

УДК 616.33-006.6-08:575.224.088

Н.А. Шаназаров¹, А.Х. Сабиров¹, А.Г. Синяков², А.В. Симонов², Н.С. Райков², Е.В. Сидоров¹, О.С. Велижанина¹
**ЗНАЧИМОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ
В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА**

¹ГОУ ВПО «Тюменская государственная медицинская академия Росздрава»

²ГЛПУ ТО Областной онкологический диспансер, Тюмень

Контактная информация

Сабиров Ахат Халимович, доцент кафедры онкологии ГОУ ВПО «Тюменская государственная медицинская академия Росздрава»

адрес: 625039, Тюмень, 50 лет Октября, 47/2; тел.: +7(3452)41-09-36, моб.: +7(912)921-22-22

e-mail: sabirov58@mail.ru

Статья поступила: 20.10.2009, принята к печати 02.03.2010.

Резюме

В статье представлены результаты изучения частоты встречаемости молекулярно-генетических маркеров при раке желудка, частоты экспрессии общебиологических маркеров, характеризующих «поведение» опухолевой клетки, их корреляцию с агрессивностью опухоли и прогнозом. Изучены материалы о 54 первичных больных раком желудка. По результатам исследования следует, что мутационный статус по парафиновым образцам опухоли и плазме крови, уровни EGFRs и VEGFRs, индекс пролиферативной активности Ki-67 могут являться маркерами для оценки эффективности проводимой терапии и определения полноты излеченности больных РЖ специальными методами противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: рак желудка, общебиологические маркеры, мутационный статус, EGFR, VEGFR, Ki-67.

N.A. Shanazarov¹, A.Kh. Sabirov¹, A.G. Sinyakov², A.V. Simonov², N.S. Raikov², E.V. Sidiriv¹, O.S. Velizhanina¹

THE SIGNIFICANCE OF BIOMARKER IDENTIFICATION IN TREATMENT OF PATIENTS WITH STOMACH CANCER

¹The Tumen Medical State University

²The Region Cancer Center, Tumen

Abstract

In this study we have examined the expression of biomarkers associated with the «behavior» of cancer cell and also the stomach cancer specific marker expression. We have analyzed the correlation of above mentioned biomarkers with the aggressiveness of tumor and their possible prognostic significance. 54 patients with different stage of stomach cancer were enrolled in the study. Here we show that the level of EGFRs, VEGFRs and Ki-67 in blood plasma and their identification by immunohistochemical analysis on slides are essential marker to follow up the treatment of stomach cancer patients.

Key words: stomach cancer, biomarker, EGFR, VEGFR, Ki-67.

Введение

Несмотря на стабильное снижение заболеваемости, рак желудка по-прежнему остается актуальной проблемой современной онкологии [2]. Длительное время РЖ – ведущая причина в структуре смертности от онкологической патологии во всем мире [7].

В России ежегодно регистрируется около 38 000 новых случаев РЖ, причем более 54 % больных погибают в течение первого года [2; 7]. В Тюменской области заболеваемость РЖ за последние 10 лет снизилась с 20,3 до 17,5 на 100 000 населения; в 2008 г. выявлены 574 случая. Особое значение в настоящее время придается ранней диагностике и лечению РЖ, возможности предупредить прогрессирование заболевания [6]. При этом даже при наличии признаков метастазирования в регионарных лимфатических узлах показано радикальное оперативное вмешательство, в то время как при отдаленных метастазах оправданы лишь паллиативные операции, позволяющие улучшить качество жизни пациентов. Современные методы позволяют с высокой точностью определить наличие, степень распространения и уровень дифференцировки первичной опухоли, однако в настоящее время отсутствует достаточное количество методов для оценки полноты излеченности, раннего выявления отдаленных

