствовали I-II степени токсичности и легко корректировались. Побочные реакции возникали при введении кофеина и исчезали в течение суток после введения. Осложнений или побочных реакций III-IV степени токсичности после введения кофеина, обусловивших бы приостановление проведения ПХТ, не наблюдалось.

Определение степени токсичности проводили согласно рекомендациям ВОЗ.

Токсичность ПХТ зависела от примененной схемы (цисплатин – доксорубин или цисплатин – доксорубин – метотрексат в высокой дозе) и количества курсов. IV степеней – 16,4±1,9%. Частота лейкопении III-IV степени в среднем по группам составила 17,5±1,2% в том числе, фебрильная нейтропения – 13,1±1,9%, тромбоцитопения III.

Токсические эффекты цитостатиков, отвечавших III-IV степени токсичности и требовали проведения интенсивного сопроводительного лечения, наблюдались у 16% больных основной и 13% контрольной групп. Вследствие осложнений у 13±3,5% больных такие реакции привели к увеличению интервалов между курсами ПХТ.

Клиническая эффективность НПХТ, определенная по критериям RECIST, у больных основной группы (РАС) составила 59,3±3,6%, а в контрольной группе (РА) – 46,2±4%, что на 13% меньше и подтверждает эффективность РАС (p < 0,05).

#### Морфологическое исследование влияния предоперационной химиотерапии на лечебный патоморфоз остеосарком

Оценку эффективности НПХТ проведено в операционном материале 61 больного морфологическим методом. Объем остаточной жизнеспособной опухолевой ткани (ООЖОТ) после НПХТ в основной группе (РАС) в среднем составил 6±2,4%, что существенно ниже, чем в контрольной (РА) – 28±8% (p < 0,05) и подтверждает эффективность применения кофеина. Такой эффект оценивали как выраженный гистологический ответ на НПХТ (таблица 1.).

Таблица 1.

#### ООЖОТ исследуемых групп больных ОС

ООЖОТ,%	ЛП (Huvos), степени	контрольная группа		основная группа	
		n	%	n	%
100-11%	I-I ст.	15	23	7	23
10-0/0%	III-IV ст./ IV ст.	15/2	77/14	24/4	77/14
Всего		30	100%	100%	100%

При оценке прогностического значения лечебного патоморфоза (ЛП) по Huvos среди всех

пациентов выявлено, что у 100% больных с I и у 79% со II степенью ЛП заболевание прогрессировало. Среди больных с III степенью ЛП заболевание прогрессировало только у 36%. При полном некрозе клеток опухоли (ООЖОТ = 0% или ЛП IV степени) рецидива не наблюдалось ни в одном случае (у 14% среди больных основной группы и 6,7% больных контрольной группы).

Взаимосвязь метастазирования и лечебного патоморфоза приведены в таблице 2.

Таблица 2.

#### Взаимосвязь метастазирования и лечебного патоморфоза

ООЖОТ,%	контрольная группа				основная группа			
	без метастазов		с метастазами		без метастазов		с метастазами	
	n	%	n	%	n	%	n	%
100-11%	1	3	14	47	3	11	4	14
10-0/0	13/2	43/7	2/0	7/0	12/4	39/14	11/0	36/0

При дальнейшем исследовании было обнаружено, что в основной группе наибольшая вероятность развития метастазов наблюдалась при условии, что ООЖОТ > 3,6% (медиана) ( $\chi^2 = 7,1$ , p < 0,01).

Количество органосохраняющих хирургических вмешательств зависело от вида примененной НПХТ и составила 90,6% в схеме РАС против 60,0% у больных, которым применялась схема РА. При этом частота местных рецидивов составила в основной группе 13±3,4%, а в контрольной группе на 20% больше (33±5,3%) (p < 0,05).

Таким образом, применение кофеина вместе с химиопрепаратами в основной группе в первую очередь уменьшило местное распространение ОС, что привело к увеличению количества больных прооперированных с сохранением конечности и соответственно к значительному улучшению функциональных результатов лечения и качества их жизни.

