

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

УДК 616.37-006.6-07-08:577.23

ШПАДАРУК
Екатерина Михайловна

**ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ
МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ
ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ЛЕЧЕНИИ
(С ПРИМЕНЕНИЕМ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ)
РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальностям 03.01.01 – радиобиология
03.01.07 – молекулярная генетика

Минск, 2018

Научная работа выполнена в учреждении образования «Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова» БГУ

Научный руководитель— **Смолякова Раиса Михайловна**,
доктор биологических наук, доцент,
заведующая кафедрой общей экологии,
биологии и экологической генетики
УО «Международный государственный
экологический институт имени А.Д. Сахарова» БГУ

Официальные оппоненты: **Грицук Александр Иванович**,
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой общей,
биоорганической и биологической химии
УО «Гомельский государственный
медицинский университет»

Дромашко Сергей Евгеньевич,
доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией
моделирования генетических процессов
ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

Оппонирующая организация — Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр
радиационной медицины и экологии человека»

Защита диссертации состоится 14 марта 2018 г. в 14.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 02.01.22 при Белорусском государственном университете по адресу: 220030, г. Минск, ул. Ленинградская, 8, юридический факультет, ауд. 407.

Телефон ученого секретаря: +375172095558, e-mail: nlyukha@mail.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Белорусского государственного университета

Автореферат разослан « » февраля 2018 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций,
кандидат технических наук

Н.А. Лысухо

ВВЕДЕНИЕ

Рак поджелудочной железы (РПЖ) занимает четвертое место в мире в структуре смертности с 5-летней выживаемостью около 5% (Hashimoto D. et al., 2014; Камарли, З.П., Туманбаев А.М., Доолотбеков С.М., 2013). Это объясняется трудностями своевременной диагностики РПЖ, а также скрытым, но при этом агрессивным его течением и высокой резистентностью к современным специальным методам лечения.

Степень злокачественности опухоли и распространенность опухолевого процесса имеют первостепенное значение для правильного выбора тактики лечения пациентов онкологического профиля. Окончательно стадировать опухолевый процесс представляется возможным только после оперативного вмешательства, поэтому в последнее время учеными проводятся активные поиски информативных малоинвазивных лабораторных тестов, которые позволяют оценить распространенность и злокачественный потенциал опухоли на дооперационном этапе (Katanyool K. et al., 2011; Biankin A.V. et al., 2012; Bluff J.E. et al., 2008).

Прогресс в молекулярной биологии в последние десятилетия позволил уверенно утверждать, что в основе развития РПЖ лежат генетические механизмы (H. Ying et al., 2016; Naugk B., 2010). Очевидно, что для повышения эффективности диагностики и лечения необходимо более глубокое понимание патофизиологических изменений, происходящих при раке поджелудочной железы на молекулярном уровне (Chang Z. et al., 2013).

По данным ряда авторов, применение лучевой терапии обеспечивает местнорегионарный контроль роста опухоли и увеличивает продолжительность жизни пациентов. Современная химиотерапия позволяет увеличить показатели выживаемости, а в сочетании с лучевым воздействием эффективно замедляет прогрессирование опухоли у пациентов, обеспечивая профилактику отдаленных метастазов (Chuong M.D. et al., 2013; Binmoeller K.F., 2013).

Применяемые в клинической практике протоколы радиотерапии не учитывают индивидуальную радиочувствительность онкопациентов. В связи с тем, что индивидуальная радиочувствительность может варьировать в широких пределах, то и выраженность терапевтического эффекта лучевой терапии может иметь весьма переменный характер.

В целом, сочетание молекулярно-биологических характеристик рака поджелудочной железы с оценкой индивидуальной радиочувствительности пациентов может обеспечить более глубокое понимание влияния лучевого воздействия на малигнизированную ткань поджелудочной железы и позволит повысить эффективность проводимого лечения.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами. Диссертационная работа выполнялась на базе учреждения образования «Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова» Белорусского государственного университета в рамках ГНТП: «Новые технологии диагностики и лечения» подпрограммы «Онкология», задание 02.08 «Разработать молекулярно-биологический метод определения фенотипа аденокарцином поджелудочной железы с целью диагностики и индивидуализации программ комплексного лечения пациентов» (№ государственной регистрации 20091405, сроки выполнения 2009–2012 гг.).

Диссертационная работа соответствует приоритетному направлению фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2011–2015 годы, отраженному в пункте 4.2 «Новые технологии профилактики, диагностики, лечения и реабилитации сердечно-сосудистых, онкологических и других социально значимых заболеваний» постановления Совета Министров Республики Беларусь «Об утверждении перечня приоритетных направлений фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь» от 19 апреля 2010 года № 585.

Цель и задачи исследования. *Цель исследования:* повысить эффективность диагностики и прогнозирования течения заболевания при раке поджелудочной железы на основе комплексного определения молекулярно-биологических маркеров и показателей радиочувствительности пациентов для индивидуализации лечебной тактики.

Для достижения настоящей цели поставлены следующие **задачи:**

1. Выявить по изменению содержания отдельных диагностически значимых форменных элементов периферической крови и показателям интегральных индексов интоксикации влияние радиационного воздействия на опухолевую ткань поджелудочной железы.

2. Определить основные фенотипы аденокарцином поджелудочной железы для оценки инвазивного потенциала, индивидуализации тактики лечения и прогнозирования течения заболевания.

3. Оценить диагностическую и прогностическую значимость выявления генных нарушений при раке поджелудочной железы, а также диссеминации опухолевых клеток по экспрессии цитокератина 19.

4. Установить взаимосвязь уровня экспрессии молекулярно-биологических маркеров с чувствительностью опухоли к радиационному воздействию, эффективностью комбинированного лечения и общей выживаемостью пациентов.

Объект исследования: ткань поджелудочной железы и клинические данные о 130 пациентах, страдающих раком поджелудочной железы, и 33 пациентах с хроническим панкреатитом, получавших специальное лечение РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова в 2005–2014 гг.

Предмет исследования: показатели клеточной реактивности гомеостаза, молекулярно-биологические маркеры аденокарциномы поджелудочной железы, прогностические факторы, бессобытийная и общая выживаемость пациентов.

Научная новизна. Впервые полученные данные показывают, что динамика интегральных показателей клеточного гомеостаза (лейкоцитарного индекса интоксикации (ЛИИ) по Я.Я. Кальф-Калифу, индекса сдвига лейкоцитов (ИСЛ), индекса соотношения нейтрофилов и лимфоцитов (ИСНЛ), индекса соотношения лимфоцитов и моноцитов (ИСЛМ)) при раке поджелудочной железы может быть использована для оценки индивидуальной радиочувствительности пациентов.

Определены агрессивные фенотипы аденокарцином поджелудочной железы по уровням экспрессии молекулярно-биологических тканевых антигенов, позволяющие прогнозировать течение заболевания.

Полиморфизм в 508 и 513 кодонах гена *DPC4* у пациентов, страдающих раком поджелудочной железы, ассоциирован с высоким риском развития рецидива заболевания в первые 6–8 мес. после радикального лечения.

Впервые разработан метод выявления диссеминации опухолевого процесса по определению диссеминированных опухолевых клеток в лимфатических узлах и периферической крови при раке поджелудочной железы методом полимеразной цепной реакции.

Разработанный комплекс молекулярно-биологических показателей характеризует радиоустойчивость пациентов и может быть использован для индивидуализации радиационного воздействия.

Положения, выносимые на защиту:

1. В процессе проведения лучевой терапии динамика содержания в крови тромбоцитов, лейкоцитов, субпопуляций нейтрофилов и лимфоцитов зависит от радиочувствительности пациентов, страдающих раком поджелудочной железы. У пациентов, чувствительных к радиотерапии, наблюдается высокий уровень ЛИИ по Кальф-Калифу (2,75 отн. ед.), ИСЛ (8,73 отн. ед.), ИСНЛ (26,75 отн. ед.) и низкий уровень ИСЛМ (0,60 отн. ед.) в сравнении с исходными данными и здоровыми лицами ($p < 0,05$). У пациентов, устойчивых к лучевой терапии, уровень интегральных показателей в крови изменяется незначительно или остается на прежнем уровне ($p > 0,05$).

