

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Быков Игорь Игоревич

**Аспекты персонализации лечения больных раком желудка с учетом
молекулярных маркеров**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

1.5.7. Генетика

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научные консультанты:
доктор медицинских наук,
профессор, академик РАН
Решетов Игорь Владимирович,
доктор биологических наук, профессор
Немцова Марина Вячеславовна

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	22
1.1. Эпидемиология рака желудка.....	22
1.2. Рак желудка как мультифакториальное заболевание	24
1.3. Роль бактерий и вирусов в патогенезе рака желудка	26
1.3.1. Вирусы семейства <i>Herpes viridae</i>	26
1.3.2. Роль <i>Helicobacter pylori</i> в патогенезе рака желудка	27
1.3.3. Вирус Эпштейна-Барр	31
1.3.4. Вирус папилломы человека	32
1.4. Предраковые повреждения слизистой оболочки желудка.....	34
1.5. Исторические этапы молекулярных исследований рака желудка	37
1.6. Молекулярные основы канцерогенеза желудка.....	39
1.6.1. Теломераза и теломеры	41
1.6.2. Регуляторы клеточного цикла и факторы роста	42
1.6.3. Подавление апоптоза	45
1.6.4. Факторы неоангиогенеза.....	47
1.6.5. Факторы инвазии и метастазирования.....	48
1.6.6. Микросателлитная нестабильность	51
1.6.7. Метилирование ДНК в опухолях	52
1.7. Значение наследственного фактора в развитии рака желудка	55
1.8. Полногеномные исследования при раке желудка	61
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	65
2.1. Дизайн и характеристика исследования	65
2.2. Общая характеристика группы исследования	68
2.2.1. Описание первой подгруппы	72
2.2.2. Описание второй подгруппы	73
2.2.3. Описание третьей подгруппы	75

2.3. Обследование пациентов.....	76
2.3.1. Молекулярные маркеры	76
2.3.2. Молекулярные маркеры для диагностики рака, определяемые в первой подгруппе исследования	77
2.3.2.1. Характеристика системы молекулярных маркеров, исследуемых в первой подгруппе исследования	77
2.3.3. Выделение геномной ДНК из опухолевого материала	78
2.3.4. Рестрикционный анализ	79
2.3.5. Определение аномального метилирования промоторных областей генов <i>CDH1</i> , <i>RASSF1A</i> , <i>MLH1</i> , <i>TUSC3</i> , <i>DAPK</i>	80
2.3.6. Разделение продуктов ПЦР в 8%-ном полиакриламидном геле методом вертикального электрофореза.....	81
2.3.7. Ультратонкое окрашивание нитратом серебра.....	82
2.3.8. Оптимальные критерии интерпретации результатов исследования.....	82
2.3.9. Выделение РНК.....	84
2.3.10. Полмеразная цепная реакция с обратной транскрипцией	86
2.3.11. Определение теломеразной активности в ткани.....	87
2.3.12. Получение лизатов ткани	88
2.3.13. Определение концентрации белка в лизатах.....	88
2.3.14. TRAP-анализ.....	89
2.3.15. Разделение и визуализация продуктов реакции.....	89
2.3.16. Подсчет теломеразной активности и оценка результатов	90
2.3.17. Получение тканевого материала для анализа системы маркеров	91
2.3.18. Молекулярные маркеры, определяющие тактику комбинированного лечения при раке желудка, регистрируемые во второй подгруппе исследования	93
2.3.19. Исследование полиморфизмов гена <i>TYMS</i> и полиморфизмов гена <i>TP53</i> ...	94
2.4. Предоперационная подготовка больных	95
2.5. Оперативное лечение пациентов.....	97
2.5.1. Субтотальная дистальная резекция желудка	97

2.5.2. Предельно субтотальная дистальная резекция желудка.....	99
2.5.3. Гастрэктомия.....	100
2.5.4. Субтотальная проксимальная резекция желудка.....	103
2.5.5. Лимфаденэктомия.....	104
2.5.6. Результаты лечения пациентов группы исследования.....	104
2.5.6.1. Результаты лечения пациентов в первой подгруппе исследования.....	105
2.5.6.2. Результаты лечения пациентов во второй подгруппе исследования.....	107
2.5.6.3. Результаты лечения пациентов в третьей подгруппе исследования.....	109
2.5.7. Подходы к лечению местно-распространенного рака желудка.....	111
2.6. Химиотерапевтическое лечение.....	113
2.6.1. Факторы, которые могут влиять на проведение химиотерапевтического лечения.....	115
2.6.2. Химиотерапия в послеоперационном периоде.....	117
2.7. Рецидив рака желудка.....	117
2.7.1. Молекулярные маркеры прогноза рецидива рака желудка, определяемые в третьей подгруппе.....	118
2.7.2. Характеристика молекулярных маркеров в определении прогноза рецидива рака желудка.....	119
2.7.3. Анализ метилирования гена <i>RUNX3</i>	120
2.7.4. Получение тканевого материала для анализа системы маркеров.....	121
2.8. Приборы, реактивы, компьютерные программы, оценка полученных данных.....	122
2.8.1. Приборы.....	122
2.8.2. Реактивы.....	122
2.8.3. Компьютерные программы.....	123
2.8.4. Статистическая обработка результатов.....	123
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	125
3.1. Маркеры диагностики рака желудка.....	125
3.1.1. Анализ метилирования генов.....	125
3.1.1.1. Определение метилирования генов в первой подгруппе пациентов.....	125

3.1.1.2. Метилирование генов у пациентов с раком желудка и больных желчнокаменной болезнью в отсутствие онкопроцесса	129
3.1.2. Экспрессия генов	129
3.1.2.1. Экспрессия генов у пациентов с раком желудка и больных желчнокаменной болезнью в отсутствие онкопроцесса	131
3.1.3. Активность теломеразы.....	132
3.1.3.1. Активность теломеразы у больных раком желудка	133
3.1.3. 2. Активность теломеразы у больных раком желудка и пациентов с желчнокаменной болезнью	133
3.1.4. Использование эндоскопического материала для анализа маркеров	134
3.1.4.1. Метилирование генов, экспрессия генов и активность фермента в образцах опухоли, полученных эндоскопически в сопоставлении с показателями маркеров, полученных интраоперационно.....	135
3.1.5. Оценка маркеров диагностики онкопроцесса.....	136
3.2. Молекулярные маркеры и лечение локализованных форм рака желудка	137
3.2.1. Связь характеристик опухолевого процесса с полиморфными вариантами генов, ферменты, кодируемые которыми, участвуют в метаболизме фторпиримидинов	137
3.2.2. Взаимосвязь полиморфизмов генов <i>TYMS</i> и <i>TP53</i> с эффективностью адъювантной химиотерапии на основе 5-фторурацила	138
3.2.3. Отдаленные результаты лечения больных местно-распространенным раком желудка с учетом молекулярных особенностей опухоли	141
3.2.3.1. Взаимосвязь полиморфизмов гена <i>TYMS</i> с отдаленными результатами комбинированного лечения больных раком желудка	141
3.2.3.2. Взаимосвязь полиморфизмов гена <i>TP53</i> с отдаленными результатами комбинированного лечения больных раком желудка	143
3.3. Молекулярные маркеры в определении прогноза рецидива рака желудка	144
3.3.1. Анализ выживаемости больных после резекции желудка.....	144

3.3.2. Исследование молекулярных маркеров в слизистой оболочке культи желудка для определения их связи с рецидивом онкопроцесса.....	146
3.4. Алгоритм выбора персонализированного подхода к лечению больных раком желудка на основе молекулярных маркеров.....	148
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	166
4.1. Характеристика системы молекулярных маркеров в диагностике рака желудка.....	166
4.2. Возможность использования молекулярных маркеров в определении тактики комбинированного лечения больных раком желудка.....	175
4.3. Роль молекулярных маркеров в определении прогноза рецидива рака желудка.....	180
4.4. Эффективность применения алгоритма, основанного на использовании молекулярных маркеров, для персонализированного ведения больных с предполагаемым диагнозом Рак желудка.....	184
4.4.1. Эффективность применения алгоритма для персонализированной диагностики рака желудка	186
4.4.2. Эффективность применения алгоритма для персонализированного подхода к комбинированному лечению больных раком желудка	188
4.4.3. Эффективность применения алгоритма для персонализированного мониторинга и диагностики рецидива заболевания.....	191
ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	195
5.1. Персонализация диагностики и хирургической тактики у больных раком желудка	195
5.2. Персонализация комбинированного лечения больных раком желудка	197
5.3. Персонализация прогноза рецидива рака желудка.....	199
5.4. Персонализация лечения больных раком желудка.....	201
ВЫВОДЫ	203
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	206
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	209
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	213

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В настоящее время рост показателей заболеваемости злокачественными новообразованиями сохраняется, что, в свою очередь, отражается на риске смерти от онкологических заболеваний, который имеет тенденцию к увеличению, и, согласно прогнозам американских ученых, возможно, скоро превысит риск смерти от болезней системы кровообращения [63, 208]. Таким образом, постепенно онкологические заболевания становятся наиболее вероятной причиной смерти.

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) за 2020 год первое место в мировом онкологическом рейтинге заболеваемости занимает рак молочной железы, далее следуют рак легкого, колоректальный рак, рак простаты, замыкает пятерку рак желудка. При этом в структуре заболеваемости пациентов мужского пола рак желудка занимает четвертое место, у пациентов женского пола рак желудка остается на пятом месте. Абсолютная заболеваемость равна 1 089 103 новых случая в год. Если оценивать смертность, то в ее рейтинге рак желудка занимает четвертое место, что отражается в годовом абсолютном числе смертельных случаев от рака желудка равном 768 793. Схожую картину показывают и отечественные статистические отчеты по заболеваемости и смертности от онкологических заболеваний [62, 118, 130].

В России более половины пациентов с диагнозом Рак желудка поступают на лечение с третьей и четвертой стадиями заболевания, когда основной метод лечения – хирургический – становится в монорежиме малоэффективным. Таким образом, изначально лечение данной категории пациентов не предвещает хорошего прогноза как для жизни, так и для ее качества, не говоря уже о трудовом прогнозе [5].

Результативность лечения больных раком желудка во многом связывают с адекватной своевременной диагностикой как предраковых состояний и

заболеваний, так и самого онкопроцесса на ранних стадиях [54, 224, 264]. Необходимо отметить, что для ранних форм рака желудка свойственно отсутствие патогномичной клинической симптоматики; они не являются опухолями визуальной локализации, а также характеризуются низкой диагностической значимостью таких рутинных лабораторных методов исследования, как общий и биохимический анализ крови, др. «Золотым стандартом» в диагностике рака желудка на настоящий момент остается эндоскопическое исследование с проведением биопсии и последующей морфологической верификацией диагноза путем цитологической, гистологической или иммуногистохимической оценки полученного материала [2, 235, 273]. Таким образом, клинический диагноз основывается на морфологических критериях, однако остается нерешенным вопрос объективизации изменений слизистой при тяжелой дисплазии на фоне хронических воспалительных изменений, когда трактовка разных специалистов-морфологов может существенно различаться и вносить субъективный элемент в решение о патоморфологическом диагнозе [9, 21, 152]. Подслизистый рост опухоли также может затруднить постановку патоморфологического диагноза, поскольку в биоптат зачастую попадают ткани, составляющие опухолевое окружение и не представляющие собственно опухоль, в отдельных случаях полученный образец может содержать опухолевые элементы, но в ничтожно малом количестве. Это диктует необходимость поиска более чувствительных методов диагностики, которые более информативны и опираются в своей оценке на молекулярный уровень организации тканей, позволяющий дать большую детализацию структуры, нежели гистологический или клеточный анализ. В свою очередь молекулярный уровень исследования тканей позволяет дать определенные суждения о выявленных изменениях как по опухолевому окружению, где регистрируются определенные изменения, так и по крайне малому объему опухолевого образца, что невозможно в рамках цитологического и гистологического исследований [29, 127].

До сих пор существуют различные мнения по поводу проведения скрининга для раннего выявления рака желудка. Например, в Японии, характеризующейся

крайне высокими показателями заболеваемости раком желудка, скрининговая политика позволила увеличить выявляемость раннего рака желудка: доля диагностированного эндоскопически раннего рака желудка выросла за несколько лет с 15% до 50%, что положительно сказалось на прогнозе и уровне смертности [145]. Однако при том, что выявляемость раннего рака желудка в Японии самая высокая среди стран мира, уровень «пропущенных» случаев раннего рака желудка оценивается в 19% [279]. В отсутствии скрининговой политики диагностики рака желудка количество случаев «пропущенного» рака естественно оценивается большим процентом [33].

Вышесказанное требует определения иных принципов диагностики и тактики ведения больных раком желудка путем поиска и разработки новых подходов и методов исследования.

Степень разработанности темы исследования

Одним из таких подходов является персонализация диагностики и лечения для каждого пациента, которая при этом не исключает наличие стандартных приемов и общих принципов ведения пациентов с данной нозологией. Персонализированную медицину можно определить, как «быстро развивающуюся область здравоохранения, основанную на интегрированном, координированном и индивидуальном для каждого пациента подходе к анализу возникновения и течения заболевания» [64, 77] или как «интегральную медицину, которая включает разработку персонализированных средств лечения на основе геномики, тестирование на предрасположенность к болезням, профилактику, объединение диагностики с лечением и мониторинг лечения» [1, 151].

Персонализированная медицина рассматривается как стратегия профилактики, диагностики и лечения болезней на основе данных о биомаркерах организма, определяемых молекулярно-генетическими особенностями конкретного индивида [40, 75].

Биомаркеры – это показатели, которые используются при проведении научных медицинских исследований для измерения биологических процессов, процессов развития болезней и реакций на лечение. Использование биомаркеров позволяет оптимизировать процесс разработки медицинских препаратов и способствует индивидуализации курсов лечения [192, 213].

Достигнутый прогресс в сфере изучения молекулярно-биологических и биохимических процессов опухолеобразования позволил применять в практической онкологии биохимические и молекулярные маркеры опухолевого роста [34, 122].

Исследование этих маркеров видится перспективным решением проблемы диагностики рака желудка и определения тактики ведения больных.

Группу маркеров можно разделить на биохимические и молекулярно-генетические.

Биохимические онкомаркеры рака желудка, применяемые в клинической практике, определяются в крови (РЭА, СА-19-9, СА-72-4 и другие) [119, 183], что упрощает забор материала для исследования, однако данные онкомаркеры характеризуются недостаточной чувствительностью и специфичностью. В повышенных концентрациях в крови они могут определяться при воспалительных заболеваниях, доброкачественных новообразованиях желудка, при опухолях других локализаций. Их применение целесообразно при подтвержденном диагнозе онкологического заболевания для оценки эффективности проводимого лечения, когда анализируется не сам показатель, а динамика его изменения, а также при динамических исследованиях с целью исключения так называемого «биохимического» рецидива заболевания, когда наличие роста опухоли или активности метастазов не регистрируются при помощи инструментальных исследований, при этом есть рост уровня биохимического маркера.

В настоящее время существенное значение приобретают молекулярные маркеры, основанные на использовании геномных технологий. К таким онкологическим маркерам относятся функциональные и структурные

повреждения, выявляемые в геноме опухолевой клетки [8]. Подобные повреждения приводят к изменению генов-регуляторов клеточного цикла, показателей метастатической и инвазивной активности, к повреждению генов, кодирующих адгезионные белки и факторы активности неоангиогенеза, к аномальному метилированию регуляторных областей генов-супрессоров, к изменению активности и экспрессии теломеразы в клетках опухолей и т. д. [61, 98]. Такие онкологические маркеры просты в лабораторном исследовании, являются достаточно чувствительными и специфичными, однако их применение требует тщательной научной разработки и валидации для внедрения в клиническую практику. Это принципиально новый уровень постановки диагноза – не цитологический, когда исследуются отдельные клетки, не гистологический (по структуре ткани), а наноуровень, оценивающий экспрессию отдельных генов и их мутации, продукты биосинтеза (белков, активности ферментов или молекулярных рецепторов).

Таким образом, решение проблемы лечения рака желудка на сегодняшний день находится на стыке нескольких дисциплин: хирургии, онкологии, фармакологии и молекулярной генетики. Сущность этого подхода заключается в создании систем молекулярных маркеров, определяемых в биоптатах слизистой желудка, которые помогут с большим уровнем точности в более короткие сроки подтвердить или опровергнуть диагноз Рака желудка и помочь в разработке тактики ведения конкретного пациента в рамках реализации принципа персонализированной медицины [56, 117, 255].

В настоящей работе проведен поиск и анализ перспективных молекулярных маркеров, которые, будучи собраны в единую систему в последующем, позволяют одновременно решать вопросы диагностики, лечения и мониторинга пациентов с предполагаемым диагнозом Рака желудка, осуществляя, таким образом, принцип персонализированного подхода в определении тактики ведения пациентов с данной нозологией, улучшая тем самым результаты лечения данной категории пациентов.

Цель исследования

Улучшить результаты лечения больных раком желудка, используя персонализированный подход на основе молекулярных маркеров.

Задачи исследования

1. Провести анализ молекулярных маркеров, используемых при определении тактики ведения пациентов с онкологическими заболеваниями, выбрать наиболее перспективные для определения у пациентов с предполагаемым диагнозом Рак желудка.

2. Разработать методологию анализа молекулярных маркеров у пациентов с предполагаемым диагнозом Рака желудка на этапах диагностики, лечения и мониторинга данной категории пациентов.

3. Определить связь исследуемых маркеров с основными клиническими показателями и морфологическими характеристиками опухоли, и течением заболевания у пациентов с раком желудка.

4. Провести исследование полиморфизмов генов, отвечающих за синтез ферментов, метаболизирующих фторпиримидины, вариации которых могут влиять на исход комбинированного лечения, сочетающего оперативное лечение и адъювантную химиотерапию при местно-распространенном раке желудка.

5. Разработать систему молекулярных маркеров для оценки изменений слизистой желудка с целью диагностики, персонализации хирургического и комбинированного методов лечения больных с предварительным диагнозом Рака желудка, определения прогноза у данных пациентов, основанную на оценке сопоставления молекулярных маркеров, характеристик опухоли, проведенного лечения и его исходов.

6. Оценить возможность использования выбранных диагностических молекулярных маркеров на дооперационном этапе для использования в рамках персонализированного подхода.

7. Разработать, апробировать и оценить эффективность для практического использования алгоритм персонализированного подхода ведения пациентов, с использованием молекулярных маркеров диагностики, лечения и мониторинга больных раком желудка.

Научная новизна

Впервые предложен персонализированный подход одновременно к диагностике, хирургическому и комбинированному лечению, оценке прогноза у больных раком желудка на основе изучения молекулярных маркеров.

Впервые оценка молекулярных маркеров для персонализации хирургического и комбинированного лечения больных с предварительным диагнозом рак желудка осуществлена на российской выборке пациентов.

Впервые разработан и апробирован алгоритм персонализированного подхода к лечению больных раком желудка на основе системы молекулярных маркеров.

Впервые показано, что использование разработанного алгоритма определения тактики ведения пациентов с предварительным диагнозом Рак желудка, основанного на персонализированном подходе, который в свою очередь построен на использовании молекулярных маркеров, при выполнении резекций желудка в объеме R0 и при условии расширенной лимфаденэктомии не только правомочно, но также повышает степень онкологического радикализма и способствует увеличению продолжительности жизни у больных раком желудка.

Получен патент №2713907 на изобретение «Способа персонализации медицинской помощи пациентам с раком желудка», дата регистрации 11 февраля 2020 года, срок действия до 26 ноября 2039 года.

Материалы работы использованы для выполнения гранта РФФИ №18-015-0033А «Молекулярное профилирование опухолей для выявления новых генов, отвечающих за развитие спорадического, наследственного и семейного рака желудка».

Теоретическая и практическая значимость работы

1. Проведена оценка возможности применения молекулярных маркеров у больных раком желудка с целью выбора персонализированного подхода к диагностике, лечению и оценке прогноза у данной категории больных.

2. Проведено адаптирование панели молекулярных маркеров рака желудка с целью использования для диагностики, оценки эффективности комбинированного лечения и прогнозирования развития рецидива заболевания.

3. Изучена целесообразность определения молекулярных маркеров для персонализации лечения больных раком желудка.

4. Разработан, апробирован и внедрен в клиническую практику алгоритм персонализированного подхода к определению тактики ведения больных раком желудка, основанный на молекулярных маркерах, позволяющий в более короткие сроки наметить план диагностики, лечения и мониторинга данной категории пациентов.

5. Проведена оценка адекватности проводимого хирургического и химиотерапевтического лечения у пациентов с местно-распространенным раком желудка с использованием персонализированного подхода, в основе которого лежат не только морфологические критерии, но и молекулярные маркеры.

6. Разработан алгоритм персонализированного выбора объема операции на желудке и комбинированного лечения с учетом молекулярных маркеров, позволяющий в более короткие сроки определить тактику ведения и оптимизировать лечение пациентов.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа выполнена по принципам и правилам доказательной медицины. Всего на первом этапе было включено в исследование 800 пациентов с предварительным диагнозом Рак желудка, проходивших обследование и лечение с 2008 по 2016 гг. Из них 289 пациентов были отобраны для исследования образцов ткани на молекулярные маркеры и у 226 было выполнено данное исследование. При этом помимо определения маркеров в материале, полученном интраоперационно, у 93 пациентов также было осуществлено определение молекулярных маркеров на дооперационном этапе в материале, полученном при эндоскопической биопсии. В дальнейшем 289 пациентов были разделены на три подгруппы. В первую подгруппу вошли 106 пациентов, материал от которых послужил основой для оценки возможности определения маркеров в рамках дифференциальной диагностики рака желудка, что включало определение метилирования генов *CDH1*, *RASSF1A*, *MLH1*, *TUSC3*, *DAPK*, экспрессии генов *hTERT*, *MMP7*, *MMP9*, *BIRC5*, *PTGS2*, *TP53*, активности теломеразы в образцах ткани. Сопоставление показателей маркеров проводилось с контрольной группой из 50 пациентов, страдавших желчнокаменной болезнью, в отсутствии возможных поражений слизистой желудка. Во вторую подгруппу вошли 80 пациентов, у которых определялись полиморфизмы генов *TYMS* и *TP53* с целью оценки значения данных параметров для проведения комбинированного лечения. В третью подгруппу вошли 103 пациента, у которых проводилось определение метилирования генов *CDH1*, *RASSF1A*, *MLH1*, *TUSC3*, *DAPK*, *RUNX3* с целью прогнозирования возможного возникновения рецидива заболевания после проведенного лечения. По результатам была сформирована панель маркеров персонализированного подхода к проведению диагностики, тактики комбинированного лечения и оценке возникновения рецидива заболевания. На втором этапе в группу исследования было введено 150 пациентов, проходивших лечение с 2016 по 2021 гг., соответственно по 50 пациентов в каждой подгруппе,

для оценки каждого из компонентов системы: диагностического, лечебного и прогностического. В последующем это дало возможность оценить значение разработанной системы молекулярных маркеров для персонализированного подхода к диагностике, лечению и оценке возможного рецидива у больных с предполагаемым диагнозом Рак желудка.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Уровни метилирования генов *RASSF1A*, *MLH1*, экспрессия генов *hTERT*, *MMP7*, *BIRC5*, активности теломеразы достоверно подтверждают наличие опухолевого процесса в слизистой оболочке желудка, данные показатели обязательны к определению для диагностики в рамках персонализированного подхода к лечению рака желудка.

2. Полиморфизмы генов, отвечающих за синтез ферментов, метаболизирующих фторпиримидины, достоверно связаны с характеристиками первичной опухоли желудка, вторичным поражением локо-регионарных лимфатических узлов, рецидивом заболевания после проведенного комбинированного заболевания, что необходимо использовать в рамках персонализированного подхода в определении тактики лечения пациентов с раком желудка.

3. Полиморфизмы генов, отвечающих за синтез ферментов, метаболизирующих фторпиримидины, достоверно связаны с выживаемостью пациентов, которым проведено комбинированное лечение, что необходимо использовать в рамках персонализированного подхода к определению тактики лечения пациентов с раком желудка.

4. Общий статус пациента, характеристики первичного опухолевого очага, полиморфизмы генов, отвечающих за синтез ферментов, метаболизирующих фторпиримидины, являются факторами прогноза лечения, что следует

использовать в рамках персонализированного подхода в лечении больных раком желудка.

5. Отдаленные результаты лечения в сопоставлении с молекулярными показателями определяют проведение радикальной резекции желудка с лимфаденэктомией в объеме D2, правомочным вариантом лечения больных раком желудка при наличии соответствующих показаний к данному объему оперативного лечения.

6. Исследование отсроченного метилирования генов *TUSC3*, *CDH1* и *RUNX3* следует использовать в качестве дополнительного маркера прогноза в рамках персонализированного подхода к послеоперационному мониторингу больных.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют пункту 2 «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)» паспорта специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия и паспорта специальности 1.5.7. Генетика.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Сформулированные в диссертации научные положения, выводы и рекомендации обоснованы теоретическими решениями и экспериментальными данными, полученными в работе, и не противоречат известным положениям наук; базируются на строго доказанных выводах, согласуются с известным опытом создания и совершенствования знаний.

Апробация результатов работы

Материалы диссертации были представлены и обсуждены на XI съезде хирургов Российской Федерации (Волгоград, 25—27 мая 2011 г.), на научно-практической конференции с международным участием «Успенские чтения» (Тверь, 2012 г.), на Всероссийском симпозиуме молодых ученых «Современные проблемы хирургии и хирургической онкологии» (Москва, 29—30 ноября 2012 г.), на Европейской конференции по генетике человека (Нюрнберг, Германия, 23—26 июня 2012 г.), на XIV международной заочной научно-практической конференции «Научная дискуссия: вопросы медицины» (Москва, 2013 г.), на 20-ом Мировом конгрессе рака желудочно-кишечного тракта ESMO (Барселона, Испания, 20—23 июня 2018 г.), на Мировом конгрессе ESMO (Барселона, Испания, 27 сентября – 1 октября 2019 г.).

Работа являлась частью проекта «Новая система молекулярно-генетических маркеров в диагностике рака желудка», который стал номинантом в категории «Лучший проект года», подноминации «Лучший научно-исследовательский проект» Всероссийской премии в области онкологии ассоциации онкологов России IN VITA VERITAS (Санкт-Петербург, 12 сентября 2013 г.).