метастазов [1; 5]. Таким образом, в ряду наиболее важных проблем онкологии представляется весьма актуальной задача изучения диагностической и прогностической значимости некоторых маркеров канцерогенеза: частоты выявления и определения уровней рецепторов EGFR, антигена Ki-67, определяемых иммуногистохимически и иммуносорбентным методами, и мутаций в некоторых онкогенах при развитии рака желудка у человека. Последние, наряду с другими онкогенами, супрессорными генами и секреторными белками, рассматриваются в качестве перспективных маркеров, характеризующих биологическое поведение опухоли и позволяющих индивидуализировать подходы к назначению терапии больным РЖ [4]. Однако, несмотря на довольно значительное количество исследований EGFR, VEGFR, антигена Ki-67 и мутаций в некоторых онкогенах, однозначного ответа на вопрос о значении этих онкомаркеров при развитии РЖ у человека до настоящего времени пока не получено [3]. В литературе практически не описана роль и значение свободнорастворимых в сыворотке крови форм рецепторов ростовых факторов в канцерогенезе РЖ. Исследование молекулярных механизмов пролиферативных (гиперпластических) процессов и поиск путей их фармакологической коррекции является одной из самых динамично развивающихся областей современной молекулярной медицины [1; 3; 4].

Таблица 1

Стадии РЖ у больных, включенных в исследование

Стадия	TNM-классификация	Количество больных
Iв	T ₂ N ₀ M ₀	4 (7,4 %),
II	T ₂ N ₁ M ₀ ,T ₃ N ₀ M ₀	10 (18,5 %),
IIIa	T ₂ N ₂ M ₀ ,T ₃ N ₁ M ₀	19 (35,2 %),
IIIв	T ₃ N ₂ M ₀	8 (14,8 %)
IV	T ₄ N ₁ M ₀ ,T ₄ N ₂ M ₀ , T ₄ N ₃ M ₀ ,T ₁₋₄ N ₀₋₃ M ₁	13 (24,1 %)
Всего		54 (100 %)

Таблица 2

Распределение больных с выявленными мутациями в различных генах в зависимости от степени дифференцировки опухоли в парафиновых образцах

Парафиновые образцы	ДНК		ВДА (n=10)	УДА (n=11)	НДА (n=33)	Всего (n=54)
	p53	5 экзон	2	3	6	11
		6 экзон	3	1	15	19
		7 экзон	6	7	26	39
		8 экзон	5	4	11	20
	C-kit		–	1	6	7
	B-raf		1	4	5	10
	APC		5	9	24	38
	K-ras		–	4	16	20
	E-cadherin		–	2	–	2
	p16		–	3	8	11
	Ki -67	>35 %	8	1	–	9
		>50 %	1	8	5	14
		>70 %	1	2	28	31

Таблица 3

Распределение больных в зависимости от экспрессии ростовых факторов EGFR и VEGFR и степени дифференцировки опухоли в сыворотке крови

Сыворотка	Маркер	Значение	ВДА (n=10)	УДА (n=11)	НДА (n=33)	Всего (n=54)
	EGFR (N = 0–9,5)	>9,5нг/мл	8	9	–	17
		>15 нг/мл	2	2	1	5
		>20 нг/мл	–	–	32	32
	VEGFR (N = 0–120)	>120 нг/мл	–	1	–	1
		>140 нг/мл	–	9	3	12
		>160 нг/мл	–	1	29	30

Таблица 4

Распределение больных с выявленными мутациями в различных генах в зависимости от степени дифференцировки опухоли в плазме крови

Плазма крови	ДНК		ВДА (n=10)	УДА (n=11)	НДА (n=33)	Всего (n=54)
	p53	5 экзон	2	2	4	8
		6 экзон	3	–	15	18
		7 экзон	6	7	26	39
		8 экзон	4	4	8	16
	C-kit		–	1	6	7
	B-raf		1	4	5	10
	APC		4	7	19	32
	K-ras		–	3	11	14
	E-cadherin		–	2	–	2
	p16		–	2	5	5

Таблица 5

Динамика количества мутаций в плазме крови при молекулярно-генетическом исследовании

Плазма крови	ДНК		До лечения			После лечения		
			ВДА (n=10)	УДА (n=11)	НДА (n=33)	ВДА (n=10)	УДА (n=11)	НДА (n=33)
	p53	5 экзон	2	2	4	–	–	2
		6 экзон	3	–	15	–	–	7
		7 экзон	6	7	26	–	1	11
		8 экзон	4	4	8	–	1	5
	C-kit		–	1	6	–	–	3
	B-raf		1	4	5	–	1	2
	APC		4	7	19	–	–	2
	K-ras		–	3	11	–	–	4
	E-cadherin		–	2	–	–	–	–
	p16		–	2	5	–	–	–

Таблица 6

Динамика экспрессии рецепторов ростовых факторов (EGFR и VEGFR) в сыворотке крови

Сыворотка	Маркер	Значение	До лечения			После лечения		
			ВДА (n=10)	УДА (n=11)	НДА (n=33)	ВДА (n=10)	УДА (n=11)	НДА (n=33)
	EGFR (n=0–9,5)	≥9,5 нг/мл	8	9	–	–	–	–
		≥15 нг/мл	2	2	1	–	2	–
		≥20 нг/мл	–	–	32	–	–	11
	VEGFR (n=0–120)	≥120 нг/мл	–	1	–	–	–	–
		≥140 нг/мл	–	9	3	–	2	1
		≥160 нг/мл	–	1	29	–	–	11

Понимание базисных основ индукции клеточного роста, особенно в условиях опухолевой трансформации клеток, является неотъемлемой частью грамотного подхода к управлению и мониторингованию пролиферативной активностью.

Цель исследования – изучение частоты встречаемости молекулярно-генетических маркеров при РЖ, частоты экспрессии общебиологических маркеров, характеризующих «поведение» опухолевой клетки, их корреляцию с агрессивностью опухоли и прогнозом.

Материалы и методы

В исследование включены 54 первичных больных РЖ, проходивших обследование и лечение на базе Тюменского областного онкологического диспансера, ООО «Центр молекулярно-генетической диагностики Сабирова А.Х.» и лаборатории ИГХ Тюменского областного онкологического диспансера. Всем больным (женщин 7; 13 %; мужчин 47; 87 %) проведено оперативное лечение и ПХТ. Данные о стадировании представлены в табл. 1. Гистологически у всех пациентов выявлена аденокарцинома различной степени дифференцировки:

- высокодифференцированная (ВДА) – у 10 (18,5 %);
- умереннодифференцированная (УДА) – у 11 (20,4 %);
- низкодифференцированная (НДА) – у 33 (61,1 %).

У преобладающего количества больных на момент диагностики была выявлена III – IV стадия опухолевого процесса – 74,1 %. Определение уровня экспрессии свободнорастворимых форм EGFR и VEGFR в сыворотке крови проводили с помощью ИФА в модификации ELISA с использованием тест-наборов BioSource International, Inc, кат. №№ KHG0111, KHG0061. Уровень экспрессии антигена Ki-67 определяли в клетках опухоли с помощью ИГХ с использованием тест-наборов фирмы «Дасо»; материалом для молекулярно-генетического исследования послужили клетки опухоли и плазма крови. Выделение ДНК проводили с помощью метода фенол-хлороформной экстракции. Наличие мутаций определяли в онкогенах *p53* (5–8 экзоны), *C-kit*, *B-raf*, *APC*, *K-ras*, *E-cadherin* и *p16* с использованием специально подобранных праймеров.

