

УДК616.33-006.6-06-085.277-085.841.114-039.75

Ю.О. ВІННИК, Т.М. ПОПОВСЬКА, О.В. МОВЧАН, О.Є. КОТЕНКО, В.Є. КУЛЬШИН
*Харківська медична академія післядипломної освіти, кафедра онкохірургії, Харків***МІКРОСАТЕЛІТНА НЕСТАБІЛЬНІСТЬ ПРИ СПОРАДИЧНОМУ РАКУ ШЛУНКА**

У дослідженні представлені результати променевої та хіміотерапії цисплатином та 5-фторурацилом у пацієнтів з місцево поширеним раком шлунка залежно від мікросателітної нестабільності у локусах BAT-25, 26, відповідальних за гени постреплікативної репарації MSH2, MLH1. Показано, що у 50 % хворих на місцево розповсюджений рак шлунка має місце мутаторний фенотип з мікросателітною нестабільністю за локусами BAT-25, BAT-26. Максимальний терапевтичний ефект променевої терапії з модифікацією цисплатином досягнуто у хворих, у яких не було МСН; а за модифікації 5-фторурацилом – у пацієнтів з наявністю мікросателітної нестабільності за локусами BAT-25, BAT-26. Токсичні ефекти хіміопротерапії не пов'язані з генетичними особливостями пухлини, а є результатом дії цисплатину та 5-фторурацилу на органи та системи організму пацієнта.

Ключові слова: рак шлунка, хімотерапія, променева терапія, мікросателітна нестабільність

Вступ. Сучасна онкологія, виходячи з результатів молекулярно-генетичних досліджень, вважає, що рак належить до хвороб геному. Основні молекулярно-генетичні відмінності ракової клітини від нормальної клітини можна представити з трьох взаємозалежних позицій:

1. Активуючі мутації в онкогенах;
2. Інактивуючі мутації в антионкогенах;
3. Геномна нестабільність.

Остання, можливо, визначає дві попередні, оскільки геномна нестабільність сприяє нагромадженню безлічі мутацій, формуючи так званий мутаційний фенотип, що призводить до порушення контролю реплікації ДНК, репарації, проліферації та апоптозу.

Однією з видів геномної нестабільності є мікросателітна нестабільність (МСН). МСН – це багаторазово повторювані короткі послідовності нуклеотидів у ДНК, які не мають будь-якої генетичної інформації, але необхідні для підтримки цілосності структури ДНК. У зв'язку з тим, що мікросателіти побудовані з повторюваних ділянок, вони сильніше інших ділянок ДНК піддаються нагромадженню помилок, що призводять до порушення правила однакової довжини мікросателітів. Слід зазначити, що сама зміна довжини мікросателітів не призводить до порушень в транскрипції генів, але це є відбитком порушення репарації ДНК, отже, є показником щодо накопичення помилок у ДНК, що рано чи пізно призводить до активації онкогенів чи інактивації генів-супресорів.

Відомо, що відтворення спадкової інформації при утворенні нових клітин забезпечується реплікацією ДНК. Нуклеотидна послідовність всього геному мусить бути точно та безпомилково передана від однієї соматичної клітини до іншої. Помилки реплікації підлягають виправленню системою постреплікативної репарації.

У людини відомо 8 генів постреплікативної репарації, так званих генів стабільності: MSH2, MSH3, MSH4, MLH1, PMS1, PMS2, GTBP (MSH6). Мутації у генах стабільності – рання подія канцерогенезу, яка генерує серію вторинних мутацій у

різних генах і особливий вид нестабільності структури ДНК у вигляді високої варіабельності структури нуклеотидних мікросателітів – МСН.

МСН, що трапляється найчастіше – мутація зародкових ліній генів MSH2, MLH1, інактивація яких порушує продукцію відповідних ядерних білків, відповідальних за відновлення комплементарності ниток ДНК під час реплікації [4].

Найбільш вивченими пухлинами з доведеними клінічними значеннями МСН є аденокарциноми товстого кишківника і прямої кишки, пухлини ендометрію і епітеліальні пухлини яєчників [7, 6, 11, 13].

Встановлено, що біологічні особливості росту пухлини, прогноз захворювання та ефект на проведену терапію лікарськими засобами, залежить від наявності МСН [3].

Останніми роками з'явилися роботи про дослідження МСН при спорадичному раку шлунка [9, 14].

Мета дослідження. Вивчити частоту трапляння МСН за локусами BAT-25; BAT-26 при МРШ. Вивчити асоціативний зв'язок МСН за локусами BAT-25; BAT-26 з абластичним ефектом та токсичними проявами під час використання фторпиригідинів і препаратів платини.

Матеріали та методи. Обстежено 70 хворих на МРШ. Діагноз верифіковано гістологічно: аденокарцинома G1-G2 виявлена у 23 пацієнтів, G3-G4 – у 47. Усі пацієнти мали ІV стадію захворювання за класифікацією TNM. Усі пацієнти отримували променеву терапію за схемою у два етапи до сумарної дози 60 Гр. Перший етап до СОД 40 Гр. протягом 28 днів, після двотижневої перерви – другий етап до СОД 20 Гр. упродовж 14 днів. Разова доза 2 Гр. 5 разів на тиждень. У першій групі (35 пацієнтів) модифікація проводилася цисплатином (50 мг після 16:00, раз на сім днів напередодні променевої терапії). У другій групі (35 пацієнтів) – 5-фторурацилом (5-ФУ) – 500 мг після 16:00, раз на сім днів напередодні променевої терапії. Абластичний ефект оцінювали за RECIST; токсичність – за шкалою токсичності (Common Toxicity Criteria NCIC).

МСН оцінювали полімеразно ланцюговою реакцією (ПЛР), використовуючи два квазімономорфні мононуклеотидні маркери (ВАТ-25; ВАТ-26). Для отримання ДНК з пухлинного матеріалу достатньої молекулярної ваги і необхідного ступеня чистоти використовували наступний метод виділення ДНК: тканину пухлини знімали очними ножицями і далі гомогенізували, додавали протеїназу до концентрації 50 мкг/мл і SDS до 0,5 % розтиранням зі склом, інкубували 12 годин при 37 °С. Доводили обсяг зразка до 5 мл розчином 10 мМ трис-ЕДТА, рН 8,0, і послідовно проводили екстракцію ДНК рівними обсягами фенолу, сумішню фенол-хлороформ і хлороформом. До зразку додавали 1/10 обсягу 5 М ацетату натрію, рН 5,3, перемішували і осаджували ДНК 2,5 обсягами холодного 96 % етанолу, витримуючи зразок 30 хв. за нормальної температури – 70° С. Пробу центрифугували 15 хв з прискоренням 12000g. Висушували осад ДНК ззовні і розчиняли в 200 мкл 10 мМ трис-ЕДТА, рН 8.0. Якість виділеної ДНК перевіряли електрофорезом в 1,5 % агарозному гелі з візуалізацією етидієм броміду. Виділену ДНК зберігали при температурі –20° С

ПЛР проводили для визначення мікросателітної нестабільності з допомогою локусів ВАТ-25, ВАТ-26 за стандартною схемою на термоциклері «Терцик-2» фірми ДНК.

Використовувані праймери (2) для мікросателітної послідовності ВАТ-26:

5'-TGA CTA CTT' TGG ACT TCA GCC-3'
 5'-AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C-3',
 Для мікросателітної послідовності ВАТ-25:
 5'-TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT-3'
 5'-TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC-3'.

У реакційну суміш, що містить 50 мМ КСl, 10 мМ трис-НСl, рН 8,4, вводили по 5 лМ праймерів, 2,5 мМ MgCl₂, 200 мкММ dNTP, 10 % DMSO, 5 мМ меркаптоетанолу і 2 одиниці термофільної ДНК-полімерази. Потім додавали краплю вазелінової олії, прогрівали суміш при 95° С протягом 10 хв. й проводили 33 цикли з параметрами: денатурація: 95° С – 30 сек, відпал і елонгація: 55 С – 30 сек.

Фінальну інкубацію проводили при 72° С протягом 10 хв.

Результати ПЛР оцінювали у 8 % ПААГ з наступним фарбуванням у розчині бромистого етидію з концентрацією 1 мг/мл, як маркери молекулярної ваги використовували ДНК плазмиди, гідролізовані ферментом НраII.

Статистичні гіпотези про наявність чи відсутність значних відмінностей результатів лікування різними препаратами до різних варіантів біологічного статусу пацієнтів перевірялися за допомогою чотириклітинного χ^2 -критерію [2]. До кожного з чотирьох варіантів біологічних характеристик формувалася таблиця:

Таблиця 1

Розрахунок χ^2 - критерію

Препарат L_1 цисплатин	a	b
Препарат L_2 5-фторурацил	c	d
	Підгрупа А Часткова регресія пухлини	Підгрупа Б Прогресія пухлини

Де a – число пацієнтів, що котрі лікувалися препаратом L_1 , які за результатами лікування опинилися у підгрупі А (регресія чи стабілізація);

b – число пацієнтів, котрі лікувалися препаратом L_1 , які за результатами лікування опинилися у підгрупі Б (прогресія);

c – число пацієнтів, котрі лікувалися препаратом L_2 , які за результатами лікування опинилися у підгрупі А (регресія чи стабілізація);

d – число пацієнтів, котрі лікувалися препаратом L_2 , які за результатами лікування опинилися у підгрупі Б (прогресія).

Введено гіпотези:

H_0 – статистично значущі розбіжності у ефективності препарату L_1 та L_2 немає,

H_1 – статистично значущі розбіжності у ефективності препарату L_1 та L_2 є.

Перевірка гіпотез здійснюється порівнянням значення розраховуваного критерію

$$\chi^2 = \frac{n(ad - bc)^2}{(a + b)(c + d)(a + c)(b + d)},$$

$$n = a + b + c + d$$

з критичним значенням $\hat{\chi}^2 = 2,7$, яке визначалося за таблицею при заданому числі ступенів свободи та рівні значущості $\alpha = 0,1$. Якщо при цьому $\chi^2 > \hat{\chi}^2$, то гіпотеза H_0 свідчить про незалежність результатів лікування від схеми, що використовувалася, з надійністю 0,9 похибки. За умови отримання інших результатів ця гіпотеза приймається, тобто статистично значущі розбіжності у ефективності лікування відсутні.

Для оцінки співвідношення токсичних ефектів терапії було використано метод порівняння двох середніх генеральних сукупностей, дисперсії деяких оцінювалися [1].

Результати досліджень та їх обговорення. За результатами аналізу МСН послідовності ВАТ-25, ВАТ-26 усі пацієнти були розподілені на 4 групи (табл. 2).

Таблиця 2

Розподіл хворих МРШ в залежності від мікросателітної нестабільності з використанням локусів ВАТ-25, ВАТ-26

Локуси	1 група (n=35)	2 група (n=10)	3 група (n=21)	4 група (n=4)
ВАТ-25	Негативний	Негативний	Позитивний	Позитивний
ВАТ-26	Негативний	Позитивний	Негативний	Позитивний

З наведених даних випливає, що у 50 % хворих визначалася МСН хоча б у одному локусі, що відповідає за гени стабільності ДНК: MSH2, MLH1.

Тобто, можна припустити, що у 50 % хворих на МРШ можливе порушення постреплікативної репарації. При цьому у 21(30 %) хворих МСН зареєстрована за локусами ВАТ-25, у 10(14,3 %) хворих – за ВАТ-26, у 4(5,7 %) – за обома локусами.

Оцінка ефективності лікування проводилася за шкалою RECIST. Повної регресії не було досягнуто жодного разу. Часткова регресія (зменшення вимірюваних об'єктів на 30 % та більше) виявлено у 30 хворих, стабілізація – у 17 хворих. Прогресування хвороби (збільшення на 20 % найменшої суми об'єктів ураження чи поява нових об'єктів) відзначено у 23 хворих (рис. 1).