#### Изучение прогностического значения уровня VEGF и экспрессии Her-2/neu.

До лечения средний уровень VEGF в сыворотке крови всех исследуемых больных ОС II стадии составлял 113,2±64 pg/ml (норма 46,8 pg/ml). При значении среднего уровня VEGF крови до лечения в пределах 164-294 pg/ml у больных в период от 6 до 12 месяцев возникли метастазы ОС. При колебаниях VEGF к лечению в диапазоне 32-109 pg/ml метастазирования не наблюдалось. Снижение уровня VEGF после проведения ПХТ до 13-109 pg/ml свидетельствовало об угнетении опухолевого ангиогенеза под влиянием цитостатиков. При развитии метастазов среднее значение уровня VEGF в лечении достигало 228,6±65 pg/ml, после ПХТ – 41,3±28 pg/ml. У



больных без метастазов этот показатель оставался стабильным (до лечения –  $63,7 \pm 32$ , после –  $77,4 \pm 31$  pg/ml).

В динамике наблюдения в течение первого года лечения уровень VEGF у больных без метастазов держался на уровне  $65 \pm 32$  pg/ml. При развитии метастазов после лечения у больных также наблюдалось значительное повышение уровня VEGF в крови от исходного до  $174 \pm 65$  pg/ml, начиная с  $9 \pm 3$  мес. после начала лечения. Проанализирована взаимосвязь между уровнем VEGF в крови и ООЖОТ. При сопоставлении данных иммуноферментного анализа и морфометрии было установлено, что чем выше уровень VEGF, тем больше значение ООЖОТ, независимо от применяемой НПХТ.

Таким образом, обнаружены корреляции между уровнем VEGF в крови у больных до лечения и частотой отдаленного метастазирования ОС, а также между уровнем VEGF в крови и ООЖОТ. При исходном уровне VEGF в крови  $164-294$  pg/ml у больных ОС II стадии повышается риск развития метастазов в 3 или более раз ( $\chi^2 = 8,1$ ,  $p < 0,01$ ) и возможно будет в 1,8 раза меньше процент некрозов клеток опухоли ( $\chi^2 = 2,8$ ,  $p < 0,01$ ). Чувствительность данной методики составила 100%, специфичность – 85,5%, что свидетельствует о высокой точности и информативности данной методики в прогнозировании метастатического процесса у больных ОС.

Определение экспрессии Her-2/neu проводили иммуногистохимическим методом с помощью моноклональных антител к белку Her-2/neu в препаратах первичной биопсии и послеоперационного материала. Среди больных с положительной экспрессией Her-2/neu в 21% случаев отмечено появление метастазов, а у 6% – их отсутствие. У пациентов, опухолевые клетки которых не экспрессировали Her-2/neu, метастазы развились в 28% случаев, тогда как у 45% больных не установлено их появление. Таким образом, четкой зависимости между экспрессией Her-2/neu опухолевыми клетками у больных ОС и клиническим течением заболевания не выявлено.

#### **Ближайшие и отдаленные результаты лечения, их анализ**

Основными осложнениями у больных в позднем послеоперационном периоде были: воспаление серомы –  $6,5 \pm 0,1\%$ , перелом эндопротеза –  $3,2 \pm 2,5\%$ , некроз кожного лоскута –  $1,6 \pm 0,7\%$ , нарушение функции почек –  $1,6 \pm 0,7\%$ , перелом аутоотрансплантата –  $1,6 \pm 0,7\%$ . Для устранения осложнений придерживались следующей схемы: выполняли ревизию очага воспаления с наложением диализа послеоперационной раны и анти-

бактериальной терапией; при неэффективности эндопротез удаляли и устанавливали провизорный временный имплантат с последующим реэндопротезированием. Для профилактики асептического расшатывания использовали бисфосфонаты в средней терапевтической дозе в течение 3-х мес.