2. Агрессивный потенциал аденокарцином поджелудочной железы характеризуется фенотипической гетерогенностью, обусловленной

повышенными уровнями экспрессии тканевых антигенов p53 (score 4-6 баллов, $\geq 30\%$), Ki-67 ($\geq 30\%$), Her-2/neu (score 2–3 балла), EGFR (score 2-3 балла), VEGF (score 4–6 баллов, $\geq 25\%$), Vim (score 4–6 баллов, $\geq 25\%$), CK-7 – (score 4–6 баллов, $\geq 25\%$), CK-19 (score 4–6 баллов, $\geq 25\%$), NSE (score 4–6 баллов, $\geq 25\%$) и снижением экспрессии E-кадгерина (score 0–1 балл, $\leq 24\%$). Высокие уровни экспрессии тканевых маркеров p53, Ki-67, Her-2/neu, EGFR, VEGF, Vim, CK-7, CK-19, NSE и низкий уровень E-кадгерина связаны с распространенностью опухолевого процесса, степенью дифференцировки опухоли и общей выживаемостью пациентов, страдающих раком поджелудочной железы. Выявлена связь низких показателей общей выживаемости с фенотипом аденокарцином поджелудочной железы.

3. Молекулярно-генетический метод определения мутаций в гене K-ras позволяет диагностировать рак поджелудочной железы с диагностической чувствительностью 87,6%, специфичностью – 97,8%, эффективностью – 92,7%. Выявление гиперметилирования промоторного участка гена p16INK4A при раке поджелудочной железы обладает высокой диагностической значимостью (ДЧ=88,3%, ДС=98,1%, ДЭ=93,7%).

Прогностическим фактором риска раннего развития рецидива заболевания (в течение 6–8 месяцев после лечения) являются мутации в 508 и 513 кодонах гена DPC4 у пациентов, страдающих раком поджелудочной железы.

Разработанный метод выявления диссеминированных опухолевых клеток по экспрессии CK-19 с помощью ОТ-ПЦР позволяет диагностировать микрометастазы в регионарных лимфатических узлах при N0 у 73% пациентов, а при N1 – у 100% ($p < 0,05$). Наиболее информативным для прогнозирования течения заболевания у пациентов, страдающих РПЖ, является определение диссеминированных опухолевых клеток в интактных лимфатических узлах и периферической крови, что позволяет индивидуализировать тактику лечения с применением более интенсивных методов воздействия.

4. Низкий уровень экспрессии мутантного онкопротеина p53 после проведенного комбинированного лечения с использованием предоперационного радиационного воздействия в суммарной очаговой дозе 28 Гр на фоне химиотерапии и в послеоперационном периоде в суммарной очаговой дозе 40 Гр связан с общей выживаемостью пациентов, страдающих раком поджелудочной железы. Применение оценки экспрессии мутантного онкосупрессора p53 позволяет повысить эффективность прогнозирования течения заболевания в сравнении с клинической оценкой на 59,7%.

Личный вклад соискателя. Лично автором выполнен аналитический обзор литературы по теме диссертации; проведены молекулярно-генетические исследования – личный вклад диссертанта 90%. С использованием

иммуногистохимического анализа выполнено определение экспрессии белков EGFR, VEGF, Ki-67, p53, HER-2/neu, Vim, NSE, E-кадгерина, СК-7, СК-19 (личное участие 85%), оценка уровней экспрессии антигенов осуществлялась совместно с врачом-патологоанатомом к.м.н. М.А. Возмитель. Автором создана компьютерная база данных, проведена статистическая обработка с использованием методов непараметрической статистики, проведены анализ и интерпретация полученных результатов. Определение прогностических факторов, выявление корреляционных связей между молекулярно-биологическими параметрами проведено лично автором. Полученные результаты обсуждены совместно с научным руководителем доктором биологических наук, доцентом Р.М. Смоляковой и представлены в рецензируемых журналах, а также изложены в совместных статьях, тезисах докладов и материалах конференций.

Апробация результатов диссертации и информация об использовании ее результатов. Основные результаты диссертации доложены и обсуждены на конференциях республиканского и международного значения: научной сессии БГМУ (Минск, Беларусь, 2013, 2014), международной научной конференции «Сахаровские чтения: экологические проблемы XXI века» (Минск, 2012, 2013, 2014), 7-ом съезде онкологов и радиологов стран СНГ (Астана, 2012), III международной научно-практической конференции: Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине (Казань, 2012), Республиканской научно-практической конференции с международным участием: «Актуальные вопросы диагностики и лечения онкологических заболеваний», (Минск, 2013), Республиканской научно-практической конференции, посвященной 40-летию кафедры онкологии (Минск, 2014), I-ой международной научно-практической конференции «Биотехнология: достижения и перспективы развития (Пинск, 2014).

Опубликованность результатов диссертации. По теме диссертации опубликовано 18 научных работ, в том числе: 4 статьи в рецензируемых научных журналах из перечня ВАК Беларуси (1,44 авт. листа), 11 статей в сборниках научных трудов и в сборниках материалов научных конференций, 1 инструкция по применению, утвержденная Министерством здравоохранения Республики Беларусь, 1 рационализаторское предложение Республики Беларусь, 1 патент.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, 4 глав, заключения, библиографического списка, включающего 136 использованных источников (из них 39 – на русском языке), и 18 собственных публикаций, занимающего 14 страниц. Работа изложена на 122 страницах, содержит 22 таблицы и 79 рисунков, 3 приложения, занимающих 10 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

При анализе степени распространенности опухолевого процесса у пациентов с РПЖ выявлена I ст. у 3,1%, II ст. – 39,2%, III ст. – у 22,3%, IV ст. – у 35,4%. Средний возраст пациентов составил $61,4 \pm 11,3$ года. Радикальная резекция поджелудочной железы проведена 33 (25,4%) пациентам, паллиативное оперативное вмешательство – в 76 (58,5%) случаях. Лучевая терапия выполнена 77 (59,2%) пациентам, химиотерапевтическое лечение – 32 (24,6%).

Средний возраст пациентов с панкреатитом составил $53,0 \pm 10,3$ года. В анализируемой группе пациентов преобладал (49%) хронический индуративный панкреатит.

Определение экспрессии тканевых антигенов (p53, Ki-67, Her-2/neu, EGFR, VEGF, Vim, СК-7, СК-19, Е-кадгерина, NSE) у пациентов с РПЖ проводилось иммуногистохимическим методом с использованием антител (ДАКО, Дания) (Гуревич Л.Е., 2003; Ansari D. et al., 2011). Пересмотр гистологических препаратов и оценка иммуногистохимического окрашивания производилась одним патологоанатомом.

Методом селективной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с рестрикцией эндонуклеазой BstNI проведен анализ точечных мутаций в первом и втором основании 12-го кодона 1-го экзона гена K-ras.

Выявление гиперметилирования промоторного участка гена p16 у пациентов с РПЖ и хроническим панкреатитом осуществлялось методом ПЦР с бисульфитной конверсией с использованием набора «Qiagen Bisulfite Kit» (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией.

Определение мутаций в 11 экзоне гена DPC4 (Smad4) проводилось методом ПЦР с последующим секвенированием. Анализ результатов выполнен с помощью программного обеспечения «Sueqence Analysis».

Определение экспрессии гена СК-19 в лимфатических узлах и периферической крови у пациентов с РПЖ выполнено методом ПЦР с обратной транскрипцией.

Оценка уровня экспрессии гена MDR1 в опухолевой ткани пациентов проводилась методом ПЦР в режиме реального времени.

