

М. Ю. Ревтович, А. И. Шмак

ВОЗМОЖНОСТИ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ ПОСЛЕ РАДИКАЛЬНОГО ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ РАКА ЖЕЛУДКА

РНПЦ ОМР им. Н. Н. Александрова, Минск

Предложен способ прогнозирования прогрессирования заболевания после радикального хирургического лечения рака желудка, включающий оценку статуса метилирования гена RECK в первичной опухоли и в смывах с брюшины после завершения лимфодиссекции в сочетании с оценкой степени метастатического поражения регионарного лимфоколлектора.

Ключевые слова: рак желудка, прогрессирование, прогнозирование.

M. Yu. Reutovich, A. I. Shmak

POSSIBILITIES FOR THE PREDICTION OF DISEASE PROGRESSION AFTER RADICAL SURGICAL TREATMENT OF GASTRIC CANCER

It has been provided a method for predicting of disease progression after radical surgical treatment of gastric cancer, that includes evaluation of the methylation status of RECK gene primary tumor and in the peritoneal washings after lymph node dissection in combination with the assessment of the degree of metastatic involvement of regional lymph nodes.

Keywords: gastric cancer, disease progression, prognostication.

Основным методом лечения рака желудка в настоящее время остается хирургический [1], являющийся «золотым стандартом» только при лечении ранних форм заболевания. Однако не менее чем в половине случаев на момент выполнения первичной операции процесс

носит распространенный характер, включающий наличие регионарных лимфогенных метастазов [2]. Выполнение лимфодиссекции D2, принятой в качестве стандарта в странах Юго-Восточной Азии, Северной Америки, Европе [3], не предотвращает последующего прогрессирования

заболевания с развитием отдаленных лимфогематогенных и имплантационных метастазов, частота которого достигает 40–80% [4]. Применение адъювантной химиотерапии в режиме ECF (этопозид, цисплатин, 5-фторурацил) (рандомизированное исследование MAGIC) [5] и адъювантной химиолучевой терапии (рандомизированное исследование SWOG 9008/INT-0116) [6] свидетельствуют об их недостаточной эффективности. Возможной причиной этого является интуитивный подход к определению показаний для адъювантной терапии без индивидуального учета особенностей аденокарциномы на основании использования молекулярно-биологических маркеров, определяющих её инвазивный и метастатический потенциал. В этой связи очевидна необходимость прогнозирования течения заболевания после радикального хирургического лечения для индивидуализированного подхода к назначению адъювантного лечения у пациентов, имеющих высокий риск того или иного варианта прогрессирования заболевания.

На сегодняшний день имеется ряд исследований, в которых продемонстрировано, что определение статуса метилирования различных генов может помочь в прогнозировании отдаленных результатов лечения рака желудка [7, 8]. Метили-

точного цикла и пролиферацию [7]. В частности, характерным для аденокарциномы желудка является наличие метилирования промоторного участка гена RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) – цистеин-богатый, внеклеточный белок с доменами, характерными для ингибиторов протеаз, являющийся геном-супрессором метастазирования [8]. Очевидно, подавление функции данного гена будет сопровождаться более агрессивным клиническим течением заболевания, следовательно, оценка статуса метилирования данного гена может быть использована при прогнозировании прогрессирования рака желудка.

Для проверки данного предположения и с **целью** повысить точность прогнозирования прогрессирования опухолевого процесса после радикального хирургического лечения рака желудка проведено настоящее исследование.

Материал и методы

В исследование включено 97 радикально оперированных пациентов в возрасте от 24 до 75 лет, страдающих раком желудка, с различной степенью распространения опухолевого процесса (табл. 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	45	32 (71)	24 (53)	20 (44)
pT4a-bN1M0	12	5 (42)	2 (17)	4 (33)
pT4a-bN0M0	22	7 (32)	4 (18)	4 (18)
pT1-3N0-3M0	18	5 (28)	3 (17)	3 (17)
Всего, n (%)		49	34	31
Медиана наблюдений до события*, дни		271	245	470
Медиана наблюдений**, дни		872	862	862

Примечание: * – медиана наблюдений для пациентов с зарегистрированным прогрессированием заболевания (цензурированных); ** – медиана наблюдений для пациентов со стабилизацией процесса.

рование ДНК является эпигенетической составляющей генома и представляет собой процесс модификации молекулы ДНК без изменения нуклеотидной последовательности. Нарушения метилирования CpG островков в промоторном регионе встречаются в клетках злокачественных опухолей и сопровождается инактивацией генов-супрессоров опухолей, нарушая регуляцию кле-

Одновременная оценка статуса метилирования гена RECK выполнена в опухолевой ткани желудка и смывах с брюшины после завершения лимфодиссекции (перед постановкой дренажей в брюшную полость и началом проведения интраперитонеальной химиотерапии) у 83 пациентов. Оценка статуса метилирования только в первичной опухоли оказалась возможной у 95

пациентов, в смывах с брюшины – у 85 пациентов. Расчет вероятности развития перитонеальной диссеминации выполнен по методу Каплан-Майера [9] на выборке из 85 пациентов. Молекулярно-генетические исследования выполнены в онкологическом отделении биочиповых технологий (заведующий – А. С. Бабенко) Республиканской молекулярно-генетической лаборатории.

При оценке статуса метилирования промоторного участка гена RECK общую фракцию геномной ДНК выделяли с использованием наборов реагентов: QIAMP DNA Blood Mini Kit №51106 (Qiagen, USA) – выделение из смывов и QIAMP DNA FFPE Tissue Kit №56404 (Qiagen, USA) – выделение из парафиновых блоков, согласно протоколу изготовителя наборов. Степень очистки и концентрацию общей фракции ДНК после выделения оценивали с использованием спектрофотометра Cary 60 UV-VIS (Agilent, USA). Бисульфитную конверсию проводили с использованием набора реагентов EpiTect Bisulfite Kit №59104 (Qiagen, USA). ПЦР с продуктами бисульфитной конверсии проводили с использованием амплификатора CFX-96 (BioRad, USA). Режим амплификации: 95 °C 5 мин. – первичная денатурация; 35 циклов амплификации: 95 °C 10 сек., 60 °C 1 мин.; финальная элонгация: 72 °C 5 мин. Объем реакционной смеси составил 25 мкл. Состав реакционной смеси: специфические олигонуклеотидные праймеры 500 нМ, 50 нг кДНК, 0,2 мМ каждого dNTP, 50 мМ KCl, 25 мМ Трис-HCl, 2 мМ MgCl₂ и 1,25 ME Taq ДНК-полимеразы (ОДО «Праймтех», Беларусь). При оценке результатов руководствовались указаниями оригинальных исследований [7]. Разделение продуктов ПЦР после бисульфитной конверсии проводили в 2% агарозном геле с использованием 1x TAE буферного раствора и камеры PowerPacHV (BioRad, USA). Результаты регистрировали с помощью системы гель-документации GelDocXR+ (BioRad, USA).

Статистический анализ. Анализ влияния статуса метилирования RECK в биоптатах различных локализаций и степени распространенности опухолевого процесса, описываемой категориями pT и pN, на характер прогрессирования заболевания (выживаемость, свободная от диссеминации – ВСД; выживаемость, свободная от прогрессирования – ВСП; канцер-специфическая выживаемость – КСВ) проводился с помощью многофакторной регрессии пропорциональных рисков Кокса. Отношение рисков (ОР) рассчиты-

валось как экспоненциальное преобразование соответствующих коэффициентов регрессии. ДИ для ОР рассчитывались также как экспоненциальное преобразование соответствующих доверительных интервалов коэффициентов регрессии. Расчеты проведены в статистической программе R [10], версия 3.1.3 с использованием пакетов *survival* [11]. Результаты анализа считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Снижение экспрессии гена RECK в первичной опухоли (RECK+ опухоль) обусловило более агрессивное течение болезни, что проявилось статистически значимым ухудшением выживаемости, выявленным в однофакторном анализе: КСВ – $p_{\log\text{-rank}} < 0,001$; ВСД – $p_{\log\text{-rank}} = 0,004$; ВСП – $p_{\log\text{-rank}} < 0,001$. Аналогичное влияние на отдаленные результаты лечения имел положительный статус метилирования гена RECK в смывах после завершения лимфодиссекции (RECK+ смывы). В однофакторном анализе отмечено статистически значимое снижение выживаемости в сравнении с пациентами с RECK – смывами, полученными после завершения лимфодиссекции: $p_{\log\text{-rank}}$ составил для КСВ – 0,0218; для ВСД – 0,0001; для ВСП – 0,0001.

Многофакторный анализ на основе регрессионной модели пропорциональных рисков Кокса подтвердил негативное влияние положительного статуса метилирования гена RECK в опухоли на отдаленные результаты лечения: отмечено увеличение риска прогрессирования заболевания с развитием отдаленных лимфогематогенных метастазов и, следовательно, риска летального исхода, связанного с прогрессированием опухолевого процесса – для ВСП ОР 3,7 (95% ДИ 1,9–7,1; $p < 0,001$), для КСВ ОР 4,3 (95% ДИ 1,8–10,0; $p < 0,001$). Это согласуется с данными литературы и является следствием более агрессивного течения опухолевого процесса на фоне подавления экспрессии гена-супрессора метастазирования [8]. В то же время не отмечено влияния статуса метилирования гена RECK в опухоли на риск развития диссеминации опухоли по брюшине – 1,7 (95% ДИ 0,8–3,5; $p = 0,170$).

В отношении влияния на прогноз статуса метилирования гена RECK в смывах после лимфодиссекции отмечено, что положительный статус метилирования позволяет прогнозировать развитие прогрессирования заболевания

в отдаленные сроки после радикального хирургического лечения рака желудка – ОР 3,0 (95% ДИ 1,6–5,7; $p < 0,001$), в том числе диссеминацию опухоли по брюшине – ОР 3,5 (95% ДИ 1,6–7,6; $p = 0,001$). В то же время не отмечено влияния статуса метилирования RECK в смывах на риск летального исхода от прогрессирования опухолевого процесса – ОР 1,5 (95% ДИ 0,7 – 3,2; $p = 0,40$).

Положительный статус метилирования гена RECK в смывах с брюшины косвенно свидетельствует о присутствии в них свободных опухолевых клеток, поскольку метилирование промоторной области гена RECK характерно именно для опухолевой ткани, в частности для аденокарциномы желудка [8]. Факт увеличения риска прогрессирования заболевания с развитием отдаленных лимфогематогенных метастазов и диссеминации опухоли по брюшине при положительном статусе метилирования гена RECK в смывах указывает на необходимость более углубленного динамического наблюдения пациентов в отдаленные сроки после радикальной операции для своевременной диагностики случаев прогрессирования заболевания и своевременного назначения того или иного варианта противоопухолевого лечения. При этом речь не идет именно об углубленной диагностике только лишь диссеминации опухоли по брюшине, поскольку обнаружение свободных опухолевых клеток в брюшной полости не обязательно является признаком инициальных стадий формирования канцероматоза. Ранее было продемонстрировано, что экспрессия интегрина $\alpha\beta 4$ и частотой перитонеальных метастазов [9]. То есть обнаружение в брюшной полости свободных опухолевых клеток не всегда является признаком развивающегося канцероматоза, но свидетельствует о наличии выраженного инвазивного и метастатического потенциала первичной опухоли, явившегося причиной инвазии опухоли серозной оболочки желудка, эксфолиации опухолевых клеток с её поверхности, а также косвенно может свидетельствовать о наличии отдаленных лимфогематогенных метастазов. Вышесказанное согласуется с результатами оценки экспрессии гена MAGE (melanoma-associated gene – гена, ассоциированного с меланомой) в перитонеальных смывах, согласно которым наличие этой экспрессии является важным прогностическим фактором общей выживаемости [10].

Влияния степени инвазии первичной опухолью стенки желудка (pT) на риск развития неблагоприятных исходов в многофакторном анализе нами не отмечено. В тоже время степень метастатического поражения регионарного лимфоколлектора, описываемая категорией pN, статистически значимо определяла риск развития неблагоприятных исходов заболевания. В частности, при pN3 против pN0-1 – ОР летального исхода от прогрессирования опухолевого процесса (КСВ) составил 3,1 (95% ДИ 1,3–7,8; $p = 0,014$), так же статистически значимо был увеличен риск прогрессирования заболевания с развитием отдаленных лимфогематогенных метастазов (ОР 3,4 (95% ДИ 1,6–7,3; $p = 0,001$) и диссеминации опухоли по брюшине (ОР 3,0 (95% ДИ 1,2–7,5; $p = 0,018$)). Результаты регрессионного анализа в отношении категории pN согласуются с литературными данными, согласно которым метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов при раке желудка считается самым важным прогностическим фактором. Так, если при отсутствии метастатического поражения регионарных лимфоузлов (pN0), 5-летняя выживаемость составляет 68–78%, то при обширном поражении регионарных лимфоузлов (pN3) – 3–14% [11].

Неблагоприятное влияние на прогноз заболевания статуса метилирования гена RECK в первичной опухоли и смывах после завершения лимфодиссекции и степени метастатического поражения регионарного лимфоколлектора (pN) послужили основанием для использования их при оценке вероятности прогрессирования заболевания после радикального хирургического лечения рака желудка.

Оценка вероятности развития прогрессирования заболевания по Каплан-Майеру [8] в зависимости от статуса метилирования гена RECK в первичной опухоли, смывах с брюшины после лимфодиссекции и степени метастатического поражения регионарного лимфоколлектора подтвердила вышесказанное.

Так, при наличии положительного статуса метилирования промоторного участка гена RECK в первичной опухоли или при наличии положительного статуса метилирования RECK в смыве с брюшины и наличии метастазов в семи или более семи регионарных лимфатических узлах (pN3) вероятность прогрессирования рака желудка составляет в течение одного года 67%, в течение двух лет – 77%, в течение трех лет – 95%.

В то же время при отсутствии метилирования промоторного участка гена RECK в первичной опухоли и либо при аналогичном статусе метилирования рассматриваемого гена в смыве с брюшины, либо при наличии метастатического поражения регионарного лимфоколлектора pN0-2 вероятность прогрессирования рака желудка в течение одного года составляет 12%, в течение двух лет 20%, в течение трех лет 40% (таблица 2, рисунок 1). Чувствительность данного способа прогнозирования составляет 73,5%, специфичность – 82,4%, диагностическая аккурратность – 77,1%, информативность (площадь под ROC-кривой) – 0,8; 95% доверительный интервал (0,71–0,89).

Таким образом, используя определение статуса метилирования гена RECK в первичной опухоли и смывах после завершения лимфодиссекции в сочетании с оценкой степени метастатического поражения регионарного лимфоколлектора, может помочь в прогнозировании клинического течения рака желудка после радикального хирургического лечения. Схема алгоритма, который может быть использован при прогнозировании прогрессирования рака желудка после радикального хирургического лечения представлена на рисунке 2.

Предлагаемый способ позволяет оценить особенности фенотипа аденокарциномы желудка у конкретного пациента на этапе первично-

Таблица 2. **Схема оценки вероятности развития прогрессирования заболевания после радикального хирургического лечения рака желудка**

Риск	Оцениваемый показатель	Вероятность развития диссеминации
Высокий риск	1. RECK опухоль «+»	1 год – 67%
	или 2. RECK опухоль «-», но RECK смыв «+» и pN3	2 года – 77% 3 года – 95%
Стандартный риск	1. RECK опухоль «-» и pN0-2	1 год – 12%
	или 2. RECK опухоль «-» и RECK смыв после «-»	2 года – 20% 3 года – 40%

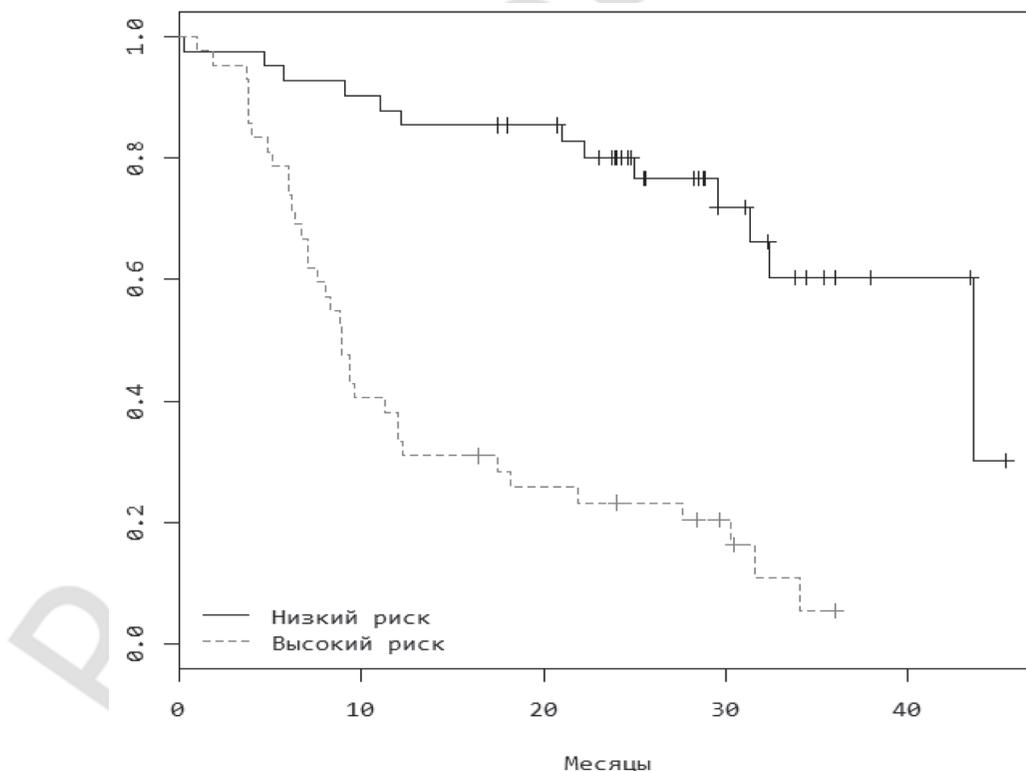


Рис. 1. Показатели выживаемости, свободной от прогрессирования, у пациентов с различным статусом метилирования гена RECK в первичной опухоли и смывах после завершения лимфодиссекции и с различной степенью метастатического поражения регионарного лимфоколлектора (pN)

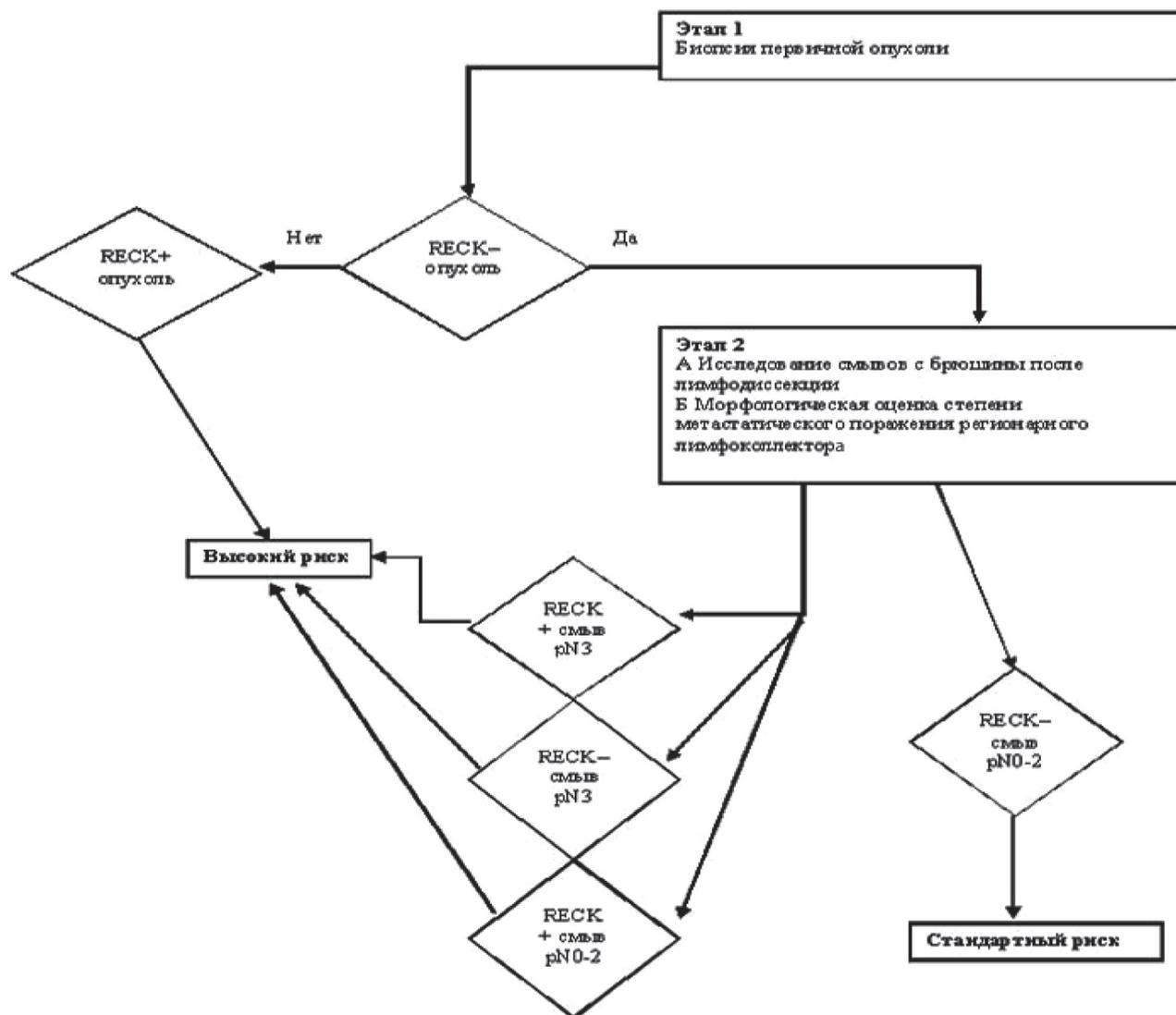


Рис. 2. Алгоритм использования способа прогнозирования прогрессирования рака желудка после радикального хирургического лечения

го радикального хирургического лечения и на основании этого, а также с учетом степени распространенности опухолевого процесса подойти к планированию адъювантного лечения, направленного на профилактику развития отдаленных лимфогематогенных метастазов в зависимости от установленного риска прогрессирования заболевания.

Таким образом, определение статуса метилирования промоторного участка гена RECK в первичной опухоли и смывах с брюшины после завершения лимфодиссекции параллельно с определением степени метастатического поражения регионарного лимфоколлектора (pN) может использоваться при прогнозировании прогрессирования заболевания после радикального хирургического лечения рака желудка.

Литература

1. Patient survival after D1 and D2 resection for gastric cancer: long-term results of the MRC randomized surgical trial. Surgical Co-operative group / A. Cuschieri [et al.] // Brit. J. Cancer. – 1999. – Vol. 79, № 9-10. – P. 1522-1530.
2. Современное состояние проблемы комбинированного лечения местнораспространенного рака желудка: основные тенденции клинической онкологии / М. Д. Тер-Ованесов [и др.] // Вопр. онкологии. – 2015. – Т. 61, № 3. – С. 329-338.
3. European Society for Medical Oncology (ESMO); European Society for Surgical Oncology (ESSO); European Society of Radiotherapy and Oncology (ESTRO). Gastric Cancer: ESMO- ESSO- ESTRO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up / T. Waddell [et al.] // Eur. J. Surg. Oncol. – 2014. – Vol. 40. – P. 584-591.
4. Скоропад, В. Ю. Современное состояние адъювантной терапии рака желудка после радикальных оперативных вмешательств с расширенной лимфодиссекцией /

В. Ю. Скоропад // *Вопр. онкологии.* – 2015. – Т. 61, № 3. – С. 339–345.

5. *Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer* / D. Cunningham [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – Vol. 350. – P. 11–20.

6. *Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction* / J. S. MacDonald [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2001. – Vol. 345. – P. 725–730.

7. *Ushijima, T., Sasako M. Focus on gastric cancer* / T. Ushijima, M. Sasako // *Cancer Cell.* – 2004. – Vol. 5. – P. 121–125.

8. *Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008* / F. Bray [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2013. – Vol. 132. – P. 1133–1145.

9. *Integrin α Jeon, CH, Shin IH, Park JB, et al. Prognostic significance of MAGE in peritoneal washes in gastric carcinoma patients without peritoneal metastasis results of a 5-year follow-up study* / C. H. Jeon [et al.] // *J. Clin. Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 44. – P. 682–686.

10. *Reim, D. Prognostic implications of the seventh edition of the international union against cancer classification for patients with gastric cancer: the Western experience of patients treated in a single-center European institution* / D. Reim, M. Loos, F. Vogl // *J. Clin. Oncol.* – 2013. – Vol. 10 – N. 31 – P. 263–271.

Поступила 02.03.2017 г.