Апробация диссертации была проведена на заседании кафедры онкологии, радиотерапии и пластической хирургии Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) (протокол № 6/29 от 29 июня 2022 г.).

Внедрение в практику

Результаты исследования внедрены в лечебный процесс онкологического отделения противоопухолевой терапии, онкологического отделения хирургических методов лечения, хирургического отделения Университетской

клинической больницы №1 ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), а также внедрены в учебный процесс кафедры онкологии, радиотерапии и реконструктивной хирургии Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Материалы диссертационного исследования использовались при выполнении НИР по государственному заказу «Разработка современных технологий подготовки специалистов с высшим медицинским и фармакологическим образованием на основе достижений медико-биологических исследований». Рег. № 01.2.006.06352.

Материалы диссертационного исследования использовались при выполнении гранта РФФИ №18-015-0033А «Молекулярное профилирование опухолей для выявления новых генов, отвечающих за развитие спорадического, наследственного и семейного рака желудка».

Получен патент №2713907 на изобретение «Способ персонализации медицинской помощи пациентам с раком желудка», дата регистрации 11 февраля 2020 года, срок действия до 26 ноября 2039 года.

Личный вклад автора

Вклад автора работы определяется тем, что исследователем лично определено направление исследования, сформулированы цели и задачи, разработан план исследования, выбраны методы для его реализации. Исследователем самостоятельно проведен отбор пациентов, собраны анамнестические данные, определены клинико-диагностические исследования, осуществлено наблюдение больных в динамике, также автор лично принимал участие в хирургических вмешательствах. Автор самостоятельно обработал полученные клинические данные, провел статистическую обработку, анализ, обобщение полученных

результатов исследований, а также сравнил выводы собственной работы с имеющимися в литературе данными и изложил результаты исследования в тексте диссертации. Автором лично проанализированы, систематизированы и статистически обработаны результаты анализа диагностики и лечения 950 пациентов с предварительным диагнозом Рак желудка, находившихся на лечении в Клинике пластической и реконструктивной хирургии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Клинике факультетской хирургии имени Н.Н. Бурденко УКБ №1 ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), а также в химиотерапевтическом отделении №2 отдела лекарственного лечения НИИ Клинической онкологии им. Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2008 по 2021 гг., из которых 439 пациентов были отобраны для проведения исследования молекулярных маркеров. Автором лично проведена большая часть клинических наблюдений, комплексное обследование и лечение (включая предоперационную подготовку, многие из оперативных вмешательств, послеоперационный период), а также ведение больных при контрольном обследовании. Таким образом, вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования от постановки цели и задач до обсуждения результатов, и формулировки выводов.

Публикации

По результатам исследования автором опубликовано 25 работ, в том числе 12 научных статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук; 3 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах (Web of Science, Scopus, PubMed, MathSciNet, zbMATH, Chemical Abstracts, Springer); 5 статей в иных изданиях; 1 патент; 2 публикации в

сборниках материалов международных научных конференций; 1 монография; 1 руководство.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 242 страницах, состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Работа иллюстрирована 16 рисунками, содержит 23 таблицы, библиография включает 284 источника, из них 76 отечественных и 208 зарубежных.

Исследование было открытым, многоцентровым, носило ретроспективно-перспективный характер, являлось информационно-поисковым и было выполнено на базе УКБ №1 ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), химиотерапевтического отделения №2 отдела лекарственного лечения НИИ Клинической онкологии имени Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, кафедре онкологии, радиотерапии и пластической хирургии Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), кафедре факультетской хирургии №1 Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), кафедре онкологии и пластической хирургии Академии постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, лаборатории медицинской генетики Института молекулярной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Эпидемиология рака желудка

В настоящее время новообразования различных органов достаточно распространены и входят в число трех ведущих причин смерти населения в мире наряду с заболеваниями сердечно-сосудистой системы и травмами, занимая среди них 2-е место. При этом вопросы диагностики, лечения и профилактики этой группы болезней сохраняют свою актуальность на протяжении многих лет.

По оценке ВОЗ (2020 г.), онкологический рейтинг заболеваемости во всем мире выглядит следующим образом: первое место занимает рак молочной железы, затем следуют рак легкого, колоректальный рак, простаты, рак желудка. Необходимо отметить, что среди пациентов мужского пола рак желудка находится на четвертом месте, среди пациентов женского пола – на пятом месте. Абсолютная заболеваемость равна 1 089 103 новых случаев в год. Если оценивать смертность, то в ее рейтинге рак желудка занимает четвертое место, что отражается в годовом абсолютном числе смертельных случаев от рака желудка равном 768 793. Схожую картину показывают и отечественные статистические отчеты по заболеваемости и смертности от онкологических заболеваний [62, 130].

В России преобладающая часть пациентов с диагнозом Рак желудка поступает на лечение на поздних стадиях заболевания, когда хирургический метод лечения является малоэффективным. Таким образом, лечение данной категории пациентов характеризуется неблагоприятным прогнозом как для жизни, так и для ее качества, не говоря уже о трудовом прогнозе.

Основой диагностики рака желудка является эндоскопическое исследование с морфологической верификацией, хотя даже в Японии при самой высокой в мире выявляемости раннего рака желудка наиболее уровень «пропущенных» при проведении систематических медицинских осмотров случаев раннего рака желудка оценивается в 19 % [281]. Трудности в определении малого очага, риск

эпителизации язвы при раннем раке, рост числа случаев преимущественно подслизистого роста опухоли, неоднозначность морфологической трактовки и самого понятия «облигатный предрак» ухудшают выявление заболевания на ранних стадиях. Участок слизистой желудка, подозрительный при эндоскопическом исследовании, требует морфологического подтверждения диагноза для определения дальнейшей тактики. При этом гистологическое подтверждение не всегда возможно после однократного забора материала, требуются повторные эндоскопические биопсии, что откладывает срок постановки диагноза и, соответственно, начало проведения хирургического лечения, а увеличение опухоли в два раза при распространенных формах рака происходит в течение 2–12 месяцев [231, 270].

Несмотря на то, что в основе постановки диагноза лежат патоморфологические критерии, правильная трактовка морфологических изменений слизистой оболочки, особенно при тяжелой дисплазии в условиях хронического воспаления и при подслизистом росте опухоли, нередко представляет значительные трудности [38, 78]. Следует отметить, что при постановке морфологического диагноза имеются определенные субъективные аспекты, отдаляющие морфологический диагноз от клинического. Так, морфологический диагноз низкодифференцированной аденокарциномы будет выставлен по препарату, в котором встречаются и клетки перстневидно-клеточного рака, если элементы низкодифференцированной аденокарциномы в количественном эквиваленте преобладают над клетками перстневидно-клеточного рака. В то же время клинически перстневидно-клеточный рак в своем течении значительно отличается от аденокарциномы по всем своим биологическим характеристикам, в частности определяется мультифокальностью роста, скоростью опухолевой прогрессии, вариантом метастазирования, что обуславливает изначально плохой прогноз и иную лечебную тактику.

Современные достижения в изучении молекулярно-биологических и биохимических процессов опухолеобразования сделали возможным применение в

практической медицине биохимических маркеров опухолевого роста, которые в идеале не зависят от субъективных факторов трактовки морфологической картины, в том числе в условиях хронического воспаления. Однако на практике оказалось, что данные маркеры эффективны преимущественно для оценки прогрессирования уже диагностированного заболевания, а также в оценке ответа на терапию генерализованного процесса [22, 24, 30, 31, 127, 271]. Перспективным направлением в диагностике представляется оценка молекулярных маркеров, неплохо зарекомендовавшая себя в отношении выявления наследственных онкологических заболеваний, но ее роль в выявлении спорадических онкозаболеваний, в том числе рака желудка, до сих пор не определена.

1.2. Рак желудка как мультифакториальное заболевание

Рак желудка является мультифакториальным заболеванием, в патогенезе которого существенную роль играют как наследственные факторы, так и факторы окружающей среды, включая генетический фон организма, влияние инфекционных агентов и особенности питания. Наиболее существенным фактором риска развития рака желудка является хронический атрофический гастрит, который следует рассматривать как состояние хронического воспаления, способствующее накоплению ошибок в синтезе ДНК при репликации, а также нарушению репарации ДНК [83]. Кроме того, снижение кислотопродукции при атрофическом гастрите по механизму отрицательной обратной связи способствует повышению выработки гастрина, который помимо стимуляции образования соляной кислоты служит универсальным фактором роста слизистой желудка, что в свою очередь приводит к развитию гипертрофии подслизистого слоя и может приводить к развитию облигатных предраковых состояний [81]. Накоплению ошибок в процессе репликации и репарации ДНК неизбежно способствуют многие инфекционные агенты, контаминирующие поврежденную слизистую желудка, которая находится в условиях неизбежного иммунодефицита, приводя к еще

большому угнетению противоопухолевого иммунного надзора, что в свою очередь обуславливает развитие метаплазии и дисплазии различной степени тяжести.

Согласно классификации P. Lauren [111, 180], можно выделить два больших гистологических типа рака желудка: диффузный и интестинальный (кишечный). Оба типа имеют клинические, морфологические и эпидемиологические особенности, которые определяются различными молекулярными механизмами опухолевого развития и прогрессии [23]. Так, для рака желудка интестинального типа характерно наличие предраковых состояний с последовательной сменой патоморфологических характеристик слизистой оболочки во времени: хронический атрофический гастрит – кишечная метаплазия – дисплазия – рак. При раке диффузного типа отсутствуют предраковые состояния, заболевание развивается резко, без атрофических изменений.

В основе злокачественной трансформации клетки лежат молекулярные нарушения, которые возникают в ее геноме и различаются в зависимости от типа опухоли. Такие нарушения приводят к прогрессирующим патологическим процессам и изменениям гистологической и цитологической структуры ткани [12, 148]. Эти молекулярные изменения первичны по отношению к морфологическим, структурным изменениям слизистой желудка и лежат в их основе [101, 250].

Опухолеобразование является многостадийным процессом, при котором на разных этапах происходят различные молекулярные нарушения. Это генетические и эпигенетические события, развивающиеся в ходе последовательного многоэтапного канцерогенеза желудка и включающие активацию онкогенов, ростовых факторов и их рецепторов, инактивацию опухолевых супрессоров, генов, регулирующих процессы репарации ДНК, молекул клеточной адгезии, нарушения генов-регуляторов клеточного цикла. Выявляемые при раке желудка генетические изменения включают амплификацию генов, точечные мутации, аллельный дисбаланс и делеции; эти нарушения возникают в структуре ДНК. К эпигенетическим изменениям при раке желудка относятся метилирование/деметилирование ДНК, химическая модификация гистоновых

белков и нарушение структуры хроматина, которые приводят к изменению активности генов без повреждения их структуры.

1.3. Роль бактерий и вирусов в патогенезе рака желудка

Бактериально-вирусная контаминация поврежденной слизистой оболочки желудка касается не только *Helicobacter pylori*. Известно, что в желудке клинически здоровых людей помимо *H. pylori* присутствуют и другие микроорганизмы, например стафилококки, стрептококки, лактобактерии (*L. antri*, *L. gastricus*, *L. kalixensis*, *L. ultunensis*), микоплазмы, грибы рода *Candida*, бактероиды, коринебактерии, вирусы герпеса человека всех типов и др. [178, 217]. В настоящее время широчайшее применение антибиотиков приводит к смене микробиологического окружения человека, пока разработка вицицидных препаратов еще только зарождается и несравнима с антибактериальной индустрией, наступает «золотой век» вирусов. В частности, при различных заболеваниях желудка вирусы герпеса находят у 15–80 % больных [11].

1.3.1. Вирусы семейства *Herpes viridae*

Семейство нейропролиферативных вирусов представлено вирусами герпеса человека (ВГЧ) 1–3-го типа, поражающими в основном нейроны. Вирус простого герпеса (ВГЧ-1) вызывает оральный герпес и энцефалит. Возможность язвообразования под действием вируса простого герпеса доказана М.А. Виноградовой (1997) с использованием прямой иммунофлюоресценции биоптатов слизистой оболочки. Вирус простого герпеса (ВГЧ-2) служит причиной развития генитального герпеса и менингоэнцефалита. *Herpes zoster* (ВГЧ-3) вызывает опоясывающий лишай и ветряную оспу. Вирус Эпштейна-Барр (ВГЧ-4) относится к лимфопролиферативным и является причиной лимфомы Беркитта, инфекционного мононуклеоза, а также назофарингеального рака. Данный вирус в

условиях иммунодефицита, выступая, как коканцероген, способствует развитию опухолей ЖКТ, поражая в основном клетки лимфатической ткани [142]. Цитомегаловирус (ВГЧ-5) относится к лимфопролиферативным, является стимулирующим фактором для развития цитомегалии и рака. ВГЧ-6 и -7, имеющие тропизм к Т-лимфоцитам CD4 (лимфопролиферативные вирусы), вызывают поражение нервной системы с развитием синдрома хронической усталости, саркомы Капоши. Они также могут быть источником серьезных осложнений при трансплантации органов, инфицируя клетки иммунной системы. На их фоне могут возникать менингиты и энцефалиты. Они участвуют в патогенезе фатальных интерстициальных пневмоний. Будучи лимфопролиферативными, ВГЧ-4, -6, -7 и -8 поражают Т- и В-клеточные звенья иммунитета, приводя к развитию иммунодефицитных состояний и генерализованных форм инфекции, сходных по своим конечным проявлениям с действием ВИЧ.

Участие в желудочном канцерогенезе наиболее изучено у ВГЧ-4. Также установлено, что герпесвирусная инфекция подавляет антикоагуляционные факторы (такие как тромбомодулин, простациклин и тканевой активатор плазминогена) с одновременным увеличением тромбоцит-активирующего фактора, что создает условия для развития тромбоза мелких сосудов стенки желудка, приводящего к дополнительному гипоксическому повреждению слизистой оболочки и прогрессированию язвенной деструкции.

Особенно важным представляется изучение сочетанного действия *H. pylori* и вирусов герпеса человека; известно, что коинфекция ВГЧ-1 и *H. pylori* отягощает течение язвенной болезни.

1.3.2. Роль *Helicobacter pylori* в патогенезе рака желудка

Helicobacter pylori — это не единственный патогенный представитель своего рода. Кроме *H. pylori* патогенными для человека и животных являются также обитающие в ротовой полости, желудке и различных отделах кишечника *H.*

nemesthnae, *H. acinonychis*, *H. felis*, *H. bizzozeronii* и *H. salomonis*. Виды рода *Helicobacter* являются единственными известными в настоящее время микроорганизмами, способными выживать в кислом содержимом желудка в течение длительного времени и даже колонизировать его слизистую оболочку. Способность *H. pylori* колонизировать слизистую оболочку желудка и вызывать гастрит либо язву желудка определяется не только иммунным статусом организма хозяина, но и индивидуальными особенностями конкретного штамма бактерии. Благодаря такому важному фактору вирулентности *H. pylori* как наличие у данной бактерии жгутиков обеспечивается быстрое продвижение микроорганизма в слое защищающей слизистую оболочку желудка от воздействия кислоты густой слизи, хемотаксис в места скопления других бактерий этого вида и быстрая колонизация слизистой оболочки. Липополисахариды и белки наружной оболочки *H. pylori* обладают свойством адгезии к наружной оболочке мембран клеток слизистой оболочки желудка. Помимо этого, липополисахариды оболочки *H. pylori* стимулируют иммунный ответ организма хозяина и приводят к развитию в слизистой оболочке воспаления. Литические ферменты муциназа, протеаза, липаза, секретлируемые бактерией во внешнюю среду, обуславливают деполимеризацию и растворение защитной слизи, состоящей главным образом из муцина, а также повреждение слизистой оболочки желудка [177].

Важную роль в вирулентности *H. pylori* и ее способности выживать в кислой среде желудка играет секреция бактерией уреазы – фермента, расщепляющего мочевины с образованием аммиака, который нейтрализует соляную кислоту желудка и обеспечивает для бактерии поддержание комфортного уровня pH, около 6–7 [28]. Помимо этого, аммиак вызывает химическое раздражение и воспаление, а затем гибель клеток слизистой оболочки желудка. Продукция *H. pylori* различных экзотоксинов, в частности вакуолизирующего экзотоксина (продукта гена *vacA*), также способствует вакуолизации, повреждению и гибели клеток слизистой оболочки желудка. *H. pylori* обладает специальной впрыскивающей системой, предназначенной для непосредственного введения различных эффекторных белков

(в частности, продуктов гена *cagA*) в клетки слизистой оболочки желудка, что вызывает воспаление, повышение продукции интерлейкина-8, угнетение апоптоза и избыточный рост определенных типов клеток. Именно с этим процессом связана наблюдающаяся при инфицировании *H. pylori* гиперплазия париетальных (кислотообразующих) клеток желудка, гиперсекреция пепсина и соляной кислоты и как результат – повышенная вероятность развития рака желудка [80].

При изучении генома *H. pylori* была выявлена последовательность, имеющая отношение к вирулентности и патогенности *H. pylori*, длиной около 40 т.п.н. Так называемые *cag*-штаммы, выделенные от пациентов с язвенной болезнью, чаще бывают *cagA*-позитивными, они обычно проявляют большую биохимическую агрессивность, чем штаммы, которые выделены от больных с гастритом. Последние обычно более агрессивны и вирулентны, чем штаммы, выделенные от бессимптомных носителей, они продуцируют экзотоксин VacA [82, 212]. Появление «островка патогенности» в геноме *H. pylori* также может быть связано с попытками эрадикации микроорганизма, бывшего в течение миллионов лет условным сапрофитом. Продукты гена *cagA* приводят к дегенерации клеток желудочного эпителия и изменению фенотипа клеток (клетки удлиняются, приобретая так называемый «колибри-фенотип»). Лейкоциты, привлеченные воспалением, вырабатывают медиаторы воспаления, что приводит к его прогрессированию и изъязвлению слизистой оболочки. Бактерия также вызывает окислительный стресс и запускает механизм программируемой клеточной гибели клеток эпителия желудка. Будучи типичным бактериальным агентом, *H. pylori* активирует системы сначала неспецифической доиммунной защиты, активируя тучные клетки и стимулируя выброс гистамина (еще один путь активации париетальных клеток), а затем и иммуноопосредованное воспаление с элементами реакции гиперчувствительности замедленного типа [171, 223].

В то же время нельзя пренебрегать патогенным потенциалом *H. pylori*, так как его считают одним из наиболее значимых факторов риска развития интестинального рака желудка, о чем свидетельствуют результаты

эпидемиологических и экспериментальных исследований. В 1994 г. по результатам эпидемиологических исследований Международный институт по исследованию рака (IARC) внес *H. pylori* в группу канцерогенов № 1 в отношении рака желудка, хотя *H. pylori* — широко распространенная инфекция и статистически не более 1 % инфицированных людей могут заболеть раком желудка.

Последние достижения молекулярной и клеточной биологии способствуют лучшему пониманию взаимодействия между *H. pylori* и трансформируемой эпителиальной клеткой. Известно, что постоянное воспаление, связанное с интенсивным обновлением тканей, вызывает избыточную скорость пролиферации. Это, в свою очередь, приводит к более частым ошибкам репликации ДНК в процессе митоза и, как следствие, к повышенной частоте генетических мутаций. Прямое мутагенное действие при инфицировании *H. pylori* было показано на трансгенных моделях мышей. Помимо этого, активные формы кислорода и азота, образующиеся при хроническом воспалении, могут напрямую повреждать геномную и митохондриальную ДНК. Митохондриальный каскад апоптоза запускаемый оксидом азота, может играть важную роль в передаче клеточного сигнала при инфицировании *H. pylori*.

Выделяемые *H. pylori* вакуолизирующий цитотоксин, липополисахариды, оксид азота потенцируют апоптоз, вызывая атрофию эпителия, стимулируют пролиферацию эпителиальных клеток и могут служить канцерогенным фактором. Следует отметить, что *H. pylori* через длительно текущее хроническое воспаление и прогрессирование дисплазии влияет на развитие интестинального типа рака желудка, заболеваемость которым имеет тенденцию к снижению, и, вероятно, не влияет на возникновение диффузных форм рака. Более того, настойчивая эрадикационная терапия, заставляющая *H. pylori* «подниматься» в верхние отделы желудка, обуславливая факультативный предрак — атрофический пангастрит, стала считаться одной из причин увеличения заболеваемости проксимальной формой рака желудка. Даже специалисты, посвятившие немало времени проблеме канцерогенного действия инфекции *H. pylori*, вынуждены признать, что сведений,

достоверно подтверждающих синтез или секрецию *H. pylori* мутагенных или канцерогенных субстанций, нет.

Многоэтапный канцерогенез рака желудка включает целый ряд последовательных событий, начинающихся с поверхностного гастрита, индуцированного *H. pylori*, проходящего стадии атрофического гастрита, кишечной метаплазии и дисплазии и в итоге прогрессирующего в рак желудка. Современные представления состоят в том, что *H. pylori* скорее действует в качестве промотора, чем инициатора желудочного канцерогенеза. Этот процесс, известный как каскад Корреа, зависит от длительности наличия хронического воспаления.

Выявление полиморфных вариантов генов, ассоциированных с развитием рака желудка, позволяет предположить существование специфического генетического профиля, связанного с наибольшим риском развития этого типа рака [157].

1.3.3. Вирус Эпштейна-Барр

Вирус Эпштейна-Барр (EBV) представляет собой убиквитарный герпесвирус человека, который связан с различными злокачественными опухолями, такими как лимфома Беркитта, экстранодальная НК/Т-клеточная лимфома, назофарингеальный рак. Рак желудка, ассоциированный с EBV, возникает в результате моноклональной пролиферации эпителиальных клеток, инфицированных вирусом. Его частота составляет приблизительно 5 % всех случаев рака желудка. EBV-ассоциированный рак желудка относится к специфической клинико-патологической подгруппе, для которой характерны преобладание пациентов молодого возраста и мужского пола, локализация в проксимальных отделах, существенная лимфоцитарная инфильтрация, низкая частота вовлечения в процесс лимфатических узлов, «ажурное» распределение в слизистой оболочке желудка [268]. Подобные опухоли имеют молекулярные

особенности, которые проявляются наличием специфического профиля белковой экспрессии, отличающегося от вирус-негативных опухолей. Этот профиль характеризуется частой потерей экспрессии генов *p16 (CDKN2A)*, *SMAD4*, *FHIT* и *CD82 (KAI-1)*, но сохранением экспрессии генов *APC*, *DCC*, а также белков, связанных с репарацией ДНК [11, 207].

Большинство EBV-позитивных опухолей желудка имеет молекулярный фенотип с высокой степенью метилирования опухолевой ДНК. Гиперметилирование CpG-островков промоторных участков генов, вовлеченных в образование опухоли, считается наиболее характерной аномалией рака желудка, ассоциированного с EBV [48, 109, 150, 245].

1.3.4. Вирус папилломы человека

Вирусы папилломы человека (HPV) – это группа вирусов из семейства папилломовирусов, включающая 27 видов из 5 родов (*Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gamma papillomavirus*, *Mupapillomavirus* и *Nupapillomavirus*) и более 170 штаммов. На основании способности провоцировать неопластические процессы папилломавирусы классифицируют на три группы:

- низкого онкогенного риска (HPV 3, 6, 11, 13, 32, 34, 40, 41, 42, 43, 44, 51, 61, 72, 73);
- среднего онкогенного риска (HPV 30, 35, 45, 52, 53, 56, 58);
- высокого онкогенного риска (HPV 16, 18, 31, 33, 39, 50, 59, 64, 68, 70).

Классификация по степени онкогенности достаточно условна, поскольку злокачественная опухоль может возникнуть на месте внедрения ВПЧ низкоонкогенного типа и не развиться на месте внедрения высокоонкогенного [68].

Вирус папилломы человека связан с различными злокачественными опухолями, хорошо известна его связь развитием рака. Считается, что 80% рака анального канала, 70% рака влагалища, 30% рака орофарингеальной зоны и 50%

случаев рака полового члена связаны с персистенцией вируса папилломы человека. Также вирус папилломы человека может вызывать развитие бородавок и папиллом кожи и остроконечных кондилом промежности.

Механизм развития опухоли обусловлен экспрессией протеинов E7 и E6, которые нарушают функционирование белков, участвующих в делении клетки. Протеины E7 и E6 взаимодействуют с регуляторами клеточного цикла, нарушая их функцию. Так E7 и E6 соединяются с p53 и pRb, иницируя продолжение деления путем блокировки соответствующих белков, что приводит к неконтролируемому делению клеток и дальнейшему накоплению мутаций клеточной ДНК. На этом этапе сборки вируса путем соединения информационной части с капсидом не происходит, и вирус еще не способен к заражению других людей, однако уже в этот момент начитается рост ткани с образованием опухоли.

С целью ранней диагностики инфицирования ВПЧ используется ПЦР диагностика, основанная на значении белков E6 и E7 на этом этапе развития вируса.

Блокирование белков E6 и E7 также является основной идеей попыток разработки перспективных лечебных вакцин от ВПЧ, которые способны действовать уже после заражения ВПЧ и останавливать развитие как доброкачественных, так и злокачественных опухолей.

В настоящий момент появилось значительное количество исследований, адресованных попытке найти связь между развитием рака желудка и наличием вируса папилломы человека.

Так в одном из исследований, в которое было включено 84 пациента и им было проведено хирургическое лечение по поводу рака желудка, а в дальнейшем выполнена количественная ПЦР для выявления 14 высокоонкогенных штаммов ВПЧ в материале, полученном интраоперационно из опухоли, помимо этого было проведено иммуногистохимическое исследование на присутствие белка p16. В результате исследования, не было подтверждено наличие вируса в опухолевой ткани. Было сделано заключение об отсутствии связи между возникновением рака желудка и наличием ВПЧ инфекции [239].

В другом исследовании проведена оценка 40 образцов ткани опухоли пациентов с раком желудка методом ПЦР для определения 16 штамма ВПЧ, при этом в 37,5% получен положительный результат. По результатам исследования сделано заключение о возможном влиянии 16 штамма ВПЧ на развитие рака желудка.

В исследовании, проведенном у 100 пациентов с онкозаболеваниями желудочно-кишечного тракта, осуществлено выявление ВПЧ путем ПЦР. По результатам исследования у 70 мужчин и 30 женщин, участвовавших в исследовании, персистенция вируса в опухоли была выявлена в 5,5 и 3,3% соответственно. При типировании были выявлены 16, 18 и 45 штаммы вируса. По итогам исследования не удалось уточнить, существует ли миграция вируса из пищевода в желудок при выявлении последнего в пищеводе. Также не удалось выявить связь между инфицированием ВПЧ и развитием рака желудка [239].

