

на правах рукописи

ЮРЧЕНКО Антон Андреевич

**Клиническое значение некоторых тканевых маркеров
метастазирования при раке желудка**

14.00.14 – онкология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва – 2007

Работа выполнена в ГУ Российском онкологическом научном центре им. Н.Н.Блохина РАМН (директор – академик РАН и РАМН, профессор М.И.Давыдов)

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор **Н.А.Огнерубов**
член-корреспондент РАМН, профессор **Н.Е.Кушлинский**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор **А.С.Ожерельев**
доктор медицинских наук, профессор **В.С.Мазурин**

Ведущая организация: ГУ Российский научный центр рентгенорадиологии министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___»_____2007г. в «___» часов на заседании Диссертационного совета К.001.17.01 при ГУ Российском онкологическом научном центре им. Н.Н.Блохина РАМН по адресу: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН

Автореферат разослан «___»_____2007г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Ю.А.Барсуков

Актуальность темы. Ежегодно в мире раком желудка заболевают более 1 млн. человек (М.И.Давыдов и соавт., 2004; В.М.Мерабишвили, 2004), при этом в подавляющем большинстве стран рак желудка у мужчин выявляют в 2 раза чаще, чем у женщин. Уровень заболеваемости колеблется в достаточно широких пределах. По данным МАИР, максимальный уровень заболеваемости раком желудка отмечен у мужчин Японии (114,7), а минимальный – у белых женщин США. В структуре онкологической заболеваемости и смертности населения России рак желудка занимает второе место после рака легкого (М.И.Давыдов и соавт., 2004). Ежегодно в России регистрируется 48,8 тыс. новых случаев рака желудка и 45 тыс. больных умирает от этого заболевания. При этом подавляющее большинство опухолей желудка представляют собой аденокарциномы и перстневидноклеточный рак. У 75% первично выявленных больных заболевание диагностируется в III-IV стадиях, что предопределяет неудовлетворительные результаты лечения, а частота обнаружения ранних форм рака желудка не превышает 10-20%.

Основным и практически единственным методом радикального лечения рака желудка на сегодняшний день является операция, которая в ряде случаев позволяет добиться полного излечения (М.И.Давыдов и соавт., 2004). Пятилетняя выживаемость больных раком желудка в европейских странах составляет: у мужчин от 8,4 до 25,3%, а у женщин – от 10,1 до 32,1%. В большинстве стран Европы 5-летняя выживаемость женщин существенно выше не только по итоговому показателю, но и по возрастным группам. Проблема прогнозирования течения заболевания у больных раком желудка после радикального лечения остается окончательно не решенной.

В настоящее время активно разрабатываются и внедряются в клиническую практику дополнительные молекулярные и биохимические маркеры, которые характеризуют степень агрессивности опухолевого процесса и, кроме того, позволяют индивидуализировать прогноз клинического течения и чувствительность опухоли к проводимой терапии.

Одним из потенциально важных маркеров, вовлеченных в процессы клеточной пролиферации, дифференцировки и контроля метастазирования при раке желудка, является белок nm23 (non-metastatic cells protein) (Ura H. et al., 1996; Ji S.Q. et al., 2002; Lee K.E. et al., 2003). Гиперэкспрессия этого белка обнаружена в некоторых злокачественных опухолях человека, таких

как рак легкого, колоректальный рак, меланома, рак молочной железы, желчного пузыря, гортани. Особое внимание исследователей было уделено изучению экспрессии белка nm23 при раке желудка (Yeung P. et al., 1998; Yoo C.H. et al., 1999; Lee K.E. et al., 2003). При этом ряд авторов (W.Muller et al., 1998, G.Nesi et al., 2001) полагают, что повышенная экспрессия nm23 в злокачественных опухолях желудка может быть ассоциирована с неблагоприятным прогнозом заболевания. Однако клиническая значимость этого показателя у больных раком желудка только начинает изучаться.

Кроме этого, в многочисленных исследованиях было показано, что информативным биохимическим показателем метастатической и инвазивной активности опухоли, а вследствие этого и биологически значимым фактором прогноза при различных новообразованиях является уровень и соотношение экспрессии различных компонентов системы активации плазминогена в опухолевой ткани (Е.С.Герштейн и соавт., 2007; Duffy M. J., Duggan C., 2004). Систему активации плазминогена изучали при различных опухолях человека: при раке молочной железы (Е.С.Герштейн и соавт., 2004; Look M.P. et al., 2002; Duffy M., 2005), колоректальном раке (О.В.Голубченко, 2004), раке пищевода (Е.С.Герштейн и соавт., 2002), опухолях костей (Н.Е.Кушлинский и соавт., 2001), новообразованиях щитовидной железы (Т.Ю.Артюшенко и соавт., 2004). При этом, исследователям удалось выявить в большинстве злокачественных опухолей различного гистогенеза значительное увеличение продукции активатора плазминогена урокиназного типа (uPA) и его ингибитора 1 типа (РАI-1) по сравнению с гомологичными нормальными тканями и доброкачественными новообразованиями (Е.С.Герштейн и соавт., 2007). Предварительные исследования экспрессии компонентов системы активации плазминогена в опухолях и окружающей слизистой больных раком желудка показали, что уже на ранних стадиях этого заболевания выявляется усиление экспрессии uPA и РАI-1 (Е.С.Герштейн и соавт., 2003).

Цель исследования

Сравнительное изучение экспрессии белка nm23 и содержания основных компонентов системы активации плазминогена в опухолях больных раком желудка для оценки их взаимосвязи с основными клиническими и морфологическими характеристиками заболевания, прогнозом.

Задачи исследования

1. Провести иммуногистохимический анализ экспрессии белка nm23 в первичных опухолях больных раком желудка.
2. Сопоставить уровень экспрессии белка nm23 с основными клиническими и морфологическими характеристиками болезни (возраст и пол больных, стадия заболевания, морфологический вариант и степень дифференцировки опухоли).
3. Иммуноферментным методом определить содержание основных компонентов системы активации плазминогена (uPA, PAI-1 и tPA) в первичных опухолях у больных раком желудка.
4. Проанализировать взаимосвязь содержания компонентов системы активации плазминогена в опухоли больных раком желудка с клинικο-морфологическими характеристиками заболевания.
5. Оценить клиническую значимость экспрессии белка nm23 и основных компонентов системы активации плазминогена в первичной опухоли больных раком желудка.

Научная новизна и практическая значимость исследования

Впервые проведен сравнительный анализ экспрессии белка nm23 и основных компонентов системы активации плазминогена (uPA, tPA, PAI-1) в первичных опухолях больных раком желудка и оценена их взаимосвязь с основными клиническими и морфологическими характеристиками заболевания, а также с клиническим течением и прогнозом рака желудка. В результате проведенных исследований показано, что определение этих показателей, в особенности, уровня PAI-1, в опухолях больных раком желудка можно рассматривать в качестве дополнительных молекулярных факторов, анализ которых в сочетании с другими клиническими и морфологическими характеристиками позволит дифференцированно подходить к оценке прогноза и выбору методов адъювантного лечения этой категории пациентов.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены на конференции «Национальные дни лабораторной медицины России-2005» (Москва, 11-14 октября 2005г.); на IX Российском онкологическом конгрессе (Москва, 22-24 ноября 2005г.); на Международной научно-практической конференции «Ведущий

многопрофильный госпиталь страны: основные функции, достижения и направления развития» (Москва 1-2 июня 2006г.).

Диссертация апробирована 16 февраля 2007г. на совместной научной конференции сотрудников лаборатории клинической биохимии, хирургического отделения диагностики опухолей, отделения абдоминальной онкологии торако-абдоминального отдела и отдела патологической анатомии опухолей человека ГУ Российского онкологического научного центра им. Н.Н.Блохина РАМН, а также кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ФПДО Московского государственного медико-стоматологического университета.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 6 научных работ.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы «Характеристика обследованных больных и методы исследований», главы результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов и указателя литературы. Общий объем диссертации 171 лист машинописного текста. Указатель литературы содержит 226 работ отечественных и зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 30 таблицами и 30 рисунками.

Положения, выносимые на защиту:

1. Экспрессия белка nm23 в клетках рака желудка выявляется в цитоплазме почти в 3 раза чаще, чем в ядрах.
2. Цитоплазматическая экспрессия белка nm23 в большей степени, чем ядерная связана с такими клиничко-морфологическими факторами, как возраст больных, локализации опухоли и ее гистологическое строение.
3. Четкой взаимосвязи экспрессии белка nm23 и содержания основных компонентов системы активации плазминогена в опухолях больных раком желудка не наблюдается.
4. Из всех изученных показателей наиболее значимым прогностическим фактором является высокий уровень PAI-1 в опухолях больных раком желудка.

Материалы и методы исследования

Общая характеристика обследованных больных

В исследование включено 108 больных раком желудка, прошедших обследование и лечение в ГУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН с января 2001г. по январь 2005г.

Рак желудка у всех больных выявлен впервые и до проведения специальных биохимических и иммуногистохимических методов исследования пациенты лечения не получали.

Всем больным выполнено предоперационное клинко-инструментальное обследование. Для анализа характера опухолевой инфильтрации по желудку всем пациентам выполнены рентгенологические и эндоскопические исследования с получением материала для морфологического изучения. Только комбинация обоих методов исследования позволяет оценить протяженность поражения, характер опухолевой инфильтрации стенки желудка с возможным переходом на смежные структуры желудочно-кишечного тракта по протяжению (пищевод, 12-перстная кишка) и классифицировать анатомическую форму опухолевого роста. В некоторых случаях было произведено хромозндоскопическое исследование слизистой оболочки желудка (окраска слизистой 0,1% раствором индигокармина или метиленовой синью).

Всем пациентам выполнено также ультразвуковое исследование органов брюшной полости, забрюшинного пространства, а у женщин – органов малого таза, и исследование лимфоколлекторов шейно-надключичной области.

Некоторым больным по показаниям была выполнена компьютерная томография и лапароскопия.

Число мужчин в обследованной группе превышало число женщин в 2 раза, 72 и 36 соответственно. Средний возраст обследованных больных раком желудка в общей группе составил 59,7 лет (медиана - 62,5 года), а колебания этого показателя были в пределах от 36 до 75 лет.

Клинический диагноз опухоли желудка у всех больных был подтвержден данными гистологического исследования удаленной хирургическим путем опухоли. У 80 (74,1%) больных выявлена аденокарцинома, у 28 (25,9%) – перстневидноклеточный рак желудка. У 8 больных (7,4%) опу-

холь была высокой степени дифференцировки (G1), у 28 (25,9%) – умеренной степени дифференцировки (G2), у 72 (66,7%) – низкой степени дифференцировки (G3).

По стадиям заболевания пациенты распределены в соответствии с международной классификацией TNM 5 пересмотра (1997г.)

IБ стадия (pT₂N₀M₀) была диагностирована у 12 пациентов (11%), II стадия (pT₂N₁M₀, pT₃N₀M₀) – у 40 больных (37%), IIIА стадия (pT₂N₂M₀, pT₃N₁M₀, pT₄N₀M₀) – у 28 больных (26%), IIIБ стадия (pT₃N₂M₀, pT₄N₁₋₂M₀) – у 24 пациентов (22%). IV стадия опухолевого процесса выявлена в 4 наблюдениях (4%).

В таблице 1 приведены данные о распределении больных раком желудка с учетом анатомического отдела органа, пораженного опухолью.

Таблица 1.

Распределение больных раком желудка в зависимости от локализации опухоли

Локализации опухоли	Число больных (Абс.)	Число больных (%)
Тело желудка	64	59,3
Проксимальный отдел	4	3,7
Антральный отдел	32	29,6
Весь желудок	4	3,7
Антральный отдел + тело желудка	4	3,7

Всем больным после проведения предоперационной подготовки, включавшей стационарную инфузионную терапию и коррекцию сопутствующих заболеваний по показаниям, проведены хирургические вмешательства в различном объеме.

Радикальные хирургические вмешательства выполнены 104 пациентам (96,3%). Среди них субтотальная дистальная резекция по Бильрот-2 произведена 20 пациентам (19,2%). Гастрэктомия выполнена 80 больным (76,9%), из них с наложением вертикального впередиободочного муфтообразного эзофагоэнтероанастомоза – 64 (80%), и с наложением эзофагоэнтероанастомоза по М.И.Давыдову в 16 (20%) случаях. В 10 наблюдениях га-

стрэктомии носили комбинированный характер, причем у 8 больных была выполнена резекция поперечноободочной кишки и у 2-х пациентов - резекция хвоста поджелудочной железы с краевой резекцией левой доли печени. Проксимальная резекция желудка произведена 4 (3,8%) больным. С паллиативной целью выполнено 4 (3,7%) хирургических вмешательства в объеме субтотальной дистальной резекции желудка. При проведении радикальных хирургических вмешательств по поводу рака желудка всем пациентам была выполнена лимфодиссекция в объеме D2.

Специальные лабораторные методы исследования

Иммуногистохимический метод исследования степени выраженности экспрессии белка nm23 в опухолях желудка

Иммуногистохимическое исследование экспрессии белкового маркера nm23 проводили на образцах ткани первичных опухолей 108 больных, оперированных по поводу рака желудка. Работа выполнена с помощью биотин-стрептавидинового иммунопероксидазного метода на серийных парафиновых срезах с применением антител к белку nm23 (фирма «Dako», Дания; рабочее разведение антител 1:50).

При оценке иммуногистохимической реакции использовали полуколичественный метод, учитывающий интенсивность окрашивания и количество антиген-позитивных клеток. По интенсивности различали слабое (+), умеренное (++) и интенсивное (+++) окрашивание. В каждом случае оценивали тип окрашивания: цитоплазматический и/или ядерный. При наличии окрашенных ядер проводился их подсчет в 5 различных полях зрения.

Реакция считалась негативной при полном отсутствии окрашивания или при наличии фокусов и единичных окрашенных клеток (< 25%).

Позитивная реакция в цитоплазме раковых клеток различалась по уровню экспрессии маркера:

- Высокий уровень экспрессии - умеренное или интенсивное окрашивание > 50% раковых клеток.
- Низкий уровень экспрессии – слабое окрашивание большинства опухолевых клеток или умеренное окрашивание 25-50% раковых клеток.

Морфологическое изучение материала проводили в соответствии с Международной гистологической классификацией опухолей желудка. Для определения гистологического типа опухоли, степени ее дифференциров-

ки, уровня инвазии, наличия регионарных метастазов изучали парафиновые срезы, окрашенные гематоксилином и эозином, альциановым синим по Крейбергу, пикрофуксином по ван Гизону.

Иммуноферментное определение концентрации компонентов системы активации плазминогена (uPA, PAI-1 и tPA)

Кусочки ткани весом 300-500 мг непосредственно после операции доставляли на леду в лабораторию и сразу же подвергали гомогенизации. Перед гомогенизацией ткань тщательно очищали от участков некроза и жира, взвешивали, а затем измельчали ножницами и растирали в жидком азоте. Полученный порошок переносили в центрифужные пробирки, помещенные в ледяную баню и добавляли TED-буфер (10 mM Трис-HCl, 1,5 mM ЭДТА, 0,5 mM дитиотреитол; pH 7,4), содержащий 10% глицерина (по объему), из расчета 1 мл буфера на 100 мг ткани. Тщательно перемешивали гомогенат и центрифугировали 30 мин. При 105000xg при 4°C (центрифуга Optima TM-TLC, «Beckman», США). Надосадочную жидкость (цитозоль) использовали для определения концентрации белка, а аликваты по 0,5 мл замораживали в полиэтиленовых пробирках и хранили при -70°C до определения концентрации компонентов системы активации плазминогена (не более 1 месяца). Определение выше указанных компонентов проводили с использованием наборов реактивов, разработанных в лаборатории проф. T. Benraad'a (Наймеген, Нидерланды).

Измерения проводили на автоматическом универсальном ридере для микроплашек Elx 800 фирмы «Bio-Tek Instruments. Inc.» (США). В соответствии с инструкциями производителя, обработку результатов измерений проводили по формуле $Y = a + bX + cX^2$, где X - концентрация анализируемого белка (нг/мл), а Y - оптическая плотность при 492 нм. При окончательных расчетах учитывали десятикратное разведение цитозолей и выражали концентрации анализируемых белков в нг/мг цитозольного белка. Определение концентрации общего белка в пробах цитозоля проводили по методу Лоури.

Статистический анализ результатов исследования

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы STATISTICA (версия 6). Выбор метода анализа определяли после сравнения формы распределения каждого пока-

зателя с нормальным распределением. Данные представляли в виде $M \pm m$, где M - выборочное среднее, m - стандартная ошибка среднего.

Сравнение показателей между группами проводили параметрическим дисперсионным анализом и непараметрическим вариантом дисперсионного анализа (Kruskal-Wallis), а также непараметрическими критериями (Mann-Whitney, медианный тест). Взаимосвязь между различными показателями определяли, используя параметрический метод (Pearson) и непараметрический метод ранговой корреляции (Spearman). Достоверность различий частот признаков в изучаемых группах оценивали с помощью критерия χ^2 , для малых выборок рассчитывали непараметрический точный критерий Фишера. Различия между показателями считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Экспрессия белка nm23 в клетках рака желудка и ее взаимосвязь с клинико-морфологическими характеристиками заболевания

Экспрессия белка nm23 проявлялась в виде диффузного гомогенного окрашивания цитоплазмы опухолевых клеток (рис. 1а, б). По интенсивности окрашивания в цитоплазме клеток опухоли больные были разделены на 3 группы: 1) отсутствие экспрессии или очень слабая экспрессия, 2) низкий уровень экспрессии, 3) высокий уровень экспрессии.

Белок nm23 (низкий или высокий уровни экспрессии) обнаружен в цитоплазме 34 (63%) опухолей. Чаще встречались опухоли с низкой экспрессией nm23 в цитоплазме (37%), а высокий уровень цитоплазматической экспрессии nm23 выявлен в опухолях 26% больных.

Различий в экспрессии белка nm23 в цитоплазме в зависимости от пола пациентов не выявили. Не было обнаружено также различий в частоте выявления и степени выраженности экспрессии nm23 в цитоплазме клеток в зависимости от показателей T и N.

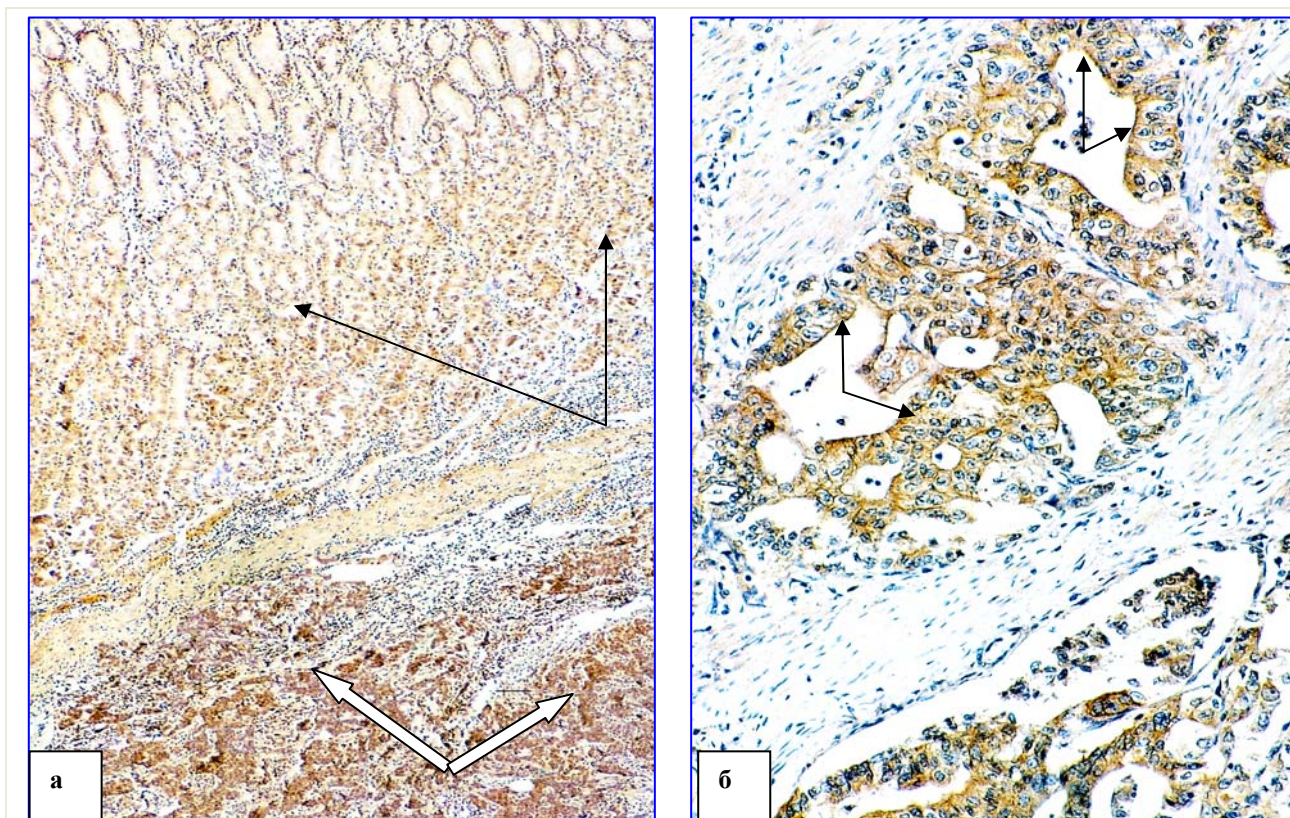


Рис. 1. Экспрессия белка p23 в цитоплазме клеток рака желудка.

а. Специфическая реакция в клетках низкодифференцированной аденокарциномы (светлые стрелки) и эпителии слизистой оболочки (темные стрелки) желудка. х 150.

б. Накопление белка в цитоплазме клеток умереннодифференцированной аденокарциномы (стрелки). х 200.

Биотин-стептавидиновый иммунопероксидазный метод. Краситель – диаминобензидин. Ядра клеток докрашены гематоксилином.

Частота выявления различных уровней экспрессии белка p23 в цитоплазме клеток опухолей при раке тела желудка была одинаковой (31,3%), тогда как при поражении антрального отдела высокий уровень экспрессии p23 выявлен только у 12,5% больных, а у половины больных экспрессия этого белка вообще отсутствовала (рис. 2).

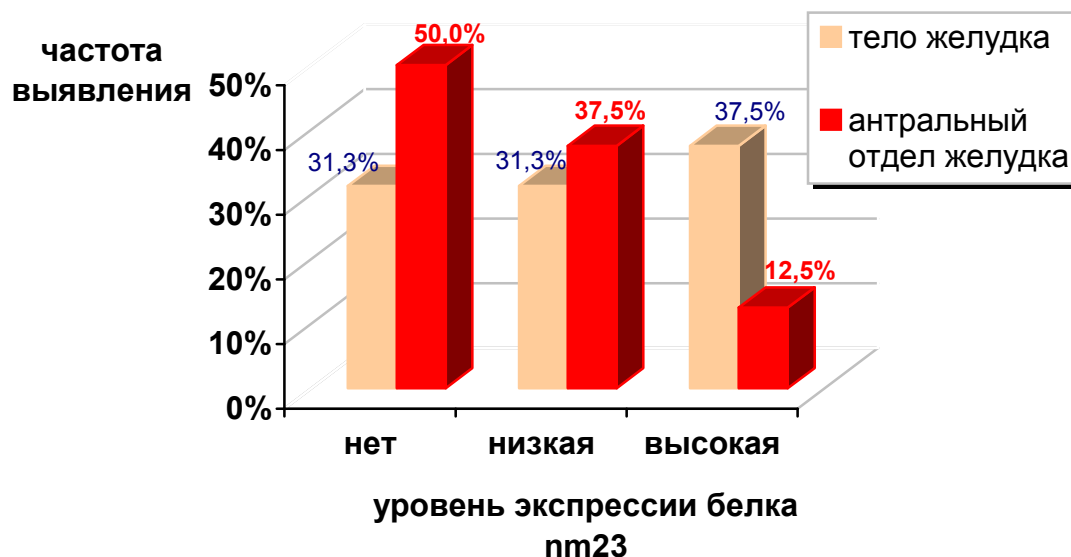


Рис. 2. Частота выявления уровней экспрессии белка p23 в цитоплазме клеток рака желудка с учетом локализации опухоли.

Обнаружена тенденция к изменению частоты выявления различных уровней экспрессии белка p23 в цитоплазме клеток рака желудка в зависимости от гистологического строения опухоли (табл. 2).

Таблица 2.

Уровни экспрессии белка p23 в цитоплазме клеток опухоли в зависимости от гистологического строения рака желудка

Уровень экспрессии белка p23 в цитоплазме клеток опухоли	Аденокарцинома желудка	Перстневидноклеточный рак желудка
Нет	24 (30,0%)	16 (57,1%)
Низкая	32 (40,0%)	8 (28,5%)
Высокая	24 (30,0%)	4 (14,3%)
Всего:	80 (100%)	28 (100%)

Так, у 70% больных, опухоли которых имели строение аденокарциномы, обнаружена экспрессии белка p23 в цитоплазме (40% и 30% опухолей с низкой и высокой экспрессией, соответственно). В то же время у 50% больных, опухоли которых имели строение перстневидноклеточного рака, белок p23 в цитоплазме не был обнаружен, а частота выявления высокой экспрессии p23 составляла всего 14,3%.

Выявлены достоверные различия в уровне экспрессии белка nm23 в цитоплазме клеток рака желудка в различных возрастных группах больных ($p=0,002$). В группе больных до 50 лет частота выявления высокого уровня экспрессии белка в цитоплазме клеток была наибольшей (66,7%), а у больных более старшего возраста она была в 4,7 раза ниже и составила всего 14,2%. Выявленная закономерность была одинаково характерна как для мужчин ($p=0,04$), так и для женщин ($p=0,02$).

В 24 опухолях (22%) было выявлено окрашивание ядер клеток антителами к nm23 (рис. 3а, б).

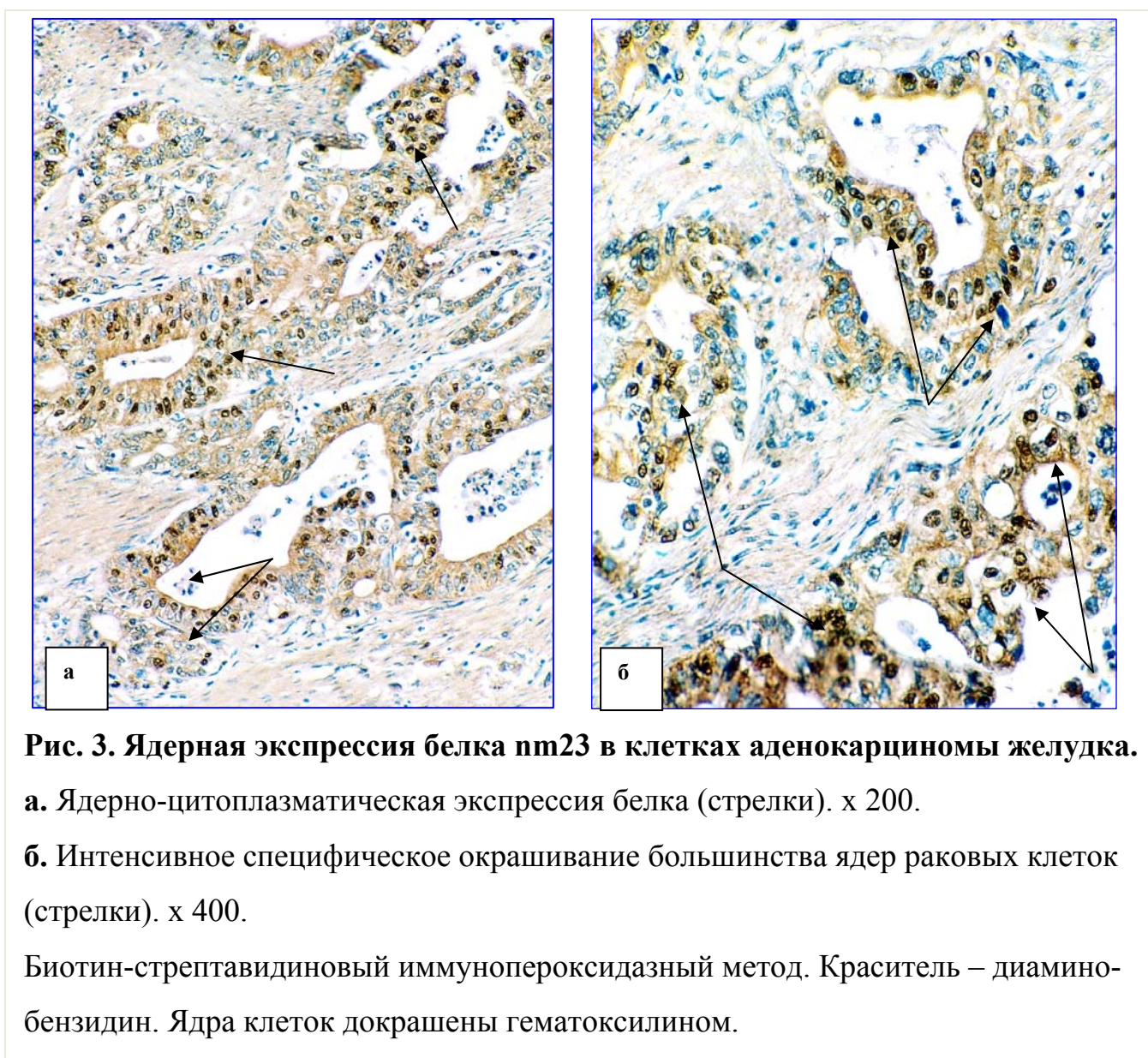


Рис. 3. Ядерная экспрессия белка nm23 в клетках аденокарциномы желудка.

а. Ядерно-цитоплазматическая экспрессия белка (стрелки). х 200.

б. Интенсивное специфическое окрашивание большинства ядер раковых клеток (стрелки). х 400.

Биотин-стрептавидиновый иммунопероксидазный метод. Краситель – диаминобензидин. Ядра клеток докрашены гематоксилином.

Достоверных различий частоты выявления окрашенных ядер в клетках опухолей желудка мужчин и женщин не выявлено, хотя у женщин час-

тота обнаружения неокрашенных ядер была в 8 раз выше, а у мужчин только в 2,6 раза выше по сравнению с окрашенными.

Окрашенные ядра в клетках перстневидноклеточного рака желудка отсутствовали, а при аденокарциномах ядерная экспрессия белка встречалась в 30% случаев ($p=0,03$). В то же время, степень дифференцировки аденокарцином желудка не была связана с окрашенностью ядер клеток опухоли антителами к белку nm23.

Таким образом, экспрессия белка nm23 в цитоплазме клеток рака желудка выявлена у 63% больных, а ядерная экспрессия этого белка обнаружена в опухолях 22% больных. Цитоплазматическая экспрессия чаще выявлялась в аденокарциномах, чем при перстневидноклеточном раке, а также в опухолях более молодых больных (в возрасте до 50 лет) по сравнению со старшей возрастной группой. Ядерная экспрессия nm23 не была достоверно связана с основными клинико-морфологическими факторами, следует отметить ее отсутствие при перстневидноклеточном раке желудка.

Анализ содержания uPA в опухолях желудка с учетом клинико-морфологических характеристик болезни и экспрессии nm23

Уровни uPA в опухолях больных раком желудка колебались от 0,1 до 1,34 нг/мг белка. Среднее его значение составило 0,3 [95% ДИ=0,21-0,39] нг/мг белка, медиана – 0,16 нг/мг белка. При сопоставлении уровней uPA в опухолях мужчин и женщин, больных раком желудка, достоверных различий не выявлено (медианы 0,17 и 0,14 нг/мг белка, соответственно).

При сопоставлении с возрастом больных самые высокие показатели uPA выявлены в группе старше 70 лет ($0,52 \pm 0,19$ нг/мг белка). При этом медиана этого показателя у больных старше 70 лет была в 2 раза выше, чем у больных в возрасте от 50 до 70 лет.

Обнаружено, что с увеличением стадии заболевания содержание uPA в цитозолях опухолей достоверно увеличивалось ($p < 0,05$; табл. 3).

Уровни uPA в опухолях больных раком желудка повышались также при увеличении показателя T (система TNM), медиана увеличивалась в 2,7 раза при показателе T₄ по сравнению с T₂ ($p=0,02$), выявлено также достоверное различие между показателями в группах больных с опухолями T₃ и T₄ ($p < 0,05$). Наиболее высокие показатели uPA обнаружены при прорастании опухоли в соседние органы (медиана 0,82 нг/мг белка). Увеличение средних уровней uPA выявлено и при увеличении показателя N.

Таблица 3.

Содержание uPA в опухолях больных раком желудка в зависимости от стадии заболевания

Стадия заболевания	Число больных	uPA, нг/мг белка (M±m)	Медиана
IB	12	0,13±0,05	0,07
II	40	0,33±0,07	0,20
IIIА	28	0,15±0,03	0,15
IIIБ	24	0,53±0,13	0,41
IV	4	0,17±0	0,17

В то же время, уровни uPA не зависели от локализации опухоли в желудке. Наиболее низкие уровни uPA обнаружены в аденокарциномах высокой степени дифференцировки (медиана 0,12 нг/мг белка), а самые высокие - в аденокарциномах с умеренной степенью дифференцировки (медиана - 0,53 нг/мг белка), однако эти различия не достигали уровня статистической достоверности.

Многофакторный анализ взаимосвязи уровней uPA в опухолях больных раком желудка с основными клинико-морфологическими характеристиками показал, что наиболее выраженная и достоверная зависимость наблюдалась с возрастом пациентов ($p=0,002$), гистологическим строением опухоли ($p=0,013$) и показателем T ($p=0,02$).

Обнаружено, что уровни uPA в опухоли не были достоверно взаимосвязаны со степенью окрашивания цитоплазмы клеток на белок pm23, хотя медиана уровня uPA была более высокой у больных раком желудка с высоким уровнем экспрессии белка pm23. Корреляционной зависимости между уровнями uPA и экспрессией белка pm23 в цитоплазме клеток опухолей больных раком желудка выявлено не было.

Медиана содержания uPA в опухолях, ядра которых не окрашивались антителами к pm23, составила 0,16 нг/мг белка и достоверно не отличалась от медианы этого показателя в опухолях с наличием окрашенных ядер (0,23 нг/мг белка).

Анализ содержания tPA в опухолях желудка с учетом клинико-морфологических характеристик болезни и экспрессии белка pm23

Уровень активатора плазминогена тканевого типа (tPA) в опухолях желудка колебался в пределах от 0,01 до 2,36 нг/мг белка (среднее значение - 0,71 [95% ДИ=0,49-0,94] нг/мг белка, медиана - 0,54 нг/мг белка), а у 28 больных (26%) tPA не выявлялся.

Средние уровни tPA в опухолях мужчин и женщин, больных раком желудка, достоверно не различались, хотя у мужчин средний показатель tPA составил $0,51 \pm 0,07$ нг/мг белка, а у женщин он был в 2 раза выше ($1,19 \pm 0,3$ нг/мг белка).

Достоверных различий уровня tPA в зависимости от стадии заболевания также не было выявлено (табл. 4).

Таблица 4.

Содержание tPA в опухолях больных раком желудка в зависимости от стадии заболевания

Стадия заболевания	Число наблюдений	tPA, нг/мг белка (M±m)	Разброс	Медиана
IБ	8	$0,34 \pm 0,01$	0,33-0,35	0,34
II	32	$0,95 \pm 0,19$	0,03-2,36	0,74
IIIА	20	$0,29 \pm 0,07$	0,01-0,55	0,30
IIIБ	16	$0,81 \pm 0,32$	0,12-2,25	0,43
IV	4	1,33	1,31-1,34	1,33

Уровень tPA в опухоли не был связан с показателями T и N. Средние уровни tPA в опухолях желудка составили: $0,4 \pm 0,05$ нг/мг белка при T₂; $0,78 \pm 0,15$ нг/мг белка - при T₃; $0,73 \pm 0,20$ нг/мг белка - при T₄.

В зависимости от вовлеченности лимфатических узлов показатели tPA составили: $0,85 \pm 0,18$ нг/мг белка - при N₀; $0,36 \pm 0,05$ нг/мг белка - при N₁; $1,23 \pm 0,39$ нг/мг белка - при N₂.

Уровни tPA в опухоли не зависели и от локализации, гистологического строения и степени дифференцировки рака желудка.

Таблица 5.

Содержание tРА в опухолях желудка в зависимости от уровня экспрессии белка nm23 в цитоплазме раковых клеток

Уровень экспрессии белка nm23 в цитоплазме клеток	Число больных	tРА, нг/мг белка (M±m)	Разброс	Медиана
Нет	40	0,41±0,14	0-1,83	0,05
Низкая	40	0,44±0,15	0-2,25	0,22
Высокая	28	0,83±0,20	0,12-2,36	0,57

Медианы уровня tРА увеличивались с ростом интенсивности окрашивания цитоплазмы клеток антителами к nm23 (табл. 5). Отмечена положительная корреляция уровня tРА с интенсивностью окрашивания цитоплазмы ($r_s=0,34$; $p=0,01$). Зависимости уровня tРА в ткани рака желудка от степени окрашивания ядер раковых клеток антителами к nm23 не обнаружено.

Анализ содержания PAI-1 в опухолях желудка с учетом клинико-морфологических характеристик болезни и экспрессии nm23

В исследованных опухолях желудка уровни PAI-1 колебались от 0 до 9,76 нг/мг белка (средний уровень - 0,84 [95% ДИ=0,34-1,33] нг/мг белка, медиана - 0,34 нг/мг белка).

Как видно из данных, представленных в таблице 6, при IB стадии медиана PAI-1 была наименьшей (0,12 нг/мг белка), а при IIIБ и IV стадиях медианы PAI-1 возрастали в 5-8 раз.

Уровни этого белка высокодостоверно отличались при различных показателях T: медиана уровня PAI-1 при T₃ была в 1,7 раза ($p=0,01$), а при T₄ - в 5,2 раза ($p=0,0003$) выше, чем при T₂. Наибольший уровень PAI-1 (9,7 нг/мг белка) выявлен в опухоли желудка больного с показателем T₄. Уровень PAI-1 в опухолях больных раком желудка не был достоверно связан с показателем N.

Таблица 6.

**Содержание PAI-1 в опухолях больных раком желудка
в зависимости от стадии заболевания**

Стадия заболевания	Число больных	PAI-1, нг/мг белка (M±m)	Разброс	Медиана
IБ	12	0,21±0,10	0-0,52	0,12
II	40	0,59±0,10	0,09-1,24	0,37
IIIА	28	0,27±0,04	0,13-0,52	0,26
IIIБ	24	2,25±1,02	0,24-9,76	0,99
IV	4	0,67	0,67-0,67	0,67

Локализация поражения, гистологическое строение и степень дифференцировки опухоли, возраст и пол пациентов также не оказывали достоверного влияния на уровень PAI-1 в опухолях больных раком желудка.

Концентрация PAI-1 в опухолях больных раком желудка не была достоверно связана с уровнем экспрессии белка pm23 в цитоплазме и ядрах опухолевых клеток.

В то же время, в общей группе больных выявили достоверную положительную зависимость между показателями uPA и PAI-1 ($r=0,69$ [95% CI=0,51-0,81]; $p=0,0001$). Эта закономерность проявлялась при всех стадиях (показатели T и N), при всех локализациях и при учете гистологического строения опухоли.

Анализ показателей общей выживаемости больных раком желудка с учетом изученных показателей выявил, что только высокий уровень PAI-1 в опухоли можно считать неблагоприятным прогностическим фактором, который коррелирует с низкой общей выживаемостью пациентов. Больные были разделены на 2 группы на основании медианы концентрации PAI-1. Первую группу составили больные с уровнем PAI-1 в опухоли $>0,6$ нг/мг белка, вторую группу – пациенты с уровнем PAI-1 $\leq 0,6$ нг/мг белка. При этом показатель общей продолжительности жизни больных в первой группе был достоверно ниже ($p<0,05$), чем во второй. Следует также отметить, что у больных с высоким показателем PAI-1 в первичной опухоли желудка

была выявлена наибольшая экспрессия белка pm23 в ядрах раковых клеток.

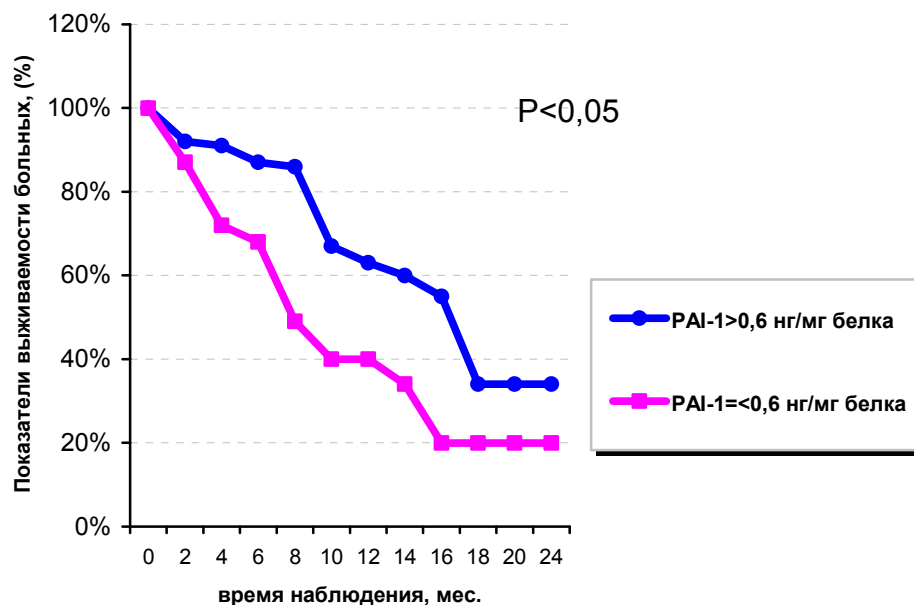


Рис. 4. Анализ общей выживаемости больных раком желудка с учетом уровня PAI-1 в опухоли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом можно заключить, что в настоящем исследовании получены данные, указывающие на связь уровней экспрессии белка pm23 в клетках рака желудка с некоторыми показателями, характеризующими систему активации плазминогена, и рядом клинико-морфологических факторов. Экспрессия белка pm23 в клетках рака желудка выявляется в цитоплазме почти в 3 раза чаще, чем в ядрах, при этом цитоплазматическая экспрессия в большей степени, чем ядерная, связана с такими клинико-морфологическими показателями, как возраст больных, локализация опухоли и ее гистологическое строение. Наиболее значимым прогностическим фактором из всех изученных показателей является высокий уровень PAI-1 в опухолях больных раком желудка.

Дальнейшее изучение выявленных закономерностей, возможно, позволит разработать патогенетические методы послеоперационного лечения больных раком желудка и более целенаправленно подходить к назначению этого лечения.

ВЫВОДЫ

1. Экспрессия белка nm23 в цитоплазме клеток рака желудка выявлена у 63% больных, а ядерная экспрессия этого белка обнаружена в опухолях 22% больных.

2. Цитоплазматическая экспрессия белка nm23 чаще выявлялась в аденокарциномах желудка, чем в перстневидноклеточном раке, а также в опухолях больных в возрасте до 50 лет по сравнению с опухолями больных старшей возрастной группы.

3. Ядерная экспрессия nm23 не была достоверно связана с основными клинико-морфологическими факторами, можно отметить лишь ее отсутствие в перстневидноклеточном раке желудка.

4. Многофакторный анализ взаимосвязи уровней uPA и PAI-1 в опухолях больных раком желудка с основными клинико-морфологическими характеристиками заболевания показал, что наиболее выраженная и достоверная связь наблюдается с возрастом пациентов, гистологическим строением опухоли и показателем T; для tPA значимых взаимосвязей с клинико-морфологическими факторами не выявлено.

5. Взаимосвязи между уровнями uPA и экспрессией белка nm23 в цитоплазме и ядрах клеток опухолей больных раком желудка не выявлено. Концентрация PAI-1 в опухолях больных раком желудка также не была достоверно связана с уровнем экспрессии белка nm23 в цитоплазме и ядрах опухолевых клеток.

6. Отмечена положительная корреляция уровня tPA и интенсивности окрашивания цитоплазмы клеток антителами к nm23 ($r_s=0,4$; $p=0,01$), взаимосвязи уровня tPA со степенью окрашивания ядер антителами к nm23 не обнаружено.

7. Из всех изученных показателей только высокий уровень медианы PAI-1 в опухоли ($>0,6$ нг/мг белка) является фактором неблагоприятного прогноза общей выживаемости больных раком желудка.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Юрченко А.А., Делекторская В.В., Огнерубов Н.А., Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Особенности экспрессии белка pm23 и содержание основных компонентов системы активации плазминогена в опухолях желудка // В материалах конференции «Национальные дни лабораторной медицины России-2005» (Москва, 11-14 октября 2005г.). Клиническая лабораторная диагностика.-2005.-№9.-с.25-26.

2. Юрченко А.А., Делекторская В.В., Огнерубов Н.А. Экспрессия белка pm23 в опухолях желудка // В материалах IX Российского онкологического конгресса (Москва, 22-24 ноября 2005г.).-М.-2005.-с.186.

3. Огнерубов Н.А., Юрченко А.А., Кушлинский Н.Е. Анализ экспрессии белка pm23 в опухоли при раке желудка // Фундаментальные исследования.-2005.-№5.-с.12.

4. Огнерубов Н.А., Юрченко А.А. Клинические особенности системы активации плазминогена в опухоли при раке желудка // Фундаментальные исследования.-2005.-№5.-с.12.

5. Юрченко А.А., Делекторская В.В., Перевошиков А.Г., Огнерубов Н.А. Особенности экспрессии pm23 и содержания основных компонентов системы активации плазминогена в опухолях желудка // В тезисах международной научно-практической конференции «Ведущий многопрофильный госпиталь страны: основные функции, достижения и направления развития» (Москва 1-2 июня 2006г.).-М.-2006.-с.199-200.

6. Юрченко А.А., Делекторская В.В., Герштейн Е.С., Огнерубов Н.А., Н.Е.Кушлинский. Экспрессия белка pm23 и содержание основных компонентов системы активации плазминогена в опухолях желудка // Бюлл.Экспер.Биол.-2007.-т.43, №5.-с.569-571.