

На правах рукописи

БУГАЁВ ВЛАДИСЛАВ ЕВГЕНЬЕВИЧ

**ЗАБРЮШИННЫЕ НЕОРГАННЫЕ ЛЕЙОМИОСАРКОМЫ:
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И КЛИНИКО-
МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА**

14.01.12 – Онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Стилиди Иван Сократович).

Научные руководители:

доктор медицинских наук
профессор, академик РАН
доктор медицинских наук

Стилиди Иван Сократович

Любченко Людмила Николаевна

Официальные оппоненты:

Чхиквадзе Владимир Давидович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий научно-исследовательским отделом хирургии и хирургических технологий в онкологии федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Наседкина Татьяна Васильевна, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биологических микрочипов федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «15» октября 2020 года в 13-00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24 и на сайте www.ronc.ru

Автореферат разослан «.....» 2020 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Лейомиосаркомы (ЛМС) являются одной из самых распространенных опухолей мягких тканей, занимая третье место по частоте среди злокачественных опухолей мягких тканей после липосаркомы и злокачественной фиброзной гистиоцитомы (Togo et al., 2006). Среди общего числа забрюшинных опухолей лейомиосаркомы являются вторым по частоте (28%) гистологическим вариантом сарком (Rajiah et al., 2011). Радикальное хирургическое лечение в объеме удаления опухоли остаётся наиболее эффективным методом, позволяющим надеяться на длительный безрецидивный период (Bonvalot et al., 2010; A. Gronchi et al., 2012; Alessandro Gronchi et al., 2009; Lehnert et al., 2009). Показатели 5-летней выживаемости у больных с забрюшинными мягкоткаными опухолями составляют 54-64% после выполнения радикальной резекции, при этом при выполнении нерадикальной резекции медиана выживаемости не превышает 18 месяцев (Paryani et al., 2012). Другими факторами прогноза у больных лейомиосаркомой являются размер и степень злокачественности опухоли, а также наличие или отсутствие отдалённых метастазов (Li et al., 2015; Nathan et al., 2009). Проведение адъювантной химиотерапии после радикально выполненной операции у больных с забрюшинными неорганными лейомиосаркомами не считается стандартным подходом (Mehren et al., 2018). В настоящее время также отсутствуют данные об эффективности таргетной терапии, направленной на определенные молекулярно-генетические нарушения в лейомиосаркомах. Также не определены специфические молекулярные биомаркеры.

Литературные данные об отдалённых результатах хирургического лечения забрюшинных лейомиосарком немногочисленны. Также важным вопросом остаётся поиск биомаркёров, позволяющих определить прогноз заболевания и ответ на проведение таргетной или иммунотерапии. Данные по частоте экспрессии PD-L1 и её прогностической значимости в мягкотканых саркомах немногочисленны, к тому же в исследования по этому вопросу были включены лишь единичные пациенты с лейомиосаркомой (Paydas et al., 2016). В настоящее время также известно, что микросателлитная нестабильность (microsatellite instability, MSI) является фактором, позволяющим определить прогноз течения заболевания и предсказать эффективность лекарственной терапии новообразований различной локализации. Изучение применения ингибиторов PD-1 при опухолях различных локализаций показало, что наличие высокого уровня микросателлитной нестабильности (MSI-high, MSI-H) ассоциировано с продолжительным ответом на анти-PD-1-терапию. Это позволяет рассматривать MSI-H фенотип как универсальный биомаркёр, предсказывающий потенциальный клинический эффект вне зависимости от гистологической структуры опухоли (Le et al., 2015). Частота микросателлитно-нестабильных опухолей среди лейомиосарком и прогностическое значение

MSI-статуса также остаётся практически неизученным. Более того, в мировой литературе практически не изучены спектр и частота соматических мутаций онкогенов и генов-супрессоров в лейомиосаркомах забрюшинной локализации, имеющих клиническое и прогностическое значение, что определяет актуальность исследования.

Цель исследования

Целью исследования является оптимизация хирургического лечения больных забрюшинными неорганными лейомиосаркомами с учётом молекулярно-генетических характеристик.

Задачи исследования

1. Изучить особенности клинического течения, характер прогрессирования и метастазирования забрюшинных неорганных лейомиосарком
2. Оценить отдалённые результаты хирургического лечения больных с забрюшинными неорганными лейомиосаркомами.
3. На основе анализа выживаемости определить оптимальный объём хирургического вмешательства в зависимости от локализации, размеров и степени злокачественности опухоли, первичного или рецидивного характера опухолевого процесса.
4. Изучить молекулярно-генетический профиль забрюшинных неорганных лейомиосарком и степень экспрессии иммуногистохимических маркеров и определить потенциальные различия, влияющие на клиническое течение и прогноз у больных.
5. Определить прогностические факторы отдалённой выживаемости с учётом генотипических характеристик.

Методы и методология исследования

Проведён анализ результатов лечения 64 больных редкой злокачественной опухолью – забрюшинной лейомиосаркомой, которые проходили хирургическое или комбинированное лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России в период с 2003 по 2019 год. Были проанализированы особенности клинического течения заболевания, изучены непосредственные и отдалённые результаты хирургического лечения, описаны особенности оперативных вмешательств. Проведены морфологические исследования на срезах опухолевой ткани из парафиновых блоков, полученных после хирургического лечения. С помощью иммуногистохимического анализа произведена оценка экспрессии PD-L1 в опухолевой ткани и опухолевом микроокружении, изучена прогностическая значимость и частота экспрессии, проведена клиническая оценка наличия экспрессии данного маркера. Методом полимеразной цепной реакции с последующим проведением фрагментного анализа исследована частота наличия микросателлитной нестабильности в опухолевой ткани. Изучен спектр соматических мутаций в опухолевой ткани, определена их прогностическая значимость.

Научная новизна

На основании анализа большого клинического материала редкой опухоли изучены особенности клинического течения заболевания, изучены непосредственные и отдалённые результаты хирургического лечения забрюшинных неорганных лейомиосарком, определены молекулярно-генетические характеристики забрюшинных лейомиосарком, определены факторы благоприятного и неблагоприятного прогноза с учётом генотипических характеристик.

Теоретическая и практическая значимость

В результате проведённого анализа доказана целесообразность выполнения комбинированных операций при местно-распространённых формах опухолевого процесса. Определены клиничко-морфологические факторы, определяющие долгосрочный прогноз. Изучена частота и характер прогрессирования заболевания после хирургического вмешательства. Изучена частота и прогностическая значимость экспрессии маркёров, которые могут быть использованы как потенциальные мишени для лекарственного лечения. Изучены молекулярно-генетические характеристики опухолей, выявлены клинически значимые мутации, являющиеся факторами неблагоприятного прогноза.

Личный вклад

Автором проведён анализ литературы, подбор клинического материала и его последующий анализ, оценка полученных результатов. Все данные и результаты, содержащиеся в диссертации, получены автором лично и представляют собой законченное самостоятельное научное исследование. Текст и выводы диссертации сформулированы и написаны автором.

Соответствие паспорту специальности

Основные положения, рекомендации и выводы диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 14.01.12 – Онкология («медицинские науки») и области исследований п.2 «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)».

Положения, выносимые на защиту

Хирургическое лечение по поводу забрюшинной лейомиосаркомы должно носить максимально радикальный характер, в том числе с выполнением резекции смежных органов или магистральных сосудов. Большие размеры опухоли или трудная локализация опухоли не должны сами по себе являться противопоказаниями к хирургическому лечению. Определение соматических мутаций в гене PIK3CA (A1035V, с.76-23509A>G и с.77+8483C>T), а также мутации N204N в гене PDGFRA позволит определять больных с неблагоприятным прогнозом и последующим дифференцированным выбором лекарственной терапии. Наличие экспрессии PD-

L1 у определенной части больных с забрюшинными лейомиосаркомами можно рассматривать как потенциальную мишень для проведения иммунотерапии.

Внедрение результатов исследования

Разработанные рекомендации апробированы и внедрены в клиническую практику НИИ клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Апробация

Материалы диссертации доложены: на IV Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи» (5-8 июня 2018 г., г. Санкт-Петербург), XXIII Российском онкологическом конгрессе (12-14 ноября 2019 г., г. Москва), 30 Мировом конгрессе Международной ассоциации хирургов, гастроэнтерологов и онкологов (IASGO World Congress, 9-12 сентября 2018 г., г. Москва).