В другом исследовании проведен анализ образцов от 53 пациентов с раком желудочно-кишечного тракта и 55 пациентов контрольной группы, у которых опухолевого процесса не было. Наличие ВПЧ инфекции было идентифицировано, как у пациентов группы исследования, так и у пациентов группы контроля. При типировании определялся 18 штамм вируса, 16 штамм вируса выявлен не был. Был сделан вывод о неопределенной роли ВПЧ в развитии рака органов желудочно-кишечного тракта [228].

Таким образом доказан факт персистенции вируса в злокачественных опухолях рака желудка, но фактической связи с развитием рака желудка, обусловленного вирусом папилломы человека на настоящий момент нет [259].

1.4. Предраковые повреждения слизистой оболочки желудка

Ранняя диагностика рака желудка неразрывно связана с выявлением предраковых изменений. Каждому клиницисту важно понимать, что ранняя диагностика рака начинается с установления именно предрака у пациентов и

динамического наблюдения за данными изменениями, ведь только так можно своевременно определить развитие раннего рака и предложить данной категории пациентов адекватное хирургическое лечение, которое ведет к полной реконвалесценции. К сожалению, пока этот вопрос окончательно не решен, в частности из-за споров вокруг изменений, относящихся к облигатному предраку, что и объясняет неудовлетворительные результаты лечения больных раком желудка.

В 1978 г. комитет экспертов ВОЗ по изучению предрака желудка рекомендовал выделять предраковые состояния (факультативный предрак) и предраковые изменения (облигатный предрак).

К предраковым состояниям относят хронический гастрит различной этиологии, в том числе аутоиммунный гастрит типа А, сопровождающийся пернициозной анемией, хроническую язву желудка, полипы желудка, резецированный по поводу доброкачественных заболеваний желудок по второму способу Бильрота (Бильрот-II) в неантирефлюксной модификации, как яркий пример канцерогенного действия производных желчи, болезнь Менетрие. В большинстве случаев данные изменения развиваются в слизистой оболочке желудка в связи с наличием в ней хронического воспаления [73, 76, 246, 251, 258]. Длительно текущую язвенную болезнь желудка следует относить к ситуации вероятного (около 10 %) озлокачествления, как типичный вариант накопления ошибок репарации в условиях хронического воспаления даже после неоднократной полифокусной биопсии, подтверждающей отсутствие первично-язвенной формы рака.

Основными предраковыми изменениями, которые часто обозначают как нестабильный желудочный эпителий, являются метаплазия и дисплазия [39, 163, 246].

Рак желудка интестинального типа чаще возникает на фоне хронического гастрита и развивается через промежуточные стадии атрофического гастрита, кишечной метаплазии и дисплазии высокой степени до финальной стадии рака *in*

situ [73, 149]. Метаплазия и дисплазия высокой степени считаются стойкими нарушениями, при которых возникают существенные изменения генетической и эпигенетической программ стволовых клеток желудка и клеток-предшественниц. На стадии кишечной метаплазии начинается накопление генетических изменений, которые впоследствии приводят к образованию опухоли. Исследования показали наличие гиперметилирования гена *p16* на участках слизистой оболочки, имеющих предраковые изменения, а также пониженную экспрессию *CDH1* у пациентов [194]. Взаимодействие между *CagA* и E-кадгеринном приводит к накоплению β -катенина в цитоплазме и ядре клеток, что способствует развитию кишечной метаплазии. Однако до сих пор нет однозначного мнения, может ли геномная нестабильность при кишечной метаплазии и дисплазии служить прямым маркером для развития рака желудка и можно ли использовать ее для клинической оценки потенциала злокачественности.

Известно, что белок Sonic Hedgehog (SHH) — незаменимый регулятор процессов формирования органов и тканей, а белок CDX2 — регулятор развития и дифференцировки кишечной ткани [169]. По-видимому, указанные белки взаимосвязаны в процессах клеточной дифференцировки посредством различных сигнальных каскадов. Потеря их экспрессии играет существенную роль в развитии предраковых изменений желудка [233].

Инфицирование *H. pylori* опосредованно способствует снижению экспрессии гена *SHH*, приводя к потере морфогенной дифференцировки слизистой желудка, разрушению железистой структуры и появлению более выраженного кишечного фенотипа за счет повышенной экспрессии кишечно-ассоциированных генов, таких как *CDX2*, *MUC2*, и гена, обеспечивающего синтез виллина. На моделях было обнаружено, что эктопическая экспрессия *CDX2* индуцирует развитие кишечной метаплазии [173]. Показано, что экспрессия *SHH* полностью отсутствует в верхних отделах нормального желудочного эпителия (желудочные pit-клетки). Однако она была существенно повышена в очагах неопластических изменений, в опухоли и при дисплазии высокой степени. В опухолях желудка экспрессия *SHH*

ассоциируется со стадией опухолевого процесса, наличием прямой инвазии и низкой дифференцировкой опухолевых клеток [201].

1.5. Исторические этапы молекулярных исследований рака желудка

Интегрированные исследования в молекулярной патологии в течение последних 30 лет частично раскрыли молекулярный механизм возникновения и прогрессирования рака желудка [154, 215]. Рак желудка является хроническим пролиферативным заболеванием и характеризуется множественными генетическими и эпигенетическими изменениями, т. е. обусловлен измененной экспрессией генов. В инактивацию опухолевых супрессорных генов, активацию матриксных металлопротеиназ, активацию онкогенеза, нарушения в генах репарации ДНК и нарушения в генах регуляторах клеточного цикла, а также нарушения клеточной адгезии и другие процессы, происходящие в ходе канцерогенеза и прогрессирования рака желудка, вовлечены различные генетические и эпигенетические изменения.

Проводимые исследования позволяют выявить все новые гены, вовлеченные в канцерогенез, причем не столько за счет традиционных клеточных онкогенов и генов-супрессоров опухолевого роста, сколько за счет генов, которые только в той или иной степени участвуют в передаче сигналов.

Тем не менее, закономерности функционирования генома раковой клетки объяснены не в полной мере, что связано с особенностями тканеспецифической регуляции экспрессии генов, многоступенчатостью процесса малигнизации и недостатком знаний о тонких механизмах функционирования клетки в норме и при онкологических заболеваниях [4, 60, 90, 168].

Большинство опухолей проявляют себя лишь во второй половине жизни, поскольку для их манифестации необходима целая цепь мутационных событий. Для возникновения трансформированного клеточного клона необходимы как

минимум 5—9 мутаций в разных генах, а меньшее количество мутаций, вероятно, защитные системы организма способны компенсировать [35, 36, 196].

Наиболее общим фундаментальным свойством опухолевых клеток следует считать нестабильность их генома, которая проявляется и на хромосомном уровне, и на уровне отдельных генов. В опухолевых тканях обнаруживается большое количество структурных перестроек, прежде всего транслокаций и делеций, число которых заметно нарастает по мере прогрессирования злокачественного роста. В неменьшей мере нарастает число мутационных повреждений в генах, вовлеченных в регуляцию клеточного цикла, происходят аномальная активация и выключение определенных генов [4].

Последние достижения в биохимии и молекулярной генетике, например, анализ экспрессии генов с помощью различных технологий с последующей оценкой связи генетического полиморфизма с риском развития рака, сделали возможным более детально раскрыть некоторые аспекты механизма канцерогенеза желудка.

При анализе исследований, посвященных изучению рака, становится понятным, что их история представляет собой воспроизведение ранее выдвинутых гипотез в сочетании с применением новых технологий и анализом вновь полученных данных, и тем самым подтверждение данных гипотез в практике.

Так, Todaro и Huebner [247] предложили онкогенную теорию в 1969 году, а Knudson [174] представил двухэтапную теорию в 1971 году. Через несколько лет были разработаны методики ДНК трансфекции, блот-гибридизация по Саузерну и полимеразная цепная реакция (ПЦР), и это позволило определить и подтвердить, что *c-src* является онкогеном, а *Rb* – опухолевым геном супрессором. В 2003 г. была завершена расшифровка генома человека, что ознаменовало наступление новой эры генно-молекулярной медицины.

История изучения молекулярных изменений слизистой оболочки при раке желудка насчитывает порядка 35 лет, первым открытием было определение амплификации *c-myc* при раке желудка в 1986 году. Первый онкоген,

ассоциированный с развитием рака желудка, *HST-1*, был выделен из опухоли в Токийском национальном центре рака в 1986 г.

За последние три с половиной десятилетия проведен активный анализ молекулярного патогенеза и определения роли вновь выделенных генов и факторов канцерогенеза в опухолях других локализаций, что позволило в короткие сроки прояснить роль данных генов и факторов в канцерогенезе желудка. Например, определено значение рецептора эпидермального фактора роста (*EGFR*), эпидермального фактора роста (*EGF*), Е-кадгерина, теломеразы (*hTERT*), *p53* (*TP53*), *MLH1*, циклина-Е и других генов и факторов в развитии рака желудка. Помимо того, доказана роль метилирования ДНК в генезе опухолей желудка. В 1993 г. была разработана система рутинной молекулярной диагностики в препаратах тканей; эта система внедрена в клиническую практику. Были открыты механизмы стромальных взаимодействий в опухолевой ткани и генетические изменения при кишечной метаплазии; установлено, что в этих процессах участвуют металлопротеиназы, мутации *TP53*, гена наследственного полипоза толстой кишки (*APC*) и другие изменения [120, 204].

1.6. Молекулярные основы канцерогенеза желудка

Процесс опухолеобразования представляет собой многостадийный процесс, на разных этапах которого происходят различные молекулярные нарушения, представляющие собой как генетические, так и эпигенетические события. Утверждение о том, что все опухоли определенной ткани имеют одинаковые молекулярные маркеры, неправомерно. Каждая опухоль уникальна по набору патологических изменений, как и геном каждого конкретного пациента. Молекулярный портрет опухоли определенного типа подразумевает не детальную картину, а всего лишь образ с четко узнаваемыми чертами, такими как наиболее характерные пути регуляции и молекулярные маркеры, которые специфичны для начала заболевания, его прогрессии и терминальных стадий. Молекулярные

маркеры позволяют определить стадию злокачественного процесса и проследить его молекулярную эволюцию. Различные генетические и эпигенетические изменения развиваются в ходе многоэтапного канцерогенеза желудка [4, 214, 234, 254]; они включают в себя активацию онкогенов и факторов/рецепторов роста, инактивацию опухолевых генов супрессоров, генов репарации ДНК, молекул клеточной адгезии, нарушения генов регуляторов клеточного цикла. Генетическими изменениями, выявляемыми при раке желудка, являются точечные мутации, амплификация генов, потеря гетерозиготности; эпигенетические изменения включают в себя потерю активности генов при метилировании ДНК и гиперэкспрессию на транскрипционном уровне [4, 104]. Некоторые повреждения определяются как в высоко-, так и в низкодифференцированных опухолях, в то время как другие могут соответствовать лишь определенному гистологическому типу. Ранние изменения могут инициировать развитие рака, в то время как поздние определяют морфогенез опухоли и биологическое поведение. Генетический полиморфизм является эндогенной предпосылкой к изменению чувствительности опухоли. Генетическую нестабильность, метилирование генов, активацию теломеразы, мутации *TP53*, как правило, связывают с ранними этапами развития рака желудка [4, 229]. Амплификацию и гиперэкспрессию генов *c-met* и циклина Е связывают с более поздними стадиями. Снижение экспрессии *p27^{Kip1}* связывают как с ранними, так и поздними этапами развития опухоли. Гиперэкспрессия генов факторов роста/цитокинов стимулирует прогрессирование развития рака посредством множественных аутокринных циклов. *K-ras* мутацию, *HER-2/c-erbB2* амплификацию и мутацию гена *APC* связывают с развитием высокодифференцированных опухолей. При предраковых изменениях, таких как кишечная метаплазия, определяются сходные изменения, что и при высокодифференцированных опухолях. Потеря гетерозиготности (LOH) *p73* происходит определенно в высокодифференцированных аденокарциномах желудка. Инактивация генов кадхеринов и катенинов, амплификация *K-sam* и *c-met* связывают с развитием низкодифференцированных опухолей [4, 17, 137, 199, 227].

1.6.1. Теломераза и теломеры

ДНК последовательность на концах хромосом (теломерах) состоит из тандемных повторов TTAGGG, которые предохраняют концы хромосом от рекомбинации и слияния, стабилизируя тем структуру хромосом. Постоянное удлинения теломеров с помощью теломеразы ведет к бессмертию клетки [4, 92, 172, 277]. Активность теломеразы определяется экспрессией гена *hTERT* и выявляется в большинстве опухолей желудка вне зависимости от гистологической структуры и стадии заболевания [4, 15, 91, 139, 172, 190]. При метаплазии определяется некоторый уровень активности теломеразы. При доброкачественных опухолях желудка активность теломеразы соответствует 10% от уровня, определяемого при раке желудка [4, 160]. Гиперплазия эпителиальных недифференцированных клеток с экспрессией гена *hTERT* и теломеразной активностью при предраковых состояниях может быть запущена воспалительным процессом, вызванным инфекцией *H. pylory*.

Исследования экспрессии гена *hTERT* при раке желудка немногочисленны и в основном посвящены техническим аспектам возможного ее определения или оценке ее роли в канцерогенезе в общем [4, 102, 115, 181, 236].

PINX1, теломер-повторяющийся связывающий фактор (TRF)1 связывающего протеина, соединяется с геном *hTERT*, чем направленно ингибирует его активность [4, 187]. Снижение экспрессии *PINX1* определяется в 70% раков желудка, что проявляется высокой активностью теломеразы. Потеря гетерозиготности гена *PINX1* локуса 8p23 определяется в 33% случаев рака желудка и коррелирует со снижением экспрессии *PINX1*. Также бывают случаи снижения экспрессии *PINX1* без потери гетерозиготности. Применение ингибитора деацетилазы гистона приводит к активации экспрессии *PINX1*, увеличивает ацетилирование гистона H4 и снижает теломеразную активность в линиях клеток рака желудка. Таким образом снижение экспрессии *PINX1* путем потери гетерозиготности локуса *PINX* и

снижение ацетилирования гистона H4 является причиной активизации теломеразы, что в итоге приводит к развитию рака.

Предполагают, что POT1, белок, связывающий концы теломер, не только кэпирует теломеры, но и опосредует соединение теломеразы с концами хромосом [4, 276]. Экспрессия *POT1* определенно выше при поздних стадиях развития рака желудка, однако определяется и на ранних стадиях [4, 276]. Снижение экспрессии *POT1* сочетается с укорочением теломер и пониженной активностью теломеразы. Ингибирование *POT1* введением антисенситивных нуклеотидов ускоряет укорочение теломер, ингибирует активность теломеразы и увеличивает количество анафазных мостиков, как признак дисфункции теломер. Таким образом *POT1* может играть важную роль в регуляции длины теломер, а ингибирование *POT1* может приводить к дисфункции теломер. Изменение уровней экспрессии *POT1* может быть связано с развитием и прогрессированием рака желудка.

1.6.2. Регуляторы клеточного цикла и факторы роста

Совокупность регуляторов клеточного цикла представляет собой регуляторный путь, который управляет клеточным циклом и обеспечивает репликацию ДНК и сегрегацию хромосом с высоким уровнем достоверности. Регуляторы клеточного цикла отвечают на повреждение блокировкой клеточного цикла, обеспечивая тем самым время на устранение повреждений. Нарушение баланса регуляторов клеточного цикла приводит к генетической нестабильности и нерегулируемой клеточной пролиферации, развитию рака желудка [4, 108].

Ген *TP53* — супрессор опухолевого роста, значимый для развития рака желудка; он считается «сторожем» клеточного цикла и часто повреждается в опухолях человека. Его функция состоит в остановке клеточного цикла клетки, в которой возникло повреждение ДНК, до момента репарации. Если исправление повреждения невозможно, то в этой клетке происходит индукция апоптоза. Приблизительно 60 % всех случаев рака желудка связаны с миссенс мутациями

одного из аллелей гена в сочетании с делецией второго аллеля, в результате чего происходит полная потеря его функции. Частота мутаций *TP53* в инвазивном раке желудка достигает 77 %, а мутационный спектр в злокачественных опухолях желудка очень широк [10, 48, 88, 269, 275]. В гене имеется несколько кодонов, называемых горячими точками, в которых мутации встречаются чаще, чем в других. Обычно замены происходят в CG-динуклеотидах. Замена GC на AT – наиболее распространенный тип мутации гена *TP53* вне зависимости от гистологического типа рака желудка; при этом в одной опухоли может присутствовать более одной мутации. Мутации гена *TP53* чаще выявляются в опухолях, локализованных в кардиальном отделе желудка, чем в его теле, при этом более распространены у пожилых пациентов [48, 185].

Изменения гена *TP53* часто встречаются в предраковых поражениях, они обнаружены в 37,5 % случаев кишечной метаплазии и в 58 % – при диспластических поражениях [179, 237]. Выявление миссенс-мутаций гена *TP53* в аденомах желудка может служить одним из ключевых показателей злокачественной трансформации. Точечные мутации *TP53* были определены в 52 % случаев гастрита, при этом они выявлены в кодонах, которые не расположены в горячих точках. На мышинных моделях показано, что дефицит *TP53* быстро приводит к диспластическим повреждениям желудка, тогда как у мышей с сохранной функцией этого гена инфекция не сопровождается быстрым развитием предопухолевых изменений. Таким образом, повреждения гена *TP53* могут участвовать в канцерогенезе желудка [48].

Важной супрессорной мишенью циклинов/CDK, регуляторов перехода из фазы G1 в S фазу, является семейство транскрипционного фактора E2F. Гиперэкспрессия *E2F-1* определяется в 40 % случаев рака желудка, в 70 % случаев рака желудка определяется снижение экспрессии *E2F-3*, считается, что члены семейства E2F могут играть определенную роль в генезе рака желудка. Chk1 и Chk2 – киназы, активируемые повреждением ДНК, играют роль в переходе из G2 фазы в M фазу. Гиперэкспрессия, как *Chk1*, так и *Chk2* определяется более чем в

70% случаев рака желудка. Гиперэкспрессию связывают с мутациями *TP53*. Таким образом *Chk1* и *Chk2* могут играть важную роль при раках, имеющих мутацию *TP53*, где их функции по ограничению клеточной прогрессии подавлены [4, 140].

Ген *RUNX3* имеет существенное значение в развитии рака желудка, расположен на хромосоме 1 в 1p36, который кодирует белок, относящийся к семейству транскрипционных факторов, содержащих Runt-домен. Данный ген является геном-супрессором опухолевого роста, при его инактивации отмечается повышение деления клеток опухоли, в том числе и за счет подавления апоптоза и снижения влияния трансформирующего фактора роста [232]. В большом проценте опухолей желудка отмечается потеря данного гена или его гиперметилирование [43, 161]. Также опосредованно через взаимодействие с эндотелиальным фактором роста сосудов *RANX3* препятствует росту новых сосудов в опухолевой ткани [147, 191, 260].

Ген *CDX2* участвует в дифференцировке нормальных клеток слизистой кишки, выступая в качестве опухолевого супрессора, проявление активности данного гена в слизистой желудка приводит к кишечной трансформации клеток желудка, что в свою очередь ведет к облигатным опухолевым состояниям, а в дальнейшем приводит к развитию рака [100, 105, 230]. При этом нужно помнить, что пациенты, имеющие опухоли желудка, представленные кишечным типом, имеют лучший прогноз при своевременно проведенном лечении, в отличие от пациентов с диффузным типом опухоли [159].

Повреждение гена *ERBB2* играет важную роль в развитии и прогрессировании любых эпителиальных опухолей. Амплификация гена *ERBB2* и гиперэкспрессия его белка часто происходят при раке молочной железы, также были выявлены в ряде случаев (4–16 %) рака желудка [53, 103]. Необходимо отметить, что амплификация гена при кишечном типе рака желудка встречается чаще, чем при диффузном. Значение амплификации *ERBB2* в качестве фактора прогноза для рака желудка неоднозначно. В некоторых исследованиях показана связь с неблагоприятным прогнозом, другие же утверждают, что амплификация

никак не влияет на прогноз.

При неопластическом процессе в желудке рядом исследователей отмечаются разнонаправленные изменения экспрессии генов регуляторов клеточного цикла [27, 112], что несколько расходится с традиционными представлениями об их роли в развитии рака желудка и требует дальнейшего изучения [4].

1.6.3. Подавление апоптоза

Нормальные клетки обладают способностью к апоптозу [57, 68, 221]. Это активная форма гибели клетки, являющаяся результатом реализации ее генетической программы или ответом на внешние стимулы, требующая затрат энергии и синтеза макромолекул гибели клетки. Такая форма гибели клетки проявляется в уменьшении ее размера, конденсации и фрагментации хроматина, уплотнении наружной и цитоплазматических мембран без выхода содержимого клетки в окружающую среду. Существует ряд путей, по которым может быть активирован апоптоз, включая повреждение ДНК, метаболические нарушения, и активацию рецепторов смерти клетки. Как только активируется механизм апоптоза, клетка выходит на путь самоуничтожения, который разрушает клетку через сигнальный каспазный каскад. Апоптоз является благоприятным явлением для организма, поскольку он предотвращает репликацию клеток с повреждениями в ДНК, опухолевые клетки же должны найти пути ухода от апоптоза, чтобы продолжить свое существование [4].

Инактивация гена *TP53* является одним из путей, по которому следуют раковые клетки. Инактивация гена может осуществляться в результате мутаций в гене, или потери гетерозиготности гена или локуса на хромосоме, в котором он расположен. Другим путем является связывание рецепторов, активация которых приводит к смерти клетки. Например, апоптоз может быть активирован путем связывания поверхностного рецептора смерти клетки Fas с Fas-лигандом [37, 266]. В норме Fas-рецепторы определяются на поверхности лимфоцитов и

эпителиальных клеток кишки, а Fas-лиганд представлен на поверхности, активированных лимфоцитов. Связываясь с Fas-рецептором, Fas-лиганд приводит к апоптозу клетки, на поверхности которой представлен Fas-рецептор. Некоторые опухолевые клетки способны связывать Fas-лиганд на поверхности атакующих лимфоцитов, разрушая тем иммунные клетки, направленные на уничтожение опухоли.

Также раковые клетки могут избегать апоптоза увеличением экспрессии гена циклооксигеназы-2 (*PTGS2*) [79, 125, 240], увеличивая тем синтез белка циклооксигеназы-2. Как было показано, гиперэкспрессия *PTGS2* снижает скорость апоптоза. Экспрессия *PTGS2* увеличивается по мере прогрессирования от дисплазии к раку [4, 123].

Ген *PTGS2* определяет синтез циклооксигеназы-2. Известно, что при снижении противоопухолевого иммунитета на фоне хронического воспаления существенную роль в развитии рака желудка играет именно циклооксигеназа-2, которая участвует в синтезе простагландинов и не экспрессируется в значительном количестве в отсутствие воспаления. Ген активирует свою экспрессию в ответ на действие провоспалительных медиаторов и онкогенных стимуляторов, таких как цитокины и факторы роста [164]. Ген *PTGS2* гиперэкспрессируется при раке желудка, считается, что его экспрессия индуцируется опосредованно *H. pylori* через воспалительный процесс [74, 272, 280]. Повышение экспрессии является ранним событием при канцерогенезе желудка кишечного типа и предшествующих предраковых повреждениях [48]. У пациентов, имеющих метилирование гена *PTGS2* в опухоли, существенно увеличивается безрецидивная и общая выживаемость, поскольку при метилировании экспрессия данного гена снижается. Полиморфные замены, выявленные в ДНК гена, также могут играть определенную роль в канцерогенезе. Показано более чем двукратное повышение риска рака желудка при генотипе 1195AA, а у курильщиков с этим генотипом риск развития опухоли существенно возрастал.

Ингибиторами апоптоза являются IAP-белки [121]. Все IAP-белки на N-конце содержат от 1 до 3 специфических повторов, называемых VIRs (примерно по 70 аминокислот в каждом). Одним из представителей семейства IAP-белков является белок сурвивин (survivin, Sur), участвующий в ингибировании каспаз. Экспрессия гена белка сурвивина (*BIRC5*) существенно повышается в опухолевых клетках. Обнаружено несколько изоформ сурвивина, образующихся в результате альтернативного сплайсинга [4, 136, 218, 263]. Некоторые из них способны образовывать гетеродимеры, обладающие антиапоптотическим потенциалом. Уровень экспрессии генов изоформ сурвивина коррелирует с прогрессией опухолей [143].

Анализ доступной литературы не прояснил в полной мере закономерности экспрессии генов, способствующих избеганию апоптоза клетками опухоли, при этом все исследования носили «ретроспективный» характер [96, 144, 175].

1.6.4. Факторы неоангиогенеза

Ангиогенез является необходимым условием для роста опухоли и метастазирования, зависящим от продукции ангиогенных факторов, образуемых здоровыми и опухолевыми клетками. Повышение васкуляризации обеспечивает рост первичной опухоли и способствует гематогенному метастазированию. При раке желудка увеличение количества микрососудов в единице объема коррелирует с метастазированием в лимфоузлы, метастазированием в печень и плохим прогнозом. Было определено несколько факторов роста, которые контролируют неоангиогенез при раке желудка. Клетки опухоли желудка продуцируют различные ангиогенные факторы, включая сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), интерлейкин-8, основной фактор роста фибробластов (bFGF), тромбоцитарный эндотелиальный фактор роста (PD-ECGF) [52, 87, 163]. Было определено, что ангиогенный фенотип различен при низкодифференцированных и высокодифференцированных раках [4, 193]. При высокодифференцированных

раках образуется большое количество эндотелиального фактора роста, в отличие от низкодифференцированных раков, и эти показатели тесно коррелируют с количеством вновь образованных сосудов в единице объема. Экспрессия основного фактора роста фибробластов выше в низкодифференцированных типах рака, особенно при скирре. Большая часть гистологических типов рака желудка продуцирует систему рецептор/интерлейкин-8, и уровни интерлейкина-8 определенно коррелируют с васкуляризацией опухоли [284]. В опыте при трансфекции гена интерлейкина-8 в клетки рака желудка, наблюдают быстрый рост опухоли и высокий уровень васкуляризации [166]. Более того, интерлейкин-8 увеличивает экспрессию рецептора эндотелиального фактора роста, сосудистого эндотелиального фактора роста, и самого интерлейкина-8 клетками опухоли [4, 188].

