

Особенности транскрипционной активности гена *K-RAS* и экспрессии рецепторов семейства ErbB в аденокарциноме желудка кишечного типа

В. А. Туманский, Т. А. Христенко

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

Цель работы – изучить особенности экспрессии мПНК гена *K-RAS*, а также ростовых рецепторов семейства ErbB (EGFR и HER2/neu) опухолевыми клетками аденокарциномы желудка кишечного типа и их взаимосвязь с уровнями клеточной пролиферации и апоптоза.

Материалы и методы. Проведено патогистологическое, иммуногистохимическое и молекулярно-генетическое исследование аденокарциномы желудка кишечного типа у 30 пациентов 49–86 лет, а также 10 образцов слизистой оболочки желудка обычной гистологической структуры.

Результаты. Установлено, что аденокарцинома желудка кишечного типа характеризуется повышенным уровнем экспрессии мПНК гена *K-RAS* [$Me = 3,62 (0,57; 5,87)$]. Имеется обратная слабая корреляционная связь между возрастанием уровня экспрессии мПНК гена *K-RAS* и снижением степени гистологической дифференцировки опухоли от G3 до G1 ($r = -0,36$). В 100 % аденокарцином желудка кишечного типа выявлена мембранная экспрессия рецепторов EGFR и HER2/neu. При этом выраженная (+++/++) экспрессия EGFR имеет место в 76,66 % аденокарцином, в то время как HER2 позитивные (+++) составили 46,66 %. Имеется прямая сильная корреляционная связь между показателями экспрессии опухолевыми клетками рецепторов EGFR и HER2/neu ($r = 0,80$), прямая средней силы корреляционная связь между показателями экспрессии маркеров EGFR и Ki-67 ($r = 0,53$), а также прямая средней силы корреляционная связь между показателями экспрессии маркера EGFR и мПНК гена *K-RAS* ($r = 0,57$). Не выявлено корреляций между уровнями экспрессии опухолевыми клетками аденокарциномы желудка кишечного типа маркеров апоптоза (p53 и каспазы-3), рецепторов EGFR и HER2/neu, а также уровнем экспрессии мПНК гена *K-RAS*.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о том, что возрастание экспрессии рецепторов EGFR и HER2/neu клетками аденокарциномы желудка кишечного типа приводит к активации транскрипции и трансляции гена *K-RAS* с последующей активацией ERK-сигнального пути, реализующего пролиферативный потенциал опухолевых клеток. Определение ErbB-рецепторного статуса аденокарциномы желудка кишечного типа целесообразно учитывать при выборе индивидуализированной таргетной терапии.

Особливості транскрипційної активності гена *K-RAS* та експресії рецепторів сімейства ErbB в аденокарциномі шлунка кишкового типу

В. О. Туманський, Т. О. Христенко

Мета роботи – вивчити особливості експресії мПНК гена *K-RAS*, а також ростових рецепторів сімейства ErbB (EGFR і HER2/neu) пухлинними клітинами аденокарциноми шлунка кишкового типу та їхній взаємозв'язок із рівнями проліферації та апоптозу.

Матеріали та методи. Здійснили патогістологічне, імуногістохімічне та молекулярно-генетичне дослідження аденокарциноми шлунка кишкового типу у 30 пацієнтів 49–86 років, а також 10 зразків слизової оболонки шлунка звичайної гістологічної будови.

Результати. Установлено, що аденокарцинома шлунка кишкового типу характеризується підвищеним рівнем експресії мПНК гена *K-RAS* [$Me = 3,62 (0,57; 5,87)$]. Наявний зворотний слабкий кореляційний зв'язок між зростанням рівня експресії мПНК гена *K-RAS* і зниженням ступеня гістологічного диференціювання пухлини від G3 до G1 ($r = -0,36$). У 100 % аденокарцином шлунка кишкового типу виявлено мембранну експресію рецепторів EGFR і HER2/neu. При цьому виразна (+++/++) експресія EGFR спостерігалась у 76,66 % аденокарцином, тоді як HER2 позитивні (+++) пухлини становили 46,66 %. Наявний прямий сильний кореляційний зв'язок між показниками експресії пухлинними клітинами рецепторів EGFR і HER2/neu ($r = 0,80$), прямий середньої сили кореляційний зв'язок між показниками експресії маркерів EGFR і Ki-67 ($r = 0,53$), а також прямий середньої сили кореляційний зв'язок між показниками експресії маркера EGFR і мПНК гена *K-RAS* ($r = 0,57$). Не виявлено кореляцій між рівнями експресії пухлинними клітинами аденокарциноми шлунка кишкового типу маркерів апоптозу (p53 та каспази-3), рецепторів EGFR і HER2/neu, а також рівнем експресії мПНК гена *K-RAS*.

Висновки. Дані, що отримали, свідчать: збільшення експресії рецепторів EGFR і HER2/neu клітинами аденокарциноми шлунка кишкового типу призводить до активації транскрипції та трансляції гена *K-RAS* із наступною активацією ERK-сигнального каскаду, що реалізує проліферативний потенціал пухлинних клітин. Визначення ErbB-рецепторного статусу аденокарциноми шлунка кишкового типу доцільно враховувати під час вибору індивідуалізованої таргетної терапії.

Ключевые слова:

рак желудка, аденокарцинома, рецепторы факторов роста, пролиферация, апоптоз.

Патология. – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 129–135

DOI:
10.14739/2310-1237.2017.2.109250

E-mail:
hristenkota@i.ua

Ключові слова:

рак шлунка, аденокарцинома, рецептори факторів росту, проліферація, апоптоз.

Патологія. – 2017. – Т. 14, № 2(40). – С. 129–135

Key words:

gastric cancer, adenocarcinoma, growth factor receptors, cell proliferation, apoptosis.