Применение НПХТ в основной группе (РАС) на – 28% увеличило количество органосохраняющих хирургических вмешательств по сравнению с контрольной группой (РА) ( $p < 0,05$ ). Количество местных рецидивов после органосохраняющих операций в основной группе было меньше контрольной на 23% ( $p < 0,05$ ). Общее количество рецидивов также было меньше на 20% ( $p < 0,05$ ). Метастазы ОС в основной группе обнаружены у 11 больных (34,3%), а у больных контрольной группы – у 14 (46,6%) ( $p < 0,05$ ). Среди больных основной группы от прогрессирования ОС умерли 9 (28,1%) больных, а в контрольной группе – 13 (43,3%) больных. В результате проведенного усовершенствованного лечения больных основной группы общая трехлетняя выживаемость составила  $69,4 \pm 1,4\%$ . У больных контрольной группы трехлетняя выживаемость составила  $57,1 \pm 1,3\%$  ( $p < 0,05$ ). Безрецидивная трехлетняя выживаемость больных основной группы составила  $62,0 \pm 2,2\%$ , а больных контрольной группы –  $40,1 \pm 2,1\%$  ( $p < 0,05$ ).

#### **Выводы**

1. Изучение токсичности НПХТ показало умеренное количество осложнений ПХТ в основной – 16% и контрольной группе – 13%. Введение кофеина у 12% больных вызывало побочные реакции I-II ст. токсичности, которые не приводили к осложнениям и не требовали коррекции лечения.
2. Клиническая эффективность НПХТ по RECIST в основной группе ( $59,3 \pm 3,6\%$ ) и контрольной группе ( $46,2 \pm 4,0\%$ ) ( $p < 0,05$ ) позволила выполнить в 90,6% и в 63% случаев, соответственно, органосохраняющие операции.
3. В результате исследования с высокой степенью вероятности доказано, что уровень ООЖОТ выше 3,6% ( $s^2=7,1$ ,  $p < 0,01$ ) и первичный уровень VEGF в сыворотке крови в 3,5 и более раз выше нормы ( $s^2=8,1$ ,  $p < 0,01$ ) у больных ОС II стадии значительно повышают риск метастазирования и могут служить в качестве независимых факторов прогноза течения заболевания. Четкой зависимости между экспрессией Her-2/neu опухолевыми клетками у больных ОС и клиническим течением заболевания не выявлено.
4. Усовершенствованное комбинированное лечение больных основной группы путем при-

менення в НПХТ кофеїна і проведення АПХТ залежності від рівня ООЖОТ і рівня VEGF в крові дозволило збільшити трьохлітню загальну виживаемість на  $12,1 \pm 6,4\%$  і трьохлітню безрецидивну виживаемість на  $18,8 \pm 7,8\%$  порівняно з контрольною групою хворих ( $p < 0,05$ ).

## Література

1. Заболотько В.М. Онкологія : клінічні протоколи надання медичної допомоги / ред. В.М. Заболотько ; МОЗ України. — К. : МНІАЦ медичної статистики МВЦ Медінформ, 2007. — 144 с.
2. Застосування в комбінованому лікуванні хворих на саркому кісток хіміотерапії у високій дозі. / А.Г. Дедков, Г.І. Климнюк, В.С. Чорний, Т.О. Тарасова // інформ. лист. — К., — 2009. — 6 с.
3. Кушлинський Н.Е. Фактор росту ендотелію судин і ангиогенін в сироватці крові хворих на остеосаркому і опухоль Юінга / Н.Е. Кушлинський, І.В. Бабкіна, Ю.Н. Солов'єв // Бюл. експер. біол. і медицини. — 2003. — Т. 130, № 7. — С 92-94.
4. Трапезников Н.Н. Современные взгляды на проблему лечения остеосаркомы конечностей / Н.Н. Трапезников, М.Д. Алиев, Г.Н. Мачак [и др.] // Казан. мед. журн. — 2000. — Т. 81, № 4. — С. 317-318.
5. Федоренко З.П. Рак в Україні, 2008-2009. Захворюваність смертність, показники діяльності онкологічної служби / З.П. Федоренко, А.В. Гайсенко, Л.О. Гулак [та інш.] // — К., 2010. — № 11. — 111 с.
6. Применение кофеина в комбинированном лечении больных остеосаркомой/ В.С. Чёрный, А.А. Бурьянов, Т.А. Тарасова, В.В. Проценко// Літопис травматології та ортопедії. — 2011. — № 1-2. — С.102-105.
7. Чорний В.С. Оптимізація комбінованого лікування хворих на остеосаркому : автореф. дис... канд. мед. наук : 14.01.07/ Чорний В.С.; ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. — К., 2011. — 20 с.
8. Патент на корисну модель UA, 7МПК G01N 33/50. Спосіб прогнозу раннього метастазування остеогенної саркоми / В.С. Чорний, С.І. Корвін, О.М. Новак, Л.Г. Югрінова, А.Г. Дедков, О.Г. Югрінов; ДУ "Національний інститут раку". — № 44239; заявл. 23.04.09; опубл. 25.09.09., Бюл. 18.