Микроокружение может влиять на ангиогенный фенотип опухоли желудка. В дополнение к раковым клеткам различные интерстициальные клетки микроокружения опухоли могут быть вовлечены в ангиогенез.

В работах по экспрессии генов факторов ангиогенеза проведена оценка отдельных маркеров [141, 243], однако данные работы не позволяют понять их роль в канцерогенезе по отношению к другим его участникам, например, к регуляторам клеточного цикла, факторам инвазии и метастазирования.

1.6.5. Факторы инвазии и метастазирования

Во многих первичных опухолях с агрессивными свойствами межклеточная адгезия часто уменьшена из-за потери гена E-кадгерина (*CDH1*), прямого посредника взаимодействий межклеточной адгезии. Цитоплазматический конец E-кадгерина соединен через α -катенин и β -катенин с актином цитоскелета; одно из свойств актина состоит в том, чтобы поддерживать соединения клетки. Нарушение экспрессии *CDH1* приводит к ранней инвазии и метастазированию. Различные механизмы могут вызвать потерю активности E-кадгерина: мутации, приводящие

к синтезу неактивного белка, утрата гена или его части в результате делеции хромосомного локуса, ингибирование путем метилирования. К гипоекспрессии гена может приводить регуляция рецепторами факторов роста, например, эпидермальным рецептором фактора роста (EGFR), рецептором фактора роста фибробласта (FGFR), инсулинподобным фактором роста I (IGF-I), SRC [18, 93]. Ген, кодирующий белок E-кадхерин (*CDH1*), также может быть ингибирован потерями нескольких транскрипционных генов-репрессоров [3, 4, 55, 138, 200, 249, 278].

Ремоделирование опухолевого микроокружения и внеклеточного матрикса путем разрушения матриксных белков является необходимым шагом для локальной инвазии и метастазирования [4, 124].

Одним из классов белков, разрушающих внеклеточный матрикс и внеклеточные белки, являются матриксные металлопротеиназы (ММР, матриксины). Матриксные металлопротеиназы принимают участие в нормальном развитии организма, например, при формировании органов в ходе эмбриогенеза [4, 42, 176]. Эти ферменты играют важную роль в процессах инвазии – не только опухолевой, но и физиологической, например, при заживлении ран, ангиогенезе, воспалении [4, 134, 256]. Необходимо отметить, что в случае опухолевой инвазии основными продуцентами ММР, как правило, являются стромальные клетки, а опухолевые лишь стимулируют их экспрессию (исключением является ММР7). Более того, ММР могут высвобождать и путем протеолитического расщепления и активировать ростовые факторы, депонированные во внеклеточном матриксе и, тем самым, усиливать опухолевую прогрессию.

Семейство матриксных металлопротеиназ в настоящее время включает более 20 ферментов, характеризующихся способностью разрушать белковые компоненты внеклеточного матрикса (протеогликаны, гликопротеины и различные типы коллагена) и потребностью в ионах Zn^{2+} для осуществления протеолиза. Секретируются матриксины в неактивной форме.

Активность ферментов в тканях зависит от уровня экспрессии их генов и от наличия активаторов и ингибиторов. ММР относятся к «индуцируемым» ферментам, транскрипция которых зависит от целого ряда факторов (цитокинов, факторов роста и некроза опухолей, химических агентов и др.). На посттрансляционном уровне известны два основных пути регуляции активности ферментов ММР: активация зимогенов с помощью протеиназ и взаимодействие с тканевыми ингибиторами металлопротеиназ TIMP.

Участие ММР в опухолевой трансформации, а также в процессах инвазии и метастазирования хорошо доказано экспериментами *in vitro* и *in vivo*. Установлено, что экспрессия ММР коррелирует с повышенной инвазивностью, с опухолевым фенотипом клеток, а также зависит от вида опухоли и ткани.

Поскольку в формировании опухоли важную роль играет стромальная окружающая среда, то ММР, изменяя ее, могут вносить вклад в развитие рака на начальных стадиях [4, 198, 253]. Кроме того, ряд исследователей предполагают, что ММР также играют значительную роль в выживании опухолевой клетки [116].

ММР9 (желатиназа В) в здоровых растущих и регенерирующих тканях играет ведущую роль в ангиогенезе, растворяя стромальные элементы, она тем самым прокладывает путь для растущих капилляров. В опухолевой ткани ММР9 обеспечивает ангиогенез, тем самым способствуя ее росту. Кроме того, ММР9 играет прямую роль в эпителиальном онкогенезе [4, 14, 189]. Клинические работы также подтверждают важную роль ММР9 в развитии опухолей. Учитывая вышесказанное, можно заключить, что продукция ММР9 опухолью коррелирует с ее злокачественным фенотипом и способствует выживанию опухолевых клеток за счет участия ММР9 в ангиогенезе.

ММР7 (матрилизин) – малая металлопротеаза, секретируется эпителием опухоли. ММР7 – основная металлопротеаза, экспрессируемая опухолевыми клетками верхнего отдела желудочно-кишечного тракта человека, и ее экспрессия коррелирует с гистологической агрессивностью опухоли [4, 274, 283].

По данным ряда авторов уровни экспрессии генов факторов, определяющих метастазирование и инвазию довольно высоки уже на ранних этапах онкогенеза, что несколько расходится с традиционными представлениями [133, 153]. Это предполагает возможное их использование в ранней диагностике.

1.6.6. Микросателлитная нестабильность

Нестабильность генома широко делится на микросателлитную нестабильность, связываемую с изменениями фенотипа, и хромосомную нестабильность, определяемую по грубым хромосомным изменениям. Генами, в которых определяется микросателлитная нестабильность, являются *TGFBR2*, *IGF1R*, *BAX*, *hMSH3*, *hMSH6*, *MBD4* [4, 59, 226]. Микросателлитная нестабильность ведет к накоплению в клетке генетических повреждений и участвует в патогенезе спорадического рака желудка. Частота микросателлитной нестабильности при раке желудка оценивается в 30 %, и особенно высока при высокодифференцированной аденокарциноме. При некоторых вариантах метаплазии и доброкачественных образований желудка микросателлитная нестабильность также определяется, и это следует оценивать, как облигатное предраковое изменение. Другим немаловажным аспектом является то, что микросателлитная нестабильность определяется при первично-множественных раках. Показано, что молекулярный патогенез опухолей с микросателлитной и хромосомной нестабильностью различны, в результате чего опухоли характеризуются различными клиническими проявлениями. Опухоли с микросателлитной нестабильностью имеют более благоприятное течение, пациенты характеризуются более высокими показателями выживаемости. Поскольку выявление микросателлитной нестабильности значительно выше при первично-множественных раках, то ее определение при раке может служить молекулярным маркером для оценки риска развития рака другой локализации у того же пациента [4, 95].

Гиперметилирование CpG-островка гена *MLH1*, приводящая к потере его экспрессии, является основным механизмом микросателлитной нестабильности при спорадическом раке желудка [4, 186, 202].

В ряде случаев признаком инициации опухолевого процесса может служить легко выявляемая микросателлитная нестабильность. При этом происходит изменение длины микросателлитных последовательностей в результате делеции или вставки нескольких нуклеотидов, что выражается в появлении в опухолевых клетках дополнительных аллелей микросателлитов, которые отличаются от аллелей в нормальных тканях того же пациента. Нестабильность микросателлитных последовательностей является следствием повышенной частоты возникновения мутаций в геноме, связанной в первую очередь с нарушением системы репарации ДНК. Если в исследуемой опухоли определяется высокий уровень микросателлитной нестабильности, то есть повреждено больше 30 %, то опухоль имеет RER+ фенотип (*replicationerror-positivephenotype*) и, значит, в ДНК ее клеток накопились сотни и тысячи мутаций в микросателлитных последовательностях [4].

Нарушения функции генов репарации неспаренных оснований (*MSH2*, *MLH1*, *PMS1* и *PMS2*) приводят к нестабильности микросателлитов и характерны для некоторых форм спорадических опухолей: они обнаруживаются в 13–15 % рака желудка.

1.6.7. Метилирование ДНК в опухолях

В качестве причин возникновения практически всех онкологических заболеваний большая роль отводится нарушениям эпигенетической регуляции активности генов. Эта регуляция основана на аномальном метилировании/деметилировании CpG-динуклеотидов, расположенных в промоторных и регуляторных областях генов, регулирующих рост и деление клеток [4, 41, 110, 131, 167, 205]. Во всех без исключения исследованных

неопластических клеток был показан дисбаланс метилирования. С одной стороны, он проявляется в общем гипометилировании генома опухолевой клетки, а с другой – в локальном гиперметилировании промоторов ряда генов, вовлеченных в регуляцию клеточного цикла, процессы дифференцировки и апоптоза. Следует отметить, что вклад метилирования ДНК в канцерогенез может проявляться не только на эпигенетическом уровне. В силу своей нестабильности 5'-метилцитозин может подвергаться спонтанному дезаминированию, в результате чего образуется тимин (около 30 % точечных мутаций), который не распознается системами репарации, что приводит к транзиции и последующему изменению строения и функции белка [4].

В то же время сочетано с гипометилированием генома происходит аномальное метилирование CpG-островков в промоторных районах генов, участвующих в регуляции клеточного цикла, что приводит к их полной инактивации. К ним также относятся гены, участвующие в апоптозе, ангиогенезе, дифференцировке, репарации ДНК, метастазировании, передаче сигнала, детоксикации, лекарственной резистентности и др. Таким образом, при отсутствии каких-либо структурных изменений нуклеотидной последовательности гена он полностью теряет свою активность.

Исследования эпигенетической регуляции экспрессии генов в последнее время приобрели большое значение, причем как научное, так и практическое. Метилирование может выступать в качестве первого, так и второго удара, приводящего к последующей инактивации гена по теории Кнудсена. Для некоторых генов было показано, что именно метилирование как одного, так и обоих аллелей является причиной развития опухоли.

В связи с этим определение метилирования генов, одной из функций которых может быть регуляция клеточного цикла в образцах различных опухолей, является необходимым компонентом характеристики гена, а также обязательным условием ДНК-диагностики при определенном заболевании. Исследования эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов уже позволили в ряде случаев установить

причины инактивации определенных генов в опухолях. Аномальное метилирование/деметилирование может служить диагностическим и прогностическим маркером, а также позволяет дифференцировать определенные типы опухолей. Характеристика профиля метилирования генов в различных тканях и типах опухолей вносит существенный вклад в понимание процессов дифференцировки тканей и канцерогенеза. Методические подходы, описанные выше, позволяют проводить такой экспресс-анализ и в операционном материале опухоли, и в лимфоцитах крови, что имеет большое значение для выбора тактики лечения конкретного больного. Сегодня уже известен целый ряд генов, вовлеченных в канцерогенез, инактивация которых в опухоли обеспечивается метилированием их регуляторных районов [4, 222].

Гиперметилирование промоторной области рецептора эстрогена обнаруживается в опухолях толстой кишки в 40—70 %, у больных раком молочной железы в 20—30 %, при острых лейкозах – в 60—70 % случаев. А ген *TUSC3* подвергается метилированию в этих же типах опухолей почти в 90 % случаев [257].

Известно, что точковые мутации в генах, отвечающих за репарацию ДНК, редко выявляются в спорадических опухолях желудка и толстой кишки с микросателлитной нестабильностью. В результате установлено, что причиной является инактивация гена *MLH1* в результате метилирования промоторного района почти в 30 % случаев.

Аномальное метилирование гена *CDH1*, приводящее к его инактивации, обнаруживается у 15—80 % больных раком гортани, пищевода, молочной железы, предстательной железы, матки, желудка, печени, мочевого пузыря; инактивация гена сопровождает острые формы миелоидного и лимфолейкозов [225, 248]. Высокий процент метилирования гена *CDH1* может говорить о высокой метастатической активности опухолей, что согласуется с клиническими характеристиками этих заболеваний.

Таким образом, можно предположить, что в процессе развития и прогрессии опухоли посредством аномального метилирования повреждается значительное

количество генов, ответственных как за общие регуляторные механизмы (основные пути регуляции клеточного цикла), так и специфичные, характерные для развития только конкретного опухолевого типа. В метилотип каждого варианта опухоли входят как гены, вовлеченные в регуляцию клеточного цикла, так и гены, регулирующие процесс инвазии и метастазирования [4, 32, 127, 158].

Определение аномального метилирования генов, отвечающих за общие и частные пути регуляции жизнедеятельности злокачественной клетки, может показывать, как далеко зашел опухолевый процесс, насколько интенсивно идет рост опухоли и процесс метастазирования [4, 19, 106, 242, 262].

Выявление генов, показывающих высокую частоту метилирования в определенном типе опухоли, является необходимым шагом в ее характеристике, указывает на специфические дополнительные регуляторные механизмы, которые нарушаются именно в опухоли определенного типа. Определение таких генов позволит использовать профиль метилирования в сочетании с другими молекулярно-генетическими данными в качестве маркера как для ранней диагностики злокачественных процессов, так и для определения прогноза развития и течения онкологического заболевания [4].

1.7. Значение наследственного фактора в развитии рака желудка

Все опухолевые заболевания можно разделить на три типа.

Первый тип — опухоли, обусловленные герминативной (наследственной) мутацией, передающейся от родителей потомкам; при высокой пенетрантности вероятность развития рака достигает 80–100 %.

Второй тип — опухоли семейного накопления, когда сочетание нескольких генетических факторов, определяющих небольшое повышение риска, приводит к увеличению возможности развития опухолей у индивида.

Третий тип — спорадические опухоли, возникающие при поломках генетического материала под воздействием факторов окружающей среды в

отдельном органе или ткани.

Наследственные заболевания (опухоли 1-го типа) относительно понятны для клинициста, то есть существует передающаяся в поколениях мутация, обуславливающая развитие заболевания; для ее выявления и постановки диагноза необходимо проанализировать семейную историю пациента, затем направить его к медицинскому генетику, который подберет тест для определения соответствующей генетической поломки. Далее клиницисту следует придерживаться протокола, который разработан для многих заболеваний, обусловленных герминативными мутациями. К их числу относится около 5–10 % всех случаев рака. По этому вопросу уже накоплен некоторый медицинский опыт.

Единственной наследственной формой рака желудка до недавнего времени считался наследственный диффузный рак, составляющий от 1% до 3% всех опухолей желудка. К развитию этой формы рака приводят наследственные (герминативные) мутации в гене *CDH1*, который расположен на хромосоме 16 в локусе 16q22.1. В мире на сегодняшний день описано более 150 герминативных мутаций *CDH1* в семьях. У носителей мутации риск развития диффузного рака желудка составляет примерно 70 % [135]. При диффузном наследственном раке желудка в слизистой оболочке сразу возникают множественные фокусы именно перстневидноклеточного рака, которые происходят *de novo* из стволовых клеток в зоне пролиферации, расположенной в шейке желудочных желез. У таких пациентов в слизистой оболочке желудка могут присутствовать до нескольких сотен микроскопических очагов, состоящих из опухолевых клеток. Возникновение фокусов именно перстневидноклеточного рака делает это заболевание наиболее неблагоприятным с точки зрения прогноза и эффективности лечения.

Известно еще несколько наследственных синдромов с предрасположенностью к опухолям желудка, которые дополняют уже известные формы наследственного рака желудка.

Например, описан синдрома Линча – наследственный синдром с предрасположенностью к раку желудка. Он обычно характеризуется появлением

колоректального семейного рака и возникает при наследственных мутациях в генах, которые осуществляют репарацию неспаренных оснований ДНК: *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2*. Однако при синдроме Линча встречаются и семейные опухоли желудка, возникающие в возрасте около 56 лет и относящиеся преимущественно к кишечному типу. Эти опухоли отличаются отсутствием инфекции *H. pylori*, что лишний раз демонстрирует опосредованность инфекционного канцерогенеза. Синдром Линча может сопровождаться проявлениями и других типов опухолей: рак эндометрия, яичников, поджелудочной железы, почечной лоханки, молочной железы, печени и желчных путей, мозга [128].

Еще одним наследственным синдромом, при котором возможно развитие рака желудка, является семейный аденоматозный полипоз. Это заболевание проявляется развитием полипов толстой кишки с их последующей злокачественной трансформацией в колоректальный рак. Заболевание связано с мутациями в гене *APC*, который располагается на длинном плече хромосомы 5 в локусе 5q21 и характеризуется 100%-й пенетрантностью. Этот синдром может сопровождаться также развитием злокачественных и доброкачественных опухолей тонкой кишки, опухолей мозга, кожи, желудка, костей и др. [282].

Синдром Ли-Фраумени — это заболевание связанной с наследственной мутацией в гене *TP53*, данный синдром в 4 % случаев приводит к развитию рака желудка [99].

Синдром Пейтца-Егерса — заболевание, связанное с герминативной мутацией в гене *STK11*, которое повышает риск развития рака желудка.

Рак желудка также может возникать у пациентов с наследственными полипозами, определенными герминальными мутациями в генах *SMAD4*, *BMPRI1A* и *PTEN*, пенетрантность при этом может достигать 25 %.

В последнее время появились сведения, что наследственный рак желудка может зависеть от герминативных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Обычно мутации в этих генах приводят к развитию наследственного рака яичников и молочной железы, однако возможны и другие варианты опухолей (рак простаты,

желудка, поджелудочной железы, молочной железы у мужчин) [261].

С опухолями семейного накопления все обстоит несколько сложнее, но и здесь семейная история может помочь клиницисту сузить область поиска в постановке верного диагноза. Но следует помнить, что опухоли семейного накопления следует отличать от случаев длительного воздействия явных канцерогенов с известным результатом, когда, например, все члены семьи употребляют в пищу одни и те же продукты, имеющие негативное воздействие. Таким примером является развитие рака пищевода у этнических групп, традиционно употребляющих очень горячую или обильно снабженную горькими пряностями пищу или регулярно употребляющими крепкие спиртные напитки. В современной Европе похожая ситуация сложилась с возникновением рака из метапластически измененной слизистой при пищеводе Барретта у больных с длительно текущим рефлюкс-эзофагитом и почти всегда страдающих ожирением.

Сейчас генетическое консультирование становится все более актуальным по целому ряду причин. Количество выявляемых детерминированных поломок противоопухолевого контроля увеличилось, они стали более понятны по механизмам их происхождения, появилась возможность прогнозирования вероятности развития генетически обусловленного рака желудка и реального генетического дообследования. В ряде случаев генетическая предрасположенность молодого пациента к возникновению рака желудка совершенно очевидна, однако абсолютно игнорируется врачами, хотя обследование его ближайших родственников — реальный путь своевременного выявления ранних форм заболевания. Кроме того, прогресс в изучении механизмов канцерогенеза привел к появлению весьма категоричных рекомендаций по удалению органов-мишеней у носителей наследственных мутаций без накопления достаточно обоснованного научного опыта.

Генетические мутации играют важную роль в развитии всех видов рака. Большинство мутаций, приводящих к развитию опухоли, происходит и накапливается в органах и тканях в течение жизни человека. Но некоторые

мутации, особенно те, которые связаны с развитием наследственных онкологических синдромов, могут наследоваться от родителей или возникать на ранних стадиях дробления зиготы. Сегодня известны генетические мутации, связанные более чем с 50 наследственными онкологическими синдромами, и генетические тесты могут определить носительство таких мутаций. Врач, медицинский генетик, помогает интерпретировать результаты полученных генетических исследований.

Генетическое тестирование направлено на поиск специфических наследственных изменений (мутаций) в хромосомах человека, его генах или продуктах синтеза — белках. Генетические мутации могут иметь вредные, нейтральные или неопределенные последствия для здоровья. Существуют мутации в генах, которые приводят к развитию опухолей в течение жизни у пациентов с вероятностью 80–100 %, такие гены обладают высокой степенью проявления (пенетрантностью), и мутации в них увеличивают риск развития опухолей в 20 раз и более по сравнению с общепопуляционным риском. Так, например, поломка гена *CDH1*, кодирующего E-кадгерин, который отвечает за межклеточное сцепление, вызывает наследственный диффузный рак желудка, как было сказано выше. Если мутации возникают в генах со средней пенетрантностью, они повышают риск развития опухолей в 5 раз и более по сравнению с риском в общей популяции. Наследуемое сочетание нескольких таких событий приведет к повышению риска проявления заболевания. Если мутации возникают в генах с низкой пенетрантностью, то риск при наличии каждой мутации повышается в 1,5 раза по сравнению с общепопуляционным. Знание о существовании герминативных мутаций важно не только для определения носителей до проявления опухолевого роста, их наблюдения и консультации, но и для выявления опухоли у пациента. В случае лечения онкологического больного наличие наследственной предрасположенности и герминативной мутации позволит получить информацию о риске возможного рецидива после лечения, т. к. носители мутации имеют повышенный риск развития другой или множественной опухоли с различной

локализацией.

К факторам риска развития опухоли относят любые обстоятельства, которые повышают вероятность заболевания у конкретного человека. Некоторые факторы риска, такие как курение, пищевые привычки, ожирение или некоторые инфекции, являются управляемыми. Другие же, например, возраст или этническая принадлежность, генетический фон, контролю не поддаются.

Описано множество факторов риска, способствующих возникновению опухолей, однако для большинства из них не установлено, может ли тот или иной фактор вызывать заболевание самостоятельно или только в сочетании с другими факторами. Наличие факторов риска может помочь врачу выявить пациентов, имеющих повышенный риск развития той или иной формы злокачественного новообразования. Понимание индивидуального риска у пациента очень важно для выбора адекватного лечения и тактики ведения больного. Оценка индивидуального риска начинается с оценки родословной. Пациенты, в семьях которых отмечаются частые случаи заболеваний или смерти от опухолей определенного типа, особенно в молодом возрасте, попадают в группу повышенного риска. Такие пациенты должны начинать регулярные скрининговые обследования в более молодом возрасте, а частота обследований должна быть выше, чем в общей популяции. Пациенты с установленным наследственным опухолевым синдромом в семье могут пройти специальное генетическое тестирование, на основании которого будет определена наследственная герминативная мутация в гене, связанном с опухолеобразованием, а также носительство этой мутации и индивидуальный риск для каждого члена семьи.

Наличие герминативной мутации в семье не означает, что у каждого, кто ее наследует, обязательно будет развиваться опухоль. Пенетрантность — это частота или вероятность проявления мутантного аллеля гена у индивидуумов родственной группы. Гены, которые отвечают за развитие наследственных онкологических синдромов, не всегда характеризуются 100%-й пенетрантностью. Как уже отмечалось выше, в некоторых случаях пенетрантность может быть неполная (60–

80 %), и тогда возможен пропуск их проявления у некоторых носителей. Однако не следует забывать, что при передаче мутантного аллеля детям таких пациентов заболевание может развиваться. На проявление гена могут влиять генетические факторы организма или факторы окружающей среды.

Спорадический рак (опухоли 3-го типа) представляет особые трудности. Сегодня невозможно точно определить первопричину развития спорадической опухоли на молекулярном уровне. Нельзя однозначно сказать, являются ли нарушения в генах причиной опухолеобразования или его следствием, возникая в результате быстрого неконтролируемого роста клеток, но возможно определить основные молекулярные события, характеризующие этапы канцерогенеза желудка.

Развитие спорадической опухоли является результатом накопления изменений в геноме клетки, возникающих под влиянием канцерогенов, и приводит к нарушению нормального функционирования. Опухолевые клетки получают возможность выживать в организме за счет изменения сигнальных путей, обеспечивающих независимые или автономные сигналы к росту, нечувствительность к ингибиторам роста, резистентность к апоптозу, неограниченный потенциал к пролиферации, способность к поддержанию ангиогенеза, а также к инвазии и метастазированию.

1.8. Полногеномные исследования при раке желудка

При развитии рака желудка происходит повреждение различных путей регуляции клеточной жизнедеятельности, таких как TFF1, HER2, p53 и Wnt/В-катенин [89, 146, 156, 244]. До недавнего времени исследования были направлены на изучение отдельных путей или их составляющих. Однако большинство опухолей являются продуктами сложных взаимодействий между несколькими регуляторными путями и требуют участия множества генов и генных сетей. Понимание молекулярного канцерогенеза сегодня стало возможным в результате появления научных исследований, направленных на изучение сразу множества

генов и белков, составляющих молекулярный профиль опухоли. Такой молекулярный профиль определяет развитие опухоли, ее клиническое поведение и может служить маркером и классификатором для опухолей различного типа. Исследования высокого разрешения, такие как определение опухолевых экспрессионных профилей, определение мутационных профилей опухоли с помощью секвенирования нового поколения (NGS), полногеномный профайлинг копийности хромосомных локусов и полногеномный анализ промоторного метилирования, выполнены для различных типов рака, в том числе и для рака желудка [170, 182, 197, 203].

Полногеномное исследование ассоциаций у 3279 пациентов с диагнозом дистальный рак желудка позволило определить локус в 5p13.1, который содержит ген *PTGER*, ответственный за регуляцию миграции клеток и иммунный ответ, ингибирующий рост клеточной линии рака желудка. Это же исследование идентифицировало локус в 3q13.31, который содержит ген *ZBTB20*, кодирующий белок цинковых пальцев. Этот белок гомологичен *BCL6*, участвует в иммунном ответе, кроветворении и канцерогенезе. Кроме того, при обследовании 6897 пациентов, выявлено несколько других локусов, в т.ч. rs2294008 и rs2976392 на 8q24, rs4072037 на 1q22 и rs13042395 на 20p13, связанных с некардиальным типом рака желудка.

Использование полногеномного анализа метилирования позволило идентифицировать ген *ADAMTS9*, супрессор опухолевого роста, который блокирует сигнальный путь АКТ/mTOR в опухолях желудка. Его эпигенетическая инактивация в результате гиперметилирования выявлена в 29,2 % первичных опухолей желудка. Многомерный анализ показал, что метилирование *ADAMTS9* в опухоли приводило к снижению общей выживаемости пациентов с раком желудка.

С целью изучить характерные для рака желудка хромосомные aberrации проведен полногеномный анализ копийности хромосомных локусов. В результате сравнительный геномной гибридизации показано, что инвазия в подслизистый слой характерна для опухолей с аллельным дисбалансом 11q13, 11q14, 11q22 и

14q32 [253].