Апробация диссертационной работы состоялась 14 февраля 2020 года на совместной конференции лабораторий и отделений ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Публикации

По результатам диссертации опубликовано 2 печатных работы в журналах, рекомендованных перечнем ВАК при Минобрнауки России.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 120 страницах машинописного текста, состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, который содержит 152 источника (14 отечественных и 138 зарубежных). Работа иллюстрирована 43 рисунками и 18 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Был проведен ретроспективный и проспективный анализ результатов лечения пациентов с забрюшинными неорганными лейомиосаркомами, которым выполнялось хирургическое или комбинированное лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» с 2003 по 2019 гг. Проведен анализ клинико-морфологических показателей, изучены и проанализированы непосредственные и отдаленные результаты хирургического лечения, характер возникающего рецидива заболевания и его метастазирования, описаны особенности оперативных вмешательств.

Молекулярно-генетическое тестирование с целью определения спектра и частоты соматических мутаций проводилось методом высокопроизводительного секвенирования (NGS)

с использованием коммерческой панели для целевого обогащения генов, которая позволяет анализировать 12 генов-драйверов онкологических заболеваний: KRAS, NRAS, KIT, BRAF, PDGFRA, ALK, EGFR, ERBB2, PIK3CA, ERBB3, ESR1, RAF1. Оценка экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках и/или иммунных клетках опухолевого микроокружения проводилась с помощью иммуногистохимического анализа. Иммуногистохимический анализ проводили на парафиновых срезах опухолевой ткани на автоматическом иммуногистостейнере BenchMark GX Ventana, Roche, с использованием антител Anti-PD-L1 [28-8] ab205921. Положительной считалась экспрессия PD-L1 более 1% в опухолевых и/или иммунных клетках. Микросателлитная нестабильность определялась в образцах ДНК, выделенных из опухолевой ткани, полученных со срезов парафиновых блоков под контролем врача-патоморфолога, методом ПЦР (полимеразной цепной реакцией) с использованием панели из пяти мононуклеотидных маркеров (BAT25, BAT26, NR21, NR24, NR27), с последующим проведением фрагментного анализа. Статистический анализ проводился с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics (выпуск 22.0) (IBM, Чикаго, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика изучаемой группы больных

Всего в исследование было включено 64 больных с первично выявленной забрюшинной лейомиосаркомой, среди которых было 12 мужчин (18%) и 53 женщины (82%). Средний возраст пациентов на момент постановки диагноза составил 52 ± 11 лет, минимум – 22 года, максимум – 86 лет. Пациентов с высокодифференцированной лейомиосаркомой G1 было 4 (6,3%), умереннодифференцированной лейомиосаркомой G2 – 26 (40,6%), с низкодифференцированной лейомиосаркомой G3 – 34 (53,1%). Медианна индекса пролиферативной активности Ki-67 составила 50% (стандартное отклонение - 22,6%, минимум – 15%, максимум – 97%).

Бессимптомное начало заболевания было отмечено у 18 больных (28,1%), в остальных случаях заболевание проявилось болевым синдромом, наличием пальпируемого образования в брюшной полости или отёком нижних конечностей.

Результаты хирургического лечения первичных забрюшинных лейомиосарком

Анализ результатов хирургического лечения первичных забрюшинных лейомиосарком был проведён в группе из 64 больных, из которых хирургическое лечение по поводу первично выявленной забрюшинной ЛМС в 42 случаях (65,6%) было проведено в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, а в 22 случаях (34,4%) – в других клиниках по месту жительства. Среди больных, оперированных по поводу первичной забрюшинной лейомиосаркомы, средний размер опухоли составил $10,5 \text{ см} \pm 5 \text{ см}$. В большинстве случаев

(93,3%) операции были выполнены открытым доступом, в 4 случаях удаление опухоли выполнено лапароскопическим доступом.

При определении локализации забрюшинной опухоли мы использовали классификацию, предложенную Цвиркун В.В. в 2001 году, в которой предложено деление забрюшинного пространства на 5 зон (Цвиркун В.В, 2001). Данная классификация была дополнена нами следующими критериями: 6 зона – корень брыжейки кишки, 7 зона – опухоли, прилегающие к нижней полой вене, или парааортально расположенные опухоли, неклассифицируемые по другим критериям. Распределение больных в зависимости от локализации первичной опухоли представлено на рисунке 1.



Рисунок 1 — Характер операций в зависимости от локализации опухоли

Из 64 больных, получивших хирургическое лечение по поводу первичной опухоли, радикальная операция (R0) была выполнена в 54 случаях (85,9%), нерадикальная (R1) – в 5 случаях (7,8%), у оставшихся 4 больных (6,3%) оценить радикальность операции не представлялось возможным. При операциях, выполненных нерадикально, опухоли располагались в корне брыжейки кишки или парааортально в квадранте между почечными и подвздошными сосудами. Помимо этого, нерадикальные операции выполнялись как при опухолях менее 10 см, так и при опухолях бóльшего размера. Нами не было выявлено статистически значимых различий в частоте радикальных операций в зависимости от локализации опухоли ($p=0,804$) или её размеров ($p=0,520$).

Комбинированные операции (с резекцией смежных органов, но без учёта необходимости сосудистой резекции) выполнены в 62,5% случаев ($n=40$). Частота резекции и удаления

различных органов была следующая: почка – в 17 случаях (26,5%), ободочная кишка – в 11 случаях (17,2%), надпочечники – в 7 случаях (10,9%), матка с придатками – в 7 случаях (10,9%), поджелудочная железа – в 5 случаях (7,8%), селезёнка – в 3 случаях (4,7%), мочевого пузыря – в 3 случаях (4,7%), желудок - в 2 случаях, тонкая кишка - в 2 случаях, желчный пузырь – в 2 случаях.

Резекция магистральных сосудов была выполнена в 17,2% случаев (n=11). Резекция подвздошных вен выполнена в 6 случаях, резекция и протезирование подвздошных артерий – в 4 случаях, циркулярная резекция и протезирование инфраренального сегмента нижней полой вены – в 2 случаях, резекция и протезирование почечной вены – в 1 случае, краевая резекция воротной вены – в 1 случае, краевая резекция брюшного отдела аорты – в 1 случае. Характер выполняемой операции в зависимости от размеров опухоли представлен на рисунке 2.

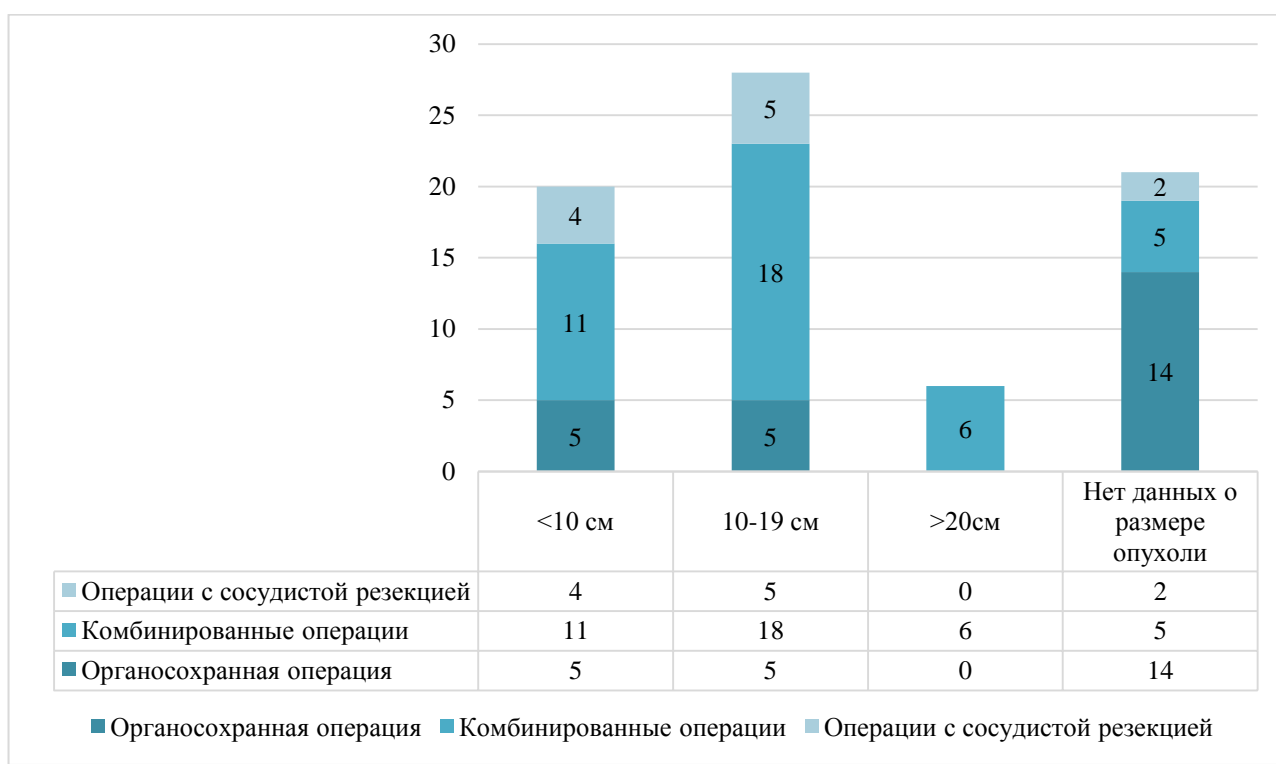


Рисунок 2 — Характер выполняемой операции в зависимости от размеров опухоли

Как видно, опухоли больших размеров (более 20 см) удавалось удалить радикально только при выполнении комбинированной операции с резекцией смежных органов. Основная доля операций при опухолях размерами от 10 до 19 см также носила комбинированный характер.

