

М. Ю. Ревтович, А. И. Шмак, Р. М. Смолякова

## ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЗНАЧЕНИЙ ЭКСПРЕССИИ ЦИКЛООКСИГЕНАЗЫ-2 И СУРВИВИНА ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ ПОСЛЕ РАДИКАЛЬНОГО ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ РАКА ЖЕЛУДКА

Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова, Минск, Республика Беларусь

Исследован уровень экспрессии генов циклооксигеназы-2 (COX-2) и сурвивина (BIRC5) в первичной опухоли и париетальной брюшине различных отделов брюшной полости у 52 радикально оперированных пациентов, страдающих раком желудка. Определено пороговое значение уровня экспрессии гена COX-2, позволяющее прогнозировать прогрессирование заболевания с формированием диссеминации опухоли по брюшине после радикального хирургического лечения.

**Ключевые слова:** рак желудка, циклооксигеназа-2, сурвивин, перитонеальная диссеминация.

M. Yu. Reutovich, A. I. Shmak, R. M. Smolyakova

## THE POSSIBILITY OF USING CYCLOOXYGENASE-2 AND SURVIVIN FOR PROGNOSTICATION OF DISEASE PROGRESSION AFTER RADICAL SURGICAL TREATMENT OF GASTRIC CANCER

It is investigated the expression's levels of cyclooxygenase-2 gene (COX-2) and Survivin (BIRC5) gene in the primary tumor and parietal peritoneum of 52 radically operated gastric cancer patients. It is defined the prognostic cutoff value of COX-2 allowing to predict the disease progression with peritoneal dissemination after radical surgery.

**Key words:** gastric cancer, cyclooxygenase-2, survivin, peritoneal dissemination.

Высокая частота прогрессирования рака желудка (РЖ) после радикальной операции в сочетании с адьювантной химио- и химиолучевой терапией, свидетельствует о недостаточной эффективности подобного комплексного подхода при интуитивном определении показаний к назначению адьювантного лечения без учета молекулярно-генетических особенностей опухоли.

Согласно литературным данным одними из потенциальных прогностических молекулярно-биологических маркеров «агрессивности» течения заболевания у пациентов с резектабельным раком желудка являются циклооксигеназа-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) и сурвивин (в англоязычной литературе baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing — BIRC5). Биологическими эффектами их являются: COX-2 — усиление ангиогенеза и роста опухоли, одновременно с подавлением апоптоза [6]; BIRC5 — белок-

ингибитор апоптоза, экспрессия которого в злокачественных опухолях ассоциируется с неблагоприятным прогнозом заболевания [10].

**Цель** настоящего исследования — определить прогностическую значимость экспрессии генов COX-2 и BIRC5 в биоптатах различных локализаций для развития прогрессирования заболевания, включая перитонеальную диссеминацию, после радикального хирургического лечения рака желудка.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования явились образцы первичной опухоли (аденокарциномы желудка) и париетальной брюшины обеих куполов диафрагмы, боковых каналов, гипогастриальной области и малого таза 52 радикально оперированных пациентов в возрасте от 20 до 70 лет, страдающих раком желудка IIA-IIIC стадий (таблица 1).

Таблица 1. Характеристика пациентов, включенных в исследование

Степень распространения опухолевого процесса / Медиана наблюдений до события	Все пациенты	Характер течения заболевания		
		Прогрессирование заболевания, n (%)	Прогрессирование заболевания с формированием диссеминации n (%)	Из них умерли от прогрессирования опухолевого процесса n (%)
pTNM, n (%)				
pT4a-bN2-3M0	22	14(63,6)	9 (40,9)	7(31,8)
pT4a-bN1M0	6	1 (16,7)	1 (16,7)	1 (16,7)
pT4a-bN0M0	8	1 (12,5)	1 (12,5)	1 (12,5)
pT1-3N0-3M0	16	4 (25,0)	2 (12,5)	3 (18,8)
Всего, n (%)	52	20 (38,5)	13 (25)	12 (23,1)
Медиана наблюдений до события*, дни		198	174	269
Медиана наблюдений**, дни		689	690	703

Примечание: \* — медиана наблюдений для пациентов с зарегистрированным прогрессированием заболевания; \*\* — медиана наблюдений для пациентов со стабилизацией процесса.

Молекулярно-генетическое исследование экспрессии исследуемых генов проводилось методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» на амплификаторе «iQ5» (Bio-Rad, США) с использованием реагентов Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Fermentas, Литва) согласно инструкции производителя. В работе использованы специфические олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченые (FAM-BHQ1) TaqMan зонды компании-производителя ОДО «Праймтех» (Республика Беларусь) для COX-2: прямой праймер — GAATCATTACCAGGCAAATG; обратный праймер — TTTCGTTACTGCGGGTGAAC; TaqMan зонд — FAM-TTCCTACCACCAGCAACCCTGCCA-BHQ1 [8]; для BIRC5: прямой праймер — CCACTGCCCACTGAGAAC; обратный праймер — GGCTCCAGCCTCCAG; TaqMan зонд — FAM-CAGACTGGCCCACTGTTCTTCTGCT-BHQ1 [5]. В качестве референсного гена применяли SCARNA5 [3]. Для нормализации пользовались усредненным значением dCp (кроссинг поинт) образцов ткани желудка без признаков морфологического изменения. Для получения значений dCp применяли метод максимума второй производной кривых флуоресценции образцов [11].

Количественные показатели экспрессии исследуемых генов подчинялись закону нормального распределения (критерий Шапиро-Уилка,  $p > 0,05$ ) и представлены средним и стандартным отклонением (SD). Частотные характеристики выборки представлены количественными и процентными величинами. Анализ влияния уровней экспрессии генов COX-2 и BIRC5 в биоптатах различных локализаций и степени распространенности опухолевого процесса (pT и pN) на характер прогрессирования заболевания проводился с помощью лог-ранк критерия. Расчет уровня экспрессии COX-2 и BIRC5 в биоптатах, ассоциированного с неблагоприятным исходом, выполнялся на основе алгоритма максимального ранга и статистики [4]. Многофакторный анализ риска развития перитонеальной диссеминации проводился также на основе регрессии пропорциональных рисков Кокса [12], в который включались показатель экспрессии генов COX-2 и BIRC5 наряду с категориями pT и pN, описывающими степень распространенности опухолевого процесса. Отношения рисков (OR) рассчитывались как экспоненциальное преобразование соответствующих коэффициентов регрессии. Доверительные интервалы для OR рассчитывались также как экспоненциальное преобразование соответствующих доверительных интервалов коэффициентов регрессии.

Все расчеты проводились в статистическом пакете R, версия 3.1.3 с использованием пакетов *survival* [2] и *maxstat* [9]. Результаты анализа считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Результаты оценки возможностей использования для прогнозирования течения заболевания категорий классификации pTNM (в частности, pT и pN) продемонстрировали недостаточную их прогностическую значимость. Было отмечено отсутствие различий в кумулятивной выживаемости, свободной от прогрессирования (ВСП), и выживаемости, свободной от диссеминации (ВСД), при сравнении пациентов по критерию pT (pT1-3 против pT4a-b) —  $p_{\log\text{-rank}} = 0,113$  (ВСП) и  $p_{\log\text{-rank}} = 0,170$  (ВСД). Увеличение метастатического поражения регионарного лимфоколлектора (pN2-3 против pN0-1) привело к ухудшению кумулятивной выживаемости (для ВСП —  $p_{\log\text{-rank}} = 0,002$ , для ВСД —  $p_{\log\text{-rank}} = 0,042$ ), что обусловлено как более интенсивным поступлением опухолевых клеток в свободную брюшную полость в процессе выполнения лимфодиссекции, так и более интенсивной лимфогематогенной диссеминацией у пациентов с pN2-3.

Однако даже при распространенном опухолевом процессе pT4a-bN2-3M0 у 36,4% пациентов радикального хирургического лечения оказалось достаточно для стабилизации опухолевого процесса в отсутствие адьювантной химиотерапии. В то же время у 12,5% пациентов с отсутствием инвазии опухоли серозной оболочки было отмечено прогрессирование заболевания с диссеминацией опухоли по брюшине, несмотря на то, что это не характерно для данной распространенности опухолевого процесса. Всё вышечисленное в совокупности свидетельствует о невозможности прогнозирования прогрессирования заболевания, ориентируясь только лишь на классификацию pTNM. В этой связи нами оценена возможность использования значений экспрессии генов COX-2 и BIRC5 в биоптатах различных локализаций для определения неблагоприятного уровня их экспрессии, составляющего «агрессивный» тип аденокарциномы, склонный к раннему системному прогрессированию заболевания.

Значения экспрессии рассматриваемых генов значительно различались в исследованных биоптатах (табл. 2).

Таблица 2. Экспрессия генов COX-2 и BIRC5 у пациентов с резектабельным раком желудка в биоптатах различных локализаций

Анализируемый биоптат, n	Значения экспрессии генов, отн.ед., среднее (SD), количество пациентов	
	COX-2, n	BIRC5, n
Первичная опухоль	3,3 (2,8), n = 40	0,2 (2,0), n = 45
Париетальная брюшина диафрагмы и боковых каналов	1,5 (4,2), n = 30	-0,1 (1,3), n = 37
Париетальная брюшина малого таза	2,8 (3,9), n = 24	0 (1,7), n = 32

При оценке влияния уровней экспрессии генов COX-2 и BIRC5 в указанных в табл. 2 биоптатах на развитие прогрессирования заболевания (вне зависимости от его варианта) по результатам однофакторного анализа какой-либо зависимости не установлено. При оценке влияния экспрессии генов COX-2 и BIRC5 в тех же биоптатах на формирование канцероматоза брюшины установлено, что высокие значения экспрессии COX-2 в биоптатах париетальной брюшины диафрагмы и боковых каналов увеличивали

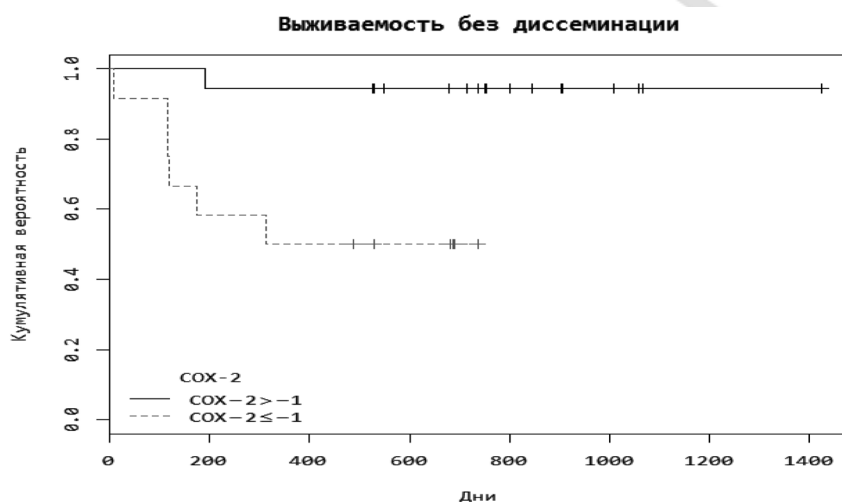
риск прогрессирования заболевания с формированием перитонеальной диссеминации (табл. 3).

Превышение порогового уровня экспрессии COX-2 сопровождалось ухудшением показателей ВСД (рисунок 1).

В противоположность данным, полученным по COX-2, взаимосвязь между значениями экспрессии гена BIRC5 и развитием диссеминированного поражения брюшины нами не установлена.

Таблица 3. Пороговый уровень экспрессии COX-2 и BIRC5 в биоптатах различной локализации для оценки риска перитонеальной диссеминации после радикального хирургического лечения рака желудка по результатам однофакторного анализа

Анализируемый биоптат	Количество наблюдений/количество событий	Результаты однофакторного анализа		
		Пороговый уровень экспрессии гена, отн.ед.	p	ОР (95%ДИ)
<b>COX-2</b>				
Первичная опухоль	40/10	—	0,722	—
Париетальная брюшина диафрагмы и боковых каналов	30/7	≤-1	0,021	12,1 (1,45–101)
Париетальная брюшина малого таза	24/5	—	0,739	—
<b>BIRC5</b>				
Первичная опухоль	45/12	—	0,492	—
Париетальная брюшина диафрагмы и боковых каналов	37/9	—	0,467	—
Париетальная брюшина малого таза	32/7	—	0,675	—

Рис. 1. Кумулятивная выживаемость, свободная от диссеминации, у пациентов с резектабельным раком желудка при различной экспрессии гена COX-2 в париетальной брюшине диафрагмы и боковых каналов ( $p_{\log\text{-rank}} = 0,021$ )

Для выявления предикторов перитонеальной диссеминации проведен многофакторный анализ, по результатам которого установлено, что риск развития канцероматоза после радикального хирургического лечения РЖ

в 12,1 раза выше у пациентов с уровнем экспрессии гена COX-2 в париетальной брюшине, превышающем установленное в данном исследовании пороговое значение — -1 отн.ед (табл. 4).

Таблица 4. Многофакторный анализ зависимости прогрессирования заболевания с развитием перитонеальной диссеминации от уровня экспрессии гена COX-2 и степени распространенности опухолевого процесса

Показатели, ассоциированные с неблагоприятным исходом	Результаты регрессионного анализа		
	$\beta$	p	ОР (95%ДИ)
Пороговый уровень экспрессии COX-2 в париетальной брюшине диафрагмы и боковых каналов	2,4	0,016	21,1 (1,8–252)
pT4 vs pT1-3	-0,9	0,503	—
pN2-3 vs pN0-1	1,3	0,151	—

Включение в многофакторный анализ категорий pT и pN не выявило их прогностического значения для прогнозирования того или иного варианта прогрессирования, включая диссеминацию опухоли по брюшине (табл.4).

Очевидно, наличие экспрессии гена COX-2 в париетальной брюшине обусловлено наличием там, изолированных опухолевых клеток или микрометастазов, поскольку согласно литературным данным экспрессия гена изоформы энзима циклооксигеназы COX-2 отсутствует в нормальных тканях и имеет место в различных типах опухолей, включая рак желудка [7]. Возможно, высокие уровни экспрессии, превышающие пороговое значение, определенное в настоящем исследовании могут свидетельствовать

о наличии в париетальной брюшине именно микрометастазов, как морфологического субстрата для формирования канцероматоза. Представленные нами данные представляют интерес потому, что в исследование включались только пациенты без макроскопических признаков перитонеальной диссеминации, тем не менее, высокие уровни экспрессии COX-2 и последующее прогрессирование с формированием диссеминации имело место как у пациентов с инвазией опухоли серозной оболочки (pT4a-b), так и без таковой (pT1-3). Среди возможных причин развития канцероматоза у пациентов с отсутствием распространения опухоли на серозную оболочку (pT1-3) называются: 1) распространение опухолевых клеток из пересеченных

лимфатических сосудов и лимфоузлов в процессе выполнения лимфодиссекции; 2) лимфогематогенное распространение опухолевых клеток из первичной опухоли [1]. Результаты нашего исследования свидетельствуют о целесообразности выполнения биопсии париетальной брюшины диафрагмы и/или боковых каналов с последующим определением уровня экспрессии COX-2 для выявления пациентов, имеющих высокий риск прогрессирования с формированием диссеминации после радикального хирургического лечения РЖ с целью дифференцированного подхода при определении показаний для профилактики данного варианта прогрессирования заболевания.

**Вывод.** Определение экспрессии COX-2 в париетальной брюшине диафрагмы и боковых каналов у радикально оперированных пациентов РЖ позволит: 1) выявить пациентов, имеющих высокий риск прогрессирования с формированием канцероматоза; 2) дифференцированно подходить к назначению адьювантной интраперитонеальной химиотерапии, опираясь не только на стадию заболевания по системе pTNM; 3) расширить показания к назначению интраперитонеальной химиотерапии за счет категории пациентов с отсутствием инвазии опухолью серозной оболочки желудка (pT1-3), традиционно считающихся менее угрожаемыми в плане развития данного варианта прогрессирования заболевания.

### Литература

1. Ганцев Ш. Х. Перитонеальный канцероматоз — новый взгляд на проблему // [Электронный ресурс]. — Креативн. онкол. и хир., 2013, № 4. — Режим доступа: <http://eoncosurg.com/prezentatsiiiperitoneal-ny-j-kantserom>. — Дата доступа: 7.02.2014.

2. Andersen, P. Cox's regression model for counting processes, a large sample study / P. Andersen, R. Gill // *Annals of Statistics*. — 1982. — Vol. 10. — P. 1100–1120.

3. Application of housekeeping npcRNAs for quantitative expression analysis of human transcriptome by real-time PCR / Ch.R. Galiveti [et al.] // *RNA*. — 2010. — Vol. 16, № 2. — P. 450–461.

4. Assessment of optimally selected prognostic factors / B. Lausen [et al.] // *Biometrical Journal*. — 2004. — Vol. 46, № 3. — P. 364–374.

5. DNA methylation inhibits p53-mediated survivin repression / N. H. Nabils, R. R. Broaddus, D. S. Loose // *Oncogene*. — 2009. — Vol. 28. — P. 2046–2050.

6. Expression of cyclooxygenase-2 in ovarian serous carcinoma: correlation with angiogenesis, nm23 expression and survival / S. Ozuyal [et al.] // *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* — 2009. — Vol. 30. — P. 640–645.

7. Expression of cyclooxygenase-2 in dysplasia of the stomach and in intestinal-type gastric adenocarcinoma / K. Saukkonen [et al.] // *Clin. Cancer Res.* — 2001. — Vol. 7. — P. 1923–1931.

8. High prevalence of cyclooxygenase-2 expression in papillary thyroid carcinoma / Ch.-Y. Lo [et al.] // *Eur. J. Cancer*. — 2005. — Vol. 152. — P. 545–550.

9. *Hothorn T.* Maxstat: maximally selected rank statistics. R package version 0.7-22 [Электронный ресурс]. — 2015. — Режим доступа: <http://CRAN.R-project.org/package=maxstat>.

10. Regulation of microtubule stability and mitotic progression by surviving / A. Giodini [et al.] // *Cancer Res.* — 2002. — Vol. 62. — P. 2462–2467.

11. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up / A. Tichopad [et al.] // *Nucleic Acids Res.* — 2003. — Vol. 31, № 20. — e 122. DOI: 10.1093/nar/gng122.

12. *Therneau, T.* A package for survival analysis in S<sub>v</sub> version 2.38 [Электронный ресурс]. — 2015. — Режим доступа: <http://CRAN.R-project.org/package=survival>.

Поступила 18.10.2016 г.