Впервые в клинической практике появились новые классификации опухолей, которые учитывают не анатомическое расположение опухоли, не морфологический тип, отражающий наличие в опухоли клеток определенного типа или определенной дифференцировки, а молекулярный патогенез опухолей, преимущественные молекулярные повреждения генов, которые характерны для опухолей этого типа. Эти классификации рассчитаны на специфическое лечение, основанное на молекулярных мишенях и их коррекции. Но, к сожалению, оно пока детально не проработано. Рак желудка до недавнего времени делили на диффузный и интестинальный по классификации P. Lauren или на кардиальный и антральный по анатомической локализации. Сегодня, с применением высокотехнологичных полногеномных методов исследования, предложена новая классификация, которая позволяет разделить рак желудка на несколько типов: EBV-позитивные опухоли; опухоли с микросателлитной нестабильностью, которые имеют повышенную частоту мутаций в онкогенах; генетически стабильные опухоли, к которым относят диффузный рак желудка; опухоли, имеющие хромосомную нестабильность с повышенной частотой анеуплоидий, для которых характерно повышение частоты амплификации тирозинкиназных рецепторов. Идентификация этих молекулярных типов напрямую связана с терапией таргетными препаратами [97].

Применение высокотехнологичных геномных методов исследования привело к значительному расширению информации о генетической и эпигенетической природе канцерогенеза, хотя в стандартах диагностики и лечения основной до сих пор остается морфологическая картина. В ближайшее время современные геномные технологии позволят перейти от стратегии тестирования единичных генов, ассоциированных с канцерогенезом, к интегральной модели канцерогенеза с определением генных сетей и последовательным тестированием каждого этапа для выявления наиболее значимого в образовании опухолей типа, что также будет отражено как в протоколах диагностики, так и лечения онкологических заболеваний [20, 84]. В свою очередь, это повлияет на прикладное

использование появившихся дополнительных типов опухолевых маркеров, связанных с клиническим течением заболевания, его ранним определением и лечением. Однако пока многие врачи продолжают искать один унифицированный клинический маркер, проводят оценку маркеров в послеоперационном материале, называя ее ранней, проводят «таргетную» терапию, основываясь на общих рекомендациях по химиотерапии, а критериям постановки диагноза остается все то же заключение морфолога по полученному препарату опухоли [65, 113, 114, 132, 258].

Определив для себя основной проблемой внедрение в клиническую практику теоретических достижений генетики рака желудка, были намечены пути решения задач по выбору набора генов, информативного для предоперационного подтверждения злокачественной трансформации слизистой оболочки, для обоснованности органосохраняющих операций, определения генетической чувствительности пациента к избираемому варианту химиотерапии и определению прогноза заболевания с целью персонализации тактики ведения пациентов с предполагаемым диагнозом Рак желудка.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн и характеристика исследования

В исследование включены пациенты с предполагаемым диагнозом – Рак желудка (Рисунок 2.1). На первом этапе в рамках клинических рекомендаций по данной нозологии в ходе стандартного обследования пациентам при ЭГДС проводится биопсия опухоли и материал направляется на исследование молекулярных маркеров: метилирование, экспрессия генов, участвующих в регуляции клеточного цикла, апоптозе, неоангиогенезе, адгезии клеток, активность ферментов. В последующем показатели маркеров сопоставляются с показателями этих же маркеров, полученных в интраоперационном материале от тех же больных с целью подтверждения возможности использовать маркеры на этапе дооперационной диагностики.

Всем пациентам с подтвержденным гистологически диагнозом Рак желудка проводится оперативное лечение. У части больных, которым проведена резекция желудка, интраоперационно полученный материал направляется на исследование молекулярных маркеров: метилирование генов, участвующих в регуляции клеточного цикла, апоптозе, неоангиогенезе, адгезии клеток. Полученные показатели маркеров сопоставляются с клиническими характеристиками опухоли и результатами лечения пациентов. У части больных, которым проведена резекция желудка или гастрэктомия, интраоперационно полученный материал направляется на исследование молекулярных маркеров: метилирование, экспрессия генов, участвующих в регуляции клеточного цикла, апоптозе, неоангиогенезе, адгезии клеток, активность ферментов. Полученные показатели маркеров сопоставляются с клиническими характеристиками опухолевого процесса. У части больных, которым проведена резекция желудка или гастрэктомия, а лечение дополняется химиотерапией, интраоперационно полученный материал направляется на исследование молекулярных маркеров: определение полиморфизмов *TUMS*, *TP53*.

Полученные показатели маркеров сопоставляются с результатами лечения пациентов и проводится его корректировка.

По результатам анализа полученных данных формируется единая панель молекулярных маркеров Рака желудка для определения персонализированного подхода к диагностике, лечению, прогнозу рецидива заболевания.

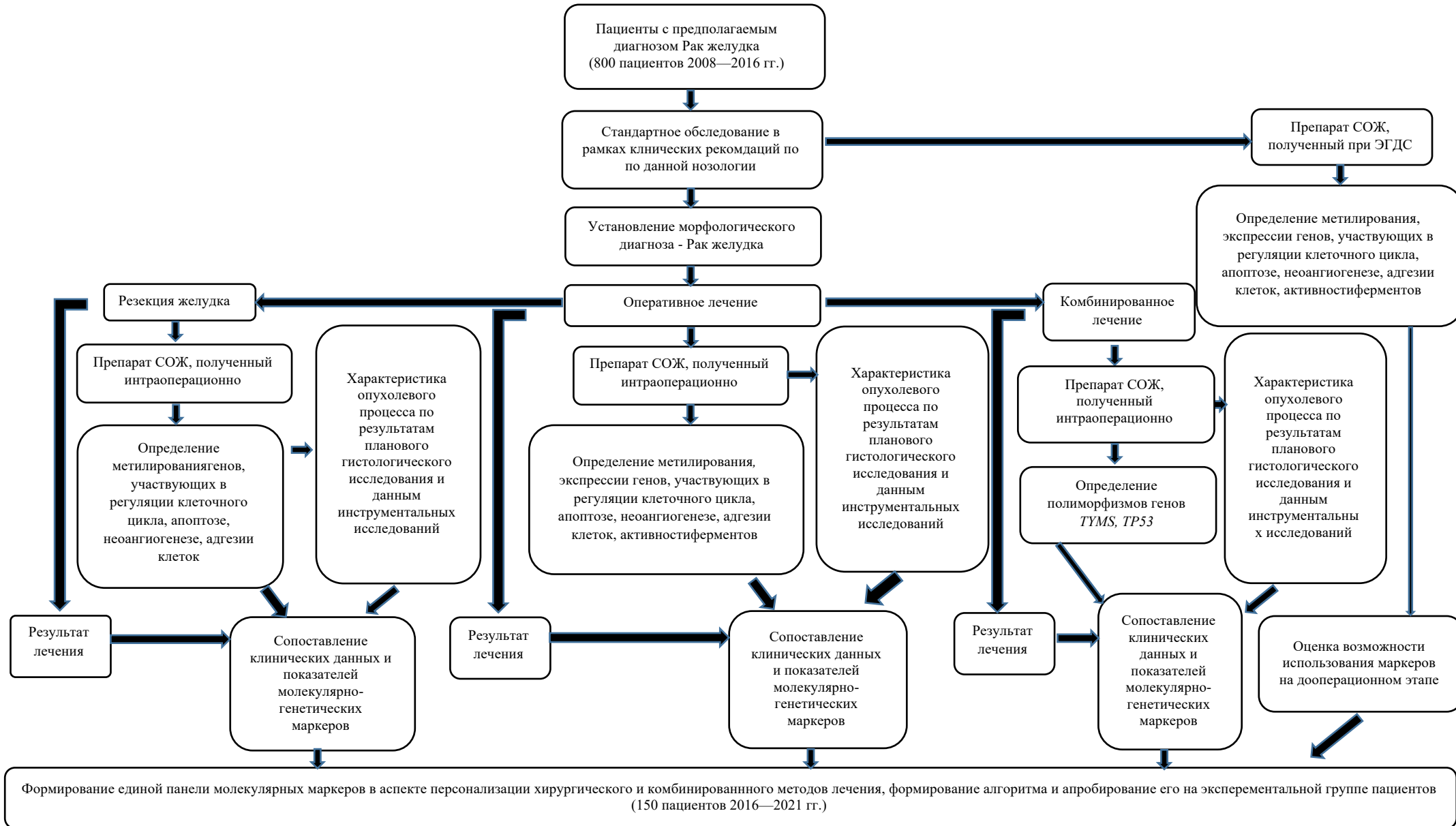


Рисунок 2.1 – Дизайн исследования

2.2. Общая характеристика группы исследования

В период 2008—2021 гг. было проанализировано в общей сложности 1808 больных раком желудка, находившихся на обследовании и лечении в УКБ №1 ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и химиотерапевтическом отделении №2 отдела лекарственного лечения НИИ Клинической онкологии имени Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Всем этим больным были выполнены стандартные методы обследования в рамках клинических рекомендаций: рентгенография желудка, эзофагогастродуоденоскопия с биопсией и последующим морфологическим исследованием биоптатов, УЗИ органов брюшной полости, электрокардиография, рентгенологическое исследование органов грудной клетки, лабораторные исследования (общий и биохимический анализы крови, коагулограмма, общий анализ мочи, исследование маркеров ВИЧ, гепатитов В и С, сифилиса, определена группа крови и резус фактор, фенотип). Также основной массе пациентов (89 %) выполняли КТ. Помимо этого, части больных с целью улучшения результатов первичной и вторичной диагностики рака желудка, проведения дифференциальной диагностики между злокачественными и доброкачественными заболеваниями желудка были проведены дополнительные исследования (ПЭТ/КТ (14,5 %), скintiграфия костей скелета (34 %), др. (11 %)).

Указанные исследования проводили при различной локализации патологического процесса в органе.

Помимо этого, отдельно были проанализированы результаты наиболее технически сложных оперативных вмешательств (непосредственные и отдаленные) 950 больных, которым с 2008 по 2021 гг. была проведена гастрэктомия или резекция желудка по поводу рака тела, проксимального и дистального отделов желудка. Указанная группа составила 44 % от общего количества (1808) больных раком желудка, находившихся на обследовании и лечении, и 44 % от количества

больных, которым были выполнены радикальные и циторедуктивные оперативные вмешательства.

С целью оценки стадии, гистологического типа и характера роста (макроскопического) рака желудка применялись следующие классификации.

1. Международная классификация по системе TNM (классификация международного противоракового союза и Американского объединенного комитета (UICC/AJCC), 8-е издание, 2017).

2. Международная классификация ВОЗ (1977).

3. Классификация рака желудка, предложенная в 1965 г. P. Lauren [180]. По данной классификации выделяют два типа рака желудка: интестинальный и диффузный, различающихся по морфогенезу, гистоструктуре, фенотипу, биологическому поведению.

4. Классификация рака по распространению опухолевого процесса, предложенная на XII Российском онкологическом конгрессе в 2008 г. [36]: ранний рак (Tis-T1N0-3M0), местно-распространенный рак (T2-4N0-3M0), генерализованный (ТлюбаяNлюбаяM1).

5. Классификация аденокарциномы зоны пищеводно-желудочного перехода, предложенная в 1996 г. J.R. Siewert [238]

6. Японская классификация регионарных лимфатических узлов желудка Японской ассоциации по изучению рака желудка (Japanese Gastric Cancer Association, 1998) [162].

Как уже указывалось выше, было проанализировано 1808 случаев лечения пациентов с предполагаемым диагнозом Рак желудка, находившихся на обследовании и лечении и динамическом наблюдении в УКБ №1 ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и химиотерапевтическом отделении №2 отдела лекарственного лечения НИИ Клинической онкологии имени Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с 2008 по 2021 гг.

Тотальное удаление желудка выполнено более чем половине пациентов – 53% (958), частичное удаление органа в объеме резекции выполнено 36 % (651),

паллиативные операции выполнены 5 % пациентов (90), диагностическая ревизия органов брюшной полости выполнена 4 % (12), остальным пациентам 2 % (37) хирургическое лечение показано не было.

Из 1808 пациентов в исследование на первом этапе было включено 800 пациентов, проходивших обследование, лечение и находившихся на динамическом наблюдении с 2008 по 2016 гг. в выше указанных ЛПУ, с целью определения молекулярных маркеров, которые могут быть включены в комплексную панель для формирования алгоритма персональной диагностики, лечения и опеределения прогноза рака желудка.

Критериями включения пациентов в исследование были:

1. Предполагаемый диагноз – Рак желудка.
2. Возраст старше 18 лет.
3. Согласие пациента на участие в исследовании, в том числе на возможное проведение дополнительного метода обследования – исследование молекулярных маркеров в материале, полученном интраоперационно, а также на дооперационном этапе, полученном при эзофагогастродуоденоскопии.
4. Наличие показаний к выполнению хирургического вмешательства по данным проведенного обследования и отсутствие противопоказаний к оперативному вмешательству.

В исследование не были включены пациенты, которые отказались участвовать в исследовании, либо не имелось юридической невозможности получения согласия на участие в исследовании, пациенты младше 18 лет, также в исследование не вошли пациенты, которые отказались от проведения дополнительного метода обследования – исследования молекулярных маркеров в материале, полученном интраоперационно, а также на дооперационном этапе, при эзофагогастродуоденоскопии. Также в исследование не вошли пациенты, у которых по данным обследования не было выявлено показаний к выполнению оперативного вмешательства, либо имелись противопоказания к оперативному вмешательству, делающие невозможным выполнение оперативного вмешательства

на момент проведения исследования и получения материала для исследования молекулярных маркеров.

Включение пациентов в группу исследования проводилось после получения письменного добровольного информированного согласия на участие в исследовании.

После включения в исследование идентификационные данные пациента, без включения личной информации, и результаты проведенного обследования сохранялись в базе данных исследования.

Операционно-анестезиологический риск оценивался согласно классификации Американской Ассоциации Анестезиологов (American Association of Anaesthetists – ASA).

Из 800 пациентов с предполагаемым диагнозом Рак желудка, вошедших в исследование, было отобрано 289 пациентов для исследования образцов на молекулярные маркеры, которые были разделены на три подгруппы. 226 из 289 пациентов было проведено исследование на молекулярные маркеры. При этом 93 пациентам была выполнена эндоскопическая биопсия и забор фрагментов опухоли и слизистой желудка для последующего определения молекулярных маркеров на дооперационном этапе.

226 больным при проведении планового оперативного лечения в полученном материале выполнено определение молекулярных маркеров в полученных образцах ткани.

Как было сказано выше, 289 пациентов с предполагаемым диагнозом Рак желудка, вошедшие в группу исследования, и у которых планировался забор материала для определения молекулярных маркеров после дообследования и установления диагноза Рак желудка, были разделены на три подгруппы в соответствии с задачами исследования.

2.2.1. Описание первой подгруппы

В первую подгруппу вошли 106 больных раком желудка, находившихся в УКБ №1 ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), а также в химиотерапевтическом отделении №2 отдела лекарственного лечения НИИ Клинической онкологии имени Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с 2008 г. по 2016 г. Материал, полученный от пациентов данной подгруппы, послужил основой для определения и оценки молекулярных маркеров комплексной дифференциальной диагностики рака на дооперационном этапе, с целью персонализации последующего хирургического и комбинированного лечения [63].

Средний возраст пациентов ($M \pm m$) – $63,4 \pm 1,4$ лет (от 44 до 82 лет).

При этом на лиц мужского пола пришлось 58,5 % (62), а на лиц женского пола пришлось 41,5 % (44).

Мужчин и женщин младше 50 лет было одинаковое количество, соответственно по 50 % (6). В возрасте от 50 до 60 лет всего было 38 пациентов, на лиц женского пола пришлось 26,3 % (10), на лиц мужского – 73,7 % (28). Пациентов старше 60 лет всего было 56, на лиц женского и мужского пола пришлось по 50 % (28).

По стадиям заболевания пациенты распределились следующим образом. Первая стадия заболевания выявлена у 35 % (37), вторая А стадия у 10,4 % (11), вторая В стадия – у 11,3 % (12), третья стадия – у 30,1 % (32), соответственно на четвертую А и В стадии пришлось по 6,6 % (7).

Гистологические варианты рака желудка распределились следующим образом: на аденокарциному G1 пришлось 15 % (16), на G2 – 32 % (34), на G3 – 30,2 % (32), G4 – 2 % (2), перстневидноклеточный рак был выявлен у 20,8 % (22) пациентов.

Кишечный и диффузный типы опухоли были представлены в равных процентах, по 50 %.

Диссеминированная форма рака была выявлена у 15,1 % (16), локо-регионарное поражение – у 71,7 % (76), ранний рак – у 13,2 % (14).

Вторичная лимфаденопатия была выявлено у 50 % пациентов, соответственно у 50 % пациентов ее выявлено не было.

Первичный очаг до 2 см определялся у 26,4 % (28) пациентов, средний размер опухоли, от 2 до 4 см, определялся у 15,1 % (16), обширное поражение желудка, более 4 см в максимальном размере, определялось у 58,5 % (62) пациентов.

Сопутствующие заболевания были выявлены у 69 пациентов (65 %), ишемическая болезнь с нарушениями ритма сердца выявлена у 20 (19 %), артериальная гипертензия у 15 (14 %), обструктивная болезнь легких у 13 (12 %), постинфарктный кардиосклероз у 12 (11 %), другие сопутствующие заболевания у 9 (9 %).

2.2.2. Описание второй подгруппы

Во вторую подгруппу вошли 80 больных раком желудка, находившихся в УКБ №1 ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), а также в химиотерапевтическом отделении №2 отдела лекарственного лечения НИИ Клинической онкологии имени Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с 2009 г. по 2016 г. с местно-распространенным раком желудка, которым было выполнено радикальное оперативное вмешательство: гастрэктомия, резекция желудка с гистологически подтвержденными интактными краями резекции (R0). Полученный от пациентов данной подгруппы материал послужил основой для определения полиморфных вариантов гена *TUMS* и гена *TP53* и их связи с эффективностью комбинированного лечения, включающего радикальное оперативное лечение и адъювантную химиотерапию на основе 5-фторурацила (5-ФУ). Таким образом, была проведена оценка эффективности возможного комбинированного лечения и значение определения молекулярных маркеров у больных с местно-распространенным раком желудка для последующего анализа и

персонализации комбинированного лечения на основании полученных показателей.

Характеристики данной подгруппы были следующими.

Большая часть подгруппы пришлась на лиц мужского пола 62% (50), в меньшинстве оказались женщины 38% (30).

На лиц менее 50 лет пришлось 14% (11), в возрастном промежутке от 50 до 60 лет было 19% (15) пациентов, и, соответственно, основной массив пациентов был старше 60 лет – 67% (54).

Стадирование в рамках местно-распространенного опухолевого процесса оказалось следующим, вторая А и В стадии составили, 25% (21) и 22% (17), соответственно, большая же часть пациентов 53% (42) пришлось на третью стадию.

Сочетанные и конкурирующие заболевания были представлены у пациентов следующим образом. Так, на долю кардиальных заболеваний как по ишемическому типу, так и с нарушением ритма пришлось 29% (23), легочные заболевания были выявлены у 5% (4), гипертоническая болезнь у 14% (11), на долю остальных заболеваний в том числе морбидного ожирения пришлось 5% (4).

Вторичная опухолевая лимфаденопатия выявлена у 62% (50) пациентов, у остальных 38% (30) поражения лимфоузлов выявлено не было.

Гистологические варианты рака желудка распределились следующим образом: на аденокарциному G1 пришлось 13% (10), на G2 – 31% (25), на G3 – 39% (31), перстневидноклеточный рак был выявлен у 17% (14) пациентов.

Кишечный и диффузный типы опухоли были представлены в разных процентах – 44% (35) и 56% (45), соответственно.

Первичный очаг до 2 см определялся у 15% (12) пациентов, средний размер опухоли, от 2 до 4 см, определялся у 36% (29), обширное поражение желудка, более 4 см в максимальном размере, определялось у 49% (39) пациентов.

2.2.3. Описание третьей подгруппы

В третью подгруппу вошли 103 больных раком желудка, находившихся в УКБ №1 ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), а также в химиотерапевтическом отделении №2 отдела лекарственного лечения НИИ Клинической онкологии имени Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с 2009 г. по 2016 г., оперированных ранее по поводу рака желудка.

Полученный от пациентов данной подгруппы материал послужил основой определения и оценки молекулярных маркеров прогноза заболевания с целью персонализации последующего мониторинга для оценки риска возникновения рецидива заболевания.

Среди больных, включенных в третью подгруппу, 54 (52,4%) были лицами мужского пола, 49 (47,6%) составляли женщины.

Возраст больных третьей подгруппы колебался от 48 до 86 лет, в среднем составил 67 ± 6 лет, при этом преобладали пациенты старше 60 лет.

Сочетанные и конкурирующие заболевания были представлены у пациентов следующим образом. На долю кардиальных заболеваний пришлось 51,5% (53), легочные заболевания были выявлены у 24,3% (25), гипертоническая болезнь выявлена у 24,3% (25).

По стадиям заболевания пациенты распределились следующим образом. 0 стадия составила 1,9% (2), первая стадия заболевания выявлена у 46,6% (48), вторая А стадия у 14,56% (15), вторая В стадия – у 9,71% (10), третья стадия – у 21,36% (22), соответственно на четвертую А и В стадии пришлось по 2,915% (3).

Гистологические варианты рака желудка распределились следующим образом на аденокарциному G1 пришлось 7,77% (8), на G2 – 32,04% (33), на G3 – 30,81% (42), G4 – 5,82% (6), перстневидноклеточный рак был выявлен у 14,56% (15) пациентов.

Интестинальный тип рак выявлен у 41 пациента (39,81%), диффузный тип рака желудка был у 62 пациентов (60,19%) (по P. Lauren, 1965).

По поражению лимфоузлов пациенты разделились на группировки: с поражением лимфоузлов 60 (58,3%) пациента, без поражения – 43 (41,7%).

По размеру опухоли пациенты разделились на следующие группировки: до 2 см – 16 больных (15,5%), 2—4 см – 28 больных (27,2%), более 4 см – 59 больных (57,3%).

2.3. Обследование пациентов

2.3.1. Молекулярные маркеры

Целостная картина молекулярных процессов в раковой клетке определенного типа опухоли далека от завершения. Интенсивное развитие молекулярной медицины позволяет не только сделать вклад в понимание фундаментальных процессов канцерогенеза, но и уже сейчас может помочь пациенту.

Молекулярно-генетическая диагностика наследственных, семейных и спорадических форм рака в скором поможет предотвратить тяжелые последствия онкологических заболеваний.

Каждая опухоль, несмотря на общие механизмы регуляции, является уникальной, ее развитие и прогрессия моделируются особенностями генома конкретного пациента, поэтому обнаружение универсального маркера для диагностики злокачественной опухоли ожидать не приходится. Выходом из ситуации становится поиск комплекса структурных (генетических и эпигенетических) маркеров, которые будучи собранными в панель, позволяют проводить эффективную диагностику на самых ранних этапах возникновения заболевания.

В связи с вышесказанным, одной из наиболее важных практических задач ДНК-, РНК-диагностики является разработка систем генетических и эпигенетических маркеров, создание эффективных и экономичных диагностических протоколов, внедрение которых позволяет своевременно диагностировать рак желудка, а значит повышает успешность лечения

заболевания, помогает оценить прогноз негативного исхода и тем самым создает персонализированный подход к ведению каждого отдельного пациента.

Создание системы молекулярных маркеров, определяемых в биоптатах слизистой желудка, позволяет уже на предоперационном этапе в более короткие сроки с большим процентом точности подтвердить или опровергнуть диагноз Рака желудка, дополнив тем гистологическое исследование, помогает скорректировать объем оперативного пособия и тактику комбинированного лечения, определяет прогноз и подводит к персонализации оказываемой медицинской помощи.

2.3.2. Молекулярные маркеры для диагностики рака, определяемые в первой подгруппе исследования

Помимо стандартных исследований в материале, полученном интраоперационно у 106 больных с предварительным диагнозом Рак желудка, находившихся на лечении с 2008 по 2016 гг., были определены молекулярные маркеры. Из этого числа больных у 53 молекулярные маркеры определяли и в образцах, полученных при эзофагогастродуоденоскопии (ЭГДС) на дооперационном этапе, с целью подтверждения диагностической значимости генетического исследования материала, полученного на предоперационном этапе.

2.3.2.1. Характеристика системы молекулярных маркеров, исследуемых в первой подгруппе исследования

В работе использована оригинальная система молекулярных маркеров, состоящая из трех частей.

Первая часть включала определение в опухолевой ткани аномального метилирования генов *CDH1*, *RASSF1A*, *MLH1*, *TUSC3*, *DAPK*, приводящего к их инактивации.

Все перечисленные гены обладают супрессорными свойствами, непосредственно влияя на сдерживание опухолевого роста. Их инактивация

посредством аномального метилирования связана с развитием опухоли. Важно отметить, что инактивация генов-супрессоров не выявляется при развитии воспалительных заболеваний различных органов, а также при обратимых гиперпластических процессах. Аномальное метилирование этих генов определяется при дисплазии II—III степени и связано с началом опухолевого роста, что делает данные молекулярные маркеры высокочувствительными для раннего выявления опухолевого роста.

Ген *CDH1* кодирует белок E-кадгерин, отвечающий за адгезию клеток. Снижение активности гена приводит к утрате клеточных контактов и приобретению опухолевой клеткой способности к инвазии и метастазированию.

Ген *RASSF1A* — ген-супрессор, участвует в регуляции клеточной пролиферации и апоптозе, кодирует фактор, контролирующий клеточный цикл.

Ген *MLH1* — ген-супрессор, кодирует фактор, участвующий в репарации неспаренных оснований, возникающих вследствие ошибок репликации ДНК.

Ген *TUSC3* проявляет супрессорные функции и демонстрирует высокий уровень метилирования в различных типах опухолей, происходящих из эпителия.

Ген *DAPK* кодирует белковую киназу, обеспечивающую апоптоз и предотвращающую опухолевую прогрессию в результате ингибирования поляризации клетки. Инактивация гена DAP-киназы приводит к усилению миграции и инвазии опухолевых клеток, препятствует апоптозу.

2.3.3. Выделение геномной ДНК из опухолевого материала

Для получения ДНК ткани опухоли использовался следующий метод выделения ДНК. Ткань опухоли или материал, полученный при эндоскопическом исследовании, отмывался 1 ml PBS, измельчался и затем гомогенизировался, путем растирания на стекле. Гомогенат переносился в пробирку, затем добавлялся экстракционный буфер (10 mM Tris-HCl, 2 mM ЭДТА, 4 mM NaCl, pH=8,0) и протеиназа К до концентрации 50 мкг/мл и SDS до 0,5 %.

Инкубировался 2 часа при 37⁰С до получения прозрачного раствора. Далее проводилась экстракция ДНК равными объемами фенола, смеси фенол-хлороформ и хлороформом с последующим центрифугированием, и отбором верхней фазы.

Полученный в результате раствор ДНК перемешивался с 1/10 объема 5 М ацетата натрия, рН 5,3, и ДНК осаждался с помощью 2,5 объемов холодного 96% этанола, выдерживался образец 30 мин при температуре - 70⁰С.

Проба центрифугировалась при 0⁰С 15 мин с ускорением 12000 g. Высушивался осадок ДНК на воздухе и растворялся в 200 мкл ТЕ рН 8,0.

Выход ДНК составлял 25—50 мкг на 1 г ткани, в случае эндоскопического материала выход ДНК соответствовал примерно 5 мкг на образец.

После полного растворения ДНК измерялась ее концентрация на спектрофлуориметре фирмы «Hoefel» (Германия) и снимался спектр поглощения в диапазоне от 220 до 320 нм, с целью определения чистоты ДНК.

При этом проверялось выполнение следующих условий: отношение поглощения на длинах волн 230нм/260нм < 0,5, 260нм/280нм >1,8. Максимум поглощения наблюдался в районе 260 нм.

2.3.4. Рестрикционный анализ

Для определения аномального метилирования проводилась обработка опухолевой ДНК соответствующей метилчувствительной рестриктазой HpaII по следующей схеме: к 1000 нг геномной ДНК добавлялось 10 е.а. фермента и 2 мкл соответствующего 10х буфера, доводилось до 20 мкл дистиллированной водой и оставлялось на 10 часов в термостате при температуре оптимальной для используемой рестриктазы.

2.3.5. Определение аномального метилирования промоторных областей генов *CDH1*, *RASSF1A*, *MLH1*, *TUSC3*, *DAPK*

Метилирование CpG-островков промоторных областей генов определялось при помощи метилчувствительной ПЦР (МЧ-ПЦР). Метод МЧ-ПЦР основан на способности метилчувствительных рестриктаз гидролизовать ДНК, не содержащую модифицированных оснований, и оставлять негидролизованной участки, содержащие метилцитозин.

В качестве матрицы для ПЦР использовалась ДНК гидролизованная метилчувствительными рестриктазами HpaII (CCGG) или HhaI (CGCG). Геномная ДНК (1 мкг) обрабатывалась 10 ед активной рестриктазы в 10 мкл инкубационной смеси в течение ночи.

Для амплификации использовалось 150 нг гидролизованной ДНК. При проведении ПЦР учитывалось присутствие сайтов узнавания используемых рестриктаз в амплифицируемом фрагменте, который содержал не менее трех-четырех HpaII или HhaI сайтов. Количество сайтов указано в Таблице 2.1.

В случае модификации цитозина в метилцитозин ДНК не гидролизуется, и продукт ПЦР может быть выявлен в геле. В отсутствие метилирования сайтов узнавания для используемых рестриктаз ДНК полностью гидролизуется, и продукт ПЦР не образуется.

Для исключения ложноотрицательных результатов проводились мультилокусные ПЦР с двумя парами праймеров: один фрагмент принадлежал изучаемому гену (*CDH1*, *RASSF1A*, *MLH1*, *TUSC3*, *DAPK*), другой служил внутренним контролем ПЦР, фрагмент гена *HBB* или фрагмент гена *CUX1*, не содержащие сайтов узнавания указанных рестриктаз.

Таблица 2.1 – Праймеры для ПЦР исследуемых генов, режимы их отжига, используемая концентрация MgCl₂ и размеры получаемых фрагментов

Исследуемый ген	Нуклеотидная последовательность праймеров	Условия ПЦР		Размер продукта, п.н.
		T°отж.	MgCl ₂ (mM)	
<i>RASSF1A</i>	F: attggtaccgactcccgttaca ^{aaat} R: ctggaccsacgc cag gt ^{ttc}	60°C	3,0	249
<i>CDH1</i>	F: gccccatctccaaaacga ^{aca} R: tctcctgtatca ^{ctt ccc cca}	67°C	3,0	361
<i>MLH1</i>	F: cgc tcg tag tat tcg tgc R: acc tca gtg cct cgt get cac g ^{tt}	55°C	3,0	501
<i>TUSC3</i>	F: tctggggactgaggaca ^{aaagg} R: gca gga gaa gga agg gaa agc	57°C	3,0	459
<i>DAPK</i>	F: ggg cag ctt agc aat gtg tc R: aca ctc cga agc agc ctc tc	60°C	3,0	380

ПЦР проводилась по следующей схеме:

– к 0,1 мкг геномной ДНК добавлялось 0,05 мкМ каждого олигопраймера, 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата, 1—2 ед. Таq-полимеразы, 50 мкл однократного буфера для ПЦР следующего состава: 50 мМ KCl, 10 мМ Трис-HCl (pH 8,4), 5 мМ MgCl₂, 10% диметилсульфоксида.

– затем добавлялось 30 мкл вазелинового масла, прогревалась смесь при 95°C в течение 10 мин и проводились 33 цикла по следующей программе: денатурация при 95°C – 30 с, отжиг и элонгация при 58—62°C – 2 мин 30 с.

2.3.6. Разделение продуктов ПЦР в 8%-ном полиакриламидном геле методом вертикального электрофореза

Разделение ПЦР-продуктов по молекулярной массе при анализе метилирования проводилось с помощью вертикального электрофореза в 8%-ном ПААГ следующего состава: 8,4 мл 30%-го раствора акриламида, 0,6 мл 10%-го персульфата аммония, 26 мкл ТЕМЕД, до 30 мл разведенного буфера ТВЕ.

Персульфат аммония и ТЕМЕД вносились после всех остальных компонентов и тщательно перемешивалась полученная смесь. Электрофорез проводился при напряжении 400 В с использованием камеры для вертикального фореа («Хеликон», Москва) в течение 2,0—3,0 часов.

В качестве контроля молекулярной массы ДНК использовалась ДНК стандартного молекулярного веса pUC19/Msp1. Визуальный контроль пробега проб ДНК проводился по ксиленцианолу и бромфеноловому синему. Окрашивание геля нитратом серебра для визуализации продуктов ПЦР проводилось по приведенной ниже методике.

2.3.7. Ультратонкое окрашивание нитратом серебра

Окрашивание гелей проводилось по усовершенствованной методике Liberman. После электрофореза гель инкубировался в растворе 0,011 М AgNO₃ в течение 10—15 минут, затем трижды промывался в дистиллированной воде. Проявление проводилось в модифицированном растворе проявителя (увеличена концентрация HCHO) следующего состава: 0,75 М NaOH; 0,5 М HCHO; 2,3mM Na(BH₄) около 10—15 минут, в зависимости от интенсивности проявления геля.

2.3.8. Оптимальные критерии интерпретации результатов исследования

Если в ДНК, полученной из биопсийного материала или опухоли, присутствует аномальное метилирование промоторов генов *CDH1*, *RASSF1A*, *MLH1*, *TUSC3*, *DAPK*, то цитозины в составе CpG-динуклеотидов заменены на 5-метилцитозины, в том числе в сайтах узнавания *HpaII*. В этом случае рестриктаза *HpaII* не в состоянии гидролизовать геномную ДНК в сайтах узнавания, матрица для МЧ-ПЦР остается интактной. В результате в окрашенном ПААГ видны фрагменты, соответствующие промоторным районам *CDH1*, *RASSF1A*, *MLH1*, *TUSC3*, *DAPK*. В тех образцах, где метилирование генов отсутствует, происходит

гидролиз геномной ДНК в сайтах узнавания *HpaII*. При первой денатурации матрица для ПЦР разрушается и ПЦР-продукт, соответствующий промотору гена, отсутствует в ПААГ. Внутренний контроль МЧ-ПЦР, не содержащий сайтов узнавания *HpaII*, должен присутствовать во всех анализируемых образцах. Отрицательный контроль не должен содержать фрагментов, соответствующих ПЦР-продуктам, в положительном контроле должны присутствовать ПЦР-продукты внутреннего контроля и промоторов исследуемых генов [63].

Вторая часть панели молекулярных маркеров включала определение экспрессии генов *hTERT*, *MMP7*, *MMP9*, *BIRC5*, *PTGS2*, *TP53*, то есть преобразование информации, записанной в гене в виде последовательности нуклеотидов ДНК в функциональный продукт — РНК.

Матриксные металлопротеиназы — протеазы, способные лизировать все структурные компоненты внеклеточного матрикса, продуцируются клетками стромы вокруг опухоли; их высокую продукцию связывают с метастазированием, неоангиогенезом, плохим прогнозом течения заболевания.

MMP7 (матрилизин) — металлопротеиназа, секретируемая эпителием опухоли, ее экспрессия коррелирует с гистологической агрессивностью опухоли.

MMP9 (желатиназа В) — металлопротеиназа, определяемая в здоровых растущих клетках, играет ведущую роль в ангиогенезе, растворяя стромальные элементы, прокладывает путь для растущих капилляров, в опухоли обеспечивает неоангиогенез, тем самым способствуя росту опухоли.

Сурвивин (survivin) — эндогенный белок, относящийся к семейству белков — ингибиторов апоптоза. В норме он участвует в процессах митоза и эмбрионального развития, поэтому присутствует преимущественно в эмбриональных клетках и нормальных соматических клетках в течение короткого периода митоза. В опухолях ген сурвивина (*BIRC5*) экспрессируется в больших количествах и подавляет апоптоз.

Циклооксигеназа-2 (COX-2) катализирует превращение арахидоновой кислоты в простагландин H₂ на первой стадии биосинтеза простагландинов, тромбоксанов и простациклинов. COX-2 увеличивает темп развития кровеносных

сосудов и рост опухоли, а также блокирует развитие апоптоза. Ген циклооксигеназы-2 — *PTGS2*.

Ген *TP53* кодирует транскрипционный фактор, который при повреждении генома вызывает задержку клеточного цикла в фазе G₁ и способствует апоптозу. В опухолевых клетках происходит нарушение функции гена: программа апоптоза переключается на программу неограниченной пролиферации.

Теломераза — фермент, кодируемый геном *hTERT*, необходимый для поддержания стабильности хромосом в процессе деления клетки и присутствующий в норме лишь в небольшом пуле активно делящихся клеток. В злокачественной опухоли теломераза играет ключевую роль в поддержании пролиферативного потенциала клеток и дальнейшего роста опухоли. ДНК-последовательность на концах хромосом (теломерах) состоит из тандемных повторов TTAGGG, которые предохраняют концы хромосом от рекомбинации и слияния, стабилизируя тем самым структуру хромосом. С течением времени в результате старения клетки длина теломерных повторов на концах хромосом уменьшается. Теломераза достраивает теломерные последовательности на концах хромосом, препятствуя сокращению их длины, что связано с увеличением продолжительности жизни клетки. Активность теломеразы определяется экспрессией гена *hTERT* и выявляется в опухолях желудка вне зависимости от гистологической структуры и стадии заболевания.

2.3.9. Выделение РНК

Тотальная клеточная РНК выделялась методом, предложенным Чомчински П. с некоторыми модификациями. Образец ткани (массой до 100 мг) после оттаивания на льду измельчался в стеклянном гомогенизаторе в присутствии 660 мкл раствора Д, содержащего 4 М гуанидинтиоционат, 25 мМ цитрат натрия (рН 7,0), 0,5% саркозил и 0,1 М β-меркаптоэтанол. К полученному гомогенату добавлялось 60 мкл 2 М ацетата натрия (рН 4,0), полученное быстро перемешивалось на вихревом смесителе, вносили 720 мкл смеси фенол-хлороформ

с изоамиловым спиртом (5:1) и вновь перемешивали на вихревом смесителе в течение 10 с. Пробирки помещались на лед и инкубировались в течение 15 мин. По окончании инкубации образцы центрифугировались при 10000 g в течение 15 мин при +4°C. Водная фаза аккуратно отбиралась, не затрагивая органическую фазу и интерфазу, переносилась в чистую пробирку и проводилась повторная экстракция равным объемом смеси фенол-хлороформ с изоамиловым спиртом (5:1). К отобранной водной фазе добавлялся равный объем смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1), полученное быстро перемешивалось на вихревом смесителе и центрифугировалось при 10000 g в течение 5 мин при +4°C. Экстракция смесью хлороформ-изоамиловый спирт проводилась дважды. Далее к водной фазе добавлялось 2,5 объема холодного 96% этанола, полученное перемешивалось на вихревом смесителе и оставлялось на ночь при -20°C для осаждения. Далее образцы центрифугировались при 10000 g в течение 20 мин при +4°C, надосадочная жидкость сливалась, а осадок промывался дважды холодным 70% этанолом. После каждого промывания образцы центрифугировались при 10000 g в течение 15 мин при +4°C. Далее осадки высушивались и растворялись в стерильной деионизованной воде, обработанной ДЭПК (0,1% раствор) и содержащей 0,1 мМ ЭДТА. Растворы РНК хранились при -70°C.

Концентрация полученных растворов РНК измерялась на спектрофотометре по поглощению при длине волны 260 нм на основе зависимости: 1 оптическая единица соответствует 40 мкг в 1 мл РНК. Чистота РНК определялась по отношениям поглощений при длинах волн 260, 280, 230 нм. Качество РНК считалось удовлетворительным, если оно соответствовало отношению $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$ и отношению $A_{260}/A_{230} > 2$.

Для оценки целостности выделенной РНК проводился анализ 1 мкг каждого образца электрофорезом в 1,5% агарозном геле, содержащем бромистый этидий (0,5 мкг на 1 мл геля), в 1хТВЕ (рН 8,3). Целостность РНК оценивалась визуально при облучении геля на УФ-трансиллюминаторе (λ 300 нм) по наличию двух субъединиц (28S и 18S) рибосомальной РНК.

2.3.10. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

Анализ экспрессии исследуемых генов проводился с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Обратная транскрипция (синтез кДНК) проводилась в реакционной смеси конечным объемом 20 мкл, приготовленной на обработанной ДЭПК деионизованной стерильной воде и содержащей 67 мМ Трис-НСl (рН 8,8); 16,6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,01% (в/о) Tween 20; 4 мМ MgCl_2 ; 1 мМ каждого dNTP; 3,2 мкг гексамерных праймеров со случайной последовательностью; 10 мМ дитиотрейтола; 10 ед. ингибитора рибонуклеаз; 30 ед. рекомбинантной обратной транскриптазы М-MLV; 1 мкг тотальной РНК. Смесь инкубировалась при 42°C в течение 1 часа. Реакция останавливалась путем тепловой инактивации обратной транскриптазы, выдерживалась смесь при 94°C в течение 10 мин.

Полученная кДНК амплифицировалась методом ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров, специфичных первичной структуре кДНК исследуемых генов.

Нуклеотидные последовательности генов были взяты из базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Проверка геноспецифичности праймеров осуществлялась при помощи программ OligoVer.6.67 и VectorNTI. Места посадки праймеров для амплификации кДНК должны находиться в разных экзонах, тогда они будут специфически гибридизоваться с кДНК даже в присутствии в препарате примеси геномной ДНК, а длина продукта ПЦР, амплифицированного с примесной геномной ДНК, будет значительно больше длины ожидаемого продукта ПЦР, амплифицированного с кДНК.

ПЦР проводилась в реакционной смеси конечным объемом 50 мкл, содержащей 67 мМ Трис-НСl (рН 8,8); 16,6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,01% (в/о) Tween 20; 1,5 мМ MgCl_2 ; 0,2 мМ каждого dNTP; 15 пкмоль каждого из пары праймеров; 2,5 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы; 5 мкл реакционной ОТ-смеси, содержащей кДНК.

Продукты полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией разделялись электрофорезом в 1,5% агарозных гелях, содержащих 0,5 мкг/мл бромистого этидия. В качестве электрофорезного буфера использовался 1xTBE. При анализе экспрессии гена электрофорез проводился в 1,8% агарозном геле с последующей окраской геля раствором красителя SYBRGreen I (разведенного деионизованной водой 1:10000) в течение 40 мин при комнатной температуре и в темноте. Образцы вносились в лунки геля в объеме 10 мкл.

Гель снимался на цифровую фотокамеру Kodak и проводился анализ изображения на компьютере с помощью программ ImageJ 1.35I и QuantityOnev.4.4.0. Уровни экспрессии исследуемых генов нормализовались по отношению к уровню экспрессии конститутивного гена (β -актина), который принимался за единицу. Уровень экспрессии исследуемого гена ниже 0,15 отн. ед. расценивался как очень низкий, от 0,15 до 0,29 отн. ед. – низкий, от 0,3 до 0,54 отн. ед. – средний, от 0,55 до 0,99 отн. ед. – высокий, выше 1 отн. ед. – очень высокий (гиперэкспрессия).

В *третьей части* панели оценивалась активность теломеразы — белка, синтезируемого опухолевой клеткой. В качестве белкового маркера была выбрана теломераза, продукт экспрессии гена *hTERT*, — фермент, необходимый для поддержания стабильности хромосом в процессе деления клетки, играющий ключевую роль в поддержании пролиферативного потенциала клеток и опухолевого роста.

2.3.11. Определение теломеразной активности в ткани

В работе использовали метод определения теломеразной активности TRAP (telomericrepeat amplification protocol). Применяли модифицированный вариант метода, с неизотопной детекцией продуктов реакции.

В качестве положительного контроля в реакции использовалась перевиваемая культура лейкозных клеток K-562.

2.3.12. Получение лизатов ткани

Исследуемый образец ткани извлекался из контейнера, взвешивался на микровесах. Образец помещался в стеклянный гомогенизатор. В гомогенизатор добавлялся холодный (+4°C) лизирующий CHAPS-буфер, содержащий 10 мМ Tris – HCl (pH 7,5), 1 мМ MgCl₂, 1 мМ EGTA, 0,1 мМ PMSF, 5 мМ β-меркаптоэтанола, 0,5 % CHAPS и 10 % (в/о) глицерина. Лизирующий буфер добавлялся из расчета 30 мкл на 10 мг ткани, но не менее 70 мкл на один образец, вне зависимости от объема.

После добавления CHAPS-буфера и гомогенизации при температуре 3-5°C взвесь ресуспендировалась и инкубировалась при той же температуре в течение 30 мин. В процессе инкубации взвесь интенсивно перемешивалась с использованием вибромешалки через каждые 5 мин. Затем лизат центрифугировался в течение 30 мин при 4°C и 12000 g, после чего супернатант переносился в чистую пробирку без захвата осадка, разделялся на аликвоты числом 3—8 по 8—20 мкл (в зависимости от исходного объема лизата), и замораживался в жидком азоте. Готовые лизаты хранились при – 70°C до последующей обработки.

Лизаты из культуры клеток положительного контроля К-562 получались следующим образом. После размораживания клетки трижды промывались холодным фосфатно-солевым буфером, pH 7,4, собирались путем центрифугирования при 4°C и 1000g. После промывания к клеткам добавлялся холодный (+4°C) лизирующий буфер CHAPS. Дальнейшие манипуляции проводились аналогично описанной процедуре получения лизатов из ткани, но без этапа гомогенизации.

2.3.13. Определение концентрации белка в лизатах

Концентрация белка в лизатах определялась при помощи красителя Coomassie Brilliant Blue G-250 по стандартному методу Брэдфорда. Выбор метода был обусловлен тем, что при его использовании не происходит связывания красителя с компонентами CHAPS-буфера.

2.3.14. TRAP-анализ

TRAP-анализ проводился в реакционной смеси, содержащей 67 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 16,6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% Tween-20, 1,5 мМ MgCl_2 , 1 мМ EGTA, 150 мкМ каждого из четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTPs), 0,1 мкг TS-праймера (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'), 1–10 мкл тканевого экстракта, содержащего 0,6–4 мкг белка.

Для повышения точности исследования, при наличии достаточного количества лизата, для каждого образца использовалось 2 точки анализа – 2 и 4 мкг белка. В случае малой концентрации белка в лизате, использовалось максимально возможное количество белка, для добавления в раствор объемом 10 мкл. При внесении образца положительного контроля бралось количество белка, равное 0,4 мкг.

Конечный объем реакционной смеси доводился деионизованной водой до 48,5 мкл. В качестве отрицательного контроля в реакционную смесь вместо лизата добавлялось соответствующее количество мкл CHAPS-буфера. Реакционная смесь инкубировалась при 37°C в течение 25 мин. После инкубации смесь выдерживалась 5 мин при 94°C для инактивации теломеразы, а затем добавлялось 0,1 мкг CX – праймера (5'-CCСТТАСССТТАСССТТАСССТТА-3') и 2,5 ед. Taq ДНК-полимеразы (0,5 мкл). Конечный объем реакционной смеси составлял 50 мкл.

Далее реакционная смесь помещалась в термоциклер и проводилось 35 циклов ПЦР в режиме: 94°C – 60 с, 50°C – 60 с, 72 °C – 90 с.

2.3.15. Разделение и визуализация продуктов реакции

Разделение продуктов реакции осуществлялось методом электрофореза в 10% неденатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ), с использованием в качестве электродного буфера 1xTBE (0,1 М борной кислоты, 0,1 М Tris, 2 мМ EDTA). Образцы вносили в лунки геля в объеме 10 мкл, предварительно смешав их с 1,5 мкл буфера для нанесения образцов (р-р красителя OrangeG («Sigma»)) в 60 –

70 % глицерине).

Визуализация TRAP-продуктов проводилась на УФ – трансиллюминаторе ($\lambda = 300$ нм) после предварительного окрашивания геля в течение 30 мин в однократном водном растворе красителя SYBRGold («MolecularProbes», США). Для последующей оценки производилось получение цифровых снимков результатов электрофореза с использованием камеры Kodak DC-200.

2.3.16. Подсчет теломеразной активности и оценка результатов

Полученные изображения картины электрофореза для каждого образца оценивались качественно и количественно.

При качественной оценке (в градации «положительный-отрицательный») определялось наличие или отсутствие специфической «лестницы» продуктов TRAP в геле. Положительным считался результат, когда в геле четко визуализировались первые 4—5 полос, соответствующих продуктам с длиной, кратной 6. В случаях, если визуализировалась только первая полоса, либо определялись «пропуски» в нормальном ходе следования полос (неспецифическая картина), а также при полном отсутствии продуктов реакции результат реакции считался отрицательным (Рисунок 2.2).

Для полуколичественной оценки результатов использовался пакет программного обеспечения ImageJ версии 1.35I (OpenSourceSoftware). При этом суммарная интенсивность свечения дорожки положительного контроля принималась за 100%. Интенсивность свечения фрагментов ДНК рассчитывалась в виде процентного отношения к интенсивности свечения положительного контроля. После применения поправочного коэффициента (с целью учета различий количества белка в лизатах образца и положительного контроля) получался конечный результат, отражающий теломеразную активность для каждого конкретного образца, выраженную в процентах (относительных единицах).

Таким образом, для диагностики был предложен сложный компонент панели молекулярных маркеров, состоящий из ДНК-, РНК- и белковых маркеров.

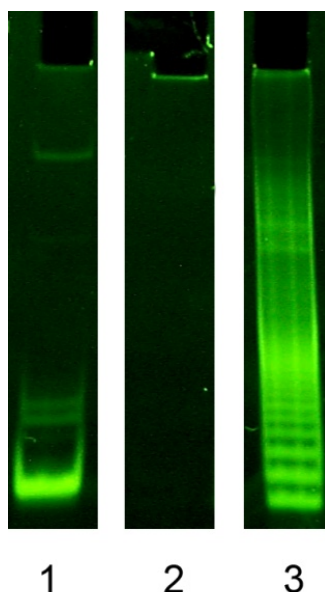


Рисунок 2.2 – Визуализация электрофореза TRAP-анализа ПЦР-продуктов (1 – отрицательный результат анализа, 2 – отрицательный результат анализа, 3 – положительный результат). Электрофорез в полиакриламидном геле

2.3.17. Получение тканевого материала для анализа системы маркеров

У 53 (50 %) пациентов в первой подгруппе исследования эндоскопически из края опухоли, точка 2э (Рисунок 2.3), был взят материал на этапе дооперационного обследования, то есть по тем же принципам, по которым он отбирается для предоперационного цитологического и гистологического исследований.

После резекции или удаления желудка, определения положения опухоли у всех 106 пациентов был иссечен участок ткани опухоли. Забор материала для исследования маркеров проводился следующим образом. Первый образец ткани, точка 1, забирался из верхнего края резекции, как минимум на 5 см выше верхнего видимого края опухоли; второй образец ткани, точка 2, — из визуально определяемой области опухоли (Рисунок 2.3). Третий образец ткани, точка 3, забирался из нижнего края резекции, как минимум 5 см вниз от нижнего видимого края опухоли; четвертый образец ткани (точка 4) — на расстоянии 0,5 см от видимого края опухоли, руководствуясь положением, что реальная граница опухоли может располагаться на расстоянии до 2–3 см при экзофитном росте опухоли, на 5–6 см при инфильтративном росте опухоли, а изменения по типу

дисплазии и метаплазии — на расстоянии до 7 см от видимого края опухоли. Общий объем получаемой ткани из одного участка забора составлял более 30 мкл. Для каждого образца, точки 1 – 4 и 2э, выполнялось гистологическое исследование на выявление опухолевых клеток, при определении опухоли проводилось ее гистотипирование.