Частота послеоперационных осложнений составила 39%. Тяжесть послеоперационных осложнений оценивались по классификации Clavien-Dindo. Структура и частота послеоперационных осложнений представлена на рисунке 3.

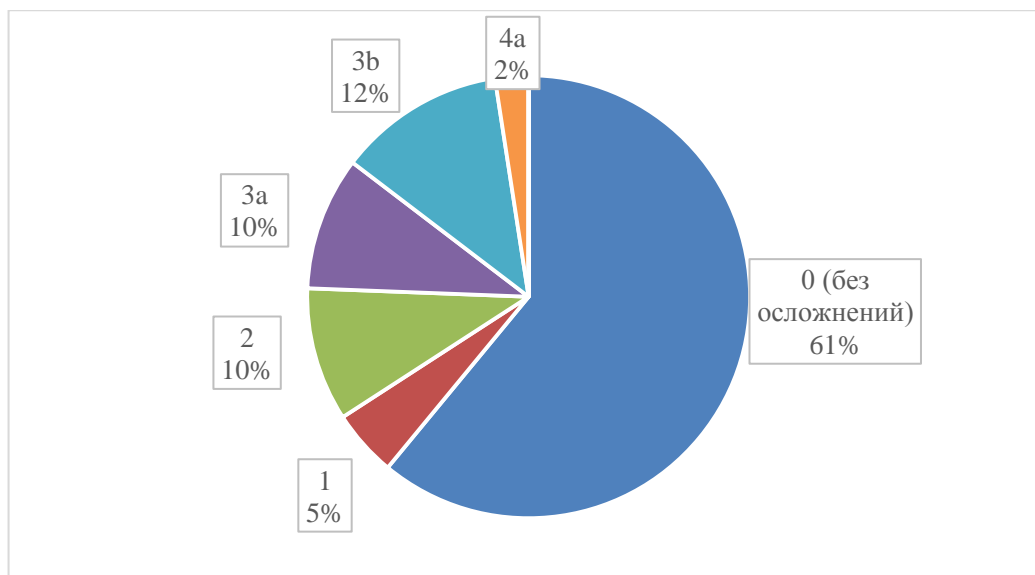


Рисунок 3 — Структура и частота послеоперационных осложнений

Среди больных, оперированных в нашей клинике по поводу первичной опухоли, послеоперационная летальность составила 0%.

Отметим, что чаще всего (12%) развивались осложнения, требующие повторных вмешательств под общей анестезией (осложнения группы 3b, а именно - эвентрация, абсцесс брюшной полости, перфорация полого органа, кишечная непроходимость и внутрибрюшное кровотечение). Вторыми по частоте (10%) были осложнения, купированные малоинвазивными вмешательствами без общей анестезии (степень 3a по шкале Clavien-Dindo). В основном, таким осложнением являлся наружный панкреатический свищ, что требовало выполнения чрескожного дренирования под местной анестезией.

В большинстве случаев (63,3%, n=38) пациенты, перенёвшие хирургическое лечение по поводу первичной опухоли, оставались под динамическим наблюдением. Адьювантная химиотерапия или лучевая терапия была проведена в 35% случаев (n=21) и 1,7% случаев (n=1) соответственно. Рецидив заболевания возник у 46 больных (71,9%). Структура типа рецидива представлена на рисунке 4. Наиболее часто развивался местный рецидив заболевания (39%), в 20% случаев – метастазы в печени или лёгких.

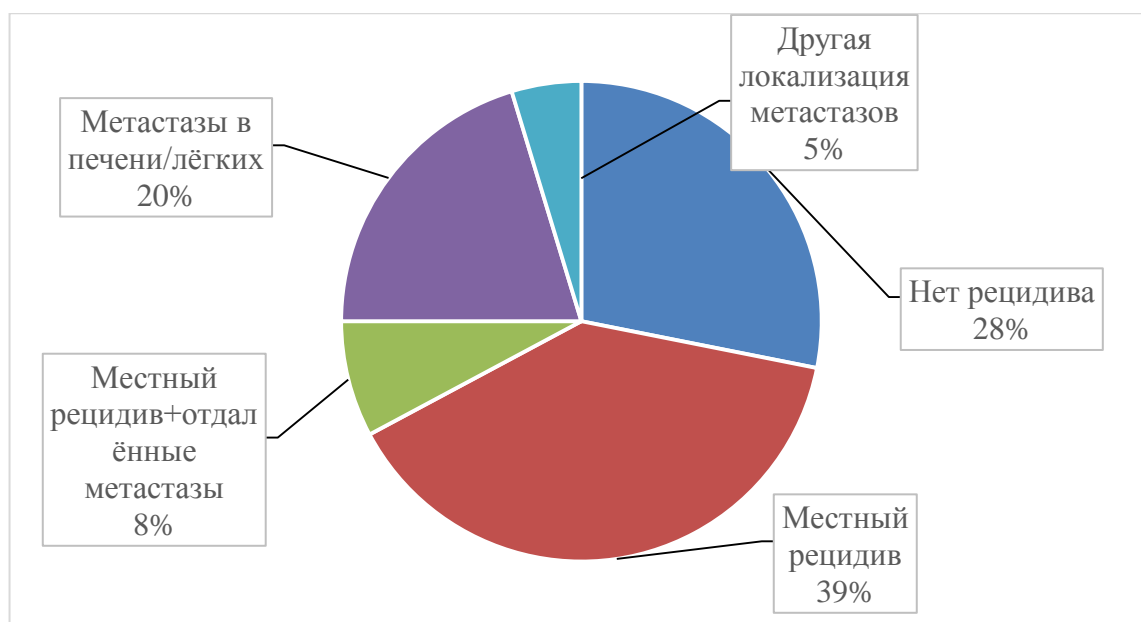


Рисунок 4 — Структура типа рецидива заболевания

Результаты хирургического лечения рецидивных и метастатических забрюшинных лейомиосарком

Как было указано ранее, рецидив заболевания после выполнения первичной операции возник у 46 больных (71,9%). Среди этой группы пациентов 29 больных (63%) были оперированы повторно в объёме удаления местного рецидива или отдалённых метастазов, 10 пациентам ввиду нерезектабельности опухоли (n=2) или появления отдалённых метастазов (n=8) проводилась паллиативная химиотерапия, а 7 пациентам – лишь симптоматическое лечение.

Среди 29 больных, которые были прооперированы по поводу первого рецидива заболевания, второй рецидив (R2) возник у 19 пациентов. Хирургическое лечение по поводу второго рецидива заболевания получили 11 пациентов (57%). В последующем, рецидив заболевания (R3) возник у 8 пациентов, трое из которых (37,5%) были прооперированы. Среди этих трёх пациентов у всех возник рецидив заболевания (R4), но только один из них (33%) был прооперирован повторно, в т.ч. после следующего рецидива (R5). Таким образом, с каждым последующим рецидивом заболевания доля пациентов, которым возможно выполнение хирургического лечения, неуклонно снижается.

Из 29 больных, прооперированных повторно, у 9 больных (31%) операция была выполнена по поводу отдалённых метастазов опухоли – 4 больным по поводу единичных метастазов в лёгких была выполнена атипичная резекция поражённого сегмента лёгкого, 2 больным по поводу метастазов в печени была выполнена резекция печени и радиочастотная абляция метастаза, ещё 3 больным было выполнено иссечение метастазов другой локализации. Критериями отбора больных на хирургическое лечение по поводу отдалённых метастазов

забрюшинной лейомиосаркомы были олигометастатический характер поражения, резектабельность метастатического очага и общее состояние больного, позволяющее выполнить хирургическое вмешательство в объёме R0.