Повний список літератури знаходиться в редакції

## Резюме

Чорний В.С., Бур'янов А.А., Тарасова Т.А., Проценко В.В.

### Прогностичне значення VEGF, Her-2/неу та лікувального патоморфозу для оптимізації комбінованого лікування хворих на остеосаркому кісток кінцівок

Статтю присвячено обґрунтуванню доцільності застосування у схемах лікування хворих на ОС кофеїну, як модулятора хіміопрепаратів, та дослідженню прогностичного значення рівня VEGF у крові та ступеня лікувального патоморфозу в пухлині.

Встановлено достовірний кореляційний зв'язок між рівнем VEGF, ступенем лікувального патоморфозу та безрецидивною виживаністю хворих.

Доведено, що найбільшу інформацію для оцінки ефективності лікування хворих на ОС та прогнозу захворювання можна отримати на підставі визначення рівня VEGF в сироватці крові, обсягу залишкової життєздатної пухлинної паренхіми після хіміотерапії.

Виявлена пряма кореляція між рівнем VEGF в крові у хворих до лікування і частотою віддаленого метастазування ОС, а також між рівнем VEGF крові і обсягом залишкової життєздатної пухлинної паренхіми. Таким чином уточнений і обґрунтований індивідуальний підхід до проведення ад'ювантної ПХТ по схемі високого ризику у даній категорії пацієнтів.

**Ключові слова:** остеосаркома, хіміотерапія, VEGF, кофеїн, обсяг залишкової життєздатної пухлинної паренхіми, прогноз перебігу захворювання.

## Resume

Chyornyj V.S., Burjanov A.A., Tarasova T.A., Konovalenko V.F., Protsenko V.V.

Article is devoted to study the feasibility of application in the treatment of OS patients of caffeine as a modulator of cytostatics and determined the prognostic value of serum VEGF, the degree of therapeutic pathomorphosis in the tumor

A correlation between the level of VEGF, therapeutic pathomorphosis and survival was determined.

Indications and contraindications for limb-preserving and radical operations in accordance with tumor spreading chemotherapy efficacy and other features of disease were systematized and clarified. Also, for each tumor in different parts of the tubular bones of the upper and lower limbs list of methods of surgical treatment, the resection of the affected bone with replacement of bone defect endoprosthesis, autotransplantation with or without replacement of the defect was proposed. Their characteristics and indications for use were given.

The study has proven that the evaluation of the effectiveness of treatment of OS and prognosis can be made by identifying primary level of serum VEGF and the degree of therapeutic pathomorphosis of tumor after chemotherapy. The positive correlation between serum VEGF level in patients before treatment and frequency of OS metastasis, and between serum VEGF levels and the amount of residual viable tumor parenchyma was observed. Individualized approach to use the adjuvant chemotherapy by the scheme of high-risk for patients of this category was corrected and specified.

**Keywords:** human osteosarcoma, chemotherapy, VEGF, caffeine, amount of residual viable tumor parenchyma, prognosis of the disease.