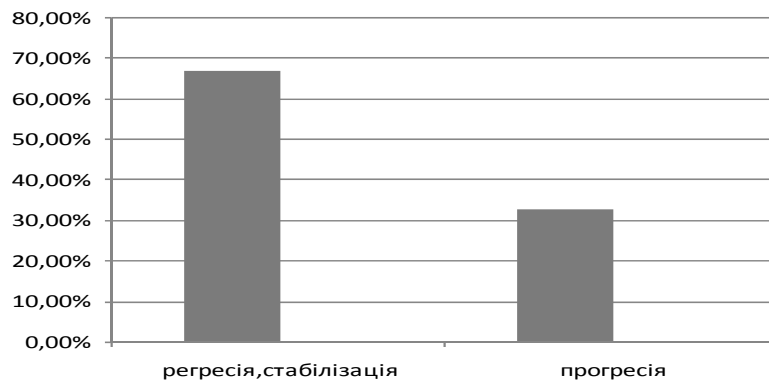


Рис. 1. Результати хіміопроменевого лікування у хворих на місцеворозповсюджений рак шлунка

Таблиця 3

Розподіл хворих за результатами лікування та наявністю МСН у ВАТ-25, ВАТ-26.

Лікарський препарат	Групи							
	Відсутня (n=35)		ВАТ-26 (n=10)		ВАТ-25(n=21)		ВАТ-25,26(n=4)	
	$\chi = 3,14$		$\chi = 0,093$		$\chi = 2,93$		$\chi = 0,08$	
	Регресія Абсол. число /%	Прогрес Абсол. число /%	Регресія Абсол. число /%	Прогрес Абсол. число /%	Регресія Абсол. число /%	Прогрес Абсол. число /%	Регресія Абсол. число /%	Прогрес Абсол. число /%
цисплатин	20/ 57,1	9/ 25,7	2/ 20	1/ 10	2/ 9,5	2/ 9,5	1	0
5-ФУ	2/ 5,7	4/ 11,4	5/ 50	2/ 20	13/ 62	4/ 19	2	1

Статистична обробка даних результатів лікування з використанням цисплатину та 5-ФУ продемонструвала, що встановлена розбіжність терапевтичного ефекту за різних варіантів МСН є вірогідною (табл. 3).

Найкращий абластомний ефект при використанні цисплатину як радіомодифікатора при проведенні променевої терапії відзначався у хворих без наявності мікросателітної нестабільності за локусами ВАТ-25, 26 (57,1 %). У той же час максимальний терапевтичний ефект при використанні 5-ФУ досягнуто з МСН за локусом ВАТ-25 (62 %) та ВАТ-26 (50 %). На жаль, у зв'язку з малою кількістю хворих з МСН за обома локусами, робити висновки щодо ефективності лікування неможливо. Аналізуючи ефективність лікування, не можна залишити без уваги токсичні прояви терапії, оцінювання яких проводилося за гематологічними показниками (анемія, нейтропенія, тромбоцитопенія) та за дисфункцією ШКТ (діарея, нудота, блювання). Прояви токсичних ефектів 3–4 ступенів оцінювались як «не дуже часті», «значно часті» та «однаково часті». За результатами статистичних досліджень гематологічні ускладнення при МСН за локусом ВАТ-25 однаково часто траплялися у всіх групах, а за локусом ВАТ-26 дещо частіше за використання цисплатину. Діарея, нудота, блювання помітно частіше спостерігалися при використанні 5-ФУ у всіх групах, що зумовлено не біоло-

гічними властивостями пухлини, а дією препарату на організм пацієнта.

Таким чином, при фактично рівнозначних токсичних проявах виявлені різні терапевтичні ефекти цисплатину та 5-ФУ за наявності МСН. Відомо, що прогресія пухлини може пройти двома незалежними шляхами: втратою гетерозиготності генів та накопиченням помилок реплікації (МСН) як результат мутацій в генах постреплікативної репарації [10,12]. У той же час аналіз мікросателітних локусів у клітинах карцином шлунка довів, що наявність МСН більше, ніж у двох локусах відповідає меншому подальшому ураженню. Пухлини з МСН характеризуються більш вираженою лімфоїдною інфільтрацією, тобто виявляють менш агресивний перебіг та мають кращий прогноз.

Висновки.

1. Виявлено, що у 50 % хворих на МРШ спостерігається мутаторний фенотип з МСН за локусами ВАТ-25, ВАТ-26.

2. Максимальний терапевтичний ефект променевої терапії з модифікацією цисплатином досягнуто у хворих, у яких не було МСН; а за модифікації 5-ФУ – у пацієнтів з наявністю МСН за локусами ВАТ-25, ВАТ-26.

3. Токсичні ефекти хіміопроменевої терапії не пов'язані з генетичними особливостями пухлини, а є результатом дії цисплатину та 5-ФУ на органи та системи організму пацієнта.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гмурман В.Е. Теория вероятностей и математическая статистика / В.Е. Гмурман. — М.: Высшая школа, 2002. — 497 с.
2. Закс Л. Статистическое оценивание / Л. Закс. — М.: Статистика, 1976. — 598 с.
3. Новик А.А. Введение в молекулярную биологию канцерогенеза: Уч. пособие / А.А. Новик – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. — 224 с.
4. Фаллер Д.М., Шилде Д. Молекулярная биология клетки. Руководство для врачей. Перевод с англ. / Д.М. Фаллер, Д. Шилде. — М.: БИНОМ-Пресс, 2003 — 272 с.
5. Arnold S. Classifying MLH1 and MSH2 variants using bioinformatic prediction, splicing assays, segregation, and tumor characteristics / S. Arnold, D.D. Buchanan, M. Barker [et al.] // Hum Mutat. — 2009. — Vol. 30 (5). — P. 757–770.
6. Bacani J. Tumor microsatellite instability in early onset gastric cancer / J. Bacani, R. Zwingerman, N. Di Nicola [et al.] // J Mol Diagn. — 2005. — Vol. 7 (4). — P. 465–477.
7. Barak F. The rate of the predominant Jewish mutations in the BRCA1, BRCA2, MSH2 and MSH6 genes in unselected Jewish endometrial cancer patients / F. Barak, R. Milgrom, Y. Laitman [et al.] // Gynecol. Oncol. — 2010. — Vol. 119. — P. 511–515.
8. Becker K. F. (2000). The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer / K. F. Becker, G. Keller, H. Hoefler // Surg Oncol. — 2000. — Vol. 9 (1). — P. 5–11.
9. Beghelli Microsatellite instability in gastric cancer is associated with better prognosis in only stage II cancers / S. Beghelli, G. de Manzoni, S. Barbi // Surgery. — 2006. — Vol. 139 (3). — P. 347–356.
10. Bouzourene H. Selection of patients with germline MLH1 mutated Lynch syndrome by determination of MLH1 methylation and BRAF mutation / H. Bouzourene, P. Hutter, L. Losi [et al.] // Fam. Cancer. — 2010. — Vol. 9. — P. 167–172.
11. Gryfe R. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer / R. Gryfe, H. Kim, E.T Hseh [et al.] // N. Eng. J. Med. — 2000. — Vol. 342. — P. 69–77.
12. Mechanisms of pathogenicity in human MSH2 missense mutants / S. Ollila, D. Dermadi Bebek, J. Jiricny, M. Nystrom // Hum. Mutat. — 2008. — Vol. 29. — P. 1355–1363.
13. Buhard O. 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.
14. Rahner N. Clinical utility gene card for: Lynch syndrome (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) / N. Rahner, V. Streinke, B. Schelgelberer [et al.] // Eur. J. Hum. Genet. — 2010. — Vol. 18 (9). — P. 1077–1079.

Y.O. VINNIK, T.N. POPOVSKA, O. MOVCHAN, O. KOTENKO, V. KULSHYN

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Department of Oncosurgery, Kharkiv

MICROSATELLITE INSTABILITY IN SPORADIC GASTRIC CANCER

This study investigated comparative results of radiation and chemotherapy with cisplatin and 5-FU for patients with the locally-spread gastric cancer allowing for microsatellite instability on loci BAT-25; BAT-26 those responsible for genes of postreplicative reparation MSH2, MLH1. It is shown that 50 % of patients with the locally-spread gastric cancer have mutation phenotype with microsatellite instability on loci BAT-25,26. The highest therapeutic effect of X-ray therapy with updating of the cisplatin were reached at patients without microsatellite instability; and in patients with microsatellite instability updating of the 5-FU. Toxic effects of radiation and chemotherapy were not connected with genetic features of the tumor, but were defined by the influence of cisplatin and 5-FU to organism of the patient.

Key words: gastric cancer, chemotherapy, radiation therapy, microsatellite instability

Стаття надійшла до редакції: 26.02.2013 р.