Pathologia

2017; 14 (2), 129–135

The features of transcriptional activity of *K-RAS* gene and expression of ErbB family receptors in intestinal-type gastric adenocarcinoma

V. A. Tumanskiy, T. A. Khrystenko

Aim – to study the features of expression of the *K-RAS* gene mRNA and the ErbB family growth receptors (EGFR and HER-2/neu) by the tumor cells of the intestinal-type gastric adenocarcinoma, and also their relations to the processes of cell proliferation and apoptosis.

Materials and methods. Pathohistological, immunohistochemical and molecular-genetic studies of the intestinal-type gastric adenocarcinoma from 30 patients (the age ranged from 49 to 86 years) and 10 samples of the normal gastric mucosa were performed.

Results. It has been established that intestinal-type gastric adenocarcinoma is characterized by the elevated level of expression of the *K-RAS* gene mRNA [Me = 3.62 (0.57; 5.87)]. There is the inverse weak correlation between the elevated expression level of the *K-RAS* gene mRNA and the decrease of the histological differentiation degree of the tumor from G3 to G1 ($r = -0.36$). In 100 % of the intestinal-type gastric adenocarcinomas, that were investigated, membrane expression of the EGFR and HER-2/neu receptors was detected. Herewith the intense expression of the EGFR (+++/++) occurs in 76.66 % of the adenocarcinomas, while the HER2 positive status (+++) occurs in 46.66 % of the adenocarcinomas. There is the direct strong correlation between the expression levels of the EGFR and HER2/neu markers by the tumor cells ($r = 0.80$), the direct medium correlation between the expression levels of the EGFR and Ki-67 markers ($r = 0.53$), and the direct medium correlation between the expression levels of the EGFR marker and *K-RAS* gene mRNA ($r = 0.57$). There are no correlations between the levels of expression of the apoptosis markers (p53 and caspase-3), EGFR and HER2/neu receptors, as well as the expression level of the *K-RAS* gene mRNA by the tumor cells of intestinal-type gastric adenocarcinoma.

Conclusions. These data suggest that the increasing of the expression levels of EGFR and HER2/neu receptors by the tumor cells of intestinal-type gastric adenocarcinoma leads to the activation of transcription and translation of the *K-RAS* gene, followed by the activation of the ERK-signaling pathway that realizes the proliferative potential of the tumor cells. The examination of ErbB-state of the intestinal-type gastric adenocarcinoma is expediently for the individual target-treatment selection.

Несмотря на регистрируемое в последнее десятилетие снижение частоты рака желудка (РЖ), он, по данным глобальной статистики, занимает четвёртое место в мире по заболеваемости и второе место – по смертности от злокачественных новообразований [1]. Лечение пациентов с местно-распространённым РЖ в странах Западной Европы и Северной Америки проводится преимущественно путём неoadъювантной химиотерапии с последующим хирургическим удалением опухоли, в то время как в странах Азии – преимущественно путём оперативного вмешательства с последующей адъювантной химиотерапией. Показатели выживаемости больных РЖ несколько улучшили достижения в области таргетной терапии [2]. Но даже при условии адекватного лечения показатель 5-летней выживаемости больных с продвинутыми стадиями РЖ не превышает 40 % [3].

В развитии РЖ активно изучается роль протоонкогенов (*c-erbB-2*, *K-RAS*, *c-мус*, *src* и других), контролирующих пролиферацию и апоптоз опухолевых клеток [4], а также влияние ростовых факторов, таких как белки семейства ErbB (HER) – EGFR, *c-erbB-2*, *c-erbB-3* и семейства *c-erbB-4* – HER-1, HER-2, HER-3 и HER-4 [5], поскольку их активация и/или дисрегуляция играют важную роль в опухолевой прогрессии и метастазировании [6]. Аберрантная иммуногистохимическая (ИГХ) экспрессия EGFR и HER-2/neu выявляется не только в РЖ, но также в раке молочной и предстательной железы, в раке яичников и лёгких [5,9]. РЖ отличается выраженная молекулярная гетерогенность: аденокарцинома желудка кишечного типа (АКЖКТ) характеризуется преимущественно гиперэкспрессией протоонкогенов (*c-erbB-2*, *K-RAS*, *c-мус*, *src*), контролирующих пролиферацию опухолевых клеток, в то время как РЖ диффузного типа характеризуется

преимущественно гиперэкспрессией некоторых онкогенов (*c-met*, *K-Sam*) и утратой опухолевыми клетками молекул межклеточной адгезии [4].

Ген *K-RAS* кодирует внутриклеточный белок (RAS-протеин), который обеспечивает передачу внешних сигналов ростовых факторов от клеточных мембранных рецепторов семейства ErbB в ядро клетки и является ключевым компонентом MAPK-сигнального каскада, регулирующего пролиферацию опухолевых клеток, устойчивость к апоптозу, метастазирование и ангиогенез в опухоли. [7]. Мутации гена *K-RAS*, обнаруживаемые в некоторых злокачественных опухолях, ассоциированы с повышенной активностью RAS-протеина, аномально активирующего Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) сигнальный каскад без воздействия внешних сигналов ростовых факторов через мембранные рецепторы клетки, в том числе – через рецепторы эпидермального фактора роста. Именно поэтому опухоли, в которых выявляются мутации гена *K-RAS*, нечувствительны к анти-EGFR таргетной терапии [5,8]. По данным современной научной литературы, частота мутаций гена *K-RAS* в РЖ колеблется в пределах 0–29 % с медианой 6,5 %, в то время как амплификация гена *K-RAS* наблюдается в 1–9 % случаев. В связи с низкой частотой генетических аномалий и относительно малыми объёмами исследованных выборок данные о взаимосвязях между *K-RAS*-статусом РЖ, его клинико-морфологическими параметрами и выживаемостью больных пока имеют недостаточную статистическую мощь [8].

Рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR) являются продуктом протоонкогена *ErbB1* (*HER1*) и относятся к рецепторам тирозин-специфических протеинкиназ. Рецептор 2 типа к эпидермальному фактору роста HER2 кодируется протоонкогеном

c-erbB-2 и является трансмембранным протеином с тирозинкиназной активностью, который вовлечён в MAPK-сигнальный каскад [7,9]. После связывания с лигандами EGFR формирует гетеродимеры с рецепторами HER2, передающими сигнал на внутриклеточный RAS-протеин, который переходит в активное (GTP-связанное) состояние, активируя тем самым MAPK-сигнальный каскад. Последний, в свою очередь, включает несколько путей передачи сигналов, которые, регулируя функции нескольких факторов транскрипции, оказывают влияние на процессы клеточной пролиферации, апоптоза, инвазии и метастазирования, а также тумор-ассоциированного ангиогенеза [7,9]. Таким образом, рецепторы эпидермального фактора роста влияют на биологическое поведение и злокачественный потенциал опухоли.

Однако вопрос о прогностической ценности *K-RAS*-статуса АКЖКТ, а также уровней экспрессии HER2/neu и EGFR опухолевыми клетками всё ещё остаётся открытым [3,8].

Цель работы

Изучить особенности экспрессии мРНК гена *K-RAS*, а также ростовых рецепторов семейства ErbB (EGFR и HER2/neu) клетками аденокарциномы желудка кишечного типа и их взаимосвязь с уровнем клеточной пролиферации и апоптоза.

Материалы и методы исследования

Проведено патогистологическое, иммуногистохимическое (ИГХ) и молекулярно-генетическое исследование аденокарциномы желудка кишечного типа (АКЖКТ) у 30 пациентов 49–86 лет. Группу контроля составили 10 образцов слизистой оболочки желудка обычной гистологической структуры. Среди исследованных АКЖКТ высокодифференцированные G1 карциномы составили 6,67 %, умеренно дифференцированные G2 – 26,66 %, низкодифференцированные G3 – 66,67 %. АКЖКТ, локализирующиеся в пределах слизистой оболочки и подслизистой основы (T1), составили 10 %; карциномы, прорастающие в мышечный слой (T2), – 30 %; прорастающие в подсерозную основу (T3) – 46,66 %; прорастающие в серозную оболочку (T4) – 13,34 %. АКЖКТ без метастазов в регионарных лимфатических узлах (N0) составили 60 %, карциномы с метастазами в 1–2 лимфатических узлах (N1) – 40 %.

Образцы опухоли и слизистой оболочки желудка фиксировали в 10 % забуференном формалине и заливали в парафин. Микроструктуру рака оценивали в парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, в серийных парафиновых срезах проводили ИГХ исследование ростовых рецепторов по стандартной методике [10] с использованием моноклональных антител Po Rb A-Hu EGFR, *Clone SP9* (DBS, США) и Po Rb A-Hu *c-erbB-2* Oncoprotein, *Clone a0485* (DAKO, Дания) [синоним HER2/neu], а также системы визуализации EnVisionFLEX с диаминобензидином (DAKO, США). Результаты ИГХ исследования оценивали в микроскопе AXIOPLAN 2 (Carl Zeiss, ФРГ).

Таблица 1. Специфические пары праймеров, использованные для анализа исследуемого и референтного генов

Ген	Праймер	Tm, °C	Product length (bp)	Exon junction
<i>K-RAS</i>	F = AAGACAGAGAGTGGAGGATGC	59,17	51	642/ 643
	R = TGTCGGATCTCCCTCACCAA	60,25		
<i>β-actin (ACTB)</i>	F = CCTTTGCCGATCCGCCG	61,30	59	78/79
	R = GATATCATCATCCATGGTGGCTGG	61,15		

Мембранную экспрессию рецепторов EGFR и HER2/neu оценивали в соответствии со шкалой, разработанной компанией DAKO и одобренной USFDA [11]: (-) – полное отсутствие экспрессии либо фрагментарная мембранная экспрессия менее чем в 10 % клеток опухоли; (+) – незначительная фрагментарная мембранная экспрессия более чем в 10 % клеток опухоли; (++) – умеренная экспрессия в базолатеральных отделах мембран или на всём протяжении мембран более чем в 10 % клеток опухоли, (+++) – значительная экспрессия в базолатеральных отделах мембран или на всём протяжении мембран более чем в 10 % клеток опухоли.

Молекулярно-генетические исследования проводили в материале, фиксированном в 10 % забуференном формалине и залитом в парафин. Для выделения тотальной РНК образцы ткани депарафинизировали в ксилоле и регидратировали в нисходящих концентрациях этанола (100 %, 96 %, 70 %), далее гомогенизировали и в пробирках «Ахуген» (USA) повторно депарафинизировали и регидратировали. Для выделения из ткани тотальной РНК использовали «Trizol RNA Prep 100» (Isogen Lab. Ltd, Российская Федерация), для получения кДНК – набор «OT-1» (Syntol, Российская Федерация). Реакционная смесь общим объёмом 25 мкл содержала 1 мкл Random-6 праймера, 2 мкл тотальной РНК, 8,5 мкл деионизированной H₂O, очищенной от нуклеаз, 12,5 мкл реакционной смеси (2,5x) и 1 мкл ревертазы MMLV-RT. Обратную транскрипцию проводили при 45 °C в течение 45 минут с последующим нагреванием в течение 5 минут при 92 °C.

Для определения уровня экспрессии мРНК использовали амплификатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) и набор реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green R-402 (Syntol, Российская Федерация). Финальная реакционная смесь для амплификации включала краситель SYBR Green, ДНК-полимеразу SynTaq с ингибирующими активность фермента антителами, 0,2 мкл прямого и 0,2 мкл обратного специфического праймера, dNTP-дезоксинуклеозидтрифосфаты, 1 мкл матрицы (кДНК). Специфические пары праймеров (5'–3') для анализа исследуемого (*KRAS*) и референтного (*ACTB*) генов фирмы Thermo Scientific (США) были подобраны в программе Primer Blast (НИН, США) (табл. 1).

Амплификация состояла из 45–50 циклов и проведена при следующих условиях: денатурация – 95 °C, 15 секунд; отжиг – 59–61 °C, 30–60 секунд; элонгация – 72 °C, 30 секунд. Относительное нормализованное количество кДНК целевого гена определяли методом $\Delta\Delta C_t$. Статистический анализ данных ПЦР проводили при помощи программного обеспечения

Таблица 2. Корреляционные связи между экспрессией мРНК гена *K-RAS*, экспрессией *Ki-67*, *p53*, каспазы-3, *EGFR*, *HER2/neu* опухолевыми клетками, а также показателями *G*, *T*, *N* (pTNM) аденокарциномы желудка кишечного типа

	<i>KRAS</i>	<i>Ki-67</i>	<i>p53</i>	<i>casp-3</i>	<i>EGFR</i>	<i>HER2/neu</i>	<i>G</i>	<i>T</i>	<i>N</i>
<i>KRAS</i>	1,00	0,73*	0,25	0,21	0,57*	0,68*	-0,36*	-0,06	-0,14
<i>Ki-67</i>	0,73*	1,00	0,15	0,98*	0,53*	0,61*	-0,07	-0,09	-0,20
<i>p53</i>	0,25	0,15	1,00	0,45*	0,19	0,16	-0,28	-0,19	-0,19
<i>casp-3</i>	0,21	0,98*	0,45*	1,00	0,23	0,14	-0,17	-0,03	-0,11
<i>EGFR</i>	0,57*	0,53*	0,19	0,23	1,00	0,80*	0,01	0,27	0,22
<i>HER2/neu</i>	0,68*	0,61*	0,16	0,14	0,80*	1,00	-0,01	0,21	0,13
<i>G</i>	-0,36*	-0,07	-0,28	-0,17	0,01	-0,01	1,00	0,31	0,08
<i>T</i>	-0,06	-0,09	-0,19	-0,03	0,27	0,21	0,31	1,00	0,46
<i>N</i>	-0,14	-0,20	-0,19	-0,11	0,22	0,13	0,08	0,46	1,00

*: наличие корреляции.

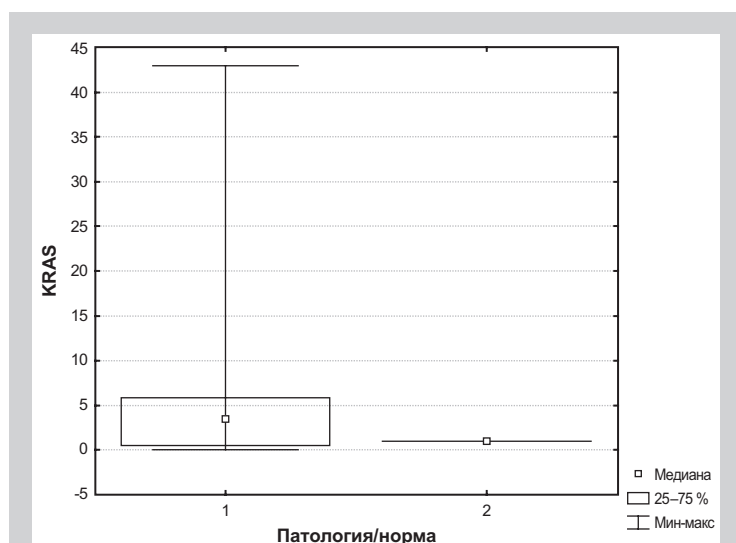


Рис. 1. Медианы экспрессии мРНК гена *K-RAS* в аденокарциноме желудка кишечного типа (1) и нормальной слизистой оболочки желудка (2) соответственно.

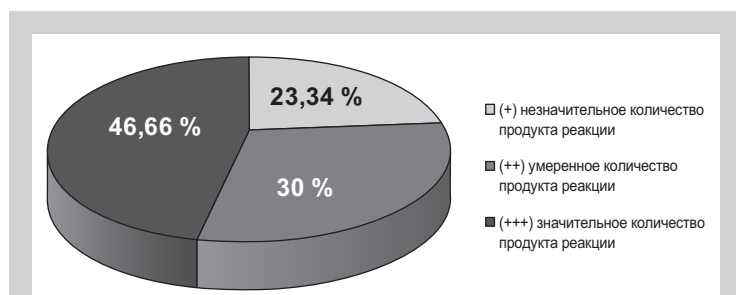


Рис. 2. Экспрессия *EGFR* в аденокарциноме желудка кишечного типа.

CFX Manager™ (Bio-Rad, USA). В эксперимент были включены негативные контроли: без добавления кДНК матрицы в реакцию ПЦР, без добавления мРНК матрицы в синтезе кДНК, без добавления фермента в синтезе кДНК. Реакции амплификации выполняли на индивидуальных образцах в трёх повторах.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи пакета «Statistica® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., лицензия №AXXR712D833214FAN5). Вычисляли медиану (*Me*), нижний и верхний квартили (*Q*₁; *Q*₃); изучение связей между исследуемыми параметрами проводили с помощью коэффициента

ранговой корреляции Спирмена (*r*). Результаты считали статистически значимыми на уровне 95 % (*p* < 0,05).

Результаты и их обсуждение

В результате молекулярно-генетического исследования установлено, что опухолевые клетки аденокарциномы желудка кишечного типа в сравнении с клетками слизистой оболочки желудка обычного гистологического строения характеризуется повышенным уровнем экспрессии мРНК гена *K-RAS* (рис. 1): медиана относительного нормализованного соотношения уровня экспрессии мРНК гена *K-RAS* клетками АКЖКТ составляет 3,62 (0,57; 5,87).

Согласно результатам статистического анализа, между уровнем экспрессии мРНК гена *K-RAS* опухолевыми клетками АКЖКТ и глубиной инвазии опухоли (pT), а также метастатическим поражением регионарных лимфатических узлов (pN) корреляций не выявлено (табл. 2). При этом выявлена обратная слабая корреляционная связь между возрастанием уровня экспрессии мРНК гена *K-RAS* и снижением степени гистологической дифференцировки АКЖКТ (от G3 до G1) (табл. 2). Таким образом, более высокий уровень экспрессии мРНК гена *K-RAS* в большей мере характерен для высоко- и умеренно дифференцированных карцином.

При ИГХ исследовании установлено, что в 100 % АКЖКТ в опухолевых клетках имеет место мембранная экспрессия рецепторов эпидермального фактора роста *EGFR* и *HER2/neu*. При этом низкий уровень экспрессии *EGFR* (+) зафиксирован в 23,4 % исследованных АКЖКТ, в 30 % аденокарцином имеет место умеренный уровень экспрессии маркера (++), в 46,66 % АКЖКТ – высокий уровень экспрессии *EGFR* (+++) опухолевыми клетками (рис. 2). Таким образом, выраженная экспрессия рецепторов эпидермального фактора роста (++/+++) имеет место в 76,66 % исследованных АКЖКТ (рис. 3).

Согласно научным литературным данным, экспрессия опухолевыми клетками *EGF*-рецепторов отмечается в 9–68 % всех гистологических вариантов РЖ, а выраженная экспрессия этого маркера выявляется в 20–25 % РЖ [12]. По данным Y. Bang et al. [2] экспрессия *EGFR* чаще выявляется в АКЖКТ, чем в РЖ диффузного типа. Определённая в нашем исследовании существенно большая частота экспрессии опухолевыми клетками *EGF*-рецепторов характеризует

именно АКЖКТ, а не все гистологические варианты рака желудка. Установлено, что высокий уровень экспрессии EGFR ассоциируется с повышенным риском инвазии и метастазирования опухоли, в то время как сниженный уровень его экспрессии ассоциируется с угнетением пролиферации и миграции опухолевых клеток, а также с подавлением тумор-ассоциированного ангиогенеза [13]. M. Gao et al. (2013) установили наличие прямой корреляционной связи между уровнем экспрессии EGFR опухолевыми клетками и такими клинико-морфологическими характеристиками РЖ как размер опухоли >5 см, степень её гистологической дифференцировки, глубина инвазии РЖ, наличие регионарных и отдалённых метастазов [12]. M. Terashima et al. (2011) показали, что высокий уровень экспрессии EGFR опухолевыми клетками ассоциируется со сниженными показателями выживаемости больных РЖ [14]. В нашем исследовании не выявлено статистически значимых корреляционных связей между уровнем экспрессии EGFR клетками АКЖКТ и степенью гистологической дифференцировки опухоли (G), глубиной её инвазии (pT) и наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах (pN) (табл. 2).

При ИГХ исследовании АКЖКТ фрагментарная экспрессия HER2/neu на части мембран опухолевых клеток (+) выявлена в 13,34 % опухолей, умеренная экспрессия маркера (++) определена в 40 % АКЖКТ, а высокий уровень экспрессии HER2/neu (+++) – в 46,66 % опухолей (рис. 4).

В соответствии с международным консенсусом [11] HER2 негативному статусу РЖ соответствует (–) или (+) уровень экспрессии его клетками HER2/neu, сомнительному HER2 статусу опухоли – (++) уровень экспрессии маркера клетками, HER2 позитивному статусу РЖ – (+++) уровень экспрессии или гиперэкспрессия HER2/neu. Причиной гиперэкспрессии HER2/neu является амплификация 17q12–q21 региона ДНК. Считается, что наиболее достоверно наличие гиперэкспрессии HER2/neu (следовательно, и степень амплификации гена) можно установить лишь на основании FISH-исследований, в то время как в ИГХ-исследованиях о гиперэкспрессии HER2/neu свидетельствует только выраженное (+++) иммуноокрашивание мембран опухолевых клеток [11]. Таким образом, в наших наблюдениях АКЖКТ с HER2 позитивным статусом составили 46,66 %, а опухоли с HER2 негативным и HER2 сомнительным статусом – 43,34 % (рис. 4, 5).

Согласно научным литературным данным, HER2 позитивный РЖ составляет 4,4 % – 53,4 % всех случаев РЖ, при этом средний показатель составляет 17,9 % [9, 11]. По данным Y. Bang et al. (2010), R. Terragni et al. (2014) имеются корреляции между гистологическим типом РЖ и частотой гиперэкспрессии HER2/neu: гиперэкспрессия маркера чаще выявляется в АКЖКТ, чем в карциномах диффузного типа [2, 5]. Согласно результатам проведённого нами корреляционного анализа не установлено статистически значимых связей между уровнем экспрессии HER2/neu в АКЖКТ и степенью гистологической дифференцировки опухоли (G), глубиной её инвазии (pT), наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах (pN) (табл. 2).

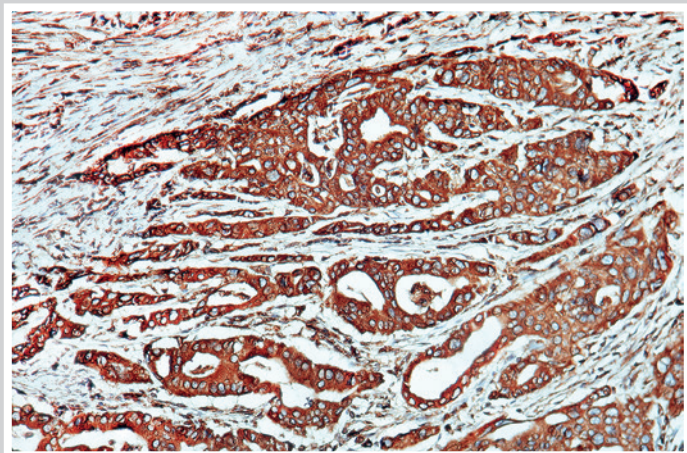


Рис. 3. Высокий уровень экспрессии EGFR опухолевыми клетками аденокарциномы желудка кишечного типа. x200.