Гематологические показатели у пациентов с РПЖ определялись на анализаторе Hemasomr 10 «SEAC» (Франция). По данным лейкограммы рассчитывались интегральные показатели клеточной реактивности: (ЛИИ, ИСЛ, ИСНЛ, ИСЛМ (Сакович А.Р., 2014; Смолякова, Р.М. и др., 2005).

Оценка нормальности распределения параметров проводилась с использованием критерия Shapiro-Wilk's. Достоверность различий оценивали

по критерию Mann-Whitney (U-test). Меры связи между анализируемыми показателями определяли по величине коэффициентов корреляции Spearman (R). Различия в категориальных переменных были проанализированы посредством критерия χ^2 Мак-Немар (χ^2 -test). При сравнительном анализе динамических процессов использовался тест Фридмана. Для расчета выживаемости использовался метод Каплан-Майера. Критическим значением уровня значимости считали $p \leq 0,05$.

Для оценки диагностической значимости выявления РПЖ рассчитывали диагностическую чувствительность (ДЧ), диагностическую специфичность (ДС), диагностическую эффективность (ДЭ).

Результаты собственных исследований

Оценка показателей периферической крови при комбинированном лечении пациентов, страдающих раком поджелудочной железы. Неoadьювантная терапия проводилась 11 (8,5%) пациентам по схеме: предоперационная лучевая терапия + хирургическое лечение + послеоперационная лучевая терапия на фоне цитостатической терапии. Адьювантное лечение получили 54,6% пациентов с РПЖ по схеме: хирургическое лечение + послеоперационная терапия. У 50,8% (66) пациентов с РПЖ выполнена послеоперационная лучевая терапия. Суммарная очаговая доза облучения (СОД) варьировала в пределах от 18 до 90 Гр. Паллиативное лечение РПЖ проведено у 82 (63,1%) пациентов.

Используя методы цитологической дозиметрии (Пяткин Е.К., Баранов А.Е., 1980; Мельнов С.Б., 2002; Lassmann M. et al., 2011), проведен анализ динамики некоторых клеточных популяций крови с учетом вида проведенного лечения пациентам с РПЖ.

Анализ данных пациентов, получавших лучевую терапию, выявил снижение количества тромбоцитов с $285,7 \pm 34,3 \times 10^9/\text{л}$ до $208,9 \pm 29,6 \times 10^9/\text{л}$ в процессе лечения. В группе пациентов на 1-е сутки после хирургического лечения уровень тромбоцитов ($375,7 \pm 52,8 \times 10^9/\text{л}$) превышал таковой у пациентов после лучевой терапии ($208,9 \pm 29,6 \times 10^9/\text{л}$) в 1,8 раза ($p < 0,05$). При индивидуализированном анализе данных динамики популяции тромбоцитов у пациентов, получавших лучевую терапию, выявлена группа чувствительных пациентов (группа 1) – 37%, у которых снижение количества тромбоцитов наступило в ходе проведения радиотерапии (таблица 1) и группа 2, у которых данной тенденции не выявлено. На 0-е и 1-е сутки после окончания лучевой терапии между 1-й и 2-й группой пациентов выявлены статистически значимые различия ($p < 0,05$).

Таблица 1. – Динамика показателей крови у пациентов с РПЖ в процессе лучевой терапии

Показатели крови	норма	исходные значения	Группа (1) пациентов с выраженной динамикой ($p_{\text{Фридман}} < 0,05$)			Группа (2) пациентов без значимой динамики ($p_{\text{Фридман}} > 0,05$)		
			0-е сутки	1-е сутки	7-е сутки	0-е сутки	1-е сутки	7-е сутки
тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	180–320	285,7 \pm 34,3	159,3 \pm 38,3	156,1 \pm 21,6	160,2 \pm 29,8	310,5 \pm 47,6	239,7 \pm 58,7	257,7 \pm 34,2
лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	4–9	7,2 \pm 0,4	3,5 \pm 0,7	5,0 \pm 1,4	5,2 \pm 0,9	7,2 \pm 1,7	8,5 \pm 1,9	9,2 \pm 2,3
лимфоциты, %	19–37	27,3 \pm 4,8	12,5 \pm 2,8	5,4 \pm 1,6	6,6 \pm 2,2	19,3 \pm 3,7	9,0 \pm 1,8	14,1 \pm 2,4
нейтрофилы, %	47–72	61,6 \pm 3,5	72,6 \pm 5,2	85,2 \pm 2,8	76,2 \pm 4,9	67,0 \pm 7,2	74,9 \pm 3,6	71,6 \pm 5,3

В группе пациентов после хирургического вмешательства выявлено повышение уровня лейкоцитов в крови с $7,2\pm 1,4 \times 10^9/\text{л}$ до $9,3\pm 1,9 \times 10^9/\text{л}$ ($p < 0,05$). Проведение лучевой терапии в данной группе пациентов не влияло на уровень лейкоцитов. При сравнительном анализе содержания лейкоцитов на 1-е сутки после окончания лечения установлены статистически значимые различия ($p < 0,05$) в группах пациентов, подвергнутых радиотерапии и хирургическому лечению. При индивидуализированном анализе данных (таблица 1) у 32% пациентов выявлена более высокая чувствительность к радиационным воздействиям (1 группа), что явно отражалось на общем содержании лейкоцитов во время проведения лучевой терапии ($p < 0,05$) по сравнению с пациентами второй группы.

Относительное количество лимфоцитов у пациентов с РПЖ до начала лечения находилось в пределах нормы, на 1-е сутки после проведения адъювантной лучевой терапии их уровень понизился (с $27,3\pm 5,7$ до $5,9\pm 5,2\%$) в 4,7 раза ($p < 0,05$) по сравнению с данным показателем у пациентов без радиационного воздействия – понижение (с $20,3\pm 3,5$ до $16,2\pm 2,7\%$) в 1,3 раза. В результате индивидуального анализа данных относительного количества лимфоцитов в процессе проведения радиотерапии (таблица 1) между группой радиочувствительных и устойчивых пациентов на 1-е и 7-е сутки после окончания лучевой терапии выявлены значимые различия ($p < 0,05$).

В ходе исследования установлено, что на 1-е сутки после окончания лечения в группе пациентов, получавших послеоперационное радиационное воздействие, отмечено увеличение относительного количества нейтрофилов ($83,5\pm 1,3\%$) по отношению к данным до лечения ($61,6\pm 3,5\%$). В группе пациентов без лучевой терапии количество нейтрофилов возросло

незначительно ($71,2 \pm 1,8\%$) по отношению к исходному уровню ($67,1 \pm 1,5\%$). Между двумя анализируемыми группами на 1-е сутки после окончания лечения установлены статистически значимые различия ($p < 0,05$). Результаты проведенных исследований показали (таблица 1) статистически значимые различия в содержании нейтрофилов между чувствительной и устойчивой группами пациентов на 1-е сутки после окончания лучевой терапии ($p < 0,05$).

Оценка изменения гемограммы выявила увеличение (с $0,77 \pm 0,25$ до $2,47 \pm 0,32$ отн. ед.) в 3,2 раза параметра тканевой деградациии лейкоцитарного индекса по Кальф-Калифу на 1-е сутки после проведения лучевой терапии, что отражает индивидуальную радиочувствительность пациентов с РПЖ ($p < 0,05$). У пациентов, не получавших лучевой терапии, после завершения лечения данный показатель повышен (с $0,80 \pm 0,67$ до $1,8 \pm 1,29$ отн. ед.) в 2,3 раза по отношению к исходным значениям. В группе пациентов, получавших лучевую терапию, по реализации эффекта радиотерапии и динамике показателя ЛИИ выделены 2 подгруппы: пациенты со слабо выраженной динамикой показателя на 1-е сутки после окончания лучевой терапии (группа 2) в 1,8 раза и группа 1, для которой характерно выраженное увеличение значений данного показателя ($p < 0,05$) в 3,6 раза (таблица 2).

Таблица 2. – Динамика интегральных индексов гомеостаза у пациентов с РПЖ в процессе лучевой терапии

Показатель, отн. ед.	норма	исходные значения	Группа (1) пациентов с выраженной динамикой ($p_{\text{Фридман}} < 0,05$)			Группа (2) пациентов без значимой динамики ($p_{\text{Фридман}} > 0,05$)		
			0-е сутки	1-е сутки	7-е сутки	0-е сутки	1-е сутки	7-е сутки
ЛИИ	$1,01 \pm 0,06$	$0,77 \pm 0,25$	$1,45 \pm 0,72$	$2,75 \pm 0,63$	$2,69 \pm 1,84$	$1,02 \pm 0,88$	$1,41 \pm 0,59$	$0,78 \pm 0,68$
ИСЛ	$2,30 \pm 0,09$	$2,30 \pm 1,28$	$4,42 \pm 1,71$	$8,73 \pm 1,28$	$3,96 \pm 1,03$	$3,94 \pm 2,12$	$5,04 \pm 1,56$	$4,45 \pm 2,70$
ИСНЛ	$2,67 \pm 0,09$	$2,81 \pm 2,82$	$7,16 \pm 1,29$	$26,75 \pm 10,38$	$12,13 \pm 8,21$	$5,98 \pm 4,45$	$10,13 \pm 5,20$	$8,02 \pm 5,64$
ИСЛМ	$5,78 \pm 0,73$	$4,64 \pm 0,63$	$1,66 \pm 1,04$	$0,60 \pm 0,09$	$0,89 \pm 0,24$	$2,50 \pm 1,40$	$0,98 \pm 0,47$	$2,67 \pm 0,61$

Специфическим критерием проявления радиационного воздействия у пациентов с РПЖ является повышение значений интегрального ИСЛ (с $2,3 \pm 1,28$ до $7,28 \pm 1,32$ отн. ед.) в 3,2 раза по отношению к значению показателя у пациентов, не получавших лучевой терапии (до лечения – $2,72 \pm 0,96$, после – $4,14 \pm 1,02$ отн. ед.) ($p < 0,05$). По данным статистического анализа динамики ИСЛ (таблица 2) на 1-е сутки после завершения радиационного воздействия между 1-й группой пациентов с выраженным повышением значений показателя в 3,8 раза ($p < 0,05$) и 2-й группой с увеличением уровня параметра в 2,1 раза установлено значимое различие в значениях данного показателя в 1,6 раза ($p < 0,05$).

Проведение радиотерапии у пациентов с РПЖ сопровождалось повышением уровня показателя ИСНЛ (исходное значение – $2,81 \pm 2,82$ отн. ед.,

после лечения – $16,45 \pm 3,20$ отн. ед.) в 5,9 раза с постепенной тенденцией к понижению на 7-е сутки после окончания лечения. В группе пациентов без радиотерапии данный параметр после лечения превышал исходные данные (с $4,27 \pm 1,14$ до $6,83 \pm 1,42$ отн. ед.) в 1,6 раза ($p < 0,05$). Статистический анализ динамики данных ИСНЛ у пациентов, подвергшихся радиотерапии показал (таблица 2), что на 1-е сутки после окончания лечения между пациентами чувствительной группы (увеличение параметра в 9,5 раза) и устойчивой группы (увеличение в 3,6 раза) выявлены значимые различия в значениях анализируемого показателя в 2,6 раза ($p < 0,05$).

Результат исследований показал, что у пациентов с РПЖ проведение радиотерапии сопряжено с угнетением функции эффекторных клеток иммунитета и неспецифическим понижением на 1-е сутки ИСЛМ (с $4,64 \pm 0,63$ до $0,68 \pm 0,52$ отн. ед.) в 6,8 раза по отношению к исходным данным. У пациентов, не получавших лучевую терапию, анализируемый показатель не изменялся в ходе наблюдения (исходное значение – $3,06 \pm 0,98$ отн. ед., после лечения – $3,05 \pm 1,01$ отн. ед.). В ходе сравнительных исследований динамики ИСЛМ в результате проведения радиотерапии было установлено (таблица 2), что в 1-й группе пациентов параметр понизился в 7,7 раза, у пациентов 2-й группы – в 4,7 раза на 1-е сутки после окончания лечения. На 7-е сутки после окончания лучевой терапии установлено статистически значимое различие в уровне параметра ИСЛМ между двумя анализируемыми группами пациентов ($p < 0,05$).

Морфологическая и иммунофенотипическая характеристика рака поджелудочной железы. Протоковая аденокарцинома выявлена у 86 (66%) пациентов, муцинозная аденокарцинома обнаружена в 14 (11%) случаях, метастатическая – в 9 (7%), смешанная протоково-эндокринная карцинома – у 6 (4,5%), высокодифференцированная нейроэндокринная карцинома – у 6 (4,5%), атипичный карциноид – у 2 (1,5%), недифференцированный анапластический рак – у 2 (1,5%), светлоклеточная аденокарцинома – у 3 (2%). Протоковая аденокарцинома с очаговым саркоматоидным строением и аденокарцинома кишечного типа выявлены в единичных случаях, что составило по 1% соответственно.

В группе пациентов с РПЖ преобладала (97/74,6% пациентов) умеренно дифференцированная аденокарцинома. Количество пациентов с высокой степенью дифференцировки опухоли G1 составило 10%, с низкой G3 – 13,9%, а также отмечено два случая (1,5%) недифференцированного рака.

У 130 пациентов с РПЖ проведено иммуногистохимическое определение экспрессии тканевых антигенов Her-2/neu (рисунок 1а), p53 (рисунок 1б), Ki-67 (рисунок 1в), EGFR, VEGF, Vim, CK-7, CK-19, E-кадгерина, NSE.

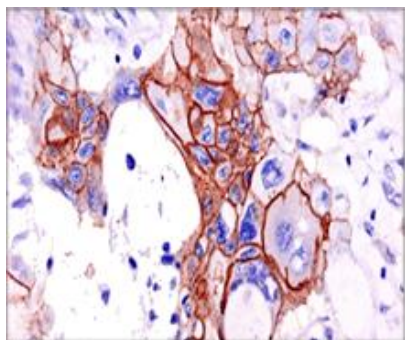


Рисунок 1а. –
Гиперэкспрессия Her-2/neu в
опухолевой ткани при раке
поджелудочной железы

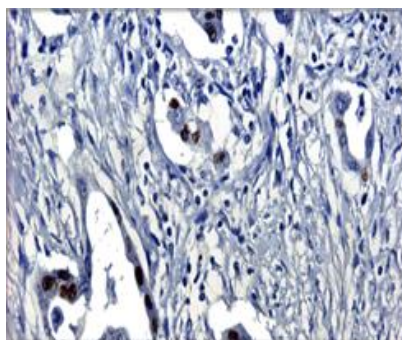


Рисунок 1б. –
Гиперэкспрессия онкобелка
p53 в опухолевой ткани
поджелудочной железы

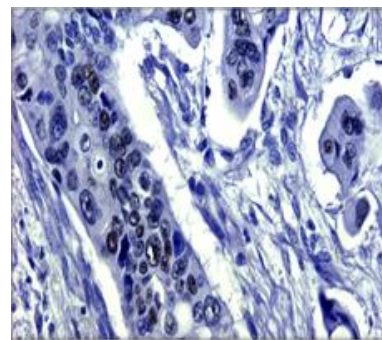


Рисунок 1в. –
Экспрессия Ki-67 в
опухолевой ткани
поджелудочной железы

Анализ молекулярно-биологических маркеров и морфологических признаков позволил выделить у пациентов с РПЖ (таблица 3) диагностически и прогностически значимые фенотипы опухоли:

Таблица 3. – Уровень экспрессии тканевых антигенов у пациентов с РПЖ

Тканевые антигены	Уровень экспрессии, баллы. Количество пациентов (%)			
	0	1+	2+	3+
HER-2/neu	77	6	7	10
p53	59	10	14	16
EGFR	66	16	9	9
VEGF	73	16	7	3
Ki-67	42	12	22	24
СК-19	3	1	24	72
СК-7	19	11	26	44
Е-кадгерин	27	24	27	22
Виментин	87	4	3	6
NSE	58	29	7	6

1) I-й фенотип выявлен у 32 (25%) пациентов с протоковой аденокарциномой и характеризовался экспрессией СК-19(+) p53(+) Е-кадгерин(+) СК-7(+). В анализируемой группе пациентов, имеющих данный фенотип, преобладала аденокарцинома с умеренной (G2) степенью дифференцировки и IV-ой стадией распространенности опухолевого процесса. При данном фенотипе выявлено снижение общей выживаемости пациентов до 6 месяцев после проведенного лечения.