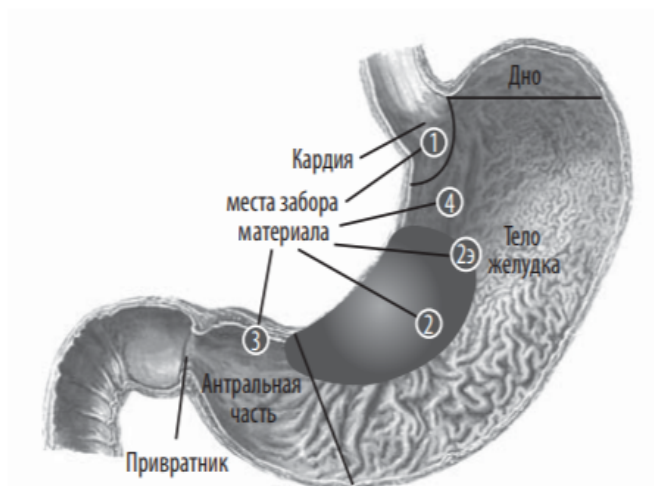


Рисунок 2.3 – Области забора тканевого материала (1–4, 2э) в исследуемой первой подгруппе пациентов

У всех 106 пациентов в каждом из образцов, точки 1–4, полученных интраоперационно, и у 53 (50 %) пациентов дополнительно из образцов, полученных эндоскопически, точка 2э, исследовалось аномальное метилирование генов *CDH1*, *RASSF1A*, *MLH1*, *TUSC3*, *DAPK* методом метил-чувствительной ПЦР с использованием рестрикционной эндонуклеазы HpaII, а также оценивалась экспрессия генов *hTERT*, *MMP7*, *MMP9*, *BIRC5*, *PTGS2*, *TP53*. Анализ экспрессии исследуемых генов металлопротеиназ *MMP7*, *MMP9*, *BIRC5*, *PTGS2*, *TP53* и *hTERT* проводился с помощью ПЦР с обратной транскрипцией. Также у всех пациентов в каждом из образцов, полученных интраоперационно, исследовалась активность теломеразы модифицированным методом TRAP.

С целью оценки уровня маркеров была сформирована группа сравнения, в которую вошли 50 пациентов с Желчнокаменной болезнью, хроническим калькулезным холециститом. В группе сравнения (больные желчнокаменной

болезнью (ЖКБ)) для исследования молекулярных маркеров использовали эндоскопический материал, который был взят на этапе дооперационного обследования для последующих цитологического и гистологического исследований. Во всех 50 образцах группы сравнения определялись те же маркеры, что и в первой подгруппе исследования.

2.3.18. Молекулярные маркеры, определяющие тактику комбинированного лечения при раке желудка, регистрируемые во второй подгруппе исследования

У 80 пациентов больных группы исследования, включенных во вторую подгруппу, определялись молекулярные изменения в опухолевой ткани, полученной интраоперационно, посредством генотипирования по полиморфизмам гена *TYMS* (R2/R3, G>C, Del6bp) и гена *TP53* (72 Arg>Pro, Ins16bp).

Полиморфизмы гена *TYMS*. Фермент тимидилатсинтаза (ТС) участвует в синтезе de novo нуклеотидов тимина и урацила (dTMP, dUMP), необходимых для синтеза ДНК, и является мишенью для лекарств, в частности производных фторпиримидинов. Экспрессия ТС является ключевым фактором, определяющим чувствительность к 5-фторурацилу (5-ФУ). Низкая экспрессия ТС у больных связана с большей чувствительностью к проведенному лечению и наоборот. В свою очередь активность ТС зависит от полиморфизмов ДНК, которые находятся в регуляторной области и влияют на резистентность к 5-ФУ.

Полиморфизмы гена *TP53*. *TP53* – ген, кодирующий транскрипционный фактор, который при повреждении генома вызывает задержку клеточного цикла в фазе G1 и способствует апоптозу. Полиморфизмы гена *TP53* влияют на активность белка p53 в отношении индукции апоптоза, что, в свою очередь, изменяет чувствительность к химиопрепаратам и их эффективность. В связи с этим, ответ на химиотерапию может различаться у лиц, несущих различные по функциональной активности аллели генов, контролирующих процессы репарации и апоптоза.

2.3.19. Исследование полиморфизмов гена *TYMS* и полиморфизмов гена *TP53*

Генотипирование полиморфных маркеров гена *TYMS*, расположенных в 5' (*TSER* G>C) и гена *TP53*: Arg > Pro в 72 проводилось с помощью цепной полимеразной реакции (ПЦР) с последующим анализом длин рестрикционных фрагментов. Термостабильная ДНКполимераза Taq получена от НПО «Биотех» (Москва), протеиназа К — фирмы «Merck» (Германия). Синтез использованных в работе олигонуклеотидных праймеров выполнен НПО «Синтол» (Москва). Геномная ДНК выделялась из цельной замороженной крови пациентов посредством инкубации с протеиназой К, с последующей экстракцией фенолом-хлороформом, и высаживалась 96% этанолом. Полученный осадок высушивался на воздухе и растворялся в 100 мкл буфера TE.

ПЦР проводилась на термоциклере «Терцик» ДНК-технологии, в 25 мкл среды, содержащей 67 mM Трис HCl, pH 8,8, 16,6 mM сульфат магния, 2 mM хлорид магния, 0,01% раствор твин-20, 10% раствор диметил-сульфоксид, 0,2 mM каждого dNTP, по 25 нг праймеров, указанных в таблице, 20—50 нг геномной ДНК и 0,5 ед. Taq-полимеразы. ПЦР проводилась по программе: 94°C/30с; 55-60°C/30 с, 72 °C/30 с. в течение 35 циклов. Последовательности праймеров, температура их отжига и длины, полученных в результате ПЦР фрагментов, приведена в Таблице 2.2. Продукты ПЦР разделяли в ПААГс последующей окраской нитратом серебра.

Таблица 2.2 – Праймеры для исследуемых полиморфизмов, режимы их отжига и длины полученных фрагментов

Полиморфизм	Последовательность праймеров	Условия ПЦР		Размер продукта п.н.
		T°отж.	MgCl ₂	
<i>TYMS</i> <i>TSER</i> , G>C	F: gcg gaa ggg gtc ctg cca R: tcc gagccg gcc aca ggc at	60°C	3,0	107-135
<i>TYMS</i> del 6	F: caa atc tga ggg agc tga gt R: cag ata agt ggc agt aca ga	60°C	3,0	148

Продолжение Таблицы 2.2

Полиморфизм	Последовательность праймеров	Условия ПЦР		Размер продукта п.н.
		T°отж.	MgCl ₂	
<i>TP53</i> Arg>Pro	F: ttg ccg tcc caa gca atg gat ga R: tct ggg aag gga cag aag atg ac	55°C	3,0	199
<i>TP53</i> Ins 16	F: ctg aaa aca acg ttc tgg ta R: aag ggg gac tgt aga tgg gtg	57°C	3,0	134

Полиморфные аллели гена *TUMS* (TSER и del6) определялись анализом длины полученных фрагментов в ПААГ, после окрашивания нитратом серебра. Аллели полиморфного маркера гена *TUMS*, в 5' (TSER G>C) определялись путем обработки полученного продукта ПЦР, фрагмента ДНК длиной от 107 до 135 пар нуклеотидов рестриктазой *NotI* (фирма «Сибэнзим»). У носителей аллеля G в результате рестрикции появлялся фрагмент на 66 пар нуклеотидов, а аллель C остается нерасщепленным.

Полиморфные аллели гена *TP53* (ins 16) определялись путем анализа длины полученных фрагментов в ПААГ после окрашивания нитратом серебра. Аллели полиморфного маркера Arg72Pro гена *TP53* определялись путем обработки амплифицированного фрагмента ДНК длиной 199 п.н. рестриктазой *Bsh1236I*. Фрагмент ДНК, содержащий аллель Arg, расщепляется этой рестриктазой, образуя продукты размером 110 и 89 п.н., тогда как фрагмент ДНК, содержащий аллель Pro, остается нерасщепленным.

2.4. Предоперационная подготовка больных

Целью предоперационной подготовки являлось обеспечение больному возможности перенести хирургическое вмешательство с меньшими потерями и сделать его как можно более легким для пациента и технически более простым для оператора. Адекватная предоперационная подготовка базировалась на полноценном обследовании. Необходимость проведения специальных

мероприятий в предоперационном периоде определялась наличием и характером осложнений рака желудка, а также выявленными сопутствующими заболеваниями и их тяжестью.

Обязательный план предоперационного обследования в соответствии с клиническими рекомендациями обычно включал следующие позиции:

- Общий анализ крови и мочи.
- Группа крови и резус-фактор, фенотип.
- Коагулограмма.
- Расширенный биохимический анализ крови.
- Электрокардиограмма.
- ЭГДС с биопсией образования и последующим цитологическим и гистологическим исследованиями полученного материала.
- ФВД.
- Рентгенография пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки.
- УЗИ органов брюшной полости и забрюшинного пространства.
- Консультация терапевта.
- КТ органов грудной клетки.
- КТ органов брюшной полости и головного мозга с внутривенным контрастированием.
- Другие исследования, в том числе сцинтиграфия костей скелета, ЭХОкг, суточное мониторирование АД, ЭКГ мониторинг.
- Консультации смежных специалистов по поводу сопутствующих заболеваний.

Обследование по возможности выполнялось амбулаторно, если выяснялось, что пациент какой-либо специальной подготовки не требует, его оперировали на следующий день после поступления в стационар.

В сложных клинических ситуациях, а также при наличии декомпенсированных сопутствующих, а по сути конкурирующих заболеваний, при выраженном алиментарном дефиците госпитализация пациента осуществлялась

за 7—10 дней до оперативного лечения, при возможности подготовка пациента проводилась на базе терапевтического отделения (кардиологического, эндокринологического и других) под наблюдением хирурга-онколога.

2.5. Оперативное лечение пациентов

Всем пациентам группы исследования было выполнено плановое оперативное вмешательство.

Объем операции определялся распространенностью и стадией опухолевого процесса, локализацией и размерами опухоли, морфологическими характеристиками новообразования; наличием или отсутствием поражения регионарных лимфоузлов, общим состоянием больных и возрастом; наличием сопутствующих патологий, а также показателями молекулярных маркеров.

Больным группы исследования были выполнены следующие типы операций: субтотальная дистальная резекция желудка, предельно субтотальная резекция желудка, гастрэктомия, субтотальная проксимальная резекция желудка.

2.5.1. Субтотальная дистальная резекция желудка

Показанием к выполнению субтотальной дистальной резекции желудка являлся рак антрального отдела желудка при отсутствии очагов тяжелой дисплазии и рака *in situ* в остающейся части желудка.

Ниже представлена методика, по которой проводилось оперативное пособие.

При проведении субтотальной дистальной резекции желудка пациент располагался на операционном столе лежа на спине с уложенным поперечно в области ниже-грудного отдела позвоночника валиком.

Верхнесрединная лапоротомия производилась от уровня мечевидного отростка. Далее ретракторами Сигала или с использованием кругового ранорасширителя реберные дуги растягивались в стороны.

Ревизия начиналась с осмотра брюшной полости на предмет асцита, канцероматоза, наличия метастазов в малом тазу и печени. Всегда проводилась пальпация печени на предмет внутрипеченочных метастазов.

Оценивалась мобильность желудка с опухолью, наличие инвазии в окружающие ткани, вторичное поражение лимфатических узлов. Желудок и поперечная ободочная кишка выводились в рану. Большой сальник натягивался между желудком и поперечной ободочной кишкой и отсекался электроножом в бессосудистой зоне у линии прикрепления к поперечной ободочной кишке вместе с передним листком мезаколон, данная манипуляция проходила почти бескровно. Справа сальник отсекался, при этом проходящие в нем сосуды брались на зажимы, пересекались и перевязывались отдельно. Весь конгломерат лимфатических узлов с клетчаткой между листками желудочно-ободочной связки смещался от головки поджелудочной железы в сторону с проходящей здесь левой желудочно-сальниковой артерией, пересекался и перевязывался. Желудок за большой сальник вытягивался кверху. Рассекалась желудочно-поджелудочная связка у ткани поджелудочной железы до сосудов. Клетчатку и лимфатические узлы сдвигали кверху, а левая желудочная артерия и сопровождающая ее вена брались на зажимы у самой поджелудочной железы отдельно, пересекались и перевязывались. Печень отодвигалась ретрактором кверху, через сальниковую сумку вводился палец к печеночно-желудочной связке, и, потягивая привратник книзу, на зажимы бралась правая желудочная артерия. Лимфатические узлы и клетчатка смещались к желудку, а артерия пересекалась и перевязывалась. В бессосудистой зоне ближе к печени рассекался малый сальник до пищевода. Оттянув кардиальный отдел желудка книзу и влево, на зажим бралась оставшаяся часть поджелудочно-желудочной связки с проходящими здесь короткими желудочными артериями, две из которых выделялись и перевязывались, далее пересекалась связка. При этом всегда прослеживалась задняя желудочная артерия, она обязательно сохранялась. От кардиального отдела желудка и пищевода порциально отсекался на зажимах малый сальник.

По завершении мобилизации желудка проводилась его резекция. По линии резекции накладывался линейный сшивающий аппарат, желудок пересекался в проксимальной части.

Ниже привратника, но не более чем 4 см, так как ниже по задней стенке возможно расположение фатерова соска, накладывался линейный сшивающий аппарат, проводилось пересечение органа, таким образом отсекалась дистальная часть удаляемого комплекса.

Далее формировался гастродуоденоанастомоза по Бильрот-I конец в конец, как наиболее физиологичный.

Формирование гастродуоденоанастомоза по Бильрот-I предусматривало непосредственное соединение культи желудка с двенадцатиперстной кишкой после резекции желудка. На большой кривизне оставлялся незашитый участок культи желудка, по диаметру равный просвету двенадцатиперстной кишки. В случае наложения трехрядного скрепочного шва линия механических швов на желудке не перитонезировалась, в случае наложения двухрядного скрепочного шва линия швов на культе желудка перитонезировалась серозно-серозным обвивным непрерывным швом или погружным швом.

В последующем производилось наложение желудочно-кишечного анастомоза, шов выполнялся двурядный.

Если по тем или иным причинам наложение желудочно-кишечного анастомоза было невозможно, то формировался желудочно-тонкокишечный анастомоз по Бильрот-II и дополнительный межкишечный анастомоз.

Дренирование брюшной полости выполнялось по стандартной методике тремя дренажами, брюшная полость ушивалась.

2.5.2. Предельно субтотальная дистальная резекция желудка

Показанием к проведению предельно субтотальной дистальной резекции желудка являлось поражение пилороантрального отдела с экзофитным характером роста опухоли, рак нижней трети тела желудка с распространением в

проксимальном направлении опухоли не выше 3 см от угла желудка у больных со сниженными репаративными процессами, а также с тяжелыми сопутствующими заболеваниями. Также необходимым условием выполнения предельно субтотальной дистальной резекции желудка являлось отсутствие очагов тяжелой дисплазии и рака *in situ* в остающейся части желудка.

Оперативное пособие выполнялось аналогично методике, описанной выше. Отличие состояло в том, что линия резекции по малой кривизне проходила на уровне пищеводно-желудочного перехода, по большой кривизне ниже второй короткой желудочной артерии при обязательном сохранении задней желудочной артерии для адекватного кровоснабжения культи желудка. При необходимости выполнялась мобилизация двенадцатиперстной кишки с целью исключения натяжения швов гастро-дуоденоанастомоза.

2.5.3. Гастрэктомия

Показанием к проведению гастрэктомии являлись все случаи рака желудка, кроме рака антрального отдела при отсутствии очагов тяжелой дисплазии и рака *in situ* в остающейся части желудка, рака кардиоэзофагеального перехода, а также небольших опухолей кардиального отдела или дна желудка экзофитной или смешанной формы роста, резектабельный рак желудка типа *linitis plastica*, недифференцированные формы рака, синдрома наследственного диффузного рака желудка.

Ниже представлена методика, по которой проводилось оперативное пособие.

При проведении гастрэктомии пациент располагался на операционном столе лежа на спине с уложенным поперечно в области ниже-грудного отдела позвоночника валиком.

Верхнесрединная лапоротомия производилась от мечевидного отростка или выше мечевидного отростка, при необходимости последний скусывался костными кусачками.

Далее ретракторами Сигала или с использованием кругового ранорасширителя реберные дуги растягивались в стороны. При необходимости выполнялась сагиттальная диафрагмотомия, которая обеспечивала доступ как к пищеводу, так и к заднему средостению с внутригрудными лимфоколлекторами.

Ревизия начиналась с осмотра брюшной полости на предмет асцита, канцероматоза, наличия метастазов в малом тазу и печени. Всегда проводилась пальпация печени на предмет внутripеченочных метастазов.

Пальпаторно определялась локализация опухоли, ее подвижность, степень поражения пищевода, вовлеченность соседних анатомических структур, в частности врастание опухоли в поджелудочную железу и чревный ствол. При необходимости использовалось интраоперационное УЗИ.

В последующем оценивались лимфоколлекторы по ходу брыжейки тонкой и толстой кишки, оценивалась область левой желудочной артерии. Производилась оценка области поджелудочной железы и области двенадцатиперстной кишки. Оценка тканей производилась по мере выделения желудка с сальниками.

После рассечения триангулярной связки мобилизовалась левая доля печени и отводилась крючком. Для обнажения левой ножки диафрагмы рассекались диафрагмально-кардиальная и печеночно-кардиальная связки. Далее пальцем пищевод мобилизовался по окружности и брался на держалку.

Рассекалась пищеводно-диафрагмальная связка, перевязывались с прошиванием концы диафрагмальной вены. При необходимости, начиная от пищевода отверстия диафрагмы, рассекалась диафрагма в сагиттальном направлении, при этом она предварительно отслаивалась пальцем, чтобы избежать вскрытия перикарда и медиастинальных синусов. Пальцами выделялся пищевод в заднем средостении. После пересечения переднего и заднего блуждающих нервов пищевод считался выделенным и свободно лежал в брюшной полости. При необходимости из данного доступа производилась мобилизация пищевода до бифуркации трахеи.

Дальнейшая мобилизация производилась в едином блоке и включала припаровку желудочно-ободочной связки с сальником и передним листком брыжейки толстой кишки, брюшиной, покрывающей поджелудочную железу.

Выделение желудка осуществлялось до ворот селезенки с прошиванием соответствующих сосудов, селезенка сохранялась.

После окончательного выделения желудка по большой кривизне пересекались соответствующие сосуды, желудок отводился в сторону и таким образом производился доступ к подлежащей клетчатке, которая также включалась в удаляемый препарат. Дальнейшее выделение препарата осуществлялось вместе с малым сальником, пересекались соответствующие сосуды и производилась резекция орально на уровне абдоминального отдела пищевода, аборально – на уровне двенадцатиперстной кишки.

При резекции пищевода всегда удалялся его абдоминальный отдел и часть нижнегрудного отдела.

Двенадцатиперстная кишка прошивалась двурядным швом вручную или накладывался трехскрепочный аппаратный шов без его дополнительной перитонизации.

Непрерывность желудочно-кишечного тракта восстанавливалась выполнением позадиободочного пищеводно-тонкокишечного двурядного арэфлюксного анастомоза по типу конец-в-конец с межкишечным анастомозом по Ру конец-в-бок. Также возможно было выполнение пищеводно-кишечного анастомоза по типу конец-в-конец с использованием сшивающего аппарата CDH23 или CDH25.

После оценки ангиоархитектоники формировалось окно в брыжейке толстой кишки. Петля тонкой кишки длиной не менее 35 см подводилась к пищеводу, пересекалась для формирования антирефлюксного анастомоза с последним путем наложения двурядного шва.

Всегда устанавливались зонд для декомпрессии, а также зонд для последующего кормления пациента.

Дренирование брюшной полости выполнялось по стандартной методике тремя дренажами, брюшная полость ушивалась.

2.5.4. Субтотальная проксимальная резекция желудка

Показанием к субтотальной проксимальной резекции желудка являлся рак кардиоэзофагеального перехода, а также небольшие опухоли кардиального отдела или дна желудка экзофитной или смешанной формы роста.

Ниже представлена методика, по которой проводилось оперативное пособие.

Первым этапом выполнялась верхнесрединная лапаротомия, начиная от мечивидного отростка грудины, который при необходимости скусывался костными кусачками.

Далее выполнялась ревизия органов брюшной полости, уточнение положения и распространенности опухоли. Мобилизация желудка производилась вместе с большим и малым сальниками и передним листком мезоколон.

Производилось выделение нижней трети пищевода, осуществлялась ревизия органа и лимфоколлекторов, мобилизованная клетчатка включалась в препарат.

Желудок выделялся таким образом, чтобы соответствующие сосуды, питающие его по правой стороне, были сохранены, те, что питали по левой, – пересекались, при этом в препарат включалась мобилизованная клетчатка. Зона резекции проходила выше привратника, при этом вся малая кривизна с клетчаткой включалась в препарат. Таким образом формировалась желудочная трубка, которая подшивалась к пищеводу, и формировался антирефлюксный анастомоз с использованием двурядного шва.

Всегда устанавливались зонд для декомпрессии, а также зонд для последующего кормления пациента.

Дренирование брюшной полости выполнялось по стандартной методике тремя дренажами, брюшная полость ушивалась.

2.5.5. Лимфаденэктомия

Стандартный объем лимфаденэктомии в ходе проведенных операций рассчитывался как D2 при проведении радикальных операций, в случае проведения исходно циторедуктивных операций объем лимфаденэктомии уменьшался до D1, объем лимфаденэктомии D3 выполнялся крайне редко, в основном при комбинированных операциях, когда осуществлялась попытка избежать циторедукции в пользу радикально выполненного пособия.

Таким образом лимфаденэктомия в основном выполнялась в объеме D2, который включает в себя при гастрэктомии: удаление 1 - 7, 8a, 9, 10, 11p, 11d и 12a групп лимфатических узлов (+19, 20, 110 и 111 групп ЛУ при переходе опухоли на пищевод); при дистальной резекции желудка: удаление 1, 3, 4sb, 5, 6, 7, 8a, 9, 11p и 12a групп лимфатических узлов.

Лимфаденэктомия D3 с удалением парааортальных лимфоузлов в области средней ободочной вены и верхней брыжеечной вен с выявленными изменениями в данных группах лимфоузлов проводилась редко.

Лимфаденэктомия в объеме D1 включала в себя удаление следующих групп лимфатических узлов при гастрэктомии: удаление 1 - 7 групп лимфатических узлов, при дистальной резекции желудка: удаление 1, 3, 4sb, 5, 6 и 7 групп лимфатических узлов; при проксимальной резекции желудка: удаление 1, 2, 3a, 4sb, 4sa и 7 групп лимфатических узлов.

2.5.6. Результаты лечения пациентов группы исследования

Из 800 пациентов группы исследования гастрэктомия была выполнена 54% (432 человека), резекция желудка была выполнена 46% (368 человек), при этом субтотальная дистальная резекция желудка в том числе предельно субтотальная дистальная резекция желудка была выполнена 285 пациентам (35,6%), а субтотальная проксимальная резекция желудка была выполнена 83 пациентам (10,4%).

Экзофитный характер роста опухоли отмечен у 7 % пациентов (56), эндофитный (инфильтративно-язвенный и инфильтративный) – у 75% (600), смешанный характер выявлен у 18% (144).

По результатам послеоперационного гистологического исследования I стадия рака диагностирована у 22,5% (180) пациентов, II – у 21,5% (172), III – у 29% (232), IV – 27% (216).

У большинства пациентов (92,0%; 736 человек) выявлена аденокарцинома различной степени дифференцировки по гистологическому строению, при этом у большинства диагностированы низкодифференцированные формы и перстневидно-клеточный рак (61,0 %, 488 пациентов). Недифференцированный рак диагностирован у 4,0% (32) больных, плоскоклеточный – у 1,5% (12). 2,5% (20) составили другие формы злокачественных образований.

Локализация опухоли в теле желудка выявлена у 45,0% пациентов (360), субтотально-тотальное поражение органа – у 15,0 % (120), кардиоэзофагеальный рак – у 40,0 % больных (320).

Из общего числа проанализированных пациентов радикальный характер (R0) операция носила у 576 (72%), у 224 (28%) – циторедуктивный характер.

2.5.6.1. Результаты лечения пациентов в первой подгруппе исследования

Всем 106 пациентам из первой подгруппы исследования было проведено плановое оперативное вмешательство: в объеме гастрэктомии у 42 (40%) больных, субтотальной проксимальной резекции у – 21 пациента (20%), субтотальной дистальной резекции желудка – у 43 (40%), с лимфаденэктомией в объеме D1 у 9 (8,5%) пациентов, D2 у 85 пациентов (80%), D3 – у 13 (11,5%).

Во всех случаях в материале, взятом из опухоли интраоперационно, в последующем при гистологическом исследовании были выявлены опухолевые клетки. Во всех биопсийных образцах из краев резекции было подтверждено отсутствие опухолевых клеток и наличие атрофического гастрита либо атрофического гастрита в сочетании с кишечной метаплазией и/или дисплазией

различной степени.

Гистологические варианты опухолей были следующими: аденокарцинома различной степени дифференцировки, перстневидно-клеточный рак, недифференцированный рак [6]. При этом на долю высокодифференцированной аденокарциномы пришлось 16 (15 %) случаев, умеренно-дифференцированной аденокарциномы – 34 (32 %), низкодифференцированной аденокарциномы – 32 (30,2 %), перстневидно-клеточного рака – 22 (20,8 %), недифференцированного рака – 2 (2 %).

Равное количество пациентов имели интестинальный и диффузный типы рака желудка по классификации P. Lauren.

По размеру опухоли пациенты разделились на следующие подгруппы: до 2 см — 28 (26,4 %) больных, 2–4 см — 16 (15,1 %), более 4 см — 62 (58,5 %).

Более чем у половины пациентов (58,5 %) опухоль была более 4 см в диаметре.

По распространенности опухолевого процесса пациенты разделились на следующие группировки, результаты представлены ниже на Рисунке 2.4 и Рисунке 2.5.

