

УДК 616.37-006.6-036:577.2.088

*Е.В. Степанова, И.А. Файнштейн***ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ
ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМАХ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ***РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация***Степанова Евгения Владиславовна, д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории НИИ ЭДнТО***Адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24; **тел.** +7(495)324-10-65**e-mail:** e_stepanova@nm.ru

Статья поступила 15.02.2011., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

Цель исследования – изучить различия в экспрессии молекулярно-биологических маркеров при аденокарциномах ПЖЖ различной локализации. Иммуногистохимическим методом на парафиновых блоках, полученных от 53 больных, изучали экспрессию 7 молекулярно-биологических маркеров. Для аденокарциномы головки ПЖЖ характерна высокая экспрессия в опухолевых клетках ангиогенных факторов ТФ (77,3 %) и VEGF (59,1 %), тогда как для аденокарцином, локализованных в теле и хвосте ПЖЖ, характерна высокая пролиферативная активность опухоли (52,6 %), высокая частота экспрессии ЦОГ-2 (68,4 %) и ТФ (57,9 %). Среди молекулярно-биологических маркеров только экспрессия Bcl-2 показала прогностическую значимость. Ни один из Bcl-2⁻ больных не прожил более 1 года, тогда как среди Bcl-2⁺ пациентов таких больных оказалось 50 %. Медиана общей выживаемости для Bcl-2⁻ больных составила 5±2 мес., а для Bcl-2⁺ – 12±4 мес. (p=0,069). Дальнейшие исследования по оценке роли молекулярно-биологических маркеров у больных раком ПЖЖ являются перспективными для оптимизации тактики лечения пациентов и выбора рациональной терапии.

Ключевые слова: рак поджелудочной железы, молекулярно-биологические маркеры, прогноз течения болезни.*E.V. Stepanova, I.A. Fanshtein***EXPRESSION OF BIOMOLECULAR MARKERS
IN PANCREATIC ADENOCARCINOMA***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

Pancreatic adenocarcinoma is generally considered to be incurable by available treatment modalities with a 5-year survival rate of less than 4 %. Existing biomarkers are often inadequate. This article focuses on identification of biomarkers depending on the localization of cancer in pancreas. 53 patients were enrolled in this study. The high expression of angiogenic factors including TP (77,3 %) and VEGF (59,1 %) was observed in head of pancreas. The high proliferative activity of tumor (52,6 %) was the feature of piece and tail of pancreatic adenocarcinoma. In this region, we have also observed the high expression COX-2 (68,4 %) and TP (57,9 %). Among the tested biomarkers the expression of Bcl-2 was of prognostic significance. 50 % of Bcl-2⁺ patients passed one year survival. The median of survival for Bcl-2⁻ patients was 5±2 months, for Bcl-2⁺ patients – 12±4 months (p=0,069). Based on data obtained, we conclude that the expression of these and other biomarkers will be valid to optimize the treatment of patients with pancreatic adenocarcinoma of different cancer localization.

Key words: pancreatic adenocarcinoma, biomarkers, disease prognosis.**Введение**

Аденокарциномы поджелудочной железы относятся к группе опухолей плохого прогноза с 5-летней выживаемостью менее 3 % [3]. В настоящее время только полная хирургическая резекция рака поджелудочной железы является оптимальным лечением. Химиотерапия и лучевая терапия являются малоэффективными. Актуальность поисков дополнительных критериев злокачественности опухолей и прогностических факторов несомненна.

Современные наиболее значимые достижения в лечении различных злокачественных опухолей связаны с пониманием молекулярно-биологических изменений. Различия в экспрессии определенных маркеров могут объяснить, почему сравнимые по распространенности и гистологической структуре опухоли различаются по агрессивности течения заболевания. Изучение изменений в экспрессии молекулярно-биологических маркеров позволит выявить новые диагностические и прогностические факторы

для постановки раннего диагноза, оценки риска возникновения рецидивов и метастазов, назначения рациональных режимов комбинированной терапии и препаратов направленного действия [4; 7]. Особое внимание исследователей привлекает возможность получить сведения о нарушениях механизмов пролиферации, апоптоза и ангиогенеза в опухоли.

Регуляция апоптоза является комплексным многоступенчатым процессом, в который вовлечены большое количество белков. Ключевыми являются p53 и семейство белков Bcl. Белок p53 получил образное название «стража генома» [6]. Мутации p53 приводят к нечувствительности к ингибирующим рост сигналам, ослаблению чувствительности к апоптозу, генетической нестабильности. Кроме того, мутированный p53 может участвовать в блокировании клеточной дифференцировки, стимуляции ангиогенеза, иммортализации, увеличении инвазивных свойств клетки. В большинстве случаев мутации p53 можно определить по накоплению белка в ядрах опухолевых клеток.

Семейство белков Bcl-2 (Bcl-2, Bax, Bcl-x и другие) играет ключевую роль при запуске гибели клетки [8]. Различная экспрессия белков семейства Bcl-2 позволяет очень тонко регулировать апоптоз, запускаемый разнообразными вне- и внутриклеточными сигналами в различных типах тканей.

Ангиогенез – формирование сети капилляров из эндотелиальных клеток, выстилающих мелкие вены – необходимое условие для дальнейшего роста опухолевого узелка, достигшего в диаметре 1–2 мм² [2]. Прорастание новых микрососудов является необходимым процессом, способствующим росту опухоли, а также увеличивающим ее метастатические способности. Ангиогенная активность опухоли обусловлена сложным балансом между ангиогенными стимулами и природными ингибиторами ангиогенеза. В опухолях находят повышенный уровень стимуляторов ангиогенеза (VEGF, тимидин фосфоорилаза, циклооксигеназа-2 (ЦОГ-2) и др.), тогда как уровень эндогенных ингибиторов (тромбоспондин 1, ангиостатин, эндостатин и др.) снижен [5].

Цель исследования – изучить различия в экспрессии молекулярно-биологических маркеров при аденокарциномах ПЖЖ различной локализации.

Материалы и методы

В исследование включены данные о 53 больных раком ПЖЖ, получавших хирургическое лечение в отделении радиохирургии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в период с 1993 по 2006 г. Из них 28 мужчин и 25 женщин. Средний возраст больных составил 58,6±9 лет (42÷77 лет). Опухоль локализовалась либо в головке ПЖЖ (54,7 % больных), либо в теле и/или хвосте ПЖЖ (45,3 % больных). Всем больным было проведено хирургическое удаление первичной опухоли. У всех больных диагноз рак ПЖЖ был подтвержден гистологическим исследованием опухоли. Оценивались также размеры опухоли, гистологический тип, степень злокачественности, количество пораженных аксиллярных лимфоузлов и другие параметры.

I стадия заболевания выявлена у 3,7 % пациентов, II – у 20,8 %, III – 15,1 %, IV – у 41,5 %. При этом аденокарцинома была диагностирована у большинства больных – в 77,4 % (41 человек) случаев, а нейроэндокринный рак – у 11,3 % пациентов, гистологический тип опухоли не был определен у 6 больных. Большинство имели умеренную степень дифференцировки опухоли (37,7 % больных). Дополнительного адъювантного химиотерапевтического лечения больным не проводилось.

Иммуногистохимическое исследование

В качестве первичных антител использовали МКА к Ki-67 (клон KiS5, разведение 1:50, DAKO Corp, Дания), p53 (клон DO7, разведение 1:200, DAKO Corp), Bcl-2 (клон 124, разведение 1:50, DAKO Corp), ТФ (клон Ab-1, разведение 1:500, Oncogene Research Products, США), VEGF (клон A-3, разведение 1:1000, Santa Cruz Biotech), ЦОГ-2 (клон, разведение 1:300, Santa Cruz Biotech, США) и кроличьи поликлональные антитела к Bax (разведение 1:500, DAKO Corp).

Иммуногистохимическое исследование проводили по стандартной методике. Для выявления антигенных детерминант проводили обработку срезов в 10 мМ цитратном буфере, pH 6,0 (DAKO Corp) в течение 30 мин при 95 °С. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение ночи при 4 °С. Для визуализации реакции антиген-

антитело использовали стрептавидин-биотиновую тест-систему LSAB+kit (DAKO Corp). Хромогеном служил ДАБ+ (DAKO Corp). Срезы докрашивали гематоксилином и заключали в полимерную среду.

В исследовании применяли следующие критерии результатов:

- 1) опухоль считали положительной по p53, Bcl-2, Bax, ЦОГ-2 или VEGF, если в ткани опухоли было окрашено более 25 % опухолевых клеток;
- 2) опухоль оценивали как положительную по ТФ, если более 5 % опухолевых клеток имели среднее окрашивание;
- 3) для оценки пролиферативной активности опухоли подсчитывали количество Ki-67⁺ опухолевых клеток, приходящиеся на 200–300 опухолевых клеток; индекс Ki-67 определяли по формуле:

$$Ki-67 = \frac{\text{число Ki-67}^+ \text{ клеток} \times 100}{\text{общее количество клеток}}$$

Опухоль оценивали как низкой пролиферативной активности при индексе Ki-67≤10 %, и высокой пролиферативной активности при индексе Ki-67>10 %.

Статистический анализ проводили на персональном компьютере с использованием программы «SPSS» (v 9.0. for Windows 2001).

Для проверки достоверности различий значений признаков в группах использовали тесты «хи-квадрат» (χ²) и точный критерий Фишера. Различия считались статистически достоверными при p<0,05 (95 % точности).

Результаты и обсуждение

Данные об экспрессии молекулярно-биологических маркеров при раке ПЖЖ приведены в табл. Средняя пролиферативная активность опухолей составила 24±28. Все опухоли были разделены на две группы:

- опухоли высокой пролиферативной активности (индекс Ki-67≥25%) – 30,2 % больных;
- опухоли низкой пролиферативной активности (индекс Ki-67<25 %) – 69,8 % больных.

Накопление p53 в ядрах опухолевых клеток, что по данным литературы коррелирует с наличием мутаций в гене, наблюдалось в 11 (20,8 %) случаях РПЖЖ. Экспрессия маркеров апоптоза Bcl-2 (ингибитора) и Bax (индуктора) выявлена у 9 (17,0 %) и 10 (18,9 %) больных соответственно.

Обнаружена высокая экспрессия ангиогенных факторов в опухолях ПЖЖ:

- экспрессия VEGF – в 23 (43,4 %) случаях;
- ТФ – в 31 (58,5 %);
- ЦОГ-2 – в 29 (54,7 %) случаях.

Экспрессия всех трех стимуляторов ангиогенеза отсутствовала только у 10 (18,9 %) больных, у 11 (20,6 %) больных наблюдалась экспрессия всех трех стимуляторов. Проанализирована экспрессия молекулярно-биологических маркеров в зависимости от локализации опухоли.

Для аденокарциномы головки ПЖЖ в опухолевых клетках характерна высокая экспрессия ангиогенных факторов ТФ (77,3 %) и VEGF (59,1 %), тогда как для аденокарцином, локализованных в теле и хвосте ПЖЖ, характерна высокая пролиферативная активность опухоли (52,6 %), высокая частота экспрессии ЦОГ-2 (68,4 %) и ТФ (57,9 %).

Проведенный статистический анализ показал различия в экспрессии маркеров среди опухолей различных локализаций. Среди пациентов, страдающих аденокарциномами тела и хвоста ПЖЖ, 52,6 % больных имели ПИ выше 30 %, а среди страдающих опухолями головки органа – только 13,6 % ($p=0,017$). Накопление p53 было выше при опухолях головки ПЖЖ (36,6 %) по сравнению с таковым при опухолях тела и хвоста органа (10,5 %); $p=0,075$. Среди клинических характеристик прогностическую значимость показала степень распространенности опухоли ($p=0,019$). Так, среди больных стадии T₃ умерли 61,5 % больных (медиана времени смерти составила 12 мес., а стадии T₄ – умерли все больные (медиана времени – 5 мес.). Степень дифференцировки опухоли не оказывала статистически значимого влияния на выживаемость больных раком ПЖЖ. Среди молекулярно-биологических маркеров только экспрессия Bcl-2 показала прогностическую значимость (см. рис.).

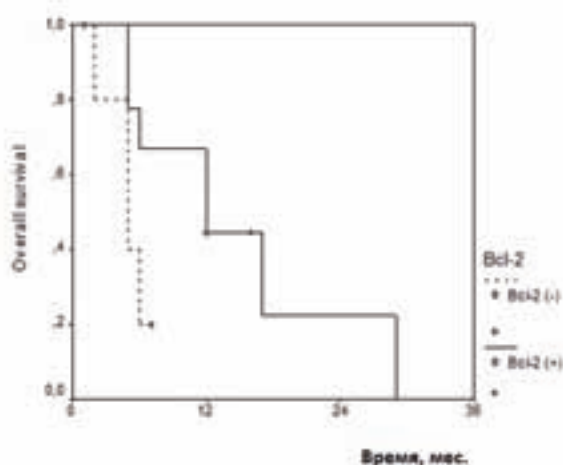


Рис. Зависимость общей выживаемости больных РПЖЖ от экспрессии Bcl-2 в первичной опухоли.

Ни один из Bcl-2⁻ больных не прожил более 1 года, тогда как среди положительных случаев – таких больных оказалось 50%. Медиана общей выживаемости для Bcl-2⁻ больных составила 5±2 мес., а для Bcl-2⁺ больных – 12±4 мес. ($p=0,069$).