2) У 25 (19%) пациентов с диагностированной протоковой аденокарциномой II-й фенотип опухоли представлен экспрессией СК-19(+) p53(+) Е-кадгерин (+) и отсутствием экспрессии Vim(-) EGFR(-). У пациентов с данным фенотипом преобладала высокодифференцированная аденокарцинома со II-ой стадией распространенности опухолевого процесса и общей выживаемостью свыше 8 месяцев.

3) III-й фенотип диагностирован у 20 (15%) пациентов и характеризовался отсутствием экспрессии EGFR(-) VEGF(-) Vim(-). У данной группы пациентов преобладала умеренно дифференцированная протоковая аденокарцинома с III-ей стадией заболевания. Общая выживаемость пациентов с данным фенотипом составила свыше 14 месяцев после проведенной терапии.

4) Для муцинозной аденокарциномы характерен следующий фенотип: наличие экспрессии CK-19(+) CK-7(+) и отсутствие экспрессии Her-2/neu(-) Vim(-), выявленный у 12 (86%) пациентов. При этом отмечено преобладание умеренной степени дифференцировки опухоли G2 и IV стадии опухолевого процесса. 90% пациентов в данной группе умерло от основного заболевания. Общая выживаемость пациентов свыше 8 месяцев.

5) При диагностировании метастатической аденокарциномы у 8 (89%) пациентов детектирован фенотип, характеризующийся экспрессией CK-19(+) и отсутствием экспрессии Her-2/neu(-) Vim(-) VEGF(-) NSE(-). При данном фенотипе 56% пациентов умерло от прогрессирования заболевания в течение 1-го месяца.

Характеристика генотипа рака поджелудочной железы. В ходе исследования у 78 (62%) пациентов с РПЖ и у 20 (61%) пациентов с хроническим панкреатитом выявлен мутантный ген K-ras. В результате анализа данных диагностическая чувствительность (ДЧ) составила 88,3%, диагностическая специфичность (ДС) – 97,8%, диагностическая эффективность (ДЭ) – 92,7%, что свидетельствует о высокой диагностической значимости использования ПЦР-метода для выявления рака поджелудочной железы.

Анализ метилирования промоторного участка гена p16INK4A позволил установить у 53 (41%) пациентов с РПЖ его гиперметилирование, что ассоциировано с неблагоприятным прогнозом и резистентностью к системной полихимиотерапии. У пациентов с хроническим панкреатитом гиперметилирование промоторного участка гена p16INK4A отмечено в 30% случаев, что свидетельствует о высоком риске трансформации в аденокарциному. Диагностическая значимость метода выявления РПЖ по оценке статуса метилирования гена p16INK4A составила: ДЧ – 87,3%, ДС – 98,1%, ДЭ – 93,7%.

В результате проведенного исследования у 24 (19,5%) пациентов с РПЖ и у 4 (12,2%) пациентов с хроническим панкреатитом выявлены ряд генетических нарушений в 11 экзоне гена DPC4 (Smad4) (рисунок 2). Среди выявленных генетических полиморфизмов преобладали делеции (G~~AAA~~ > GAA; Gly > Ala; T~~ACC~~ > TCC; Tyr > Ile) в 508 и 513 кодонах соответственно. У 18 (14,6%) пациентов с РПЖ детектированы делеции в 513 кодоне, в 508 кодоне – у 6 (4,9%). Среди пациентов с хроническим панкреатитом у двух выявлены делеции в 508 кодоне и в 513 – в 2 случаях.

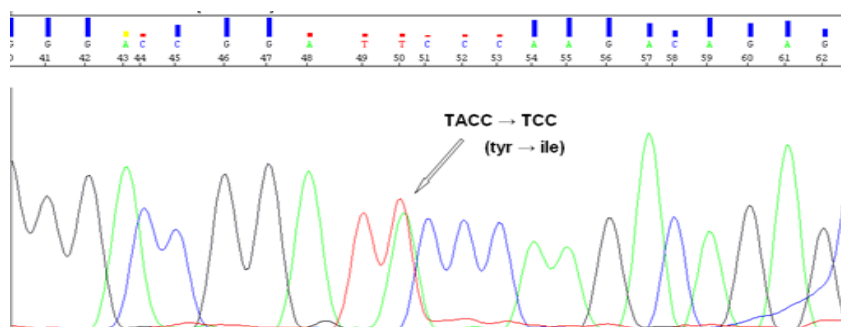


Рисунок 2. – Фрагмент электрофореграммы 11 экзона гена DPC4 (делеция TACC > TCC; Tyr > Ile, кодон 513) при раке поджелудочной железы

Выявление генетических нарушений (GAAA > GAA; Gly > Ala; TACC > TCC; Tyr > Ile) в 508 и 513 кодонах гена DPC4 у пациентов с РПЖ сопряжено с высоким риском раннего развития рецидива заболевания (в первые 6–8 мес.) по отношению к пациентам, не имеющим делеций в данном гене ($p < 0,05$).

Результаты молекулярно-генетических исследований установили (рисунок 3), что экспрессия эпителиального гена СК-19 детектирована в морфологически интактных лимфатических узлах у 18 (85,7%) пациентов с РПЖ, в периферической крови – у 5 (23,8%) пациентов.

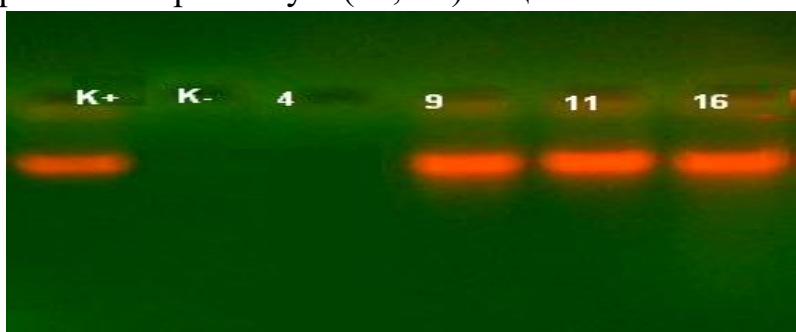


Рисунок 3. – Гель-электрофорез гена СК-19 (в образцах 9, 11, 16 выявлена экспрессия СК-19; K+ - положительный контроль, K- отрицательный контроль) у пациентов с РПЖ

Сравнительный молекулярно-генетический анализ показал, у 33,3% пациентов с РПЖ при I и II стадиях опухолевого процесса имеются микрометастазы в региональных лимфатических узлах и периферической крови. При РПЖ диссеминированные опухолевые клетки с экспрессией гена СК-19 обнаружены в морфологически интактных лимфатических узлах при N0 у 73% пациентов, при наличии метастазов в лимфоузлах категории N1 – у 100%, что свидетельствует о высокой чувствительности молекулярно-генетического метода для уточнения степени распространённости опухолевого процесса ($p < 0,05$).

Взаимосвязь молекулярно-биологических маркеров с выживаемостью пациентов, страдающих раком поджелудочной железы, и объемом лечения. При проведении оценки корреляционной взаимосвязи между статусом метилирования гена p16INK4A и наличием мутаций в гене

K-ras, мутациями в гене K-ras и наличием мутаций в гене p53 установлена отрицательная корреляция средней силы.

