

УДК 616.33-006.6-08-089-018:615.28

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ОТВЕТА ОПУХОЛИ НА ХИМИО- /ЛУЧЕВУЮ ТЕРАПИЮ ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА

Мозеров С.А.^{1,5}, Скоропад В.Ю.^{1,5}, Новиков Н.Ю.¹, Михайлова Г.Ф.¹, Силантьева Н.К.¹,
Агабабян Т.А.¹, Бекетова О.Г.¹, Комин Ю.А.², Чаиркин И.Н.³, Пашкин С.Б.⁴,
Мозерова Е.С.⁵

¹Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Обнинск, e-mail: mozerov@list.ru;

²Военно-медицинское учреждение, Москва, e-mail: yura.komin@yandex.ru;

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, e-mail: chairkin@rambler.ru;

⁴Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, e-mail: sergejppashkin@mail.ru;

⁵Обнинский институт атомной энергетики, Обнинск, e-mail: skoropad@mrrc.obninsk.ru

Цель исследования: изучение возможности применения иммуногистохимических и молекулярно-генетических маркеров в качестве предикторов эффективности неoadьювантной химиолучевой терапии (НХЛТ) и факторов прогноза течения заболевания. **Материалы и методы:** обследован 21 больной раком желудка Т3-4 [N0-3 M0 (средний возраст – 61 год; 10 мужчин). Всем пациентам проводилась НХЛТ с последующей гастрэктомией D2 через 4-6 недель. Конкурентно проводилась химиотерапия по модифицированной схеме CapOX. Мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ) проводилась до начала лечения и через 3,5-4 недели после ее завершения. Для оценки лечебного патоморфоза применялась четырехуровневая система оценки ответа опухоли. Исследовалась экспрессия маркеров: HER2/neu, Ki-67, p53, CyclinD1, E-кадгерин в биопсийном материале (до терапевтического воздействия) и в операционном материале (после проведения химиолучевой терапии и перерыва в лечении). Оценка молекулярно-генетических маркеров AURKA и TP53 проводилась с использованием FISH-метода. **Результаты:** выявлено статистически значимое снижение экспрессии маркеров Ki-67 и CyclinD1, тенденции к снижению экспрессии p53 после проведения НХЛТ, а также статистически значимое снижение числа копий гена AURKA. У большинства пациентов (62 %) выявлен патоморфоз 1b, при этом у большинства пациентов с данной стадией патоморфоза наблюдалось также снижение экспрессии маркеров p53, CyclinD1, Ki-67, и уменьшение среднего числа копий AURKA и TP53. У большинства пациентов (75 %) отмечено снижение T и/или N категорий после НХЛТ. Точность МСКТ при определении категории усТ составила 81 %, усN – 94 %. **Заключение:** изучение динамики экспрессии иммуногистохимических и молекулярно-генетических маркеров является перспективным подходом для поиска предикторов эффективности НХЛТ и прогноза у больных местно-распространённым раком желудка.

Ключевые слова: рак желудка, неoadьювантная химиолучевая терапия, гастрэктомия D2, патоморфоз, иммуногистохимические маркеры, молекулярно-генетические маркеры, МСКТ.

HISTOLOGICAL AND MOLECULAR GENETIC EVALUATION OF TUMOR RESPONSE TO CHEMOTHERAPY / RADIATION THERAPY FOR GASTRIC CANCER

Mozerov S.A.^{1,5}, Skoropad V.Yu.^{1,5}, Novikov N.Y.¹, Mikhailova G.F.¹, Silanteva N.K.¹,
Agababian T.A.¹, Beketova O.G.¹, Komin Yu.A.², Chairkin I.N.³, Pashkin S.B.⁴,
Mozerova E.S.⁵

¹ A. Tsyb Medical Radiological Research Centre – branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, e-mail: mozerov@list.ru;

² Military medical facility, Moscow; e-mail: yura.komin@yandex.ru;

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, The Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, e-mail: chairkin@rambler.ru;

⁴ Herzen State Pedagogical University of Russia, Saint-Petersburg, e-mail: sergejppashkin@mail.ru;

Objective: the examination of the possibility of using immunohistochemical and molecular genetic markers as predictors of effectiveness of neoadjuvant chemoradiotherapy (NCRT) and prognostic factors of the disease state. **Materials and Methods:** medical testing of 21 patients with locally advanced gastric cancer (the average age 61 years; 10 men) were carried out. All patients underwent the NCRT followed by gastrectomy D2. All patients received CapOX-modified chemotherapy. Also patients underwent the multispiral computed tomography (MSCT) before the NCRT and 3.5 to 4 weeks after the NCRT. A four-level scoring system of tumor response was used to evaluate the therapeutic pathomorphism. We analyzed the expression of HER2 / neu marker, Ki-67, p53, Cyclin D1, E-cadherin in biopsy (before therapy) and the operating material (after chemoradiotherapy and the treatment gap). Molecular genetic markers AURKA and TP53 were evaluated using FISH-method. **Results:** we have found statistically significant decrease in the expression of Ki-67 markers and Cyclin D1, a trend towards to a decrease of p53 expression after the NCRT and statistically significant decrease in number of AURKA gene copies. The majority of patients (13 of 21, 62 %) has the 1b pathomorphism, while most of patients with G1b pathomorphism also shows decrease of p53 markers, Cyclin D1, Ki-67, and decrease of the average number of TP53 and AURKA copies. The majority of patients (12 of 16, 75 %) experienced the decrease of T and / or N categories after NCRT. The MSCT accuracy in determining the category of ycT was 81 %, ycN – 94 %. **Conclusion:** the dynamics of expression of immunohistochemical and molecular genetic markers examination is a promising approach in search for predictors of NCRT effectiveness and for medical prognosis for patients with locally advanced gastric cancer.

Keywords: gastric cancer, neoadjuvant chemoradiotherapy, D2 gastrectomy, pathomorphism, immunohistochemical markers, molecular genetic markers, MSCT.

Рак желудка является одной из наиболее актуальных проблем современной онкологии, что связано с высокими показателями заболеваемости как в мире, так и в России, инвалидизацией больных, а также сохраняющейся высокой смертностью и низкой 5-летней выживаемостью, несмотря на внедрение в клиническую практику в последние годы ряда новых методов лечения. Ежегодно в мире регистрируется около 1 млн новых случаев рака желудка, а злокачественные новообразования этой локализации составляют около 6,8 % в структуре онкологической заболеваемости. В России в 2014 году заболеваемость составила 95,2 на 100 000 населения. Более чем в 70 % случаев рак желудка диагностируется на поздних стадиях заболевания. Радикальное лечение проводится только у 42,1 % пациентов с впервые выявленным заболеванием, в большинстве случаев (71 %) – с применением только хирургического метода лечения. Поздняя диагностика и агрессивное течение опухолевого процесса являются важнейшими причинами высокой смертности населения от рака желудка. В 2004–2014 годах в России в течение первого года летальность от злокачественных новообразований этой локализации составила около 50 % [1]. Представленные данные свидетельствуют о необходимости поиска новых подходов к терапии пациентов раком желудка, а также поисков предикторов эффективности применения различных методов лечения.

Одним из таких подходов, активно разрабатываемых в последние годы, является неoadъювантная терапия (НТ) [2]. Показано, что основными причинами неудовлетворительных результатов хирургического лечения пациентов раком желудка являются уже имеющиеся к

моменту выполнения оперативного вмешательства, но клинически неопределяемые метастазы; неудаленные во время операции опухолевые комплексы, локализованные в зоне инвазии, лимфатических узлах, клетчатке и т.д.; а также диссеминированные во время операции, в том числе при лимфодиссекции, опухолевые клетки. В связи с этим основными задачами НТ являются регрессия первичной опухоли и регионарных лимфатических узлов; увеличение числа радикальных операций; уничтожение микрометастазов и циркулирующих раковых комплексов; а также снижение биологического потенциала опухолевых клеток, уменьшение их способности к формированию метастазов при интраоперационной диссеминации [3,4]. Для объективного выбора схем терапевтического воздействия необходимо изучать параметры генетических изменений в опухолях [5].

В проведенных к настоящему времени исследованиях показано, что добавление НТ к хирургическому лечению позволяет улучшить отдаленные результаты лечения. Так, в исследовании, проведенном Н. Ohnuma и соавт., было показано, что проведение неоадьювантной химиотерапии (НХТ) при раке желудка позволило добиться снижения стадии заболевания у 26 из 75 пациентов и не приводило к увеличению числа послеоперационных осложнений [3]. В работе Z. Shao и соавт. проведение неоадьювантной химиолучевой терапии (НХЛТ) позволило увеличить 2-летнюю выживаемость до 68,5 % по сравнению с 56,3 % при проведении только хирургического лечения [6].

Одной из важных проблем применения НТ при раке желудка является вариабельность ответа опухолевой ткани на применяемые методы лечения, что определяет различия в эффективности комбинированной терапии и прогнозе заболевания. В настоящее время в онкологии используется термин опухолевый ответ, подразумевающий существенные и стойкие изменения характера онкологического процесса под влиянием лечебных факторов. Опухолевый ответ может рассматриваться как предиктор выживаемости и прогноза [7-9]. Актуальной задачей является поиск новых биомаркеров, позволяющих оценивать изменение биологических свойств опухоли, в частности, снижение биологического потенциала опухолевых клеток и способности их к пролиферации. Среди подобных биомаркеров значительный интерес в последние годы вызывают иммуногистохимические и молекулярно-генетические маркеры [10]. До настоящего времени в литературе отсутствуют данные о возможности использования данных маркеров для оценки лечебного патоморфоза (опухолевого ответа) в процессе комбинированного лечения местно-распространенного рака желудка [11,12].

В связи с вышесказанным была сформулирована цель исследования – изучить возможности применения ряда иммуногистохимических и молекулярно-генетических маркеров в качестве предикторов эффективности НТ и факторов прогноза течения заболевания.

Материалы и методы

В исследование был включен 21 пациент с морфологически верифицированным диагнозом рака желудка. Средний возраст пациентов составил 61 год; было 10 мужчин и 11 женщин.

Всем пациентам проводилась НХЛТ с последующей гастрэктомией D2. Лучевая терапия проводилась в СОД 45 Гр на линейном ускорителе электронов по методике дневного дробления дозы: 1 Гр + 1,5 Гр с интервалом 4–5 часов (50 изоГр). Конкурентно проводилась химиотерапия по модифицированной схеме CapOX (капецитабин 1850 мг/м² за 2 приема, ежедневно; оксалиплатин 85 мг/м² в/в кап., 1 и 21 дни курса). Оперативное вмешательство с лимфодиссекцией D2 выполняли через 4–6 нед. Всем пациентам проводилась мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ) до начала НХЛТ и через 3,5–4 недели после ее завершения.

Подготовка материала для гистологического, иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследований проводилась по стандартным протоколам.

Для оценки лечебного патоморфоза использовали четырехуровневую систему оценки ответа опухоли, предложенную Японским обществом исследований рака желудка (The Japanese Research Society for Gastric Cancer) [13]:

- 1a – отсутствие резидуальных опухолевых элементов;
- 1b – сохранено менее 10 % элементов опухоли;
- 2 – сохранено 10–50 % элементов опухоли;
- 3 – сохранено 50 % и более объема опухолевой ткани.

В качестве иммуногистохимических маркеров исследовалась экспрессия: HER2/neu, Ki-67, p53, CyclinD1, E-кадгерин. Подсчитывали количество окрашенных ядер на 100 ядер в 3 полях зрения. Динамика изменения степени интенсивности иммунного окрашивания и числа окрашенных ядер была оценена в биопсийном материале (до терапевтического воздействия) и в операционном материале (после проведения химиолучевой терапии и перерыва в лечении). Оценку молекулярно-генетических маркеров AURKA и TP53 проводили с использованием FISH-метода, анализировали по 100 генетически абберантных клеток. Полученные результаты выражали в процентах.

Сравнивались данные первичной и контрольной МСКТ с целью анализа изменений симптомов опухолевого поражения, структуры, размеров, денситометрической плотности опухоли и регионарных лимфоузлов.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ «Statistica 6.1» (StatSoft, Inc. USA). В таблицах и тексте данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. Сравнение полученных данных для двух связанных групп проводили с использованием метода Краскела – Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При анализе результатов НХЛТ с последующей гастрэктомией D2 оценивалась стадия опухолевого ответа. Было выявлено, что у большинства пациентов – 13 (61,9 %) наблюдается стадия опухолевого ответа 1b, что соответствует сохранению менее 10 % элементов опухоли, у 3 (14,3 %) была выявлена стадия 2 и еще у 3 (14,3 %) – стадия 3 опухолевого ответа. У 2 (9,5 %) пациентов ответа на лечение выявлено не было.

При изучении динамики экспрессии иммуногистохимических маркеров было выявлено, что проведение НХЛТ приводит к статистически значимому снижению экспрессии Ki-67 (см. рис. 1а, 1б, 1в), CyclinD1 (см. рис. 2а, 2б, 2в), а также тенденции к снижению экспрессии маркера p53 (см. рис. 3а, 3б, 3в).

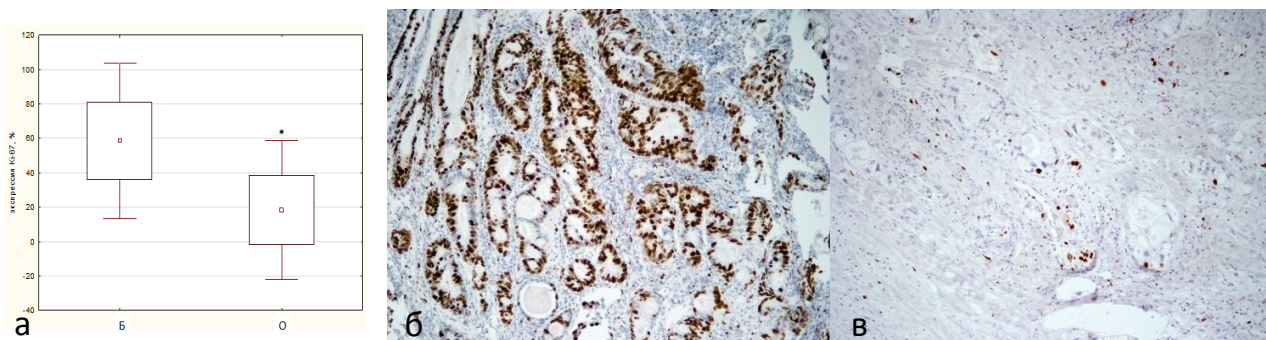


Рис. 1. а – Динамика изменения экспрессии маркера Ki-67 в процессе проведения неoadъювантной химиолучевой терапии (* – статистически значимые различия),

(Б – биопсийный материал, О – операционный материал);

б – Экспрессия маркера Ki-67 в биопсийном материале, $\times 100$;

в – Экспрессия маркера Ki-67 в операционном материале, $\times 100$

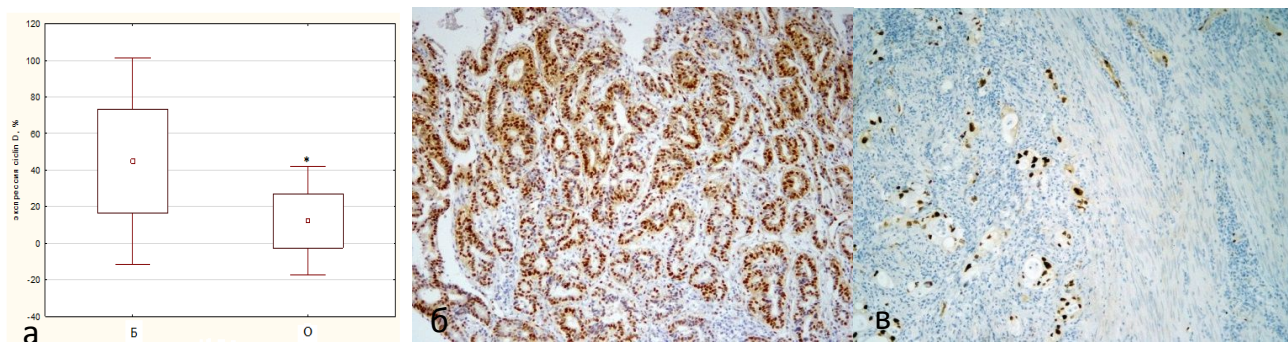


Рис. 2. а – Динамика изменения экспрессии маркера CyclinD1 в процессе проведения неоадьювантной химиолучевой терапии (– статистически значимые различия), (Б – биопсийный материал, О – операционный материал); б – Экспрессия маркера CyclinD1 в биопсийном материале, x100; в – Экспрессия маркера CyclinD1 в операционном материале, x100*

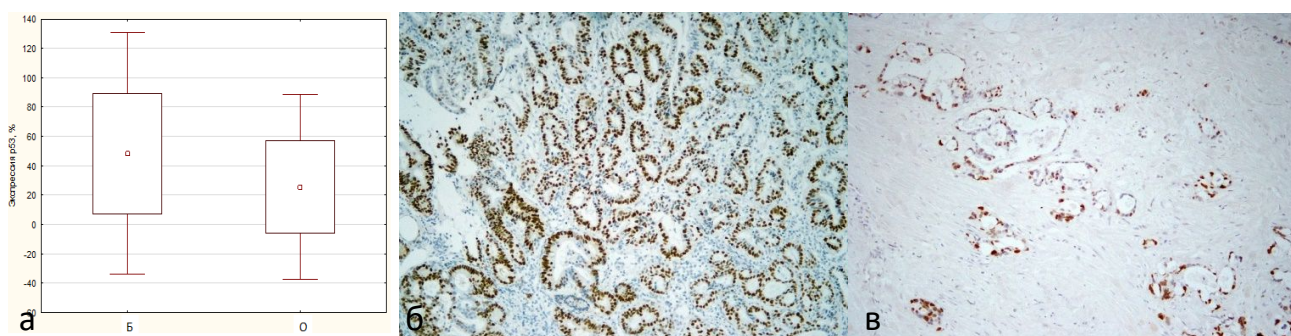


Рис. 3. а – Динамика изменения экспрессии маркера p53 в процессе проведения неоадьювантной химиолучевой терапии (p=0,11), (Б – биопсийный материал, О – операционный материал); б – Экспрессия маркера p53 в биопсийном материале, x100; в – Экспрессия маркера p53 в операционном материале, x100

При анализе результатов изменения экспрессии маркеров Ki-67, p53, CyclinD1 нами было выявлено, что у большинства больных после проведения НХЛТ наблюдается снижение экспрессии данных маркеров опухолевыми клетками. У 19 (90,4 %) пациентов выявлено снижение экспрессии Ki-67, у 12 (57 %) – снижение экспрессии p53 и у 16 (76,2 %) – снижение экспрессии CyclinD1. При этом увеличение экспрессии p53 отмечено у 3 (14,5 %), а CyclinD1 – у 2 (9,5 %) пациентов. Увеличение экспрессии Ki-67 выявлено только у одного пациента (4,8 %). Экспрессия маркера HER2/neu у большинства пациентов 12 (57,1 %) оставалась без изменений, у

9 (42,9 %) пациентов отмечено снижение экспрессии данного маркера. У 18 (85,7 %) не менялась экспрессия E-кадгерин (таблица 1).

Таблица 1

Динамика изменения экспрессии иммуногистохимических маркеров у пациентов раком желудка после проведения неoadъювантной химиолучевой терапии

	Снижение экспрессии	Повышение экспрессии	Экспрессия без изменений
p53	12(57 %)	3(14,5 %)	6(28,5 %)
Cyclin D1	16(76,2 %)	2(9,5 %)	3(14,3 %)
Ki-67	19(90,4 %)	1(4,8 %)	1(4,8 %)
E-кадгерин	3(14,3 %)	-	18(85,7 %)
HER2/neu	9(42,9 %)	-	12(57,1 %)

Нами также проводился анализ динамики изменения среднего числа копий генов AURKA и TP53 на aberrантную клетку до и после проведения химиолучевой терапии (таблица 2). Выявлено статистически значимое снижение числа копий гена AURKA.

Таблица 2

Среднее число копий генов AURKA и TP53 на aberrантную клетку до и после проведения химиолучевой терапии

ген	Среднее число копий на aberrантную клетку (биопсийный материал)	Среднее число копий на aberrантную клетку (операционный материал)	p-value
AURKA	3,46±1,4	2,5±1,6	p<0,001
TP53	2,6±1,12	2,1±0,8	p=0,51

Важно отметить, что у подавляющего большинства пациентов с патоморфозом 1b наблюдалось снижение экспрессии маркеров p53, CyclinD1, Ki-67, а также уменьшение среднего числа копий AURKA и TP53. У пациентов с патоморфозом стадий 2 и 3 не было выявлено статистически значимого изменения экспрессии маркера p53 ($p > 0,05$), в то время как при патоморфозе стадии 1b отмечается статистически значимое снижение экспрессии данного маркера ($p=0,023$). Таким образом, динамика изменения и снижение экспрессии данных маркеров могут рассматриваться как прогностический предиктор благоприятного лекарственного патоморфоза.

При оценке категорий T и N по данным МСКТ, проведенной у 16 больных, оказалось, что при первичном исследовании в 2 случаях определена категория T1-3, в 9 – T4a, в 5 – T4b; N0 диагностирована в 8 случаях, N1 – в 6, N2 – в 2. При контрольном обследовании после завершения НХЛТ T1-3 определялась у 8, T4a у 6 и T4b у 2 пациентов; N0 – у 15, а N2 – у 1 больного. Точность метода при определении категории T составила 81 %, N – 94 %; во всех ошибочных КТ-заключениях отмечалось завышение стадии T за счет воспалительных и фиброзных изменений после НХЛТ и занижение категории N из-за микрометастазирования. У большинства пациентов (12 из 16, 75 %) отмечено снижение T и/или N категорий после НТ.

Поиск новых маркеров опухолевого ответа при проведении комбинированной терапии рака желудка является актуальной проблемой. К настоящему времени в мировой литературе обсуждается возможность, информативность и целесообразность применения нескольких вариантов оценки патоморфоза опухоли – инструментальных методов (лучевые методы диагностики, гастроскопия) и гистологического исследования биопсийного материала [14]. Несмотря на то, что клинические и лучевые методы предоставляют ценную информацию и позволяют произвести первичную оценку эффективности терапии, для точного определения степени патоморфоза необходимо морфологическое исследование операционного и/или биопсийного материала. Пока не найдена корреляция гистологических и клинических изменений и они не могут являться точным предиктором эффективности проводимой терапии, поэтому необходимы дальнейшие исследования, направленные на изучение прогностической и предиктивной ценности широкой панели иммуногистохимических, молекулярно-генетических маркеров и лучевых методов диагностики, а также подтверждение полученных результатов в проспективных исследованиях, в т.ч. рандомизированных [15].

Заключение

В настоящем исследовании предпринята попытка оценить изменение экспрессии иммуногистохимических и молекулярно-генетических маркеров в сопоставлении с патоморфологическими изменениями. Показано, что в операционном материале по сравнению с биопсийным выявлено статистически значимое уменьшение количества клеток, которые экспрессируют CyclinD1 и Ki-67, тенденция к снижению экспрессии маркера p53, снижение среднего числа копий гена AURKA на aberrантную клетку до и после проведения НХЛТ, что свидетельствует о снижении злокачественного потенциала опухоли и является ранним показателем эффективности НТ, а также происходит снижение категорий uсT и uсN по данным МСКТ, что может служить критерием клинической оценки опухолевого ответа.

Список литературы

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2014 году / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2015. – С. 236.
2. Mezhir J.J., Tang L.H., Coit D.G. Neoadjuvant therapy of locally advanced gastric cancer // *J.Surg. Oncol.* 2010; 101(4):305-14. doi: 10.1002/jso.21483.
3. Hirakawa M., Sato Y., Ohnuma H., Takayama T., Sagawa T., Nobuoka T., Harada K., Miyamoto H., Sato Y., Takahashi Y., Katsuki S., Hirayama M., Takahashi M., Ono M., Maeda M., Takada K., Hayashi T., Sato T., Miyanishi K., Takimoto R., Kobune M., Hirata K., Kato J. A phase II study of neoadjuvant combination chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and S-1 for locally advanced resectable gastric cancer: nucleotide excision repair (NER) as potential chemoresistance marker // *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013; 71(3):789-97. doi: 10.1007/s00280-013-2073-5.
4. Fushida S., Nashimoto A., Fukushima N., Kawachi Y., Fujimura T., Kuwabara S., Musha N.; DCS Study Group. Phase II trial of preoperative chemotherapy with docetaxel, cisplatin and S-1 for T4 locally advanced gastric cancer // *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2012; 42(2):131-3. doi: 10.1093/jjco/hyr183.
5. Анализ клинического экзоза рака желудка / Т.В. Кекеева [и др.] // *Медицинская генетика.* – 2016. – №15(6). – С. 25-30.
6. Shao Z.Y., Zhang J.D. Efficacy of oxaliplatin plus 5-fluorouracil/leucovorin calcium combined with concurrent radiotherapy for local advanced gastric cancer // *ZhonghuaYiXueZaZhi.* 2008; 88(36):2547-9.
7. Галахин К.А. Лечебный патоморфоз злокачественных опухолей пищеварительного тракта /К.А. Галахин. – М., 2000. – 176 с.
8. An J.Y., Kim H.I., Cheong J.H., Hyung W.J., Kim C.B., Noh S.H. // *Yonsei Med. J.* 2013; 54(4):888-94. doi: 10.3349/ymj.2013.54.4.888.
9. Патоморфоз рака желудка при неoadъювантной пролонгированной химиолучевой терапии с последующей гастрэктомией D2. / Е.Ф. Лушников [и др.] // *Сибирский онкологический журнал.* – 2014. – 1. – С. 5–10.
10. Chang J., Ormerod M., Powles T.J., Allred D.C., Ashley S.E., Dowsett M. Apoptosis and proliferation as predictors of chemotherapy response in patients with breast carcinoma // *Cancer.* 2000; 89(11): 2145-52.
11. Михайлова Г.Ф., Цепенко В.В., Скоропад В.Ю., Мозеров С.А. Нарушения частоты генов AURKA и TP53 у больных местно-распространенным раком желудка /Г.Ф. Михайлова [и др.] //

Молекулярная онкология: итоги и перспективы: материалы конференции. – Москва, 16–17 декабря 2015 г. // Успехи молекулярной онкологии. – 2015. – Т. 2, № 4. – С. 75–76.

12. Иммуногистохимия в оценке степени патоморфоза злокачественных новообразований/ С.А. Мозеров [и др.] // Здоровье и образование в XXI веке: журнал научных статей. – 2016. – Т. 18, № 11. – С. 108-117.

13. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese gastric cancer treatment guidelines 2010 (ver. 3) // Gastric. Cancer. 2011; 14(2):113-23. doi: 10.1007/s10120-011-0042-4.

14. Морфологические и клинические изменения рака желудка после неoadъювантной химиолучевой терапии (обзор литературы) / С.А. Мозеров [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 6-1. – С. 59-64.

15. Планируемое многоцентровое рандомизированное клиническое исследование II фазы: неoadъювантная химиолучевая терапия с последующей гастрэктомией D2 и адъювантной химиотерапией у больных местнораспространенным раком желудка/ В.Ю. Скоропад [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2016. – Т. 15, № 2. – С. 12-18.