Анализ выживаемости и определение клинико-морфологических факторов прогноза

Медиана наблюдения за больными от момента первичной операции составила 38 месяцев. Медиана безрецидивной выживаемости в общей когорте больных составила 27 месяцев (95% ДИ: 10-43,9 мес.). 3-летняя и 5-летняя безрецидивная выживаемость составила 43% и 21% соответственно. Медиана общей выживаемости – 79 месяцев (95% ДИ: 49-108,9 мес.). 3-летняя и 5-летняя общая выживаемость составила 73% и 59% соответственно.

В зависимости от степени злокачественности опухоли показатели общей и безрецидивной выживаемости были следующими: медиана безрецидивной выживаемости при опухолях 2 и 3 степени злокачественности составила – 49 и 18 месяцев, соответственно ($p=0,271$), медиана общей выживаемости – 146 и 58 месяцев, соответственно ($p=0,018$) (Рисунок 5).

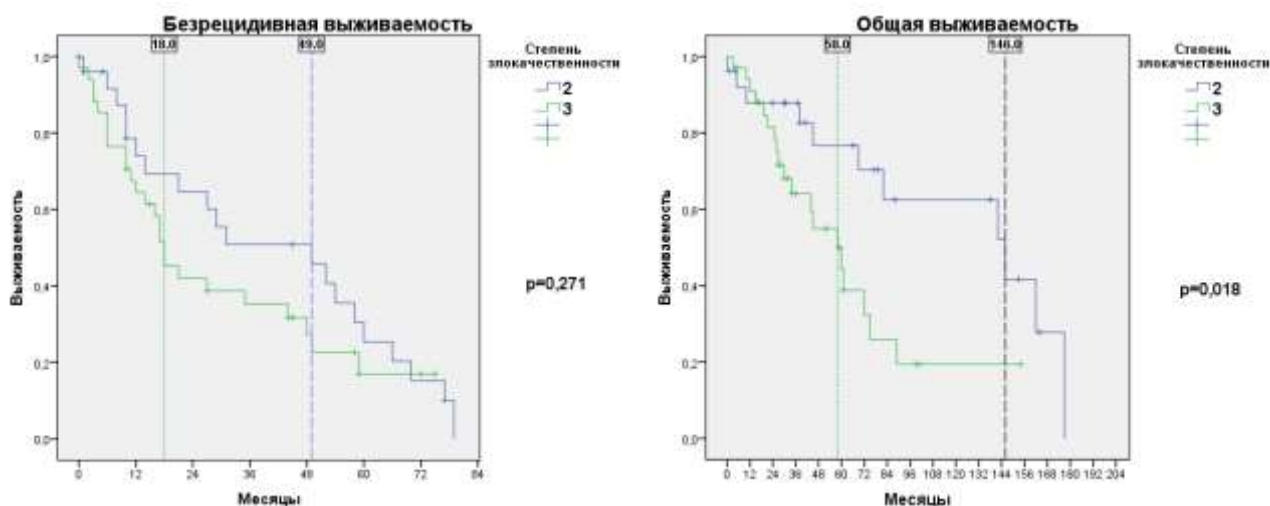


Рисунок 5 — Общая и безрецидивная выживаемость в зависимости от степени злокачественности опухоли

При сравнении результатов лечения больных, перенёсших радикальные (R0) или нерадикальные (R1/R2) операции, были получены статистически значимые различия в показателях общей ($p=0,028$) и безрецидивной выживаемости ($p<0,001$) (Рисунок 6).

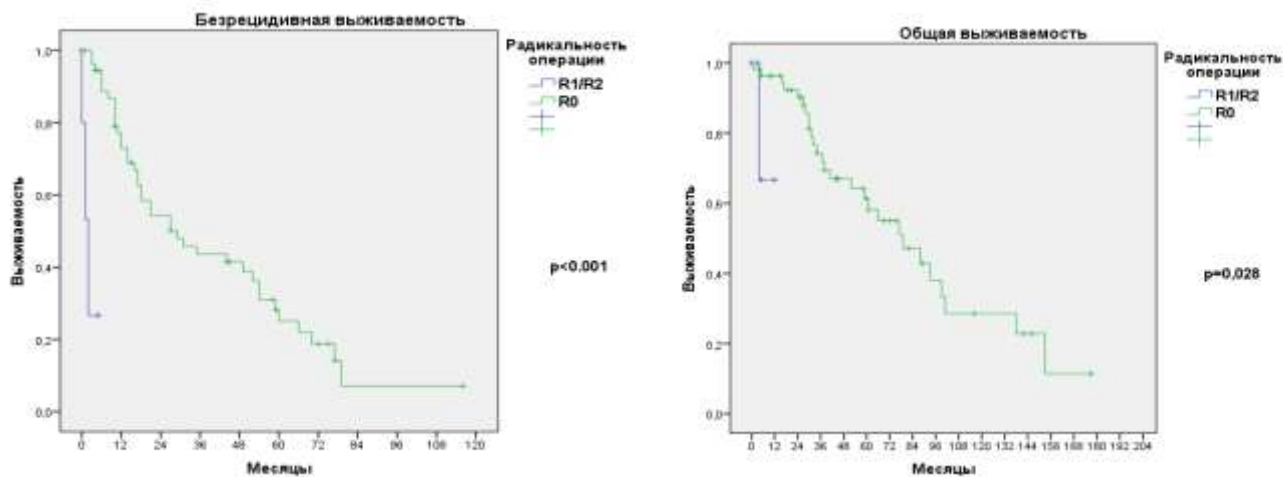


Рисунок 6 — Общая и безрецидивная выживаемость в зависимости от радикальности операции

При сравнении групп больных, которые подвергались комбинированным или стандартным операциям, было выявлено, что выполнение комбинированных операций с резекцией смежных органов не приводило к снижению показателей безрецидивной выживаемости и общей выживаемости (Рисунок 7). Медиана безрецидивной выживаемости составила 35 месяцев при выполнении стандартных операций и 27 месяцев при выполнении комбинированных операций ($p = 0,981$). Медиана общей выживаемости составила 93 месяца при выполнении стандартных операций и 79 месяцев при выполнении комбинированных операций ($p = 0,270$).

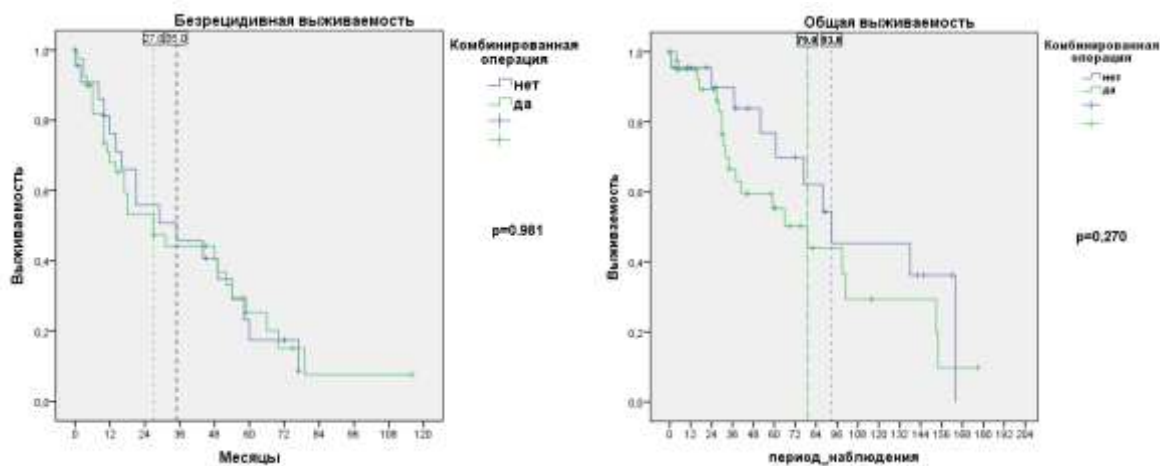


Рисунок 7 — Общая и безрецидивная выживаемость при комбинированных и стандартных операциях

При анализе группы больных, которым выполнялись операции с сосудистой резекцией, также не было выявлено статистически значимой разницы в безрецидивной выживаемости и общей выживаемости (рисунок 8). Медиана безрецидивной выживаемости при выполнении сосудистой резекции составила 21 месяц по сравнению с 29 месяцами в группе больных,

перенёсших стандартную операцию ($p=0,705$). Медиана общей выживаемости при выполнении сосудистой резекции составила 30 месяцев по сравнению с 93 месяцами в группе больных, перенёсших стандартную операцию, однако данные различия не были статистически значимыми ($p=0,095$).