У 59,7% пациентов, страдающих раком поджелудочной железы, общая выживаемость статистически значимо повышалась с 8,8 мес. до 16,1 мес. (рисунок 4) при снижении экспрессии мутантного онкопротеина p53 ($p < 0,05$).

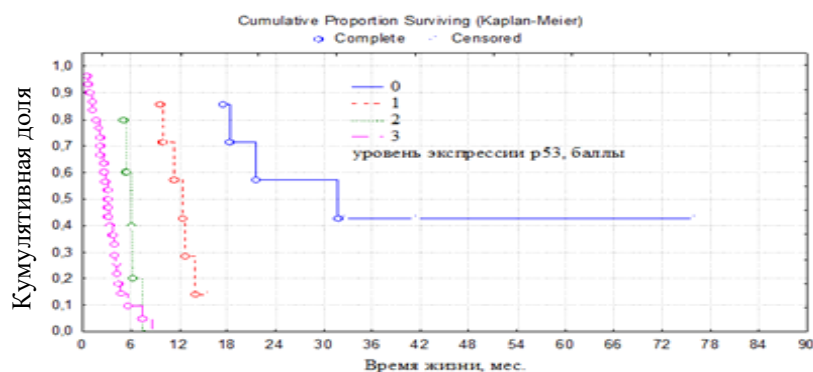


Рисунок 4. – Общая выживаемость пациентов с РПЖ в зависимости от экспрессии мутантного онкопротеина p53 в опухоли (кривая Kaplan-Meier)

При анализе генотипа пациентов с РПЖ установлено, что при наличии мутации в гене K-ras и гиперметилирования p16INK4A все проанализированные пациенты умерли от основного заболевания. Сравнительными исследованиями показано, что при отсутствии экспрессии СК-19 в регионарных лимфатических узлах выявлен благоприятный прогноз течения заболевания.

У пациентов с РПЖ проведен однофакторный анализ взаимосвязи молекулярно-биологических маркеров с программами комплексного лечения пациентов. Результаты исследования представлены в таблице 4.

Таблица 4. – Сравнительный анализ взаимосвязи программ комплексного лечения с иммунофенотипом опухоли

Схема лечения	Предоперационная			Послеоперационная		
	Высокий	Умеренный	Низкий/ отсутствие	Высокий	Умеренный	Низкий/ отсутствие
p53	0,3*	0,07*	0,03*	0,35*	0,54*	0,67*
Ki-67	0,96	0,36	0,19	0,56	0,09	0,61
EGFR	0,2	0,3	0,06	0,02*	0,02*	0,79
Her-2/neu	0,5	0,47	0,2	0,09	0,08	1
VEGF	0,24	0,9	0,19	0,06	0,36	0,3
СК-19	0,5	0,68	0,3	0,5	0,3	0,3
NSE	0,2	0,8	0,7	0,2	0,6	0,3
Vim	0,4	0,6	0,5	0,8	0,6	0,6
СК-7	0,7	0,7	0,3	0,4	0,2	0,5
Е-кадгерин	0,2	0,2	0,1	0,7	0,5	0,5

Примечание: * (p) – уровень статистической значимости

При лечении пациентов по программе, включающей предоперационное лучевое лечение СОД 28 Гр, хирургическое вмешательство и послеоперационное лучевое лечение СОД 40 Гр с курсами полихимиотерапии, установлен статистически значимый низкий уровень экспрессии мутантного онкопротеина p53 и повышение общей выживаемости пациентов с РПЖ до 16,1 мес. ($p < 0,05$). Оценка уровня экспрессии мутантного онкопротеина p53 в процессе комбинированного лечения позволяет повысить эффективность прогнозирования течения заболевания на 59,7% по сравнению с клиническими данными. При лечении пациентов по стандартной схеме (с послеоперационной терапией) отмечено статистически значимое увеличение уровня экспрессии EGFR и прогрессирование опухолевого процесса ($p = 0,02$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Радиационная терапия оказывает модифицирующее воздействие на клеточный гомеостаз пациентов, страдающих раком поджелудочной железы. Популяции тромбоцитов, лейкоцитов, лимфоцитов и нейтрофилов являются наиболее чувствительными к радиационному воздействию. У пациентов чувствительной группы установленные динамические изменения ($p < 0,05$) интегральных индексов крови на 1-е сутки после проведенной радиотерапии (повышение ЛИИ в 3,6 раза; ИСЛ – в 3,8 раза; ИСНЛ – в 9,5 раза; понижение ИСЛМ – в 7,7 раза) и незначительные изменения у пациентов устойчивой группы ($p > 0,05$) (повышение ЛИИ в 1,8 раза; ИСЛ – в 2,1 раза; ИСНЛ – в 3,6 раза; понижение ИСЛМ – в 4,7 раза) могут являться дополнительными маркерами индивидуальных реакций организма на лучевую терапию [3, 4, 16].

2. Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы характеризуется высокой степенью молекулярной гетерогенности с преобладанием 3 основных фенотипов опухоли, различающихся по степени агрессивности. I фенотип ассоциирован с повышенными уровнями экспрессии СК-19(+) p53(+) Е-кадгерин(+) СК-7(+), умеренной степенью дифференцировки опухоли, IV стадией опухолевого процесса и общей выживаемостью до 6 месяцев; II фенотип аденокарциномы характеризовался повышенной экспрессией СК-19(+) p53(+) Е-кадгерин(+) и отсутствием экспрессии Vim(-) EGFR(-), высокой степенью дифференцировки опухоли, II-ой стадией заболевания и общей выживаемостью пациентов свыше 8 месяцев; III фенотипу соответствовали отсутствие экспрессии тканевых антигенов EGFR(-) VEGF(-) Vim(-), умеренная степень дифференцировки опухоли, III стадия заболевания и общая выживаемость свыше 14 месяцев. Для муцинозной аденокарциномы характерен фенотип с экспрессией

СК-19(+), СК-7(+), отсутствием экспрессии Her-2/neu(-) Vim(-) и общей выживаемостью свыше 8 месяцев; для метастатической – СК-19(+) Her-2/neu (-) Vim (-) VEGF (-) NSE (-) фенотип с прогрессированием заболевания в течение 1-го месяца после проведенного лечения [3, 5, 7, 14–16].

3. Молекулярно-генетический метод по определению мутаций в гене K-ras позволяет диагностировать рак поджелудочной железы с диагностической чувствительностью 87,6%, диагностической специфичностью 97,8%, диагностической эффективностью 92,7%. Гиперметилирование промоторного участка гена p16INK4A позволяет выявить рак поджелудочной железы на ранних стадиях опухолевого процесса с диагностической чувствительностью 88,3%, специфичностью – 98,1%, эффективностью – 93,7% [1, 6, 8, 11, 12].

4. Выявление мутаций в 508 и 513 кодонах гена DPC4 у пациентов, страдающих раком поджелудочной железы, позволяет прогнозировать риск раннего развития рецидива заболевания. Разработанный молекулярно-генетический метод оценки экспрессии гена цитокератина 19 выявляет диссеминированные опухолевые клетки в интактных лимфатических узлах у 85,7% пациентов, что является фактором неблагоприятного прогноза и снижения общей выживаемости пациентов в раннем посттерапевтическом периоде ($p < 0,05$) [2, 7–10, 12–18].

5. При снижении уровня экспрессии мутантного онкопротеина p53 (score 0–1 балл) наблюдается статистически значимое увеличение общей выживаемости пациентов, страдающих раком поджелудочной железы, до 16,1 мес. ($p < 0,05$). Комбинированное лечение с использованием предоперационной лучевой терапии, хирургического лечения и послеоперационного воздействия, сопровождается снижением уровня экспрессии мутантного онкопротеина p53, что позволяет повысить эффективность прогнозирования течения заболевания на 59,7% по сравнению с клиническими данными [3, 5, 8–10, 16].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Определение экспрессии СК-19 в лимфатических узлах и периферической крови позволяет выявить диссеминацию опухолевых клеток и произвести объективную оценку распространенности опухолевого процесса у пациентов с раком поджелудочной железы, а также индивидуализировать тактику комбинированного лечения [15, 16].

Выявление генетических нарушений в 508 и 513 кодонах гена DPC4 с использованием метода молекулярного секвенирования у пациентов, страдающих раком поджелудочной железы, позволяет прогнозировать высокий риск раннего развития рецидива заболевания (в первые 6–8 мес.) после радикального лечения [17].

Результаты диссертационного исследования были использованы при разработке утвержденной Министерством Здравоохранения Республики Беларусь инструкции по применению, рационализаторского предложения и патента на изобретение Республики Беларусь (Приложение В диссертации). Полученные данные приняты к использованию в ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова».

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

Статьи в рецензируемых научных журналах, соответствующих требованиям ВАК Беларуси

1. Оценка диагностической значимости молекулярно-генетических маркеров при аденокарциноме поджелудочной железы / Е.М. Шпадарук, Р.М. Смолякова, А.И. Шмак, Э.В. Макаревич // Проблемы здоровья и экологии. – 2012. – № 4 (34). – С. 109–113.

2. Шпадарук, Е.М. Молекулярно-генетическая оценка экспрессии цитокератина 19 при раке поджелудочной железы / Е.М. Шпадарук, Р. М. Смолякова, Э.В. Макаревич // Онкологический журнал. – 2012. – Т. 6, №4 (24). – С. 12–16.

3. Шпадарук, Е.М. Иммунофенотипическая характеристика аденокарциномы поджелудочной железы: прогностическая значимость / Е.М. Шпадарук, И.В. Смолякова, Э.В. Макаревич // Экологический вестник. – 2013. – №1 (23). – С. 55–60.

4. Шпадарук, Е.М. Оценка показателей клеточной реактивности гомеостаза при комбинированном лечении пациентов, страдающих раком поджелудочной железы / Е.М. Шпадарук, Р.М. Смолякова // Экологический вестник. – 2016. – №1 (35). – С. 78–85.

Статьи в сборниках научных трудов и материалах конференций

5. Шпадарук, Е.М. Прогностическая значимость экспрессии рецепторов эпидермальных факторов роста ERBB1 (EGFR) и ERBB2 (Her-2/neu) при аденокарциномах поджелудочной железы / Е.М. Шпадарук, Р.М. Смолякова // Сахаровские чтения 2012 года: экологические проблемы XXI века: материалы 12-й междунар. науч. конф., Минск, 17–18 мая 2012 г. / МГЭУ имени А.Д. Сахарова; редкол.: С.П. Кундас [и др.] – Минск, 2012. – С. 177–178.

6. Определение статуса метилирования промоторного участка гена p16INK4A у больных раком поджелудочной железы / Э.В. Макаревич, Е.М. Шпадарук, А.И. Шмак, М.Ю. Ревтович, И.В. Смолякова // 7-й съезд онкологов и радиологов стран СНГ: материалы междунар. науч.-практ. конф.,

Астана, 5–7 сентября 2012 г. / Казахский НИИ онк. и радиологии; редкол.: В.Н. Богатырев [и др.] – Астана, 2012. – С. 148–149.

7. Шпадарук, Е.М. Прогностическая значимость определения экспрессии цитокератина 19 у пациентов раком поджелудочной железы / Е.М. Шпадарук, И.В. Смолякова // III международная научно-практическая конференция: Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине, Казань, 22–24 ноября 2012 г. / Казанский (Приволжский) федеральный университет, НИИ физико-химической медицины ФМБА России; – Казань, 2012. – С. 403–404.

8. Прогнозирования риска раннего рецидива при раке поджелудочной железы / Р.М. Смолякова, А.И. Шмак, М.Ю. Ревтович, Е.М. Шпадарук, Э.В. Макаревич // Актуальные вопросы диагностики и лечения онкологических заболеваний: материалы Респ. науч.- практ. конф. с междунар. участием, Минск, 20 дек. 2013 г. / РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова; – Минск, 2013. – С. 54.

9. Шпадарук, Е.М. Молекулярно-генетическая диагностика микрометастазов в периферической крови и лимфатических узлах по экспрессии гена СК-19 у пациентов раком поджелудочной железы / Е.М. Шпадарук, Р.М. Смолякова // Сахаровские чтения 2013 года: экологические проблемы XXI века: материалы 13-й международной научной конференции, Минск, 17–18 мая 2013 г. / МГЭУ имени А.Д. Сахарова; редкол.: С.П. Кундас [и др.]. – Минск, 2013. – С. 156–157.

10. Шпадарук, Е.М. Детекция мутаций в 11 экзоне гена DPC4 (Smad4) у пациентов, страдающих раком поджелудочной железы и хроническим панкреатитом / Е.М. Шпадарук // Сборник материалов I междунар. научно-практической конф.: «Биотехнология: достижения и перспективы развития», Пинск, 25–26 сентября 2014 г. / Полесский государственный университет; редкол.: Шебеко К.К. [и др.]. – Пинск, 2014. – С. 150–155.

11. Шпадарук, Е.М. Определение экспрессии гена множественной лекарственной устойчивости (MDR) у пациентов с раком поджелудочной железы / Е.М. Шпадарук // Сборник материалов I междунар. научно-практической конф.: «Биотехнология: достижения и перспективы развития», Пинск, 25–26 сентября 2014 г. / Полесский государственный университет; редкол.: Шебеко К.К. [и др.]. – Пинск, 2014. – С. 155–156.

12. Возможности прогнозирования раннего прогрессирования опухолевого процесса при радикальном лечении рака поджелудочной железы / Р.М. Смолякова, М.Ю. Ревтович, А.И. Шмак, Е.М. Шпадарук, Э.В. Макаревич // сб. науч. работ Республ. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию каф. онкологии / под общ. ред. профессора А.В. Прохорова. – Минск, БГМУ, 2014. – С. 96.

13. Прогностическая значимость выявления опухолевых клеток в лимфатических узлах и периферической крови при раке поджелудочной железы / Р.М. Смолякова, А.И. Шмак, М.Ю. Ревтович, И.В. Смолякова, Е.М. Шпадарук // сб. науч. работ Республ. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию каф. онкологии / под общ. ред. профессора А.В. Прохорова. – Минск, БГМУ, 2014. – С. 97.

14. Шпадарук, Е.М. Определение СК-7 и СК-19 у пациентов, страдающих раком поджелудочной железы / А.Э. Филькевич, Е.М. Шпадарук // Сахаровские чтения 2014 года: экологические проблемы XXI века: материалы 14-й международной научной конференции, Минск, 29–30 мая 2014 г. / МГЭУ имени А.Д. Сахарова; редкол.: С.П. Кундас [и др.]. – Минск, 2014. – С. 131–132.

15. Шпадарук, Е.М. Прогностическая значимость выявления мутаций в гене-супрессоре опухолевого роста DPC4/SMAD4 и гиперэкспрессии антигена KI-67 у пациентов с раком поджелудочной железы / Е.М. Шпадарук, Р.М. Смолякова // Сахаровские чтения 2014 года: экологические проблемы XXI века: материалы 14-й международной научной конференции, Минск, 29–30 мая 2014 г. / МГЭУ имени А.Д. Сахарова; редкол.: С.П. Кундас [и др.]. – Минск, 2014. – С. 140.

Инструкция по применению и рационализаторское предложение

16. Способ прогнозирования хирургического и комбинированного лечения пациента раком поджелудочной железы: рац. предл. РБ № 159 / Р.М. Смолякова, Э.В. Макаревич, Е.М. Шпадарук, А.И. Шмак, М.Ю. Ревтович; ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»; заявл. 08.08.2012.