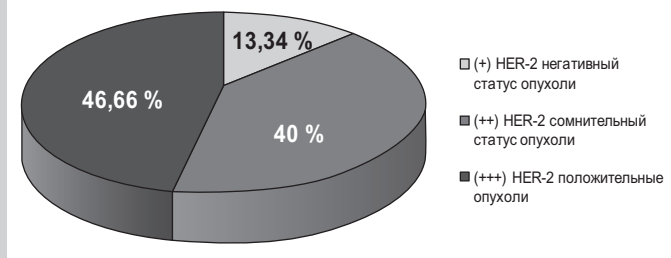


Рис. 4. Экспрессия HER2/neu в аденокарциноме желудка кишечного типа.

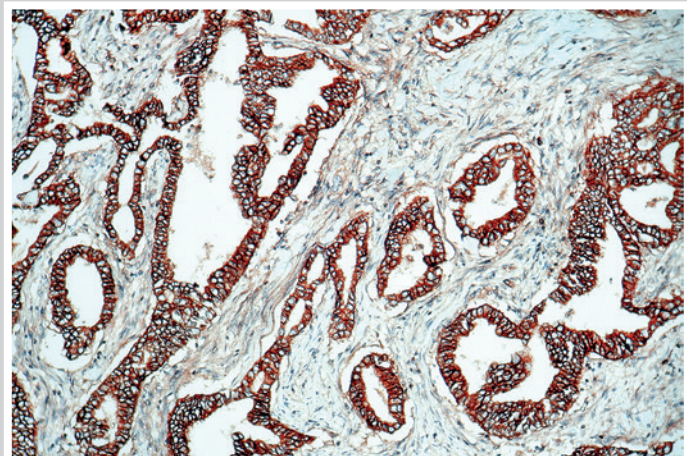


Рис. 5. Высокий уровень экспрессии HER2/neu опухолевыми клетками аденокарциномы желудка кишечного типа. x200.

Это соответствует данным S. Ling et al. (2013), не обнаружившим корреляции между уровнем экспрессии HER2/neu и глубиной инвазии РЖ, наличием регионарных и/или отдалённых метастазов [15]. В то же время эти исследователи установили наличие прямой корреляции между HER2 позитивным статусом РЖ и показателями его гистологической G1-G2

дифференцировки [15]. Известно также, что гиперэкспрессия HER2/neu опухолевыми клетками РЖ ассоциируется со снижением показателей выживаемости больных и является прогностически неблагоприятным фактором [9, 11]. По результатам международного рандомизированного исследования ToGA (Trastuzumab for Gastric Cancer) доказано увеличение показателей выживаемости больных HER2 позитивным РЖ при лечении таргетным препаратом Трастузумаб [2].

Нами в предыдущих работах [16, 17] было установлено, что АКЖКТ характеризуется средним уровнем пролиферации опухолевых клеток [медиана экспрессии Ki-67 составляет 45,10 % (30,58; 61,17)] и низким уровнем апоптоза [медиана экспрессии p53 = 18,81 % (6,56; 24,40), каспазы-3 – 66,23 (45,94; 86,16) УЕОП]. Выполненный в этом исследовании статистический анализ показал, что в АКЖКТ имеет место прямая сильная корреляционная связь между показателями экспрессии опухолевыми клетками рецепторов семейства ErbB (EGFR и HER2/neu), прямая средней силы корреляционная связь между показателями экспрессии EGFR и Ki-67, а также прямая средней силы корреляционная связь между показателями экспрессии EGFR и мПНК гена *K-RAS* (табл. 2). То есть возрастание экспрессии рецепторов семейства ErbB 1 типа (EGFR) ассоциировано с возрастанием экспрессии рецепторов семейства ErbB 2 типа (HER2/neu), что согласуется с приведённой выше информацией о гетеродимерном комплексе рецепторов EGFR [7]. Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что возрастание экспрессии опухолевыми клетками EGFR ассоциируется с возрастанием транскрипционной активности гена *K-RAS* и с возрастанием индекса пролиферации раковых клеток АКЖКТ. Y. J. Bang et al. [2], G. Ming et al. [12], M. Terashima et al. [14] также выявили корреляции между экспрессией EGFR опухолевыми клетками РЖ и индексом их пролиферации. Вероятно, активация экспрессии опухолевыми клетками рецепторов EGFR приводит к компенсаторному возрастанию количества RAS-протеина в цитоплазме за счёт активации транскрипции и трансляции гена *K-RAS*. По данным J. P. Manzi [7], возрастание количества активных форм RAS-протеина в цитоплазме опухолевых клеток, в свою очередь, активирует сигнальный путь ERK (часть сигнального каскада MARK), отвечающий за пролиферативную активность клеток [7].

Не выявлено корреляций между уровнями экспрессии опухолевыми клетками АКЖКТ маркеров апоптоза (p53 и каспазы-3), экспрессии EGFR и HER2/neu, а также уровнем экспрессии мПНК гена *K-RAS* (табл. 2). Эти результаты свидетельствуют о том, что рецепторы EGFR и HER2/neu, вовлечённые в работу MARK-сигнального каскада, оказывают регуляторное влияние на пролиферативную активность опухолевых клеток, но при этом не влияют на интенсивность апоптоза клеток АКЖКТ.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что возрастание экспрессии рецепторов EGFR и HER2/neu клетками АКЖКТ приводит к активации транскрипции и трансляции гена *K-RAS* с последующей активацией ERK-сигнального пути, реализующего

пролиферативный потенциал опухолевых клеток. Определение ErbB-рецепторного статуса АКЖКТ целесообразно учитывать при выборе индивидуализированной таргетной терапии.

Выводы

1. Аденокарциному желудка кишечного типа отличает повышенный уровень транскрипционной активности гена *K-RAS*: медиана относительного нормализованного соотношения уровня экспрессии опухолевыми клетками мПНК гена *K-RAS* равняется 3,62 (0,57; 5,87).

2. Для аденокарциномы желудка кишечного типа характерна значимая экспрессия опухолевыми клетками ростовых рецепторов семейства ErbB: в 76,66 % опухолей выявляется выраженная экспрессия EGFR (++/+++); 46,66 % аденокарцином имеют (+++) иммунопозитивный HER2/neu статус.

3. В аденокарциноме желудка кишечного типа имеется тесная корреляционная взаимосвязь между возрастанием транскрипционной активности гена *K-RAS*, возрастанием уровня экспрессии опухолевыми клетками ростовых рецепторов EGFR и HER2/neu, а также возрастанием уровня пролиферативной активности опухолевых клеток.

Благодарность. Авторы выражают благодарность профессору А. М. Камышному и сотрудникам ПЦП-лаборатории учебного медико-лабораторного центра Запорожского государственного медицинского университета, с участием которых выполнены молекулярно-генетические исследования.

Финансирование. Работа выполнена в рамках госбюджетной НИР «Ранне молекулярно-генетичне та імуногістохімічне прогнозування схильності до прогресування раку легенів та органів травлення» (0117U002580) 2017–2019, которая финансируется МЗ Украины.

Funding: The research was carried out within the state budget scientific-research work “Early molecular genetic and immunohistochemical predicting of susceptibility to lung and digestive system cancer progression” (0117U002580), 2017–2019, funded by the Ministry of Health of Ukraine.

Список литературы

- [1] Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 / J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit et al. // International Journal of Cancer. – 2015. – Vol. 136. – №5. – P. E359–386.
- [2] Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial / Y. J. Bang, E. van Cutsem, A. Feyereislova et al. // Lancet. – 2010. – №376. – P. 687–697.
- [3] KRAS and BRAF mutations are rare and related to DNA mismatch repair deficiency in gastric cancer from the East and the West: results from a large international multicentre study / N. C. van Grieken, T. Aoyama, P. A. Chambers et al. // British Journal of Cancer. – 2013. – Vol. 108. – №7. – P. 1495–1501.
- [4] Relevance of MET activation and genetic alterations of KRAS and E-cadherin for cetuximab sensitivity of gastric cancer cell lines / S. Heindl, E. Eggenstein, S. Keller et al. // Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. – 2012. – Vol. 138. – №5. – P. 843–858.
- [5] EGFR, HER-2 and KRAS in Canine Gastric Epithelial Tumors: A Potential Human Model? / R. Terragni, A. C. Gardini, S. Sabatini et al. // PLOS one. – 2014. – Vol. 9. – №1. – P. 1–7.

- [6] Lorenzen S. How will human epidermal growth factor receptor 2-neu data impact clinical management of gastric cancer? / S. Lorenzen, F. Lordick // *Current Opinion in Oncology*. – 2011. – №23. – P. 396–402.
- [7] Exploring cancer proliferative signaling pathways / ed. by J. P. Manzi. – Boston: ThermoFisher SCIENTIFIC, 2015. – 75 p.
- [8] KRAS, BRAF and gastric cancer / L. C. Hewitt, G. G. Hutchins, V. Melotte et al. // *Translational Gastrointestinal Cancer*. – 2015. – Vol. 4. – №6. – P. 429–447.
- [9] Abrahao-Machado L. F. HER2 testing in gastric cancer: An update / L. F. Abrahao-Machado, C. Scapulatempo-Neto // *World Journal of Gastroenterology*. – 2016. – Vol. 22. – №19. – P. 4619–4625.
- [10] Diagnostic Immunohistochemistry / ed. by D. J. Dabbs. – 3rd ed. – Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2010. – 951 p.
- [11] HER2/neu Testing in Gastric Cancer by Immunohistochemistry / B. S. Sheffield, J. Garratt, S. E. Kalloger et al. // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. – 2014. – Vol. 138. – P. 1495–1502.
- [12] Relationship between expression of EGFR in gastric cancer tissue and clinicopathological features / M. Gao, X. Liang, Z. Zhang et al. // *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. – 2013. – Vol. 6. – Issue 4. – P. 260–264.
- [13] Hypermethylated Epidermal growth factor receptor (EGFR) promoter is associated with gastric cancer / X. Weng, H. Zhang, J. Ye et al. // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – P. 10154.
- [14] Impact of expression of human epidermal growth factor receptors EGFR and ERBB2 on survival in stage II/III gastric cancer / M. Terashima, K. Kitada, A. Ochiai et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2012. – Vol. 18. – №21. – P. 5992–6000.
- [15] Shan L. HER2 expression and relevant clinicopathological features in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma in a Chinese population / L. Shan, J. Ying, N. Lu // *Diagnostic Pathology*. – 2013. – Vol. 8. – P. 76.
- [16] Христенко Т. А. Сравнительная иммуногистохимическая характеристика экспрессии Ki-67, p53, каспазы-3 в гиперпластических полипах и неинвазивной аденокарциноме желудка кишечного типа / Т. А. Христенко // *Запорожский медицинский журнал*. – 2016. – №4(97). – С. 83–88.
- [17] Tumanskiy V. A. Comparative immunohistochemical characteristic of expression levels of Ki-67, p53, caspase-3 in non-invasive and invasive intestinal-type gastric adenocarcinoma / V. A. Tumanskiy, T. A. Khrystenko // *Патологія*. – 2016. – №2(37). – С. 70–75.
- [11] Sheffield, B. S., Garratt, J., Kalloger, S. E., Chang, H. H., Torlakovic, E. E., Gilks, C. B., & Schaeffer, D. F. (2014) HER2/neu Testing in Gastric Cancer by Immunohistochemistry. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 138, 1495–1502. doi: 10.5858/arpa.2013-0604-0A.
- [12] Gao, M., Liang, X., Zhang, Z., Ma, W., Chang, Z. W., & Zhang, M. Z. (2013) Relationship between expression of EGFR in gastric cancer tissue and clinicopathological features. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(4), 260–264. doi: 10.1016/S1995-7645(13)60054-1
- [13] Weng, X., Zhang, H., Ye, J., Kan, M., Liu, F., Wang, T., et al. (2015) Hypermethylated Epidermal growth factor receptor (EGFR) promoter is associated with gastric cancer. *Scientific Reports*, 5, 10154. doi: 10.1038/srep10154.
- [14] Terashima, M., Kitada, K., Ochiai, A., Ichikawa, W., Kurahashi, I., Sakuramoto, S., et al. (2012) Impact of human epidermal growth factor receptor (EGFR) and ERBB2 (HER2) expressions on survival in patients with stage II/III gastric cancer, enrolled in the ACTSGC study. *Clinical Cancer Research*, 18(21), 5992–6000. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1318.
- [15] Shan, L., Ying, J., & Lu, N. (2013) HER2 expression and relevant clinicopathological features in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma in a Chinese population. *Diagnostic Pathology*, 8, 76. doi: 10.1186/1746-1596-8-76.
- [16] Khrystenko, T. A. (2016) Sravnitel'naya immunogistokhimicheskaya kharakteristika e'kspresii Ki-67, p53, kaspazy-3 v giperplasticheskikh polipakh i neinvazivnoy adenokarcinome zheludka kishechnogo tipa [Comparative immunohistochemical characteristics of Ki-67, p53, caspase-3 expression in gastric hyperplastic polyps and non-invasive intestinal-type gastric adenocarcinoma]. *Zaporozhye medical journal*, 4(97), 83–88 [in Russian]. doi: 10.14739/2310-1210.2016.4.79773.
- [17] Tumanskiy, V. A., & Khrystenko, T. A. (2016) Comparative immunohistochemical characteristic of expression levels of Ki-67, p53, caspase-3 in non-invasive and invasive intestinal-type gastric adenocarcinoma. *Pathologia*, 2(37), 70–75. doi: 10.14739/2310-1237.2016.2.81333.

References

- [1] Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., et al. (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–386. doi: 10.1002/ijc.29210.
- [2] Bang, Y. J., van Cutsem, E., Feyereislova, A., Chung, H. C., Shen, L., Sawaki, A., et al. (2010) Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*, 376, 687–697. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61121-X.
- [3] van Grieken, N. C., Aoyama, T., Chambers, P. A., Bottomley, D., Ward, L. C., Inam, I., et al. (2013) KRAS and BRAF mutations are rare and related to DNA mismatch repair deficiency in gastric cancer from the East and the West: results from a large international multicentre study. *British Journal of Cancer*, 108(7), 1495–1501. doi: 10.1038/bjc.2013.109.
- [4] Heindl, S., Eggenstein, E., Keller, S., Kneissl, J., Keller, G., Mutze, K., et al. (2012) Relevance of MET activation and genetic alterations of KRAS and E-cadherin for cetuximab sensitivity of gastric cancer cell lines. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 138(5), 843–858. doi: 10.1007/s00432-011-1128-4.
- [5] Terragni, R., Gardini, A. C., Sabattini, S., Bettini, G., Amadori, D., Talamonti, C., et al. (2014) EGFR, HER-2 and KRAS in Canine Gastric Epithelial Tumors: A Potential Human Model? *PLOS one*, 9(1), 1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0085388.
- [6] Lorenzen, S., & Lordick, F. (2011) How will human epidermal growth factor receptor 2-neu data impact clinical management of gastric cancer? *Current Opinion in Oncology*, 23, 396–402. doi: 10.1097/CCO.0b013e3283469567.
- [7] Manzi, J. P. (Ed.) (2015). Exploring cancer proliferative signaling pathways. Boston: ThermoFisher SCIENTIFIC.
- [8] Hewitt, L. C., Hutchins, G. G., Melotte, V., Saito, Y., & Grabsch, H. I. (2015) KRAS, BRAF and gastric cancer. *Translational Gastrointestinal Cancer*, 4(6), 429–447.
- [9] Abrahao-Machado, L. F., & Scapulatempo-Neto, C. (2016) HER2 testing in gastric cancer: An update. *World Journal of Gastroenterology*, 22(19), 4619–4625. doi: 10.3748/wjg.v22.i19.4619.
- [10] Dabbs, D. J. (Ed.) (2010). Diagnostic Immunohistochemistry. Philadelphia: Saunders/Elsevier.

Сведения об авторах:

Туманский В. А., д-р мед. наук, профессор каф. патологической анатомии и судебной медицины, проректор по научной работе, Запорожский государственный медицинский университет, заслуженный деятель науки и техники Украины.
Христенко Т. А., аспирант каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Відомості про авторів:

Туманський В. О., д-р мед. наук, професор каф. патологічної анатомії і судової медицини, проректор із наукової роботи, Запорізький державний медичний університет, заслужений діяч науки і техніки України.
Христенко Т. О., аспірант каф. патологічної анатомії та судової медицини, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Information about authors:

Tumanskiy V. A., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Pro-rector for Scientific Work, Zaporizhzhia State Medical University, Honorary Science and Engineering Worker of Ukraine.
Khrystenko T. A., PhD student, Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Конфликт интересов: отсутствует.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 02.05.2017
Після доопрацювання / Revised: 25.05.2017
Прийнято до друку / Accepted: 02.06.2017