Выводы

1. Низкая степень дифференцировки опухолевой клетки коррелирует с высоким индексом пролиферативной активности Ki-67.
2. Низкая степень дифференцировки опухолевой клетки коррелирует с высоким уровнем EGFRs.
3. Низкая степень дифференцировки опухолевой клетки коррелирует с высоким уровнем VEGFRs.
4. В результате лечения происходит снижение количества мутаций и уровней EGFRs и VEGFRs.
5. Мутация гена *p53* в 7 экзоне выявлена в большинстве случаев у больных с низкодифференцированной аденокарциномой, высоким уровнем EGFR и VEGFR и высоким индексом пролиферативной активности клеток, что является маркером высокой агрессивности опухоли и плохого ответа опухоли на проводимое лечение.
6. Мутационный статус по парафиновым образцам опухоли и плазме крови, уровень EGFRs и VEGFRs, индекс пролиферативной активности Ki-67 могут являться маркерами для оценки эффективности проводимой терапии и определения полноты излеченности больных РЖ после специальных методов противоопухолевого лечения.

Литература

1. Белявская В.А., Вардосанидзе В.К., Смирнова О.Ю. и др. Генетический статус *p53* при раке желудка: соматические мутации и полиморфизм кодона 72 // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 141, № 2. – С.202–4.
2. Гарин А. М., Базин И. С. Десять наиболее распространенных злокачественных опухолей. – М.: ККМ, 2006. – 266 с.
3. Заридзе Д.Г. Канцерогенез. – М.: «Медицина», 2004. – 575 с.
4. Киселев В.И., Муйжнек Е.Л. Общие принципы профилактики метастатической болезни и сенсibilизации опухолей. – М.: Компания Димитрейд График Групп, 2007. – 125 с.
5. Петросян А.М., Харченко В.З. Изменения протеиназ ингибиторной системы у больных раком желудка // Онкология. – 2007. – Т. 9, № 4. – С. 303–6.
6. Слинчак С.М. Рак желудка. – Киев: Здоров'я, 1972. – 200 с.
7. Состояние онкологической помощи населению России в 2008 году. Под редакцией В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М.: ФГУ МНИОИ им. П.А. Герцена Росмедтехнологий, 2009. – 192 с.

Результаты анализа верифицировали прямым секвенированием полученных фрагментов ПЦР. Исследование проводилось непосредственно после выполнения оперативного вмешательства а также после окончания полного курса лечения (операция + адъювантная ХТ ПХТ по стандартным схемам).

Результаты

В ДНК, выделенной из парафиновых образцов опухолевой ткани, выявлены многочисленные мутации в различных онкогенах: *p-53* (ex 5–8), *C-kit*, *B-raf* (15 кодон), *APC*, *K-ras* (12 кодон), *E-cadherin*, *p-16*. Наибольшее количество мутаций выявлено в *p-53*, особенно в 7 экзоне (табл. 2). Индекс пролиферативной активности Ki-67 имеет наибольшее значение у пациентов с низкой степенью дифференцировки опухолевых клеток, что коррелирует с литературными данными. Свободнорастворимая фракция эпидермального фактора роста и сосудистого эндотелиального фактора роста, выделенная из сыворотки крови, наиболее выражена у пациентов с низкодифференцированной аденокарциномой, высоким индексом пролиферативной активности и у больных, имеющих мутацию в 7 экзоне гена *p53*, что также является маркером агрессивности и метастатической активности этих клеток (табл. 3). Мутации в генах определялись в ДНК, выделенной из парафиновых образцов опухоли и плазме крови. Следует отметить, что генетическая картина, полученная из ДНК парафиновых образцов опухоли, коррелировала с генетической картиной, выделенной в плазме крови (табл. 4). По представленным в табл. 4 данным видно, что максимальное количество мутаций в ДНК определено у больных с низкодифференцированной аденокарциномой. Для определения наличия изменений в генетическом статусе нами проведено молекулярно-генетическое исследование плазмы крови больных РЖ после комбинированного лечения. Результаты молекулярно-генетического исследования после окончания лечения показали достоверное снижение количества мутаций (табл. 5). По представленным данным в табл. 5 следует, что количество мутаций в генах, определенных до лечения, снизилось во всех группах исследования больных. Такая же тенденция отмечена при определении экспрессии рецепторов ростовых факторов в сыворотке крови (табл. 6).