Таким образом, проведенное исследование показало, что при аденокарциномах ПЖЖ встречается высокая экспрессия ТФ, VEGF и ЦОГ-2, что делает перспективным клиническое изучение их ингибиторов. ТФ является скоростью-лимитирующим ферментом активации Капецитабина.

Селективное накопление 5-ФУ в опухолевой ткани обеспечивается высокой активностью ТФ в опухолевых клетках по сравнению с клетками нормальных тканей. Экспрессия ТФ в нашем исследовании была обнаружена в 58,5 % случаев, что делает актуальным использование Капецитабина (Кселоды) у этой группы больных. Нами также обнаружены различия в экспрессии молекулярно-биологических маркеров (K-67 и p53) в опухолевых клетках аденокарцином, локализованных в головке или теле и хвосте ПЖЖ. Требуется проведение дополнительных исследований по изучению значимости данного феномена. В нашем исследовании показано, что Bcl-2 может являться благоприятным прогностическим фактором при аденокарциномах головки ПЖЖ. Требуется проведение дополнительных исследований по подтверждению прогностической роли Bcl-2 при аденокарциномах ПЖЖ. По другим данным экспрессия Bcl-2 не связана с прогнозом течения болезни [1]. При этом в хорошо дифференцированных опухолях (G1 степень) экспрессия Bcl-2 встречается чаще, чем в низкодифференцированных.

Заключение

Дальнейшие исследования по оценке роли молекулярно-биологических маркеров у больных раком ПЖЖ являются перспективными для оптимизации тактики лечения пациентов и выбора рациональной терапии.

Т а б л и ц а

Экспрессия молекулярно-биологических маркеров при раке ПЖЖ различной локализации

Маркер	Экспрессия маркеров в группе, n (%)		
	Общая группа	Рак головки	Рак тела и хвоста
Ki67			
отриц	28 (68,3)	19 (86,4)	9 (47,4)
полож	13 (58,5)	3 (13,6)	10 (52,6)
P53			
отриц	31 (75,6)	14 (63,4)	17 (89,5)
полож	10 (24,4)	8 (36,6)	2 (10,5)
Bcl			
отриц	34 (82,9)	17 (77,3)	17 (89,5)
полож	7 (17,1)	5 (22,7)	2 (10,5)
Vax			
отриц	32 (78,0)	15 (68,2)	17 (89,5)
полож	9 (22,0)	7 (31,8)	2 (10,5)
ТФ			
отриц	13 (31,7)	5 (22,7)	8 (42,1)
полож	28 (68,3)	17 (77,3)	11 (57,9)
ЦОГ2			
отриц	17 (41,5)	11 (50,0)	6 (31,6)
полож	24 (58,5)	11 (50,0)	13 (68,4)
VEGF			
отриц	22 (53,7)	9 (40,9)	13 (68,4)
полож	19 (46,3)	13 (59,1)	6 (31,6)

Литература

1. *Campani D., Esposito I., Boggi U. et al.* Bcl-2 expression in pancreas development and pancreatic cancer progression // *J Pathol.* – 2001. – 194(4). – P. 444–50.
2. *Folkman J.* Tumor angiogenesis. In *Cancer Medicine*, JF. Holland, RC.Bast, DL.Morton, E.Frei, DW.Kufe, RR.Weichselbaum, eds. – Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 1997. – P. 181–204.
3. *Jemal A., Murray T., Samuels A. et al.* Cancer Statistics // *CA Cancer J Clin.* – 2003. – 53. – P. 5–26.
4. *Jimeno A., Hidalgo M.* Molecular biomarkers: their increasing role in the diagnosis, characterization, and therapy guidance in pancreatic cancer. – *Mol Cancer Ther.* – 2006. – 5. – P. 787–96.
5. *Kuwahara K., Sasaki T., Kuwada Y. et al.* Expressions of angiogenic factors in pancreatic ductal carcinoma: a correlative study with clinicopathologic parameters and patient survival // *Pancreas.* – 2003. – 26(4). – P. 344–9.
6. *Lane D.P.* p53 and human cancers // *Br. Med. Bull.* – 1994. – 50. – P. 582–99.
7. *Mimeault M., Brand R.E., Sasson et al.* Recent advances on the molecular mechanisms involved in pancreatic cancer progression and therapies // *Pancreas.* – 2005. – 31. – P. 301–16.
8. *Reed J.C.* Bcl-2 and the regulation of programmed cell death // *J. Cell Biol.* – 1994. – 124. – P. 1–6.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН

