

**ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОГО
ПРОФИЛЯ ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF THE MOLECULAR-BIOLOGICAL
PROFILE OF PATIENTS WITH PANCREATIC CANCER**

***В. В. Дробышева, Е. М. Шпадарук, Р. М. Смолякова
V. Drobysheva, K. Shpadaruk, R. Smolyakova***

*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь
drob.valeriya17@gmail.com
Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus*

В ходе молекулярно-генетического анализа у пациентов с раком поджелудочной железы были выявлены полиморфизмы в гене DPC4 (делеции в 508 и 513 кодонах) и мутации в гене K-ras, а также проанализирован уровень экспрессии пролиферативного антигена Ki-67. В настоящем исследовании был проведен анализ взаимосвязи молекулярно-биологических маркеров рака поджелудочной железы и клинических данных пациентов. Проведен статистический анализ общей выживаемости пациентов во взаимосвязи с уровнем экспрессии Ki-67, наличием мутаций в гене K-rasi полиморфизмом в гене DPC4.

During molecular genetic analysis, patients with pancreatic cancer were found to have polymorphisms in the DPC4 gene (coding at 508 and 513 codons) and mutations in the K-ras gene, also analyzed the expression level of the Ki-67 proliferative antigen. In this study, an analysis of the relationship of molecular biological markers of pancreatic cancer and clinical data of patients was carried out. Statistical analysis of the overall survival of patients in relation to the expression level of Ki-67, the presence of mutations in the K-ras gene and polymorphism in the DPC4 gene.

Ключевые слова: рак поджелудочной железы, K-ras, DPC4, Ki-67, мутация, экспрессия, полиморфизм, общая выживаемость.

Keywords: pancreatic cancer, K-ras, DPC4, Ki-67, mutation, expression, polymorphism, overall survival.

По данным GLOBOCAN 2018 в мире было зарегистрировано 2,5 % (458 918) новых случаев заболеваемости раком поджелудочной железы среди всех злокачественных новообразований. Смертность от данного заболевания наблюдалась в 4,5 % (432 242) случаев от всех смертей, вызванных онкологическими заболеваниями. По этим данным рак поджелудочной железы занимает 10-е место по распространенности и 4 место по 5-летней выживаемости в мире. Это может быть обусловлено в связи с ухудшением экологической ситуации в развитых странах [1].

В диагностике данного заболевания существует ряд сложностей. Прежде всего, это связано с бессимптомным течением заболевания на первых стадиях. Пациенты обращаются за медицинской помощью на III или IV стадии, когда опухоль имеет большие размеры или дает метастазы.

Ген RAS является протоонкогеном, расположенный в хромосоме 12p. Он играет важную роль в пролиферации опухолевой клетки, апоптоза, ее метастазирование и др. RAS белки принимают важное участие в RAS-сигнальном пути клетки. При раке поджелудочной железы было отмечено, что наличие точечных мутаций в данном гене приводит к уменьшению выживаемости пациентов, у которых выявлен экзокринный рак. Стоит отметить, что мутации в данном гене встречаются у 95 % случаев рака поджелудочной железы. Некоторые исследователи считают, что мутации в данном гене можно использовать в качестве маркера на ранней стадии неоплазии поджелудочной железы [2].

DPC4 (homozygously deleted in pancreatic carcinoma) – ген-супрессор опухолевого роста при раке поджелудочной железы. Данный ген локализован на 18 хромосоме (18q21.1). Он способен контролировать пролиферацию клеток железы, а так же включает процесс апоптоза. Данные механизмы осуществляются за счет сигнального пути трансформирующего фактора роста β (TGF- β). С потерей функцией SMAD4 происходит выключение TGF- β пути, что приводит к неконтролируемой клеточной пролиферации. Это также опосредованно с более худшими прогнозами течения заболевания и приводит к широким метастазам. Также некоторые исследования отмечают, что при мутации в данном гене опухоль в большинстве случаев метастазирует в печень. В ходе изучения мутаций в гене DPC4 было установлено, что потеря функции белка SMAD4 коррелируется с возникновением протоковой аденокарциномы поджелудочной железы [3].

Ki-67 – это ядерный белок, принимающий активное участие в пролиферации клеток. Гиперэкспрессия наблюдается при развитии раковых новообразований. Следовательно, данный белок является специфичным маркером при развитии злокачественных новообразований. При детекции Ki-67 в ткани поджелудочной железы менее

чем в 15 % клеток опухоль считается менее агрессивной, а при показателе более чем 30 % клеток опухоль можно отнести к высоко агрессивной [4].

В основу работы для исследования были использованы данные 70 пациентов, страдающих раком поджелудочной железы, находившиеся на лечении в Государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова».

С помощью программного обеспечения STATISTICA (версия 10.0, «StatSoft», США) проводился анализ корреляции между молекулярно-биологическими параметрами и клиническими данными пациентов, страдающих раком поджелудочной железы, с использованием коэффициента корреляции Спирмена, а также оценка общей выживаемости осуществлялась с применением метода Каплан-Майер.

Выделение геномной ДНК из образцов опухолевых тканей осуществлялось с помощью наборов «QIAamp DNA FFPE Tissue» фирмы «Qiagen» (Германия) в соответствии с инструкцией. В ходе исследования был проведен анализ по выявлению мутаций в гене K-ras методом REMS-PCR (полимеразная цепная реакция с рестрикцией эндонуклеазой) у 66 пациентов с раком поджелудочной железы. ПЦР-анализ выполнялся на амплификаторе «ICycler». У 61 пациента была выполнена детекция мутаций в 11 экзоне гена DPC4 (Smad4) методом ПЦР с последующим секвенированием. Определение уровня экспрессии ядерного антигена Ki-67 у 70 пациентов, страдающих раком поджелудочной железы, осуществлялось иммуногистохимическим методом с применением реагентов ДАКО (Дания) с системой визуализации (EnVision+).

При анализе клинических данных пациентов с раком поджелудочной железы было установлено, что наиболее часто встречаемый морфотип – протоковая аденокарцинома, выявленная у 43 (62,86 %) пациентов. Муцинозная аденокарцинома была обнаружена у 10 (14,29 %) пациентов, а метастатическая аденокарцинома – у 5 (7,14 %). Количество пациентов со смешанной протоково-эндокринной карциномой составило 3 (4,29 %), карциноидом – 2 (2,86 %), высокодифференцированной нейроэндокринной карциномой – 2 (2,86 %), аденокарциномой кишечного типа составляет 1 (1,43 %) случай, недифференцированным раком – 1 (1,43 %), нейроэндокринной карциномой – 1 (1,43 %), светлоклеточной аденокарциномой – 1 (1,43 %).

При исследовании распространенности опухолевого процесса у пациентов с раком поджелудочной железы было установлено, что IA стадия детектирована у 1 (1,43 %) пациента; IB стадия – 2 (2,89 %); IIA стадия – 14 (20 %); IIB стадия – 17 (24,29 %); III стадия – 5 (7,14 %); IV стадия – 31 (44,29 %).

Средний возраст анализируемой группы пациентов, страдающих раком поджелудочной железы, составил $59,8 \pm 1,39$ года. Распространенность по полу составила: мужчины – 35 (50 %) случаев, женщин – 35 (50 %). Общая выживаемость пациентов с раком поджелудочной железы составила $13,4 \pm 2,1$ месяцев, медиана выживаемости – 6 месяцев.

В зависимости от локализации опухоли преобладал рак головки поджелудочной железы, диагностированный у 41 (58,57 %) пациента, головки и тела – 9 (12,86 %), тела – 8 (11,43 %), тотальное поражение железы – 6 (8,57 %), хвоста – 3 (4,29 %), тела и хвоста – 3 (4,29 %). Такое распределение по локализации обусловлено анатомическим строением поджелудочной железы – головка самая большая часть органа.

В ходе проведенного молекулярно-биологического исследования было установлено, что мутации в 12 кодоне 1 экзона гена K-ras обнаружены у 41 (62,12 %) пациента. Полиморфизм гена DPC4 представлен в двух вариантах: делеция в 508 и 513 кодонах. У 9 (14,75 %) пациентов имеют делеция в 513 кодоне, и 3 (4,92 %) пациента в 508 кодоне. Пациентов с гипоэкспрессией белка Ki-67 было детектировано 26 (37,14 %), отсутствие экспрессии – у 25 (35,71 %) пациентов. Гиперэкспрессия наблюдалась у 19 (27,14 %) пациентов. У 45 пациентов (64,29 %) выявлена экспрессия белка Ki-67, что может свидетельствовать об агрессивном течении заболевания.

В результате проведенного исследования было установлено, что у 27 (65,85 %) пациентов с мутацией в гене K-ras диагностируется протоковая аденокарцинома, муцинозная аденокарцинома – 5 (12,2 %), карциноид – 2 (4,88 %), метастатическая аденокарцинома – 2 (4,88 %), недифференцированный рак – 1 (2,44 %), нейроэндокринная карцинома – 1 (2,44 %), светлоклеточная аденокарцинома – 1 (2,44 %), смешанная протоково-эндокринная аденокарцинома – 1 (2,44 %), аденокарцинома кишечного типа – 1 (2,44 %). При изучении опухолевой распространенности у пациентов, страдающих раком поджелудочной железы IB стадия выявлена в 2 (4,88 %) случаях, IIA стадия – 9 (21,95 %), IIB стадия – 9 (21,95 %), III стадия – 4 (9,76 %), IV стадия – 17 (41,46 %). Чаще всего злокачественное новообразование локализуется в головке железы – 23 (56,1 %) пациента, головка и тело – 6 (14,63 %), тело – 5 (12,2 %), хвост – 3 (7,32 %), тотальный рак – 3 (7,32 %), хвост и тело – 1 (2,44 %). При наличии мутаций 5-летняя выживаемость у пациентов составляет $14,48 \pm 2,53$ месяцев, медиана составила 7 месяцев, без мутаций $10,04 \pm 3,04$ месяцев, медиана – 6 месяцев. При этом 78 % пациентов, с выявленными мутациями в гене K-ras, умерло от основного заболевания.

У пациентов, страдающих раком поджелудочной железы, при детекции делеций в гене DPC4 из всех морфотипов чаще диагностировалась протоковая аденокарцинома – 9 (75 %) случаев, смешанная протоково-эндокринная карцинома – 1 (8,33 %), муцинозная аденокарцинома – 1 (8,33 %), карциноид 1 (8,33 %). При анализе опухолевой прогрессии было установлено, что 5 (41,67 %) пациентов находились на IIA стадии заболевания, IIB стадия – 7 (58,33 %), IV стадия – 1 (8,33 %). Преимущественно опухоль локализовалась в головке железы 8 (66,67 %), тело – 2 (16,67 %), хвост – 1 (8,33 %), головка и тело – 1 (8,33 %). С делециями в гене DPC4 общая выживаемость пациентов составляет $20,42 \pm 5,48$ месяцев, медиана составила 12 месяцев, без делеций $11,9 \pm 2,2$

месяцев, а медиана составила 5 месяцев. При оценке 5-летней выживаемости было установлено, что 75 % пациентов с полиморфизмом гена DPC4 скончались от основного заболевания.

Особо важным в прогнозе течения заболевания является определение маркеров пролиферации, отражающих пролиферативную активность, как фактор злокачественной трансформации клетки, так и признак агрессивного поведения уже развившихся опухолей. Среди них первое место занимает антиген Ki-67, экспрессирующийся во всех фазах митотического цикла.

При отсутствии экспрессии белка Ki-67 у пациентов с раком поджелудочной железы протоковая аденокарцинома диагностировалась в 16 (64 %) случаев, муцинозная аденокарцинома – 3 (12 %), высокодифференцированная карцинома – 2 (8 %), метастатическая аденокарцинома – 1 (4 %), нейроэндокринная аденокарцинома – 1 (4 %), светлоклеточная аденокарцинома – 1 (4 %), смешанная протоково-эндокринная карцинома – 1 (4 %). У 2 (8 %) пациентов злокачественное новообразование находилось на IA стадии опухолевой прогрессии, ПА стадия – 3 (12 %), ПВ стадия – 8 (32 %), III стадия – 3 (12 %), IV стадия – 9 (36 %). Общая выживаемость пациентов без экспрессии 12,89±3,89 месяцев. Медиана при данном показателе составила 5 месяцев.

При гипоэкспрессии ядерного белка Ki-67 у 14 (53,85 %) пациентов диагностирована протоковая аденокарцинома, муцинозная аденокарцинома – 6 (23,1 %), смешанная протоково-эндокринная карцинома – 2 (7,69 %), карциноид – 2 (7,69 %), метастатическая аденокарцинома – 2 (7,69 %). При этом у 1 (3,85 %) пациента опухоль диагностирована на IA стадии, ПА стадия – 6 (23,08 %), ПВ стадия – 7 (26,92 %), III стадия – 1 (3,85 %), IV стадия – 11 (42,31 %). Рак головки поджелудочной железы выявлен у 16 (61,54 %) пациентов, тело – 3 (11,54 %), тотальный рак – 3 (11,54 %), головка и тело – 2 (7,69 %), хвост – 2 (7,69 %). Общая выживаемость у пациентов с гипоэкспрессией ядерного белка Ki-67 составляет 13,4±3,98 месяцев. Медиана составила 9 месяцев.

У пациентов с гиперэкспрессией белка Ki-67 среди всех морфотипов чаще диагностируется протоковая аденокарцинома, верифицированная у 14 (73,68 %) пациентов, метастатическая аденокарцинома – 2 (10,53 %), аденокарцинома кишечного типа – 1 (5,26 %), муцинозная аденокарцинома – 1 (5,26 %), недифференцированный рак – 1 (5,26 %). При выявлении опухолевой распространенности установлено, что у 5 (26,32 %) пациентов опухоль детектирована на ПА стадии заболевания, ПВ стадия – 2 (10,53 %), III стадия – 1 (5,26 %), IV стадия – 11 (57,89 %). Также, у 8 (42,11 %) пациентов поражена головка поджелудочной железы, головка и тело – 6 (31,58 %), тело – 3 (15,79 %), тело и хвост – 1 (5,26 %), тотальный рак – 1 (5,26 %). 5-летняя выживаемость у пациентов с гиперэкспрессией составляет 12,53±1,2 месяца, а медиана – 5 месяцев.

Было выявлено, что при наличии экспрессии белка Ki-67 от основного заболевания умерло 78 % пациентов.

При изучении 5-летней выживаемости 70 пациентов, страдающих раком поджелудочной железы, от основного заболевания умерло 79 %. Медиана выживаемости составила 6 месяцев, а средняя продолжительность жизни – 13,4±2,1 месяцев.

При анализе общей выживаемости пациентов, страдающих раком поджелудочной железы, в зависимости от стадии опухолевого процесса было установлено, что выживаемость пациентов с III и IV стадиями заболевания ниже, чем при II стадии распространенности ($p = 0,0002$). Выживаемость пациентов с III стадией составляет – 7,1±2,6 месяца с медианой 4 месяца, с IV стадией 8,8±6,1 месяца, при медиане 3 месяца. Общая выживаемость пациентов со II стадией заболевания 13,4±3,34 месяца, а медиана – 12 месяцев.

Анализ общей выживаемости пациентов с раком поджелудочной железы изучался в зависимости от наличия полиморфизмов гена DPC4, мутаций гена K-ras, различного уровня экспрессии белка Ki-67. Было установлено, что при наличии делеций в гене DPC4 у пациентов, страдающих раком поджелудочной железы, наблюдается тенденция снижения выживаемости ($p_{\text{(Каплан-Майер)}} = 0,096$). При анализе данных общей выживаемости у пациентов с гиперэкспрессией Ki-67 и при наличии мутаций в гене K-ras выявлено незначительное снижение продолжительности жизни, однако данные не являются статистически значимыми ($p_{\text{(Каплан-Майер)}} > 0,05$).

В данной работе проведена оценка взаимосвязи между наличием мутаций гена K-ras, наличием делеций гена DPC4, уровнем экспрессии белка Ki-67 и клиническими данными (морфотип, стадия опухолевой прогрессии, степень дифференцировки) с помощью корреляционного анализа по Спирмену. Все показатели характеризуются уровнем значимости при $p < 0,05$.

В результате корреляционного анализа выявления взаимосвязей между наличием мутаций в гене K-ras, делеций гена DPC4 был получен коэффициент равный 0,297, уровнем экспрессии белка Ki-67 и наличием мутаций гена K-ras – 0,074, наличием полиморфных вариантов и экспрессией ядерного белка Ki-67 – 0,333. Все изученные пары характеризуются прямой взаимосвязью слабой силы.

Анализ корреляционной взаимосвязи между молекулярно-биологическими данными рака поджелудочной железы (наличие мутаций гена K-ras, наличие полиморфных вариантов гена DPC4, уровень экспрессии белка Ki-67) и клиническими данными пациентов (морфотип, стадия опухолевой прогрессии, степень дифференцировки) показал наличие слабой связи между исследуемыми параметрами. Отрицательная взаимосвязь выявлена в парах: морфотип и наличие полиморфизмов в гене DPC4 и составила $R_s = -0,097$, морфотип и наличие мутаций гена K-ras $R_s = -0,014$, морфотип и экспрессия белка Ki-67 – $R_s = -0,048$, стадией опухолевой прогрессии и наличием полиморфных вариантов гена DPC4 – $R_s = -0,336$, стадией заболевания и наличием мутаций в гене K-ras – $R_s = -0,059$, степенью дифференцировки опухоли и наличия делеций в гене DPC4 – $R_s = -0,191$. При этом положительная, слабая взаимосвязь установлена между стадией и уровнем экспрессии белка Ki-67 – 0,111, сте-

пенью дифференцировки и наличием мутаций в гене K-ras – $R_s = 0,1895$, степенью дифференцировки и уровне экспрессии белка Ki-67 – $R_s = 0,076$.

По полученным данным при определении взаимосвязей между изучаемыми молекулярно-биологическими параметрами (мутации в гене K-ras, полиморфизмы гена DPC4, уровни экспрессии ядерного белка Ki-67) выявлено, что нет взаимосвязей среди исследуемых пар. Результаты анализа взаимосвязи молекулярно-биологических показателей (мутации в гене K-ras, полиморфизмы гена DPC4, уровни экспрессии ядерного белка Ki-67) и клинических данных пациентов, страдающих раком поджелудочной железы (морфотип, стадия опухолевой прогрессии, степень дифференцировки), показал, что изучаемые показатели являются независимыми прогностическими факторами. Выявленная слабая корреляционная взаимосвязь между изучаемыми параметрами характеризует общность биологических процессов, участвующих в онкотрансформации, отражающих агрессивное течение заболевания и неблагоприятный прогноз.

Таким образом, в результате проведенных молекулярно-биологических исследований было установлено, что наиболее часто встречаемый морфотип – протоковая аденокарцинома на IV стадии опухолевого процесса. Мутации в гене K-ras выявлены у 61,12 % пациентов, полиморфные варианты гена DPC4 у 19,67 % случаев, экспрессия Ki-67 у 64,19 % пациентов. Общая выживаемость пациентов с мутациями в гене K-ras составила 7 месяцев, а без мутаций – 6 месяцев. У пациентов с делециями гена DPC4 медиана составила 12 месяцев, без делеций – 5 месяцев. При отсутствии экспрессии белка Ki-67 5-летняя выживаемость 5 месяцев, у пациентов с гипоэкспрессией – 9 месяцев, с гиперэкспрессией – 5 месяцев. При этом было установлено, что наличие полиморфных вариантов гена DPC4 может являться тенденцией прогностически значимого критерия ($p_{\text{(Каплан-Майер)}} < 0,1$), в виду резкого снижения выживаемости пациентов с детектированными делециями данного гена. В зависимости от стадии распространенности опухолевого процесса было установлено, что общая выживаемость пациентов, страдающих раком поджелудочной железы, с III и IV стадиями заболевания статистически значимо ниже, чем при II стадии ($p_{\text{(Каплан-Майер)}} = 0,0002$). Следовательно, исходя из полученных данных, рак поджелудочной железы является гетерогенной опухолью, характеризующийся независимыми прогностически значимыми молекулярно-биологическими маркерами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bray, F. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / F. Bray [et. al] // CA Cancer. – 2018. – Vol. 68. – № 6. – P. 394–424.
2. Sahin, I. H. Molecular signature of pancreatic adenocarcinoma: an insight from genotype to phenotype and challenges for targeted therapy / I.H.Sahin [et. al] // Expert Opinion Ther Targets. – 2016. – Vol. 20. – № 3. – P. 341–359.
3. Wood, L. D. Pathology and Molecular Genetics of Pancreatic Neoplasms / L. D. Wood, R. H. Hruban // Cancer Journal. – 2012. – Vol. 18. – № 6. – P. 492–501.
4. Pelosi, E. Pancreatic Cancer: Molecular Characterization, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells / E. Pelosi [et. al] // Biomedicines. – 2017. – Vol. 65. – № 5. – P. 44–96.

ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ МОЧИ – НЕИНВАЗИВНЫЙ СПОСОБ ДОКЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ НЕФРОПАТИИ У НОВОРОЖДЕННЫХ URINE LUMINESCENCE AS A NON-INVASIVE METHOD /FOR PRECLINICAL DIAGNOSTIC OF NEPHROPATHIA IN NEWBORNS

**Г. П. Зубрицкая, А. Г. Кутько, Е. И. Слобожанина
G. Zubritskaya, A. Kutko, E. Slobozhanina**

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь
slobozhanina@ibp.org.by*

Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Science, Minsk, Republic of Belarus

Разработан неинвазивный экспресс-способ выявления патологии мочевой системы у новорожденных детей, заключающийся в анализе параметров собственной люминесценции мочи новорожденного. Появление в спектре люминесценции мочи максимума в области 520–540 нм свидетельствует о перинатальной нефропатии на стадии предболезни у новорожденных. Главное преимущество этого способа – неинвазивность, экспрессность, достоверность и возможность выявления патологии мочевой системы у недоношенных новорожденных.

A non-invasive express method of detecting of the urinary system pathology in newborns was developed. The method based on analysis of the intrinsic luminescence parameters of the newborn's urine. When in the luminescence spectrum of urine appeared the maximum in the region of 520–540 nm it indicates perinatal nephropathy at the stage