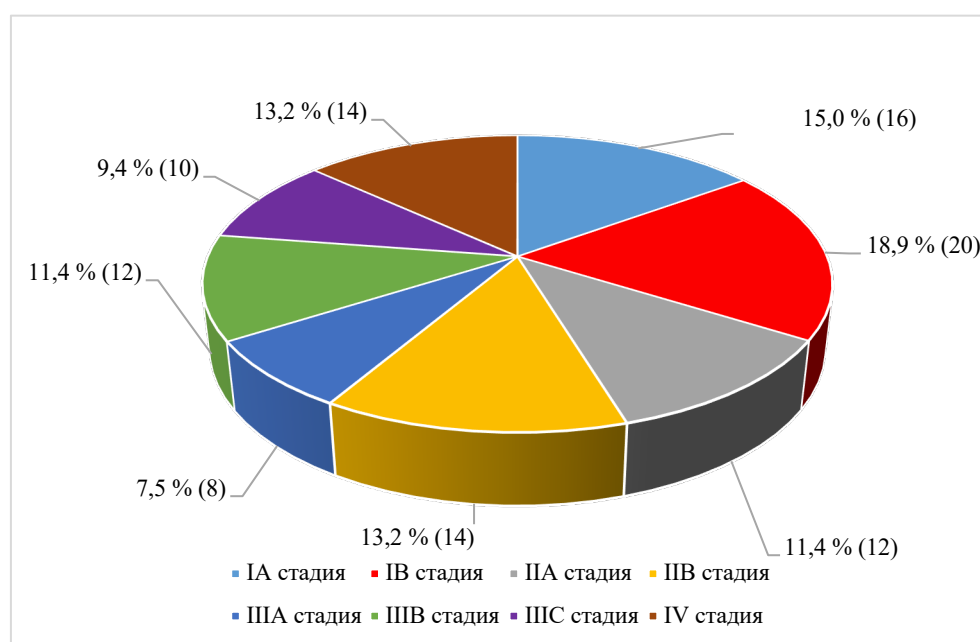


Рисунок 2.4 – Распределение пациентов в зависимости от стадии заболевания (% и абс.)

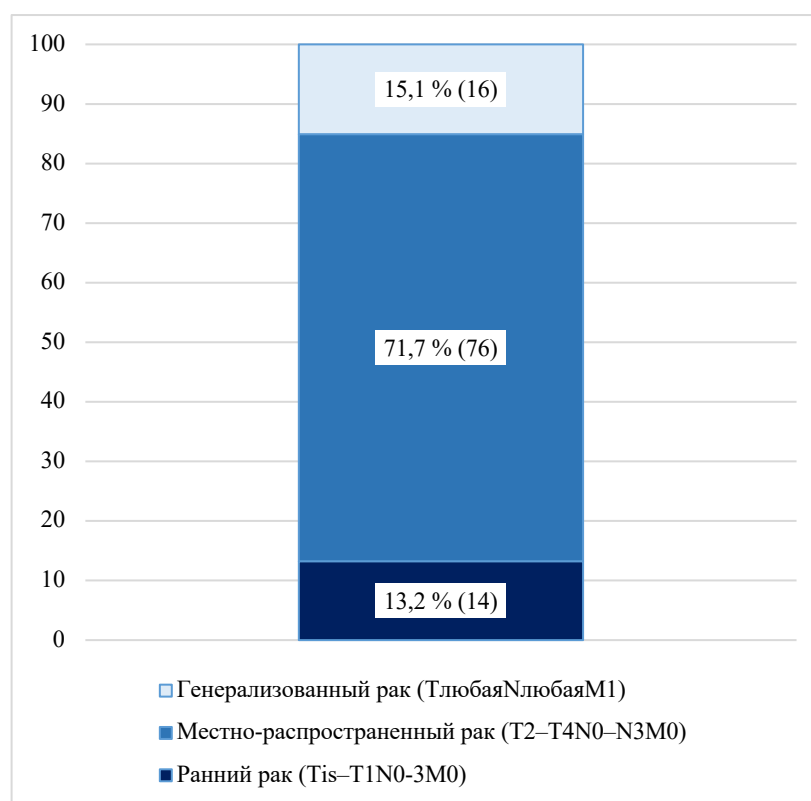


Рисунок 2.5 – Распределение пациентов в зависимости от распространенности опухолевого процесса (% и абс.)

2.5.6.2. Результаты лечения пациентов во второй подгруппе исследования

Всем 80 пациентам было выполнено радикальное оперативное вмешательство: гастрэктомия, субтотальная либо предельно субтотальная дистальная резекция желудка с гистологически подтвержденными интактными краями резекции (R0).

Всем 80 пациентам из группы исследования, у которых планировалась оценка использования молекулярных маркеров в определении комбинированного лечения при раке желудка, было проведено плановое оперативное вмешательство: в объеме резекции желудка 34 пациентам (43%), гастрэктомия выполнена 46 пациентам (57%).

Распределение больных в зависимости от вида и объема оперативного вмешательства представлено в Таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Распределение больных в зависимости от вида и объема оперативного лечения

Признак	Количество больных n=80 (100%)
Объем оперативного лечения	
➤ гастрэктомия	➤ 46 (57%)
➤ резекция желудка	➤ 34 (43%)
Объем лимфаденэктомии	
➤ D1	➤ 3 (4%)
➤ D2	➤ 73 (91%)
➤ D3	➤ 4 (5%)
Метод лечения	
➤ Только оперативное	➤ 22 (27%)
➤ Комбинированное	➤ 58 (73%)
Вид комбинированного вмешательства	
➤ Холецистэктомия	➤ 36 (45%)
➤ Резекция пищевода	➤ 30 (37%)
➤ Резекция ножек диафрагмы	➤ 8 (10%)
➤ Спленэктомия	➤ 8 (10%)
➤ Резекция поджелудочной железы	➤ 5 (6%)
➤ Резекция мезоколон	➤ 3 (4%)
➤ Резекция поперечно-ободочной кишки	➤ 1 (1%)
➤ Атипичная резекция печени	➤ 1 (1%)
➤ Адреналэктомия	➤ 1 (1%)

Гастродуоденоанастомоз по Бильрот-I сформирован 27 больным (34%), Бильрот-II — 7 (9%).

Лимфаденэктомия выполнена в объеме D1 – 3 пациентам (4%), D2 – 73 (91%) пациентам, D3 – 4 пациентам (5%).

Из 80 больных у 54,0% (43 человека) оперативное вмешательство имело комбинированный характер, причем у одного пациента могло быть удалено или резецировано два и более органов. 45,0% (36 больным) выполнена холецистэктомия, 37,0% (30) – резекция пищевода, 10,0 % (8) – резекция ножек диафрагмы, 10,0 % (8) – спленэктомия, 6,0 % (5) – резекция поджелудочной железы, 4,0 % (3) – резекция мезоколон, по 1,0 % (1) – резекция поперечно-ободочной кишки, атипичная резекция печени и адреналэктомия.

Всем пациентам было выполнено гистологическое патоморфологическое исследование материала, полученного интраоперационно.

В зависимости от стадии опухолевого процесса пациенты разделились на следующие группировки: ПА стадия — 20 (25 %), ПВ стадия — 18 (22,5 %), ША стадия — 11 (13,75 %), ШВ стадия — 14 (17,5 %), ШС стадия — 17 (21,25 %). По размеру опухоли пациенты разделились на следующие подгруппы: до 2 см — 25 (31,25 %) больных, 2–4 см — 40 (50 %), более 4 см — 15 (18,75 %).

2.5.6.3. Результаты лечения пациентов в третьей подгруппе исследования

Всем 103 пациентам из группы исследования выполнено оперативное вмешательство: в объеме дистальной резекции желудка — 98 (94,2%), проксимальной резекции — 5 (4,8%) пациентов, стандартный объем лимфаденэктомии выполнен 85 пациентам (82,5%), расширенная лимфаденэктомия состоялась у 10 (9,7%).

У 8,7% (9) больных выполнены комбинированные вмешательства, 3,9% (4) — обширная резекция мезоколон, 2,9% (3) — атипичная резекция печени, 1,9% (2) — плоскостная резекция головки поджелудочной железы.

Гистологические варианты опухолей представлены аденокарциномой различной степени дифференцировки, перстневидно-клеточным раком и недифференцированным раком. На долю высокодифференцированной аденокарциномы пришлось 3,9 % случаев (4), умеренно-дифференцированной аденокарциномы — 33% (34), 42,7 % (44) составила низкодифференцированная аденокарцинома, 16,5 % (17) перстневидно-клеточный рак, недифференцированный рак — 4 (3,9 %).

Значительная часть опухолей гистологически была представлена соответственно низкодифференцированной (42,7%) и умеренно-дифференцированной аденокарциномой (33,0 %).

Несколько большее количество пациентов имели диффузный тип рака — 63,0% (65 человек) по классификации P. Lauren, у 37,0% (38 пациентов) был выявлен интестинальный тип рака желудка.

Вторичная лимфаденопатия была выявлено у 44% (45) пациентов, соответственно у остальных пациентов ее выявлено не было.

Первичный очаг до 2 см определялся у 20% (21) пациентов, средний размер опухоли, от 2 до 4 см, определялся у 22,5% (23), обширное поражение желудка, более 4 см в максимальном размере, определялось у 57,5% (59) пациентов.

По распространенности опухолевого процесса пациенты разделились на следующие группировки, результаты представлены на Рисунке 2.6 и Рисунке 2.7.

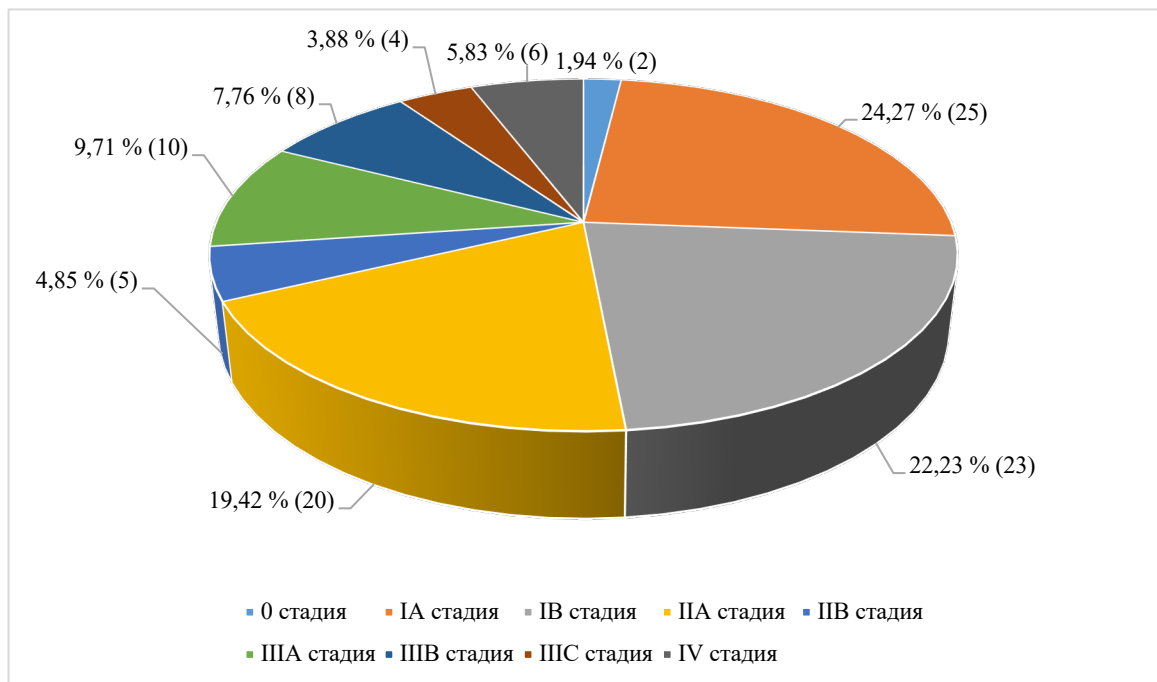


Рисунок 2.6 – Распределение пациентов в зависимости от стадии заболевания (% и абс.)

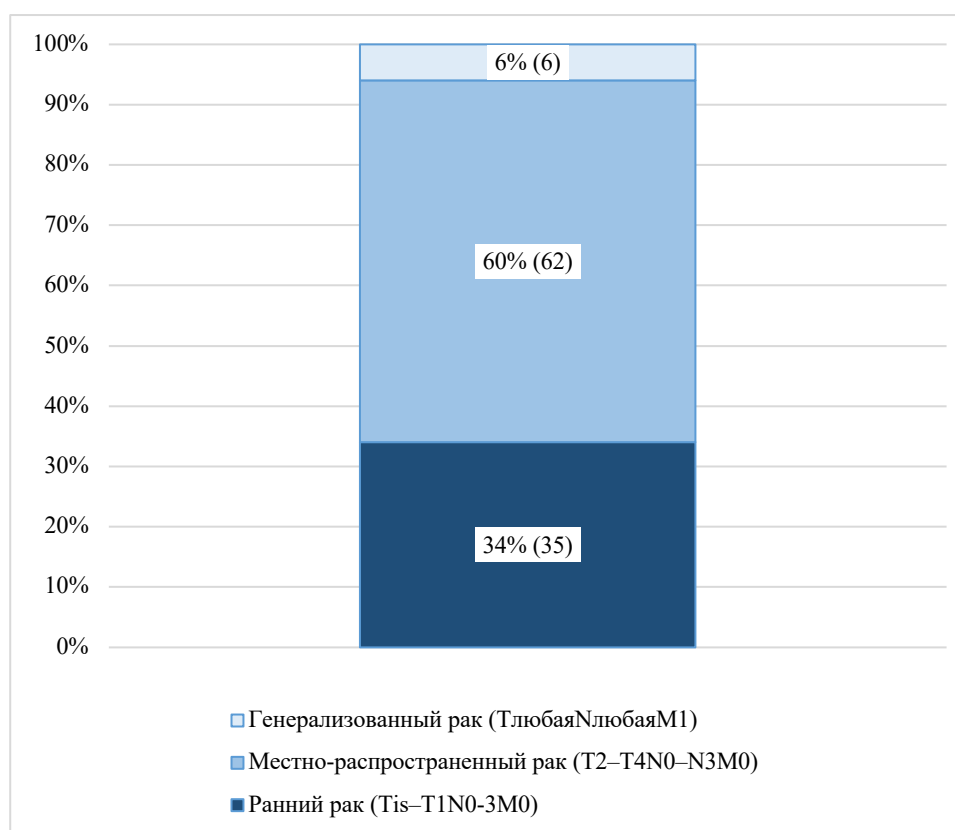


Рисунок 2.7 – Распределение пациентов в зависимости от распространенности опухолевого процесса (% и абс.)

2.5.7. Подходы к лечению местно-распространенного рака желудка

Ранний рак желудка (Tis, T1) подлежит хирургическому лечению. При этом выживаемость без дополнительных методов противоопухолевого воздействия составляет более 90 %. Основным методом лечения генерализованного рака желудка (M1), как и любого другого диссеминированного онкологического заболевания, является химиотерапия и/или использование таргетных препаратов. Местно-распространенные формы рака желудка представляют довольно разрозненную по распространенности и прогнозу группу опухолей (T2-T4N0-N3M0).

Отдаленные результаты хирургического лечения местно-распространенного рака желудка неудовлетворительные, так как распространение опухолевого процесса в таком объеме предполагает, что проведение лишь хирургического лечения является недостаточно эффективно.

Следует отметить, что хирургическое лечение у пациентов с третьей и четвертой стадиями опухолевого процесса во многом носит циторедуктивный характер. Однако оперативное лечение даже при такой распространенности опухолевого процесса является обязательным компонентом лечения, но требует сочетания с другими методами лечения с целью увеличения продолжительности жизни пациента и улучшения ее качества.

Изменение схем лечения рака желудка, препаратов, входящих в эти схемы химиотерапевтического лечения, ранее не учитывало молекулярный профиль опухоли и во многом носило эмпирический характер, что прослеживается и в настоящее время.

Таким образом, основой парадигмой комбинированного лечения на настоящий момент является оценка молекулярного профиля как опухоли, так генотипа самого пациента, которые в сочетании приводят к пониманию эффекта проводимого комбинированного лечения уже не *in vitro*, а *in vivo*.

В последнее время активно разрабатываются и активно внедряются в практику дополнительные молекулярные опухолевые маркеры, которые позволяют охарактеризовать степень агрессивности опухолевого процесса, спрогнозировать клиническое течение и чувствительность опухоли к проводимой терапии. К этим маркерам можно отнести структурные и функциональные повреждения, выявляемые в геноме опухолевой клетки. Подобные повреждения приводят к изменению генов-регуляторов клеточного цикла, показателей метастатической и инвазивной активности, к поломке генов, кодирующих адгезионные белки и факторы активности неоангиогенеза, аномальному метилированию регуляторных областей генов-супрессоров, изменению активности и экспрессии теломеразы в клетках опухолей и так далее. Указанные онкологические маркеры достаточно чувствительны и специфичны, просты в лабораторном исследовании, однако их применение требует тщательной научной разработки.

К другим методам в молекулярной онкологии относятся молекулярные исследования, направленные на характеристику генома пациента. Собственный генетический фон играет существенную роль в росте опухоли и определяет

чувствительность к намеченной терапии. Для этого проводят генотипирование пациента по полиморфным вариантам в генах, имеющих отношение к канцерогенезу желудка или влияющих на утилизацию и элиминацию лекарственных средств, используемых при лечении. Наличие определенных полиморфных вариантов в генах может значительно повышать риск рака желудка у человека. Выявление молекулярных маркеров опухоли и генетических факторов, влияющих на развитие рака желудка, представляется важной научной и клинической задачей, решение которой позволяет выработать индивидуальный подход к лечению пациента.

2.6. Химиотерапевтическое лечение

Развитие подходов к лекарственному лечению рака желудка в настоящее время не приносит значительных результатов, хотя аденокарциномы желудка более чувствительны к химиопрепаратам по сравнению с другими опухолями желудочно-кишечного тракта.

Набор препаратов, применяемых для лечения рака желудка, включает в себя ингибиторы синтеза пиримидинов (5-фторурацил, фторафур, UFT, S1, капецитабин), ингибиторы синтеза фолиниевой кислоты (метотрексат), алкилирующие агенты (митомидин С), ингибиторы топоизомеразы I (кампто, топотекан), ингибиторы топоизомеразы II (доксорубин, этопозид, эпирубин, тенипозид), препараты платины (цисплатин, оксалиплатин), таксаны (таксол (доцетаксел) и таксотер (паклитаксел), производные нитрозомочевины. Основным принятым подходом к лечению больных раком желудка является назначение комбинаций данных препаратов.

Основными четырьмя направлениями химиотерапии рака желудка, которые сейчас развиваются, являются: неoadъювантное применение препаратов, интраоперационная и послеоперационная интраперитонеальная терапия, адъювантное назначение лекарств.

Задачей адъювантной химиотерапии является ликвидация микрометастазов и увеличение общей выживаемости больных.

Одной из причин развития неоадъювантной химиотерапии явилась высокая токсичность при проведении адъювантной терапии в условиях снижения резистентности к ней организма ввиду ранее перенесенной хирургической травмы, к тому же проведение неоадъювантной химиотерапии способствует редукции опухолевого объема и перемещению акцента в лечении от циторедукции в сторону радикального оперативного вмешательства, а также создает возможность в более раннем воздействии на неопределяемые опухолевые сателлиты. Однако в настоящее время неоадъювантная терапия так и не стала обязательной. Разностороннее отношение к ней связано с высокой резистентностью рака желудка к цитостатическому и лучевому методам лечения.

Одним из осложнений проведения химиотерапии на дооперационном этапе является кровотечение из первичной неудаленной опухоли желудка.

Значимым недостатком лучевой терапии в предоперационном периоде является повреждение попадающих в поле облучения нормальных тканей, способствующее развитию осложнений как на дооперационном, так и на послеоперационном этапах.

После радикальных операций по поводу рака желудка третья часть рецидивов обусловлена интраабдоминальными метастазами.

Основой для введения препаратов в брюшную полость является достижение большей концентрации препаратов в брюшине по сравнению с внутривенным введением.

При проведении внутрибрюшинной химиотерапии используются цисплатин в дозе 75–100 мг, карбоплатин 100—150 мг, блеомицин 60 мг, ТиоТЭФ 40–60 мг. При таком способе введения в брюшной полости создается высокая концентрация противоопухолевых препаратов на длительный срок. Не имеет смысла внутрибрюшинное введение циклофосфана, поскольку циклофосфан сам по себе не обладает противоопухолевой активностью. Только в печени под действием фермента P450 циклофосфан превращается в метаболит фосфарамид мустард,

обладающий противоопухолевой активностью. По аналогии с циклофосфаном лишено смысла и внутривенное введение 5-фторурацила, который только в печени превращается в обладающий противоопухолевой активностью 5-фтор-2'-дезоксинуридинмонофосфат (5-ФдУМФ).

Разнообразие применяемых методик лучевой и химио-лучевой терапии, а также отсутствие их стандартизации делают невозможным подбор единой оптимальной схемы, которую можно было бы рекомендовать для практического применения. Результаты хирургического лечения местно-распространенного рака остаются неудовлетворительными, поскольку предполагают изначально интраоперационную диссеминацию раковых клеток. Таким образом, процент рецидива заболевания и развития диссеминации процесса остается высоким, создавая необходимость проведения комбинированного лечения, в частности послеоперационной химиотерапии. При этом использование общих схем химиотерапевтического лечения не дает улучшения результатов лечения пациентов, персонализированный подход с подбором индивидуальных схем лечения предполагает возможность улучшения результатов лечения для каждого конкретного индивида.

2.6.1. Факторы, которые могут влиять на проведение химиотерапевтического лечения

Информация о структуре белка закодирована в ДНК, таким образом изменение генетической информации ведет к изменению структуры белка. Если говорить о ферментах, то перестройка гена приводит к изменению активности фермента, которая может как увеличиваться, так и уменьшаться. Полиморфные варианты генов определяют структуру одного и того же фермента, при этом активность его может значительно варьировать. Если применить это к химиотерапевтическому лечению и метаболизму определенных препаратов в организме, становится понятным, почему один и тот же химиопрепарат у разных пациентов может иметь иной эффект при сходном механизме действия.

Выявление полиморфных вариантов гена помогает спрогнозировать ответ на проведение химиотерапевтического лечения у конкретного пациента, скорректировать дозу препарата как в сторону увеличения, так и редукции, оценить необходимость замены одного компонента полихимиотерапии на другой или пересмотреть весь план химиотерапевтического лечения.

Одним из компонентов химиотерапевтического лечения при раке желудка являются фторпиримидины, в частности 5-ФУ, который может быть использован, как в режиме монотерапии, так и входить в схемы полихимиотерапевтического лечения.

Метаболизм данного препарата обусловлен наличием некоторых ферментов, в том числе тимидилатсинтазы.

Фторпиримидины, проникая в клетку, метаболизируются, их производные встраиваются в РНК, нарушая ее синтез и блокируют тимидилатсинтазу, что в свою очередь приводит к снижению нуклеотидов в клетке. Таким образом, в делящихся клетках теряется возможность к проведению репликации и росту. На этом основан цитотоксический эффект химиотерапии фторпиримидинами. При этом если синтез фермента изначально высок, то эффект от проводимой терапии фторпиримидинами оказывается низким.

Тимидилатсинтаза кодируется геном *TYMS*, участвует в синтезе нуклеотидов тимина и урацила. Известно, что ген данного фермента существует в нескольких вариантах – полиморфизмах. В зависимости от варианта гена кодируемый им фермент может иметь разную активность.

Промотор гена может иметь разную последовательность повторов информации, что и определяет активность синтезируемого фермента.

Также одним из важных генов, относящихся к регуляторам клеточного цикла, является *TP53*, он является супрессором опухолевого роста и кодирует белок p53, который, соответственно, является супрессорным белком. Белок p53 не только останавливает клеточный цикл, но также и является участником процессов восстановления ДНК. При встраивании метаболитов химиопрепаратов в ДНК белок p53 останавливает клеточный цикл и способствует развитию апоптотической

реакции в клетках. Соответственно, эффективность действия химиопрепарата во многом зависит от активности данного белка.

Как и в случае с геном *TUMS* у гена *P53* существуют полиморфные варианты, которые определяют активность форм белка p53.

2.6.2. Химиотерапия в послеоперационном периоде

Из 80 пациентов второй подгруппы исследования 58 пациентам проводилась адьювантная химиотерапия. Схема и количество курсов химиотерапии были определены рекомендациями химиотерапевта. Лечение проводили с включением 5-фторурацила по следующим схемам: 32 пациента получали только кселоду (капецитабин) 1250 мг/м² 2 раза в сутки с 1 по 14 день, каждые 3 недели; 14 пациентам – болюсно интраперитонеально на 10 сутки после операции вводился карбоплатин 150 мг через установленный заранее интраоперационно катетер в брюшную полость + кселода (капецитабин) 1250 мг/м² 2 раза в день с 1 по 14 дни, каждые 3 недели; 7 пациентам – по схеме CapOX (XELOX) оксалиплатин 130 мг/м² в 1 день, кселода (капецитабин) по 1000 мг/м² 2 раза в день с 1 по 14 дни, каждые 3 недели; 5 пациентам – 5-фторурацил 450 мг/м² в сутки в/в 30-минутная инфузия с 1 по 5 дни + лейковорин 50 мг/м² в сутки в/в с 1 по 5 день, каждые 4 недели.

Внутрибрюшную химиоинфузию проводили больным с установленным на дооперационном этапе диагнозом Перстневидно-клеточного рака желудка. Во время операции оставляли катетер в брюшной полости и вводили препарат платины на 10 сутки после операции, после чего катетер удаляли.

2.7. Рецидив рака желудка

Лечение рецидива рака желудка до сих пор является важной проблематикой. С того момента, как начали проводить операции на желудке, возник и вопрос, что делать с пациентами при возникновении рецидива. Ранее считалось, что повторные

операции не улучшат прогноз для пациента, и, несмотря на проведенное лечение, пациент в итоге погибнет, таким образом от повторных операций воздерживались.

С развитием хирургической техники, внедрением новых хирургических инструментов и материалов, используемых при оперативном лечении, удалось снова обратиться к вопросу о возможностях хирургического лечения рецидива рака желудка.

Подчас затруднительно констатировать, имеет ли место истинный рецидив рака желудка или речь идет о продолженном росте, вследствие оставленной резидуальной опухоли.

К рецидивам рака желудка относят: распространение опухолевого процесса по брюшине, опухоль в оставшейся части желудка, в области анастомоза или месте, где ранее находилась опухоль, в также регионарных лимфатических узлах. К местному рецидиву опухолевого процесса относят опухоль в оставшейся части желудка, анастомозе или том месте, где было ложе опухоли. Более широко рецидив заболевания включает вторичное поражение лимфоколлекторов, а также перитонеальное распространение вверх и вниз от основного очага, с захватом соседних областей брюшной полости.

2.7.1. Молекулярные маркеры прогноза рецидива рака желудка, определяемые в третьей подгруппе

Рецидивы рака желудка, в отличие от первичной опухоли, характеризуются большей биологической активностью, выражающейся в склонности к инфильтративному росту, высокой степенью инвазии, частым прорастанием в окружающие органы. