

Молекулярно-биологические особенности нейроэндокринных опухолей желудочно-кишечного тракта.

Гафтон И.Г.¹, Имянитов Е.Н.^{1,2}, Семиглазов В.В.^{1,3}, Мацко Д.Е.¹, Гафтон Г.И.^{1,3},

Семилетова Ю.В.^{1,2}, Иевлева А.Г.¹, Лемехов В.Г.^{1,2}, Клиценко О.А.²

1. ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова» Минздрава РФ, г.СПБ

2. ГБОУ ВПО «СЗГМУ им. И.И.Мечникова» Минздрава РФ, г.СПБ

3. ГБОУ ВПО «СЗГМУ им. академика И.П.Павлова» Минздрава РФ, г.СПБ

Контакты: 197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, дом 68,

тел.439-95-55 (доб. 1310), e-mail: gafton_ivan@mail.ru

Резюме

Представлены результаты молекулярно-генетического исследования экспрессии генов BRCA1, C-kit и мутации гена EGFR и транслокации ALK у 34 больных нейроэндокринными опухолями (НЭО) желудочно-кишечного тракта. Исходя из анализа результатов выживаемости больных НЭО, в зависимости от уровня экспрессии BRCA1, допустимо предположить о возможности использования данного показателя, как прогностического критерия, так и фактора, определяющего целесообразность назначения препаратов платины. Выявлено отсутствие влияния экспрессии C-kit на показатели выживаемости больных НЭО. Мутации гена EGFR и транслокации ALK не выявлены в исследуемом материале.

Ключевые слова: нейроэндокринные опухоли, лечение, мутации, EGFR, ALK-транслокация, BRCA1, C-KIT.

Molecular biological features of neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract

Gafton I.G.¹, Imyanitov E.N.^{1,2}, Semiglazov V.V.^{1,3}, Matsko D.E.¹, Gafton G.I.^{1,3},
Semiletova Y.V.^{1,2}, Ievleva A.G.¹, Lemehov V.G.^{1,2}, Klitsenko O.A.²

1. Scientific Research Institute of Oncology named after N.N. Petrov
2. North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov
3. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University

Abstract.

The results of molecular-genetic study of the expression of genes BRCA1, c-kit mutation and EGFR gene and ALK translocation in 34 patients with neuroendocrine tumors (NETs) of the gastrointestinal tract. Based on the analysis results NET survival, depending on the level of expression of BRCA1, is allowed to assume the possibility of using this index as a prognostic criterion and the factor that determines the appropriateness of the appointment of platinum. The absence of the effect of the expression of c-kit in the survival rates of patients with NETs. EGFR gene mutations and ALK translocations have been identified in the material.

Keywords: neuroendocrine tumor, treatment, mutation, EGFR, ALK-translocation, BRCA1, C-KIT

Введение

Патогенез нейроэндокринных опухолей, как и других карцином, сопряжён с накоплением соматических мутаций в онкогенах и антионкогенах [2,4]. Результаты большого числа исследований прогностического значения молекулярно-биологических особенностей различных злокачественных опухолей показали возможность индивидуального подхода в лечении онкологических больных. Правильная и своевременная оценка прогностических и предиктивных факторов позволяет получить наилучшие отдаленные результаты лечения пациентов даже на этапе генерализации неоплазии. Использование генетических характеристик, как самого организма, так и опухолевой ткани, позволит выбрать оптимальный цитотоксический препарат, а в ряде случаев применить таргетную терапию. Вместе с тем нельзя забывать о большом прогностическом и предиктивном значении

стандартных традиционных клинических показателей при принятии решения о выборе метода лечения. Наибольшую известность получили экспрессионные прогностические и предиктивные характеристики опухолевого процесса [10,12]. Помимо безусловной предиктивной значимости, мутационные тесты отличаются исключительной воспроизводимостью; в отличие от анализа экспрессионных характеристик опухолей, поиск мутаций не сопряжен с получением «промежуточных», не интерпретируемых результатов [3]. В последние десятилетия возрастает значение рецепторов тирозинкиназы (c-kit, EGFR, ALK-транслокация) в качестве молекулярных мишеней для лечения рака. Существует мнение, что они играют определенную роль в развитии некоторых опухолей человека, таких, как мелкоклеточный рак легких, рак молочной железы [5]. В ряде исследований в случае нейроэндокринных опухолей желудочно-кишечного тракта экспрессия C-kit определялась иммуногистохимически, но отдаленные результаты лечения ингибиторами тирозинкиназы были неудовлетворительными, хотя при этом данные исследований были противоречивы и в разных центрах показания разнились [6]. Уровень экспрессии методом ПЦР и мутация C-kit в этих исследованиях не проводилась.

Как правило, высокий уровень экспрессии EGFR наблюдается в клетках рака молочной железы, рак легких, толстой кишки, что коррелирует с плохим прогнозом. Он играет важную роль в пролиферации, адгезии, инвазии, выживаемости клеток. Тест на мутацию EGFR стал показателем успеха предиктивной медицины в онкологии его положительный результат позволяет с высокой точностью отобрать тех больных НМРЛ, у которых весьма вероятен положительный результат применения гефитиниба, эрлотиниба или афатиниба [11,13]. Столь же успешный опыт накоплен при использовании ингибитора тирозинкиназы ALK – кризотиниба – у больных с ALK-транслоцированными карциномами легкого [8,15]. В связи с тем, что НЭО ЖКТ развиваются из элементов АПУД системы, как и НМРЛ, данная особенность натолкнула нас на предположение о возможной оценке экспрессии генов тирозинкиназы.

Хорошо известен предиктивный экспрессионный маркер опухоли - BRCA1, который можно оценивать, как посредством ИГХ, так и при помощи ПЦР-анализа генной экспрессии. Определение мутации и уровня экспрессии гена BRCA1 широко и успешно используется при лечении рака молочной железы (РМЖ) и рака яичников (РЯ), для определения прогноза заболевания и эффективности терапии. При наличии генетического дефекта в одном из генов наследственного РМЖ BRCA1, BRCA2 или PALB2, опухоли

обычно демонстрируют высокую чувствительность к BRCA - специфическим препаратам производным платины, ингибиторам PARP, митомицину [14].

Большое количество исследований по данной теме, не содержит единого мнения по поводу использования диагностических возможностей генетических маркеров среди больных НЭО [6,7,9].

Целью настоящего исследования

Поиск путей улучшения результатов лечения больных нейроэндокринными опухолями желудочно-кишечного тракта.

Задачами исследования являются выявление влияния уровня экспрессии генов и прогностически значимых мутаций у больных нейроэндокринными опухолями желудочно-кишечного тракта, и оптимизация лечения данной группы пациентов.

Материалы и методы:

В связи с достаточно редкой патологией в исследование включено 58 больных с гистологически верифицированным нейроэндокринным раком желудочно-кишечного тракта pT1-4N0-3M0, радикально оперированных с января 1994 по декабрь 2013 года в клинике ФГБУ НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова. Сведения о пациентах были получены из историй болезни, амбулаторных карт, гистологических заключений, стандартных протоколов исследования операционного материала. Минимальный период наблюдения составил 5 месяцев, максимальный 18 лет. Отдаленные результаты наблюдения собраны по всем пациентам. При их анализе удалось установить, что 18 (31%) больных умерли от основного заболевания. У 34 (58.6%) пациентов выявлен рецидив заболевания в различные сроки наблюдения. При скрининге гистологического материала 34 пациентов, получивших сходное лечение, на предмет наличия в опухоли уязвимых мутаций были выявлены следующие особенности: транслокаций EML4-ALK и делеций в 19 экзоне гена EGFR выявлено не было. При последующем анализе была выявлена низкая экспрессия BRCA1 у 2 (5.9%) из 34 (100.0%) пациентов (таблица 1). Также была выявлена экспрессия гена C-kit у 9 (27%) из 34 (100.0%) больных.

Таблица 1.

Показатели экспрессии гена BRCA1	
До 0	8 (23.5%)
0-2	13 (38.2%)
2-4	11 (32.4%)
Более 4	2 (5.9%)
Итого	34 (100%)

Таблица 2.

Показатели экспрессии гена C-kit

До 0	5 (15.0%)
0-2	11 (32.0%)
2-4	9 (27.0%)
Более 4	9 (27.0%)
Итого	34 (100%)

Делеции в 19 экзоне гена EGFR детектировали путем ПЦР-амплификации всей последовательности экзона при помощи прямого 5'-CTGTCATAGGGACTCTGGAT-3' и обратного 5'-CAGCAAAGCAGAAACTCACAT-3' праймеров. Детекция транслокаций EML4-ALK осуществлялась путем ПЦР-амплификации 5 наиболее частых типов транслокаций ((EML4ex13/ALKex20, V.1; EML4ex20/ALKex20, V.2; EML4ex6/ALKex20, V.3; EML4ex18/ALKex20; EML4ex2/ALKex20) с помощью специфических праймеров. Последовательности кДНК гена-мишени BRCA1 и гена-рефери (SDHA) амплифицировали при помощи специфических праймеров в присутствии TaqMan-зондов. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием принятых методов параметрической и непараметрической статистики. Вычисляли средние показатели и стандартные ошибки относительных величин. Статистическая значимость различий сравниваемых групп оценивалась с помощью критериев Пирсона и точных методов Фишера [1].

Результаты и обсуждение.

Для выявления взаимосвязей уровня экспрессии гена BRCA1 и C-kit с исследуемыми показателями мы использовали коэффициент корреляции Спирмена (Rsp), который может принимать значения от -1 до +1. При этом отрицательный коэффициент корреляции позволяет принять гипотезу о наличии монотонной отрицательной связи, т.е. увеличение значения одной переменной ведет к уменьшению значения коррелирующей с ней переменной. Для выявления взаимосвязей показателей экспрессии BRCA1 с исследуемыми критериями мы не могли применить традиционное значение BRCA1 = 4, т.к. с такими показателями имели всего 2-х пациентов. По этой причине мы воспользовались статистическими характеристиками нашей выборки по уровню экспрессии BRCA1 и реализовали 2 варианта анализа:

- 1- Делением показателей BRCA1 по медиане;
- 2- Делением показателей BRCA1 по тертилям.

Взаимосвязи уровня экспрессии BRCA1 удалось выявить при выделении подгруппы по верхней тертили равной 2.

Рис.1 Показатели безрецидивной выживаемости больных НЭО в зависимости от уровня экспрессии BRCA1. $p<0.05$

Как следует из рисунка 1. имеет место статистически значимое ($p<0.05$) увеличение показателей безрецидивной выживаемости при наличии уровня экспрессии BRCA1 выше значения 2.0 по сравнению со значением BRCA1 менее 2.0. Медиана годичной безрецидивной выживаемости при наличии уровня экспрессии BRCA1 выше значения 2.0 составляет 52%, а пятилетней – 28%. Тогда как, при значении показателя уровня экспрессии BRCA1 менее 2.0, медиана годичной безрецидивной выживаемости пациентов с НЭО составила 72%, а пятилетняя – 62%.

Рис.2 Показатели общей выживаемости больных НЭО в зависимости от уровня экспрессии BRCA1. $P=0.12$

Как следует из рисунка 2. при наличии уровня экспрессии BRCA1 выше значения 2.0 имеет место тенденция ($p=0.12$) к увеличению показателей общей выживаемости по сравнению со значением уровней экспрессии менее 2.0.

Рис.3 Показатели пострецидивной выживаемости больных НЭО в зависимости от уровня экспрессии BRCA1. $p<0.1$

Как следует из рисунка 3. при наличии уровня экспрессии BRCA1 выше значения 2.0 имеет место тенденция ($p<0.1$) к увеличению показателей пострецидивной выживаемости по сравнению со значением менее 2.0. Исходя из анализа результатов пострецидивной выживаемости больных НЭО в зависимости от уровня экспрессии BRCA1 можно предположить возможность использования данного показателя, как прогностического критерия, так и фактора, определяющего целесообразность назначения препаратов платины.

При анализе показателей общей выживаемости в зависимости от уровня экспрессии C-kit достоверных различий выявлено не было (рисунок 4). Медиана годичной общей выживаемости при наличии уровня экспрессии C-kit выше значения 4.0 составляет 89%, а пятилетней – 78%. Тогда как, при значении показателя уровня экспрессии C-kit менее 4.0, медиана годичной общей выживаемости пациентов с НЭО составила 85 %, а пятилетняя – 60%.

Рис.4 Показатели общей выживаемости больных НЭО в зависимости от уровня экспрессии C-kit, $p>0.05$

При анализе показателей общей выживаемости в зависимости от уровня экспрессии C-kit достоверных различий выявлено не было (рисунок 4). Медиана годичной общей выживаемости при наличии уровня экспрессии C-kit выше значения 4.0 составляет 89%, а пятилетней -78%. Тогда как, при значении показателя уровня экспрессии C-kit менее 4.0, медиана годичной общей выживаемости пациентов с НЭО составила 85 %, а пятилетняя – 60%. Аналогичная ситуация наблюдается и при анализе показателей безрецидивной выживаемости, $p>0.05$ (рисунок 5).

Рис.5 Показатели безрецидивной выживаемости больных НЭО в зависимости от уровня экспрессии C-Kit, $p>0.05$.

Заключение.

Таким образом, обобщая вышеописанные данные можно предположить возможность использования показателя экспрессии гена BRCA1, как с прогностической, так и с предиктивной целью - чем агрессивнее нейроэндокринные опухоли ЖКТ, тем ниже экспрессия. Тогда как, в случае с экспрессией гена C-kit, только с предиктивной целью. Исследование у пациентов с нейроэндокринными опухолями ЖКТ мутации EGFR и ALK-транслокации не целесообразно.

Данная работа поддержана грантом РФФИ № 14-15-00528

Литература

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. - М., Практика, 1998г. - 459 с.
2. Имянитов Е.Н. Принципы индивидуализации противоопухолевой терапии //Практическая онкология Т.14, №4, 2013
3. Имянитов Е.Н. Стандартные и потенциальные предиктивные маркеры при опухолях желудочно-кишечного тракта //Практическая онкология Т.13, №4 – 2012, с 219-228
4. Имянитов Е.Н. Эпидемиология и биология нейроэндокринных опухолей //Практическая онкология Т.6, №4 – 2005, с 202-205
5. D'Angelo SP, Janjigian YY, Ahye N, Riely GJ, Chaft JE, Sima CS, Shen R, Zheng J, Dycoco J, Kris MG, Zakowski MF, Ladanyi M, Rusch V, Azzoli CG Distinct clinical course of EGFR-mutant resected lung cancers: results of testing of 1118 surgical specimens and effects of adjuvant gefitinib and erlotinib // J. Thorac. Oncol. 2012. Vol. 7. P. 1815–1822. DOI: 10.1097/JTO.0b013e31826bb7b2.
6. Fjällskog M.L., Hallin-Lejonklou M, Öberg K.E., Eriksson B.K., Janson E. Expression of molecular targets for tyrosine kinase antagonist in malignant endocrine pancreatic tumors. Clin cancer res 9 1469-1473
7. Imyanitov E.N., Moiseenko M.V. Drug therapy for hereditary cancers // Hered. Cancer Clin. Pract. 2011. Vol. 9. P. 1–16. DOI:10.1186/1897-4287-9-5
8. Janson ET, Holmberg L, Stridsberg M, Eriksson B, Theodorsson E, Wilander E & Öberg K 1997 Carcinoid tumors: analysis of prognostic factors and survival in 301 patients from a referral center. Annals of Oncology 8 685-690. (DOI:10.1023/A:1008215730767)
9. Kulke M.H. Neuroendocrine tumours: clinical presentation and management of localized disease // Cancer Treat. Rev. – 2003. – Vol. 29. – P. 363-370. DOI: 10.1016/S0305-7372(03)00072-0
10. Leotlela P.D., Jauch A., Holtgreve-Grez H., Thakker R.V. Genetics of neuroendocrine and carcinoid tumours // Endocrin. Relat. Cancer. – 2003. – Vol. 10. – P. 437-450. DOI: 10.1677/erc.0.0100437
11. Modlin IM, Öberg K, Chung DC, Jensen RT, de Herder WW, Thakker RV, Caplin M, Delle Fave G, Kaltsas GA, Krenning EP et al. 2008 Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. Lancet Oncology 9 61-72. (DOI:10. 1016/S1470-2045(07)70410-2)

12. O'Toole D, Grossman A, Gross D, Delle Fave G, Barkmanova J, O'Connor J, Pape UF & Plockinger U 2009 ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: biochemical markers. *Neuroendocrinology* 90 194-202. (DOI:10.1159/ 000225948)
13. Pallis A.G., Syrigos K.N. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in the treatment of NSCLC // *Lung Cancer*. – 2013 (May). – Vol.80(2). – P.120130.
14. Pao W., Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer // *Lancet Oncol*. 2011. Vol. 12. P. 175–180. (DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70087-5)
15. Shaw A.T., Engelman J.A. ALK in lung cancer: past, present, and future // *J. Clin. Oncol*. – 2013 (Mar 10). – Vol.31(8). –P.11051111.