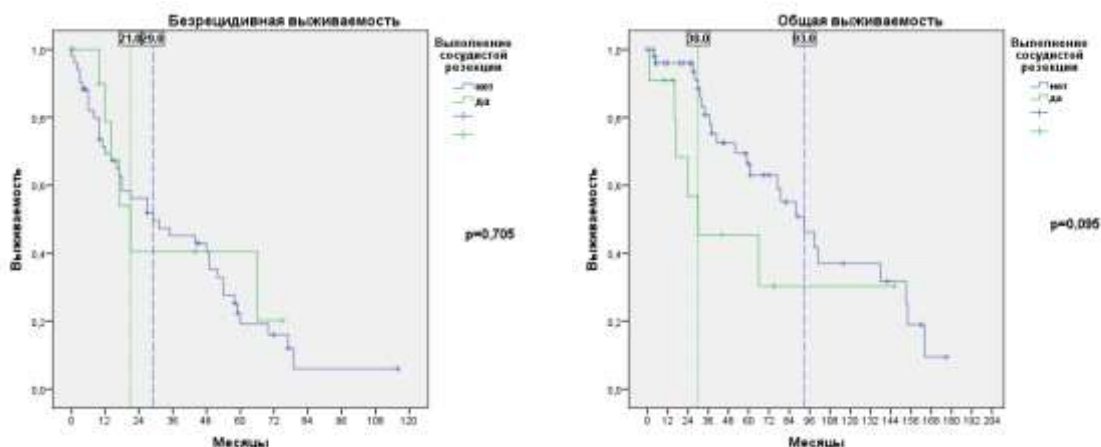


Рисунок 8 — Общая и безрецидивная выживаемость в зависимости от выполнения сосудистой резекции

При сравнении групп больных с разным типом прогрессирования заболевания было выявлено, что наихудший прогноз отмечается у пациентов с комбинированным типом рецидива заболевания, когда синхронно определялся рецидив в области ранее выполненной операции и отдалённые метастазы (Рисунок 9). Медиана общей выживаемости в таком случае составляла 30 месяцев, что было значимо меньше по сравнению с медианой общей выживаемости при развитии только локального рецидива (медиана равна 66 месяцам, $p=0,013$) или в случае прогрессирования заболевания в виде метастазов в лёгких или печени (медиана равна 99 месяца, $p=0,047$). При этом важно отметить, что достоверной разницы между медианами общей выживаемости в группах больных, у которых развился локальный рецидив заболевания или отдалённые метастазы в лёгких или печени получено не было ($p=0,548$).

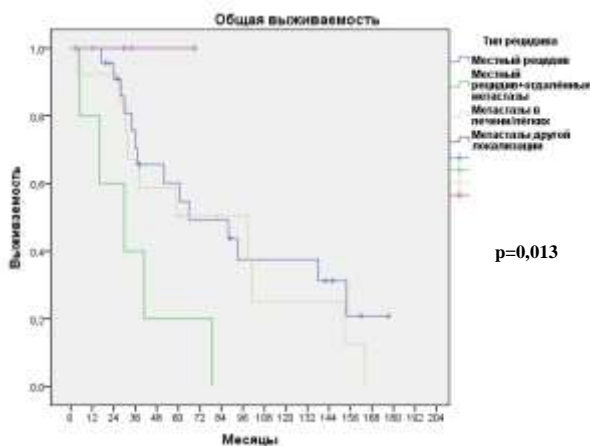


Рисунок 9 — Общая выживаемость в зависимости от типа прогрессирования заболевания

Также было проанализировано влияние размеров первичной опухоли на показатели общей и безрецидивной выживаемости. Разделение больных было проведено на три подгруппы: размеры опухоли менее 10 см, в пределах 10-19 см или 20 см и более. Нами не было выявлено статистически значимых различий в общей ($p=0,581$) и безрецидивной выживаемости ($p=0,555$) при анализе пациентов, имеющих опухоль размерами менее 10 см, в пределах 10-19 см или 20 см и более (Рисунок 10).

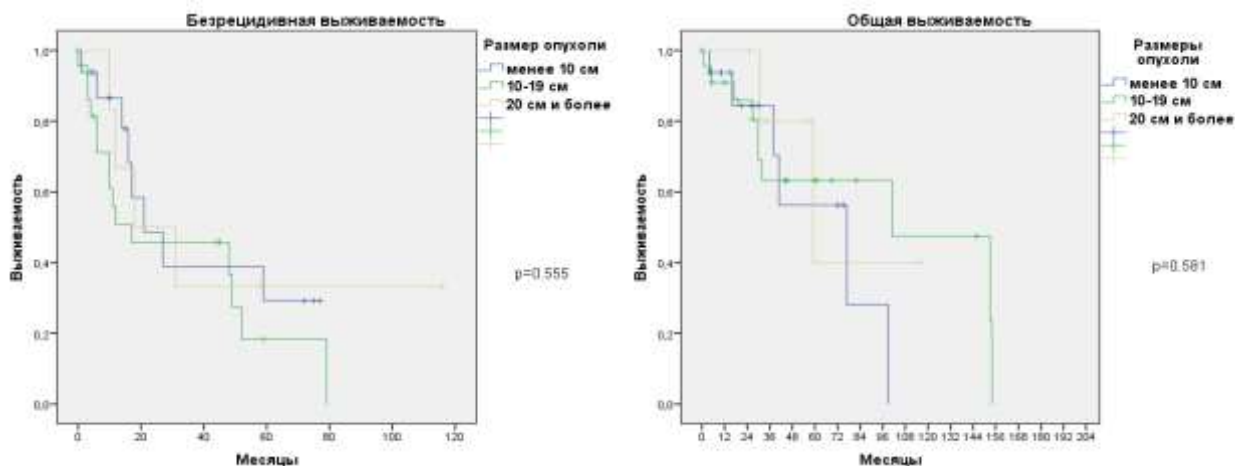


Рисунок 10 — Общая и безрецидивная выживаемость в зависимости от размеров первичной опухоли

Нами также было проведено сравнение отдалённых результатов лечения между группами больных, которые после операции по поводу первичной опухоли оставались под наблюдением или получали курсы адъювантной химиотерапии. Сравнение кривых общей и безрецидивной выживаемости представлено на рисунке 11.

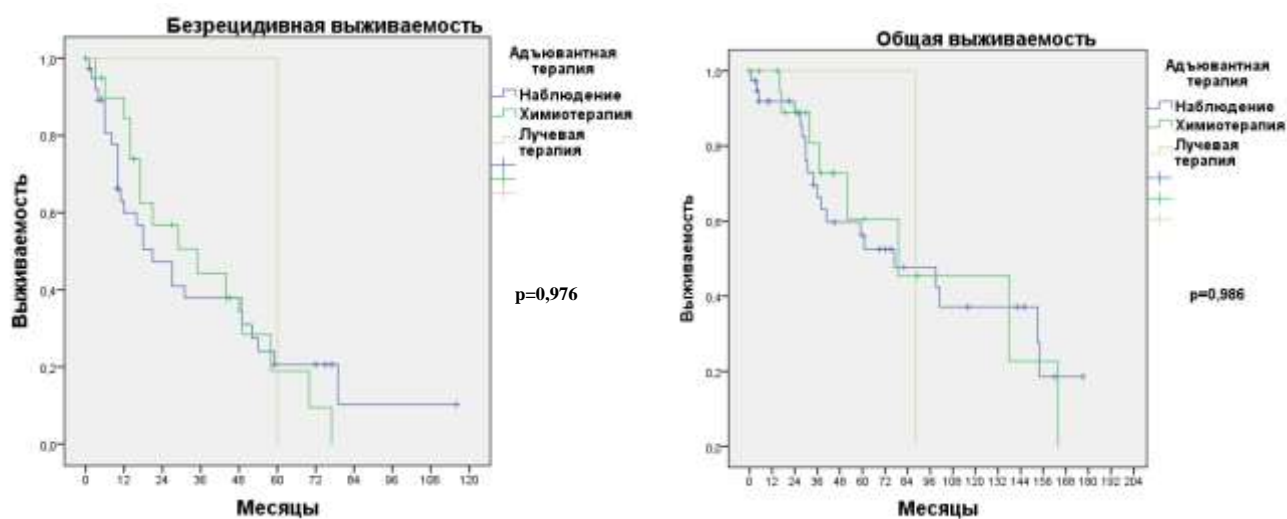


Рисунок 11 — Влияние адъювантной химиотерапии на безрецидивную выживаемость

Таким образом, было выявлено, что проведение адъювантной терапии не влияло значимо на безрецидивную выживаемость ($p=0,976$), общую выживаемость ($p=0,986$) и тип прогрессирования заболевания (местный рецидив/отдалённые метастазы/мультифокальное прогрессирование) ($p=0,981$).

Клинико-морфологические факторы прогноза

Определение клинико-морфологических факторов прогноза, влияющих на общую выживаемость, проводилось с помощью регрессионного анализа Кокса.

Изначально был проведён однофакторный анализ с пошаговым включением всех факторов, указанных выше. Результаты однофакторного анализа пропорциональных рисков по Коксу представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Результаты однофакторного анализа прогностической значимости клинико-морфологических факторов после хирургического лечения первичных забрюшинных лейомиосарком

Факторы	p	Отношение рисков	ДИ 95,0%	
			Нижняя граница	Верхняя граница
Возраст	,009	1,035	1,008	1,061
Пол	,091	,467	,193	1,128
Наличие симптомов	,696	,836	,340	2,053
Размер опухоли	,351	,996	,988	1,004
Степень злокачественности (Grade 3 по сравнению с Grade 2)	<u>,023</u>	<u>2,608</u>	1,144	5,945
Индекс Ki-67	,462	1,014	,977	1,052
Проведение неоадъювантной терапии	0,251	1,886	0,638	5,580
Проведение адъювантной терапии	,251	1,886	,638	5,580
Радикальная операция (R0)	<u>,028</u>	<u>,108</u>	,010	1,216
Комбинированная операция	,274	1,535	,713	3,305
Операция с сосудистой резекцией	,103	2,138	,857	5,331
Проведение адъювантной терапии	,986	,994	,496	1,992

Как видно из таблицы, достоверное прогностическое значение имели только фактор радикально выполненной операции и степень злокачественности опухоли. Помимо этого, риск повышен при выполнении комбинированных вмешательств, в т.ч. с сосудистой резекцией, однако статистически достоверных различий не получено.

При многофакторном анализе было подтверждено достоверное влияния на общую выживаемость радикального характера операции ($p < 0,001$) и степени злокачественности опухоли ($p = 0,023$; Таблица 2).

Таблица 2 — Многофакторный анализ: клиничко-морфологические факторы прогноза после хирургического лечения первичных забрюшинных лейомиосарком

	р	Отношение рисков	ДИ 95,0%	
			Нижняя граница	Верхняя граница
Радикальная операция (R0)	<u><0,001</u>	<u>,020</u>	,003	,112
Степень злокачественности (Grade 3 по сравнению с Grade 2)	<u>0,023</u>	<u>2,809</u>	1,154	6,836

Таким образом, из клиничко-морфологических факторов достоверное прогностическое значение имели только радикальность операции и степень злокачественности опухоли.

Молекулярно-генетические характеристики забрюшинных лейомиосарком

Частота экспрессии PD-L1 и её прогностическая значимость

Оценка экспрессии PD-L1 выполнена на 45 опухолевых образцах у 41 пациента (в 4 случаях анализ PD-L1 статуса был проведён и в первичной опухоли, и в метастазе). На основании PD-L1-статуса больные были разделены на 2 группы - с отсутствием или наличием экспрессии PD-L1 (PD-L1 < 1% клеток и PD-L1 > 1% клеток) - для оценки её клинической значимости. Пациенты были сопоставимы по клиничко-морфологическим характеристикам за исключением индекса пролиферации Ki-67, который был достоверно выше у больных с экспрессией PD-L1 ($p = 0,02$). Из 41 обследованного пациента у 10 (24%) был определён PD-L1-положительный статус (уровень экспрессии составил от 3% до 50%). Степень экспрессии в 7 случаях составляла от 3% до 15%, в 2 случаях – 30%, и в одном случае - 50%.

Медиана безрецидивной выживаемости среди больных с опухолями 2 степени злокачественности при отсутствии или наличии экспрессии PD-L1 составила 27,6 месяца и 17,5 месяца соответственно, однако различия не были статистически значимыми ($p = 0,88$). Медиана общей выживаемости среди больных с экспрессией PD-L1 была достоверно ниже и составила 30 месяцев по сравнению со 105 месяцами среди больных, у которых экспрессия PD-L1 отсутствовала ($p = 0,043$) (Таблица 3, Рисунок 12).

У пациентов с опухолью 3 степени злокачественности медиана безрецидивной выживаемости составила 15,8 месяцев при отсутствии экспрессии PD-L1 и 19,5 месяцев при положительном PD-L1-статусе ($p = 0,47$). Медиана общей выживаемости составила 31 и 61,2 месяца соответственно ($p = 0,11$) (Таблица 3, Рисунок 13).

Таблица 3 — Общая и безрецидивная выживаемость у больных с лейомиосаркомой 2 и 3 степени злокачественности в зависимости от PD-L1-статуса

Степень злокачественности опухоли (grade)	Экспрессия PD-L1	n	Медиана БРВ	p	Медиана ОВ	p
2	<1%	12	27,6	0.88	<u>105</u>	0.043
	≥1%	4	17,5		<u>30</u>	
3	<1%	17	15,8	0.47	31	0.11
	≥1%	6	19,5		61.2	
Суммарно	<1%	31	18	0.802	78	0.62
	≥1%	10	19		60	

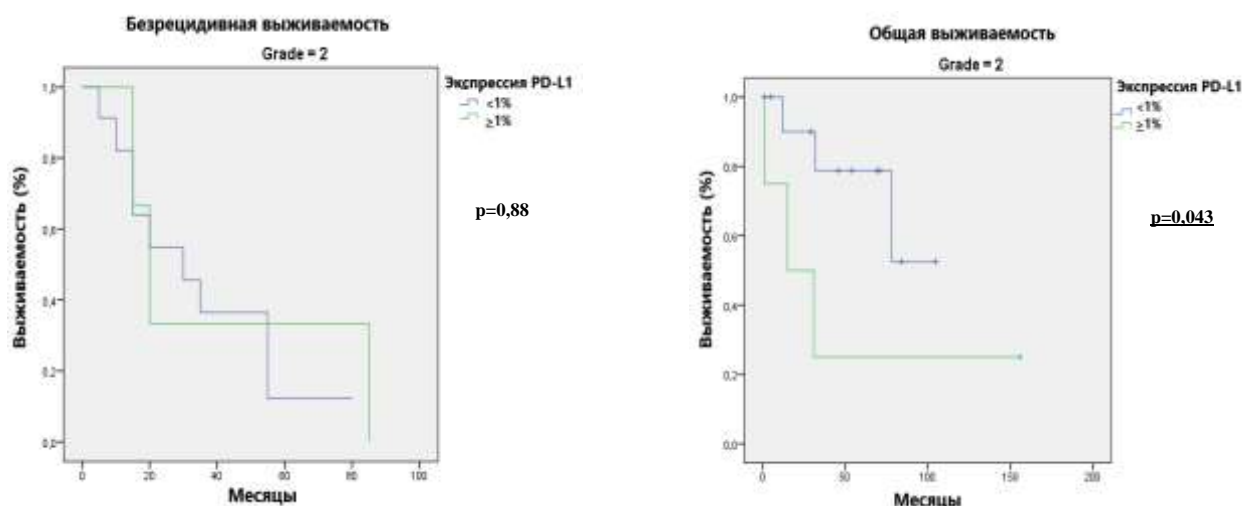


Рисунок 12 — Общая и безрецидивная выживаемость у больных с опухолями 2 степени злокачественности в зависимости от PD-L1-статуса

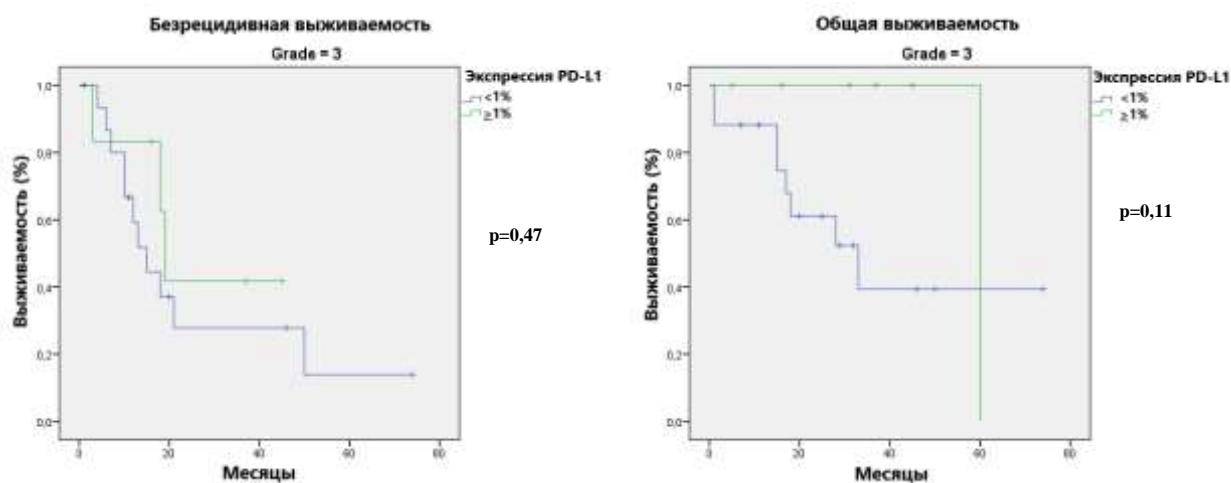


Рисунок 13 — Общая и безрецидивная выживаемость у больных с опухолями 3 степени злокачественности в зависимости от PD-L1-статуса

Статус микросателлитной нестабильности

Оценка статуса микросателлитной нестабильности проведена у 41 больного. В большинстве случаев – 97,6% (40/41) – лейомиосаркомы были представлены опухолями со стабильной системой репарации (microsatellite stable, MSS). В 1 случае из 41 (2,4%) и первичная опухоль и метастатический очаг были нестабильными по маркёру NR21 (Рисунок 14), что позволило определить их статус микросателлитной нестабильности как низкий (MSI-low, MSI-L). При этом у данной пациентки отмечен различный уровень экспрессии PD-L1 в первичной опухоли (0%) и метастатическом очаге (15%). Изначально данная пациентка была прооперирована по поводу лейомиосаркомы G3 размерами 25 см; адъювантная терапия не проводилась. Безрецидивный период составил 19 месяцев, после чего было отмечено прогрессирование в виде появления двух метастатических очагов в печени, неоднократно подвергнутых сеансам радиочастотной абляции. Через 60 месяцев пациентка скончалась от прогрессирования заболевания.

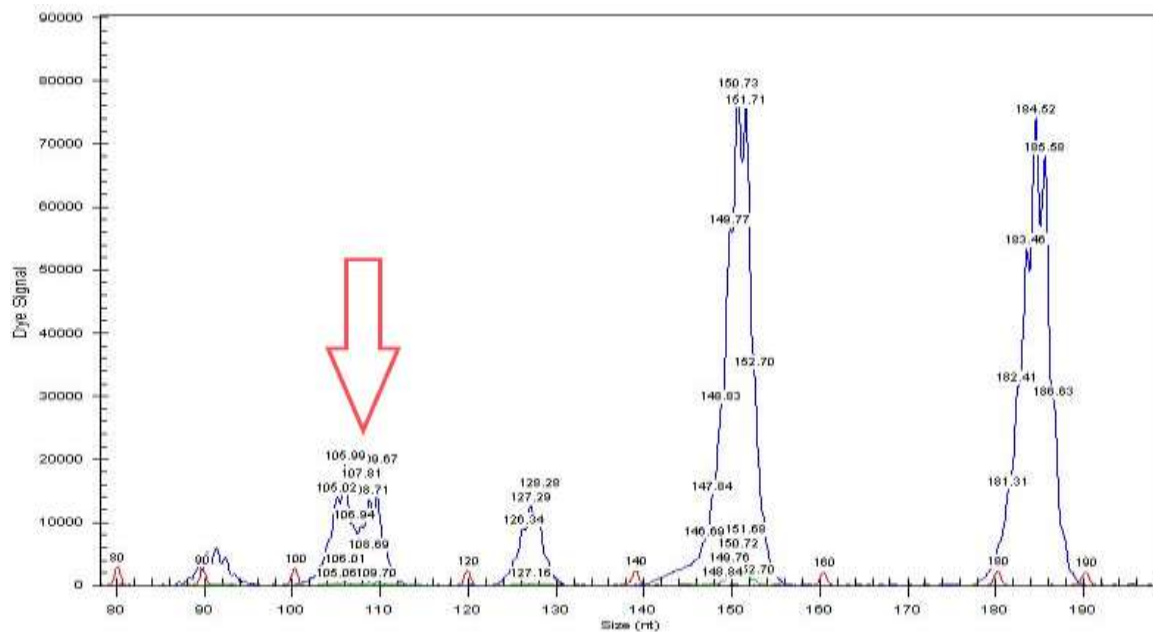


Рисунок 14 — Результаты фрагментного анализа опухоли с микросателлитной нестабильностью низкого уровня (MSI-L). Маркёр NR21 имеет два фрагмента разной длины

Опухолей с высоким уровнем MSI (MSI-H) в нашей выборке больных выявлено не было.

Считается, что наличие микросателлитной нестабильности – редкое явление среди мягкотканых сарком. В опубликованных в литературе исследованиях анализу подвергались гетерогенные группы больных с различными гистологическими формами мягкотканых сарком. Таким образом, насколько известно из доступных источников, проведённый в данной работе анализ частоты микросателлитно-нестабильных опухолей является самым крупным среди больных с лейомиосаркомой. Тем не менее, наше исследование оставляет открытым вопрос о прогностической значимости MSI-статуса у больных с лейомиосаркомой.

Генетическое профилирование и генетические факторы прогноза

Исследование мутационного профиля проведено на опухолевых образцах 15 больных. По результатам таргетного секвенирования получен широкий спектр соматических мутаций в генах, вовлечённых в канцерогенез. В исследуемой популяции больных был выявлен 31 вариант однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП). Перечень выявленных мутаций и частота их встречаемости представлен в таблице 4.

С наибольшей частотой диагностировались мутации в генах ALK, PDGFRA, ERBB2 и EGFR (таблица 4). Реже встречались мутации в генах KIT, BRAF и KRAS.

Таблица 4 — Список выявленных мутаций в лейомиосаркомах и частота их встречаемости

Мутация	Частота	Мутация	Частота
ALK c.4472A>G, p.K1491R	47%	PDGFRA c.1701A>G (p.P567P)	100%
ALK c.2535T>C (p.G845G)	93%	PDGFRA c.1432T>C (p.S478P)	40%
ALK c.3036G>A (p.T1012T)	13%	PDGFRA c.1809G>A (p.A603A)	40%
EGFR c.2361G>A (p.Q787Q)	67%	PDGFRA c.2472C>T (p.V824V)	40%
EGFR c.474C>T (p.N158N)	73%	PDGFRA c.612T>C (p.N204N)	40%
EGFR c.1562G>A (p.R521K)	40%	PDGFRA c.939T>G (p.G313G)	47%
EGFR c.2982C>T (p.D994D)	20%	PDGFRA c.236G>A (p.G79D)	7%
EGFR c.1968C>T (p.H656H)	7%	PIK3CA c.3104C>T (p.A1035V)	7%
ERBB 2 c.1963A>G (p.I655V)	33%	PIK3CA c-76-14537C>G	27%
ERBB 2 c.3508C>G (p.P1170A)	80%	PIK3CA c-76-23509A>G	27%
ERBB3 c.1347T>C (p.I449I)	27%	PIK3CA c-77+8483C>T	20%
ERBB3 c.3355A>T (p.S1119C)	27%	KIT c.2362-77G>A	13%
ESR1 c.30T>C (p.S10S)	67%	KIT c.1638A>G (p.K546K)	7%
ESR1 c.1782G>A (p.T594T)	53%	KIT c.1383A>G (p.T461T)	7%
ESR1 c.1369+13777T>G	20%	BRAF c/1929A>G (p.G643G)	7%
		KRAS c.2626T>G	13%

Как видно из таблицы, у большинства больных исследуемой когорты были выявлены следующие синонимичные мутации: мутация p.P567P (с.1701A>G) в гене PDGFRA (частота встречаемости – 100%), мутация p.G845G (с.2535T>C) в гене ALK (частота встречаемости – 93%), мутация p.P1170A (с.3508C>G) в гене ERBB2 (частота встречаемости – 80%), мутация p.N158N (с.474C>T) в гене EGFR (частота встречаемости – 73%). Мутация с.1701A>G в гене PDGFRA была выявлена у 100% больных, в литературе сообщается о частоте данной мутации равной 99% согласно базе данных gnomAD. Отдельно необходимо отметить, что частота некоторых выявленных мутаций была значительно выше, чем в литературных данных. Так, например, частота мутации с.3508C>G в гене ERBB2 по литературным данным составляет 45%, в то время как в нашей группе больных данная мутация встречалась у 80% больных. Аналогично, в исследованной нами группе больных мутация с.2535T>C в гене ALK выявлена в 93% случаев, что было значительно выше по сравнению с опубликованной в литературе частотой 49%.

Среднее количество миссенс-мутаций у одного пациента составило 4. Результаты мутационного анализа представлены на рисунке 15.

Мутация	Номер случая														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ALK c.4472A>G, p.K1491R	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ALK c.2535T>C (p.G845G)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ALK c.3036G>A (p.T1012T)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
EGFR c.2361G>A (p.Q787Q)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
EGFR c.474C>T (p.N158N)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
EGFR c.1562G>A (p.R521K)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
EGFR c.2982C>T (p.D.994D)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
EGFR c.1968C>T (p.H656H)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ERBB 2 c.1963A>G (p.I655V)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ERBB 2 c.3508C>G (p.P1170A)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ERBB3 c.1347T>C (p.I449I)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ERBB3 c.3355A>T (p.S1119C)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ESR1 c.30T>C (p.S10S)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ESR1 c.1782G>A (p.T594T)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ESR1 c.1369+1377T>G	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
PDGFRA c.1701A>G (p.P567P)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
PDGFRA c.1432T>C (p.S478P)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
PDGFRA c.1809G>A (p.A603A)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
PDGFRA c.2472C>T (p.V824V)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
PDGFRA c.612T>C (p.N204N)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
PDGFRA c.939T>G (p.G313G)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
PDGFRA c.236G>A (p.G79D)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
PIK3CA c.3104C>T (p.A1035V)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
PIK3CA c-76-14537C>G	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
PIK3CA c-76-23509A>G	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
PIK3CA c-77+8483C>T	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
KIT c.2362-77G>A	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
KIT c.1638A>G (p.K546K)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
KIT c.1383A>G (p.T461T)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
BRAF c/1929A>G (p.G643G)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
KRAS c.2626T>G	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Рисунок 15 — Профиль мутаций в забрюшинных лейомиосаркомах

При определении мутационного профиля забрюшинных лейомиосарком было отмечено, что характерной особенностью является кластерное распределение соматических мутаций в

гене PDGFRA в группе пациентов, а именно мутаций с.1701A>G, с.1432T>C, с.1809G>A, с.2472C>T, с.612T>C и с.939T>G.

Среди исследованной группы больных была выявлена редкая мутация A1035V в гене PIK3CA, которая зарегистрирована в базе данных COSMIC как высокопатогенный и клинически значимый вариант. У пациента с данной мутацией в ранние сроки после радикальной операции (безрецидивный период - 3 месяца) было отмечено прогрессирование заболевания в виде локального рецидива опухоли и появления метастазов в лёгких, проводилась симптоматическая терапия. Спустя 6 месяцев после оперативного вмешательства пациент скончался от прогрессирования заболевания. Важно отметить, что у пациентов с аналогичной стадией заболевания и диким типом гена PIK3CA медиана безрецидивной выживаемости равна 27 месяцам, а медиана общей выживаемости 79 месяцам, что значительно превышает данный показатель у пациентов с mtPIK3CA.

Общая и безрецидивная выживаемость в зависимости от статуса генов

PIK3CA и PDGFRA

Определение генетических факторов прогноза, влияющих на общую выживаемость, проводилось с помощью регрессионного анализа Кокса. Результаты однофакторного анализа пропорциональных рисков по Кокс представлены в таблице 5. При анализе влияния выявленных мутаций на общую и безрецидивную выживаемость было выявлено, что общая выживаемость была достоверно хуже у больных, имеющих мутации в гене PIK3CA и PDGFRA. Помимо этого, мутация A1035V в гене PIK3CA также была ассоциирована с достоверно более низкой безрецидивной выживаемостью ($p=0,019$).

Таблица 5 — Влияние мутаций на безрецидивную и общую выживаемость (показатели отношения рисков)

Ген	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Отношение рисков по БРВ (95% ДИ)	Значимость (p)	Отношение рисков по ОБ (95% ДИ)	Значимость (p)
PIK3CA	с.3104C>T	р.А1035V	12,0 (0,751-191,85)	0,019	12,49 (0,781-199,795)	0,022
	с.76-23509A>G	н.д.	1,176 (0,236-5,867)	0,841	6,668 (1,074-41,399)	0,020
	с.77+8483C>T	н.д.	2,812 (0,541-14,612)	0,193	5064,997 (0-8,64*10 ¹⁰)	<0,001
PDGFRA	с.612T>C	р.N204N	0,727 (0,2-2,618)	0,622	57,898 (0,108-3*10 ⁴)	0,005

Таким образом, полученные нами данные обосновывают внедрение молекулярно-генетического тестирования соматических мутаций в генах PIK3CA и PDGFRA при лейомиосаркомах с целью прогнозирования течения болезни и персонализации лечения.

ВЫВОДЫ

1. Забрюшинные неорганные лейомиосаркомы чаще возникают у женщин (82% случаев). Средний возраст пациентов на момент постановки диагноза составил 52 года. Бессимптомное начало заболевания было отмечено у 28,1% больных (18/64). Средний размер опухоли составил 10,5 см.

2. Местный рецидив при забрюшинных неорганных лейомиосаркомах был наиболее частой формой прогрессирования заболевания (39% случаев). В подавляющем большинстве случаев отдалённые метастазы возникают в печени или лёгких (20% случаев). Комбинированный характер рецидива (местный рецидив и отдалённые метастазы) развивался в 8% случаев.

3. Медиана безрецидивной выживаемости после выполнения операции по поводу первичной опухоли составила 27 месяцев, 3-летняя и 5-летняя безрецидивная выживаемость – 43% и 21% соответственно. Медиана общей выживаемости после выполнения операции по поводу первичной опухоли составила 79 месяцев, 3-летняя и 5-летняя общая выживаемость – 73% и 59% соответственно.

4. Радикально выполненная операция (R0) – наиболее оптимальный объем вмешательства. Выполнение резекции смежных органов или магистральных сосудов не приводило к снижению показателей безрецидивной выживаемости и общей выживаемости. С каждым последующим рецидивом заболевания возможность выполнить радикальную операцию снижается, но, тем не менее, хирургическое лечение должно быть направлено исключительно на оперативное пособие в объёме R0.

5. Наиболее значимыми факторами прогноза у больных с забрюшинной лейомиосаркомой является степень злокачественности опухоли и радикальность выполненной операции. Размер опухоли в нашем исследовании не влиял на отдалённые результаты лечения и возможность выполнения радикальной операции.

6. Частота экспрессии PD-L1 среди больных с забрюшинными лейомиосаркомами составила 24%. У больных с опухолью 2 степени злокачественности наличие экспрессии PD-L1 связано с достоверным ухудшением общей выживаемости ($p=0.043$). Положительную экспрессию PD-L1 у больных забрюшинными лейомиосаркомами следует рассматривать как прогностический маркёр и потенциальную терапевтическую мишень при использовании иммунотерапевтических препаратов.

7. Микросателлитная нестабильность (MSI-low статус) определена в 2,4% случаев, опухолей с высоким уровнем микросателлитной нестабильности (MSI-H) не было выявлено.

8. Общая выживаемость была достоверно ниже при наличии соматических мутаций в гене PIK3CA ($p < 0,05$) и гене PDGFRA ($p = 0,005$). Мутация A1035V в гене PIK3CA также была ассоциирована с достоверно более низкой безрецидивной выживаемостью ($p = 0,019$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Хирургическое лечение по поводу забрюшинной лейомиосаркомы должно носить максимально радикальный характер, в том числе с выполнением резекции смежных органов или магистральных сосудов.

2. Большие размеры опухоли или трудная локализация опухоли не должны сами по себе являться противопоказаниями к хирургическому лечению.

3. Определение соматических мутаций в гене PIK3CA (A1035V, с.76-23509A>G и с.77+8483C>T), а также мутации N204N в гене PDGFRA позволит определять больных с неблагоприятным прогнозом и последующим дифференцированным выбором лекарственной терапии.

4. Наличие экспрессии PD-L1 у определенной части больных с забрюшинными лейомиосаркомами можно рассматривать как потенциальную мишень для проведения иммунотерапии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Бугаёв, В.Е. Прогностическая значимость экспрессии PD-L1 и оценка статуса микросателлитной нестабильности у пациентов с забрюшинными неорганными лейомиосаркомами / В.Е. Бугаёв, М.П. Никулин, Н.И. Поспехова, В.М. Сафронова, Н.В. Кокосадзе, Я.А. Божченко, С.Н. Неред, Л.Н. Любченко, И.С. Стилиди // Успехи молекулярной онкологии. — 2019. — Т.6. — № 3. — С. 37–48.

2. Бугаёв, В.Е. Результаты хирургического лечения больных забрюшинной неорганической лейомиосаркомой / В.Е. Бугаёв, М.П. Никулин, С.Н. Неред, Л.Н. Любченко, И.С. Стилиди // Современная онкология. — 2019. — Т.21. — №4. — С. 27–34