17. Молекулярно-генетическая диагностика микрометастазов при раке поджелудочной железы методом полимеразной цепной реакции: инструкция по применению № 106-0812 МЗ РБ / Р.М. Смолякова, Э.В. Макаревич, Е.М. Шпадарук, М.А. Возмитель, А.И. Шмак, М.Ю. Ревтович. – Минск, 2013. – 10 с.

Патент

18. Способ диагностики раннего развития рецидива при раке поджелудочной железы: пат. 19779 Респ. Беларусь, МПК А 61В 10/00, С 12Q 1/68 / Р.М. Смолякова, Э.В. Макаревич, Е.М. Шпадарук, И.В. Смолякова; заявитель РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова – № а 20121227; заявл. 22.08.2012; опубл. 28.02.2016 // Национальный центр интеллектуальной собственности. – 2013. – <http://www.belgopatent.org.by/database/index.php?pref=inv&lng=ru&page=2>.

РЭЗІЮМЭ

Шпадарук Кацярына Міхайлаўна

Прагнастычнае значэнне малекулярна-біялагічных маркераў ў камбінаваным лячэнні (з ужываннем прамянёвай тэрапіі) рака падстраўнікавай залозы

Ключавыя словы: малекулярна-біялагічныя маркеры, рак падстраўнікавай залозы, прамянёвая тэрапія, радыяцыйнае ўздзеянне.

Мэта работы – павысіць эфектыўнасць дыягностыкі і прагназавання цяжэння захворвання пры раку падстраўнікавай залозы на аснове комплекснага вызначэння малекулярна-біялагічных маркераў і паказчыкаў радыеадчувальнасці пацыентаў для індывідуалізацыі лячэбнай тактыкі.

Метады даследавання: імунагістахімічны, малекулярна-генетычны (ПЦР, секвеніраванне), статыстычны.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: Упершыню вывучана дынаміка паказчыкаў клетачнай рэактыўнасці гамеастазу, а таксама ўзровень радыяцыйна-індукаванай інтаксікацыі ў пацыентаў з ракам падстраўнікавай залозы, якія атрымалі прамянёвую тэрапію. Устаноўлена, што прамянёвая тэрапія аказвае мадыфікаванае ўздзеянне на клетачны гамеастаз пацыентаў з ракам падстраўнікавай залозы, што дазваляе стратыфікаваць пацыентаў на групы радыеадчувальных і радыерэзістэнтных ($p < 0,05$).

Па ўзроўнях экспрэсіі малекулярна-біялагічных тканкавых антыгенаў устаноўлены асноўныя фенатыпы адэнакарцыном падстраўнікавай залозы.

Упершыню праведзена выяўленне адзінкавых дысемініраваных пухлінных клетак у лімфатычных вузлах і перыферычнай крыві пры раку падстраўнікавай залозы метадам палімеразнай цапной рэакцыі.

Пры камбінаваным лячэнні з выкарыстаннем перадаперацыйнай прамянёвай тэрапіі, хірургічнага лячэння і пасляперацыйнага ўздзеяння, выяўлены статыстычна значна нізкі ўзровень экспрэсіі мутантнага анкапратэіну p53 і павышэнне агульнай выжывальнасці пацыентаў, якія хварэюць на рак падстраўнікавай залозы, з 8,8 да 16,1 месяца.

Атрыманыя даныя даказваюць радыеадчувальнасць комплексу малекулярна-біялагічных паказчыкаў, які можа быць выкарыстаны для ацэнкі індывідуальнай радыеадчувальнасці і персаніфікацыі радыяцыйнага ўздзеяння.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: распрацаваны інструкцыя па ўжыванні, зацверджаная Міністэрствам аховы здароўя Рэспублікі Беларусь, рацыяналізатарская прапанова, патэнт.

Вобласць ужывання: малекулярная біялогія, клініка-лабараторная дыягностыка, анкалогія, прамянёвая тэрапія, сістэма вышэйшай біялагічнай і паслядыпломнай адукацыі.

РЕЗЮМЕ

Шпадарук Екатерина Михайловна

Прогностическая значимость молекулярно-биологических маркеров при комбинированном лечении (с применением лучевой терапии) рака поджелудочной железы

Ключевые слова: молекулярно-биологические маркеры, рак поджелудочной железы, лучевая терапия, радиационное воздействие.

Цель работы – повысить эффективность диагностики и прогнозирования течения заболевания при раке поджелудочной железы на основе комплексного определения молекулярно-биологических маркеров и показателей радиочувствительности пациентов для индивидуализации лечебной тактики.

Методы исследования: иммуногистохимический, молекулярно-генетический (ПЦР, секвенирование), статистический.

Полученные результаты и их новизна: Впервые изучена динамика показателей клеточной реактивности гомеостаза, а также уровень радиационно-индуцированной интоксикации у пациентов с раком поджелудочной железы, получивших лучевую терапию. Установлено, что лучевая терапия оказывает модифицирующее воздействие на клеточный гомеостаз пациентов с раком поджелудочной железы, что позволяет стратифицировать пациентов на группы радиочувствительных и радиорезистентных ($p < 0,05$).

По уровням экспрессии молекулярно-биологических тканевых антигенов установлены основные фенотипы аденокарцином поджелудочной железы.

Впервые проведено выявление единичных диссеминированных опухолевых клеток в лимфатических узлах и периферической крови при раке поджелудочной железы методом полимеразной цепной реакции.

При комбинированном лечении с использованием предоперационной лучевой терапии, хирургического лечения и послеоперационного воздействия, выявлен статистически значимо низкий уровень экспрессии мутантного онкопротеина p53 и повышение общей выживаемости пациентов, страдающих раком поджелудочной железы, с 8,8 до 16,1 месяцев.

Полученные данные доказывают радиочувствительность комплекса молекулярно-биологических показателей, который может быть использован для оценки индивидуальной радиочувствительности и персонализации радиационного воздействия.

Рекомендации по использованию: разработаны инструкция по применению утвержденная Министерством здравоохранения Республики Беларусь, рационализаторское предложение, патент.

Область применения: молекулярная биология, клиничко-лабораторная диагностика, онкология, лучевая терапия, система высшего биологического и последипломного образования.

SUMMARY

Shpadaruk Katsiaryna Mihajlovna

The prognostic significance of molecular biological markers in the combined treatment (with the use of radiation therapy) of pancreatic cancer

Keywords: molecular-biological markers, pancreatic cancer, radiation therapy, radiation exposure.

Purpose of the work: to increase the effectiveness of diagnosis and prediction of the course of the disease in pancreatic cancer on the basis of a comprehensive determination of molecular-biological markers and patient radiosensitivity indicators for individualizing therapeutic tactics.

Research methods: immunohistochemistry, molecular genetics (PCR, sequencing), a statistical.

Results and their novelty. For the first time the dynamics of the values of cellular responsiveness of homeostasis, as well as the level of radiation-induced toxicity in patients with pancreatic cancer who received radiation therapy are studied. It was found that radiation therapy has a modifying effect on the cellular homeostasis of patients with pancreatic cancer which allows to stratify the patients into the groups of radiosensitive and radioresistant ($p < 0.05$).

According to the levels of the expression of molecular biological tissue antigens, the main phenotypes of adenocarcinomas of the pancreas are identified.

For the time, the detection of the disseminated tumor cells in lymph nodes and peripheral blood in pancreatic cancer using polymerase chain reaction is conducted.

In the combined treatment with pre-surgical radiotherapy, surgery and post-surgical radiation exposure, the statistically significant low level of expression of the mutant oncoprotein p53 and to increase the overall survival of patients, suffering from pancreatic cancer, are identified from 8.8 to 16.1 months.

The obtained data prove the radiosensitivity of complex molecular- biological indicators that can be used to assess individual radiosensitivity and personification of radiation exposure.

Recommended use: The instruction for use, has been developed and approved by the Ministry of Health of Belarus as well as the innovation proposal and the patent.

Application area: molecular biology, clinical and laboratory diagnostics, oncology, radiation therapy, biological system of higher and postgraduate education.