

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СПОРАДИЧЕСКОГО РАКА ЖЕЛУДКА

Проф. Т. Н. ПОПОВСКАЯ, проф. Ю. А. ВИННИК, А. В. МОВЧАН, А. Ю. ВИННИК

Харьковская медицинская академия последипломного образования

Представлены результаты химиолучевого лечения с использованием цисплатина и 5-фторурацила (5-ФУ) у больных с местнораспространенным раком желудка в зависимости от микросателлитной нестабильности (МСН) локусов VAT-25 и VAT-26, ответственных за гены пострепликативной репарации MSH2, MLH1. Показано, что у 50 % больных местнораспространенным раком желудка имеет место мутаторный фенотип с МСН по локусам VAT-25, VAT-26; максимальный терапевтический эффект при лучевой терапии с модификацией цисплатином достигнут у больных без МСН, а при модификации 5-ФУ — у больных с наличием МСН по локусам VAT-25, VAT-26; токсические эффекты химиолучевой терапии не связаны с генетическими особенностями опухоли, а являются результатом действия цисплатина и 5-ФУ на органы и системы организма опухоленосителя.

Ключевые слова: рак желудка, микросателлитная нестабильность, химиолучевое лечение.

Несмотря на имеющую место тенденцию к снижению заболеваемости, рак желудка (РЖ) остается мировой онкологической проблемой. Ежегодно в мире регистрируется 1 067 000 вновь заболевших данным заболеванием. По частоте встречаемости РЖ стоит на четвертом месте после рака легкого, рака молочной железы и рака толстой кишки, а по причине смертности — на втором месте после рака легкого.

Многочисленные цитогенетические и молекулярно-генетические исследования позволили сформулировать общие гипотезы развития рака. Среди всех факторов наиболее существенными можно считать активирующие мутации в онкогенах, инактивирующие мутации в антионкогенах, геномную нестабильность. Последняя, возможно, определяет две предыдущие, так как геномная нестабильность способствует накоплению множества мутаций, формируя так называемый мутаторный фенотип, приводящий к нарушению контроля репликации ДНК, репарации, пролиферации и апоптоза [1]. Одним из видов геномной нестабильности является микросателлитная нестабильность (МСН).

Микросателлиты — это многократно повторяющиеся короткие последовательности нуклеотидов в ДНК, не несущие какой-либо генетической информации, но необходимые для поддержания целостности структуры ДНК. В связи с тем что микросателлиты построены из повторяющихся участков, они сильнее других участков ДНК подвержены накоплению ошибок, приводящих к нарушению правила одинаковой длины микросателлитов.

Следует отметить, что само по себе изменение длины микросателлитов не приводит к нарушению в транскрипции генов, но оно является отражением нарушения репарации ДНК, и, следовательно, показателем накапливающихся в ДНК

ошибок, приводящих рано или поздно к активации онкогенов или инактивации генов-супрессоров.

Известно, что воспроизведение наследственной информации при образовании новых клеток обеспечивается репликацией ДНК. Нуклеотидная последовательность всего генома должна быть точно и безошибочно передана от одной соматической клетки к следующей. Ошибки репликации подлежат исправлению системой пострепликативной репарации. У человека известно 8 генов пострепликативной репарации, так называемых генов стабильности: MSH2, MSH3, MSH4, MLH1, PMS1, PMS2, GTBP, MSH6 [2].

Считается, что мутации в генах стабильности — раннее событие канцерогенеза, генерирующее серию вторичных мутаций в различных генах и особый вид нестабильности структуры ДНК в форме высокой вариабельности структуры нуклеотидных микросателлитов — МСН.

Наиболее часто встречающаяся МСН проявляется мутацией зародышевых линий генов MSH2, MLH1, инактивация которых нарушает продукцию соответствующих ядерных белков, ответственных за восстановление комплементарности нитей ДНК, происходящих во время репликации ДНК [3].

Более изученными опухолями с доказанным клиническим значением МСН являются аденокарциномы толстого кишечника и прямой кишки, а также опухоли эндометрия и эпителиальные опухоли яичников. Установлено, что биологические особенности роста опухоли, прогноз заболевания и ответ на проводимую лекарственную терапию зависят от наличия МСН [4].

В последние годы появились единичные работы об исследовании МСН при спорадическом РЖ. Установлено, что нарушение пострепликативной репарации с возникновением МСН и мутации в генах

стабильности MLH1 и MSH2 при спорадическом РЖ являются одним из механизмов канцерогенеза. Кроме того, установлены некоторые клинико-патологические особенности РЖ в зависимости наличия МСН. Так, при МСН отмечено преобладание антральной локализации и **меньшая частота метастазирования** в лимфоузлы по сравнению с опухолями без МСН [5]. В других исследованиях показано, что МСН определялась у 16% больных РЖ. При этом отмечена корреляция между прогнозом выживаемости, стадией заболевания и метастазированием. Данные показатели со статистически достоверным результатом были лучше у лиц с МСН [6].

Таким образом, рассматривая с современных позиций рак как болезнь генома, исследование геномной нестабильности, одной из составляющих которой есть МСН, является актуальной проблемой, открывающей новые механизмы канцерогенеза и **возможности новых лечебных технологий** [7, 8].

Цель исследования — изучить клинические особенности и **эффективность химиолучевого** лечения распространенного РЖ в зависимости от МСН по локусам ВАТ-25, ВАТ-26.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи: изучить частоту встречаемости МСН по локусам ВАТ-25, ВАТ-26 при местнораспространенном РЖ (МРРЖ) и **ассоциативную связь МСН по локусам ВАТ-25, ВАТ-26 с абластическим эффектом** при использовании фторпиримидинов и **препаратов платины** в качестве радиомодификации при лучевой терапии.

Было обследовано 70 больных МРРЖ. Диагноз верифицирован гистологически: аденокарцинома G1-G2 установлена у 23 человека, G3-G4 — у 47 человек. По классификации TNM все пациенты с IV стадией заболевания.

Всем пациентам проводилась лучевая терапия методом классического фракционирования (СОД 40 Гр) в течение 28 дн. Больные были разделены на две группы. Больным первой группы (35 человек) модификацию осуществляли цисплатином — 50 мг один раз в семь дней. Больным второй группы (35 человек) радиомодификация проводилась 5-фторурацилом (5-ФУ) — 500 мг один раз в семь дней.

Абластический эффект оценивали по RECIST, токсичность — по шкале токсичности (Common Toxicity Criteria NCIC), МСН — при помощи полимеразной цепной реакции ПЦР, используя два квазимономорфных мононуклеотидных маркера (ВАТ-25; ВАТ-26).

Для получения ДНК из опухолевого материала достаточного молекулярного веса и необходимой степени чистоты использовали следующий метод выделения ДНК.

1. Ткань опухоли измельчали глазными ножницами и затем гомогенизировали.

2. Добавляли протеиназу К до концентрации 50 мкг/мл и SDS до 0,5% растиранием со стеклом. Инкубировали 12 часов при 37 °С.

3. Доводили объем образца до 5 мл раствором 10 mM трис-ЭДТА, pH 8,0 и последовательно проводили экстракцию ДНК равными объемами фенола, смеси фенол-хлороформа и хлороформа.

4. К образцу добавляли 1/10 объема 5M ацетата натрия, pH 5,3, перемешивали и осаждали ДНК 2,5 объемами холодного 96% этанола, выдерживая образец 30 мин при температуре 70 °С.

5. Пробу центрифугировали 15 мин с ускорением 12 000g. Высушивали осадок ДНК на воздухе и растворяли в 200 мкл 10 mM трис-ЭДТА, pH 8,0.

6. Качество выделенной ДНК проверяли электрофорезом в **1,5%-ном агарозном геле с визуализацией этидием бромидом**. Выделенную ДНК хранили при температуре -20 °С.

Определение МСН осуществляли с использованием локусов ВАТ-25, ВАТ-26 методом ПЦР. ПЦР проводили по стандартной схеме при помощи программируемого термоциклера «Терцик-2» фирмы «ДНК».

Используемые праймеры для микросателлитной последовательности ВАТ-26:

5'-TGA CTA CTT' TGG ACT TCA GCC-3',
5'-AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C-3'

и для ВАТ-25:

5'-TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT-3',
5'-TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC-3'.

В реакционную смесь, содержащую 50 mM KCl, 10 mM трис-HCl, pH 8,4, по 5 пМ праймеров, 2,5 mM MgCl₂, 200 мкММ dNTP, 10%-ный DMSO, 5 mM меркаптоэтанола и 2 единицы термофильной ДНК-полимеразы, добавляли каплю вазелинового масла, прогревали смесь при 95 °С в течение 10 мин и проводили 33 цикла с параметрами: денатурация — 95 °С, 30 с; отжиг и элонгация — 55 °С, 30 сек. Финальную инкубацию проводили при 72 °С в течение 10 мин.

Результаты ПЦР оценивали в **8%-ном** растворе полиакриламидного геля ПААГ с последующим окрашиванием в **растворе бромистого этидия** с концентрацией 1 мг/мл, в качестве маркера молекулярного веса использовали ДНК плазмиды puc19, гидролизованную ферментом HpaII.

Статистическая обработка производилась с использованием четырехклеточного χ^2 -критерия. Статистические гипотезы о наличии или отсутствии значимых различий результатов лечения разными препаратами для разных вариантов биологического статуса пациентов проверялись с использованием четырехклеточного χ^2 -критерия [9].

Для соотношения токсических эффектов терапии был использован метод сравнения двух средних генеральных совокупностей, дисперсии которых оценивались [10].

Анализ результатов исследования МСН по локусам ВАТ-25 и ВАТ-26 представлен в табл. 1 в виде 4 вариантов: отсутствие МСН (35 человек) — 1-й вариант, наличие МСН по локусу ВАТ-25 (21 человек) — 2-й, ВАТ-26 (10 человек) —

Таблица 1

**Микросателлитная нестабильность по локусам
BAT-25, BAT-26 у больных раком желудка**

Локусы	Наличие МСН			
	1-й вариант, n = 35	2-й вариант, n = 21	3-й вариант, n = 10	4-й вариант, n = 4
BAT-25	–	–	+	+
BAT-26	–	+	–	+

Примечание. – означает отсутствие МСН, + показывает присутствие МСН.

3-й и по двум локусам одновременно (4 человека) – 4-й вариант.

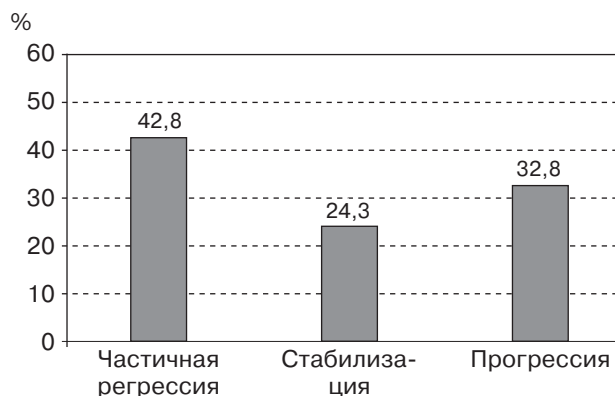
Как видно из приведенных данных, у 50% больных определялась МСН хотя бы по одному локусу, ответственному за гены стабильности ДНК: MSH2, MLH1.

Следовательно, можно предположить, что у 50% больных РЖ возможно нарушение пострепликативной репарации, причем у 21 (30%) больного МСН зарегистрирована по локусам BAT-25, у 10 (14,3%) больных – по BAT-26, у 4 (5,7%) – по обоим локусам.

Оценка эффективности лечения проводилась по шкале RECIST. Полная регрессия не достигнута ни в одном случае, частичная регрессия (уменьшение измеряемых очагов на 30% и более) была выявлена у 30 (42,8%) больных, стабилизация – у 17 (24,3%) больных. Прогрессирование болезни (увеличение на 20% минимальной суммы очагов поражения или появление новых очагов) отмечено у 23 (32,8%) больных (рисунок).

Статистическое исследование результатов лечения с использованием цисплатина и 5-ФУ продемонстрировало, что есть достоверно установленное различие терапевтического эффекта при разных вариантах МСН (табл. 2).

Как можно увидеть из приведенных выше данных, лучший абластомный эффект с использованием цисплатина в качестве радиомодификатора при лучевой терапии отмечается у больных без наличия МСН по локусам BAT-25, BAT-26 (57,1%). В то же время максимальный терапевтический эффект с использованием 5-ФУ достиг-



Результаты химиолучевого лечения при местнораспространенном раке желудка

нут у больных с МСН по локусам BAT-25 (62%) и BAT-26 (50%). К сожалению, в связи с небольшим количеством больных с МСН по обоим локусам сделать выводы об эффективности лечения у этой группы больных невозможно.

Анализируя эффективность лечения, нельзя оставить без внимания токсические проявления лечения, оценку которых проводили по гематологическим показателям, – это анемия, нейтропения, тромбоцитопения, и по проявлениям дисфункции ЖКТ – диарея, тошнота, рвота. Проявления токсических эффектов 3–4-й степени оценивали как «не очень частые», «более частые» и «одинаково частые». По результатам статистических исследований, гематологические осложнения при МСН по локусу BAT-25 одинаково часто встречались в обеих группах с разными модификаторами, а по локусу BAT-26 немного чаще – при использовании цисплатина. Диарея, тошнота, рвота в большей степени наблюдались при применении 5-ФУ в каждой группе, что скорее всего обусловлено не биологическими свойствами опухоли, а действием препаратов на организм опухоленосителя.

Таким образом, при фактически равнозначных токсических проявлениях обнаружены разные терапевтические эффекты цисплатина и 5-ФУ при МСН.

В результате проведенных исследований можно сделать следующие выводы.

Установлено, что у 50% больных МРРЖ имеет место мутаторный фенотип с МСН по локусам BAT-25, BAT-26.

Таблица 2

Результаты лечения больных раком желудка в зависимости от микросателлитной нестабильности при использовании цисплатина и 5-фторурацила

Препарат	Наличие МСН													
	1-й вариант, n = 35				2-й вариант, n = 21				3-й вариант, n = 10				4-й вариант, n = 4	
	регрессия		прогрессия		регрессия		прогрессия		регрессия		прогрессия		регрессия	прогрессия
	абс. ч.	%	абс. ч.	%	абс. ч.	%	абс. ч.	%	абс. ч.	%	абс. ч.	%	абс. ч.	абс. ч.
Цисплатин	20	57,1	9	25,7	2	9,5	2	9,5	2	20	1	10	1	0
5-ФУ	2	5,7	4	11,4	13	62	4	19	5	50	2	20	2	1

Максимальный терапевтический эффект при лучевой терапии с модификацией цисплатином достигнут у больных, у которых не было МСН, а при модификации 5-ФУ — с наличием МСН по локусам ВАТ-25, ВАТ-26.

Токсические эффекты химиолучевой терапии не связаны с генетическими особенностями опухоли, а являются результатом действия цисплатина и 5-ФУ на органы и системы организма опухоленосителя.

Список литературы

1. Новик А. А. Введение в молекулярную биологию канцерогенеза: учеб. пособие / А. А. Новик.— М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004.— 224 с.
2. Фаллер Д. М. Молекулярная биология клетки: руководство для врачей; пер. с англ. / Д. М. Фаллер, Д. М. Шилде.— М.: БИНОМ-Пресс, 2003.— 272 с.
3. Classifying MLH1 and MSH2 variants using bioinformatic prediction, splicing assays, segregation, and tumor characteristics / S. Arnold, D. Buchanan, D. Barker [et al.] // Hum. Mutat.— 2009.— Vol. 30, № 5.— P. 757–770.
4. Tumor microsatellite instability in early onset gastric cancer / J. Vacani, R. Zwingerman, N. Di Nicola [et al.] // J. Mol. Diagn.— 2005.— № 7 (4).— P. 465–477.
5. Becker K. F. The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer / K. F. Becker, G. Keller, H. Hoefler // Surg. Oncol.— 2000.— № 9 (1).— P. 5–11.
6. Source Microsatellite instability in gastric cancer is associated with better prognosis in only stage II cancers / S. Beghelli, G. de Manzoni, S. Barbi [et al.] // Surgery.— 2006.— № 139 (3).— P. 347–356.
7. Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors / O. Buhard, F. Cattaneo, Y. F. Wong [et al.] // J. Clin. Oncol.— 2006.— Vol. 24.— P. 241–251.
8. Mechanisms of pathogenicity in human MSH2 missense mutants / S. Ollila, D. Dermadi Bebek, J. Jiricny, M. Nyström // Hum. Mutat.— 2008.— Vol. 29.— P. 1355–1363.
9. Гмурман В. Е. Теория вероятностей и математическая статистика / В. Е. Гмурман.— М.: Высшая школа, 2002.— 497 с.
10. Закс Л. Статистическое оценивание / Л. Закс.— М.: Статистика, 1976.— 598 с.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СПОРАДИЧНОГО РАКУ ШЛУНКУ

Т. М. ПОПОВСЬКА, Ю. О. ВІННИК, О. В. МОВЧАН, А. Ю. ВІННИК

Подано результати хіміопроменевого лікування з використанням цисплатину та 5-фторурацилу (5-ФУ) у хворих із місцевопоширеним раком шлунку залежно від мікросателітної нестабільності (МСН) локусів ВАТ-25 і ВАТ-26, відповідальних за гени постреплікативної репарації MSH2, MLH1. Показано, що у 50 % хворих на місцевопоширений рак шлунку наявен мутаторний фенотип із МСН за локусами ВАТ-25, ВАТ-26; максимальний терапевтичний ефект при променевої терапії з модифікацією цисплатином досягнуто у хворих без МСН, а при модифікації 5-ФУ — у хворих із наявністю МСН за локусами ВАТ-25, ВАТ-26; токсичні ефекти хіміопроменевої терапії не пов'язані з генетичними особливостями пухлини, а є результатом дії цисплатину та 5-ФУ на органи та системи організму пухлиноносія.

Ключові слова: рак шлунку, мікросателітна нестабільність, хіміопроменеве лікування.

MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF SPORADIC GASTRIC CANCER

T. N. POPOVSKAYA, Yu. A. VINNICK, A. V. MOVCHAN, A. Yu. VINNICK

The results of chemoradiation therapy with cisplatin and 5-fluorouracil (5-FU) in patients with locally advanced gastric cancer are presented according to microsatellite instability (MSI) of loci BAT-25 and BAT-26, responsible for the post-replicative repair genes MSH2, MLH1. It is shown that in 50 % of patients with locally advanced gastric cancer, mutagenic phenotype with MSI for loci BAT-25, BAT-26 is present. Maximum therapeutic effect of radiation therapy with cisplatin modification was achieved in patients without MSI, and modification with 5-FU in patients with the presence of MSI for loci BAT-25, BAT-26. Toxic effects of chemoradiation therapy were not associated with the genetic characteristics of the tumor, but were the result of the action of cisplatin and 5-FU on the organs and systems of the organism of the tumor-carrier.

Key words: gastric cancer, microsatellite instability, chemoradiation therapy.

Поступила 26.03.2013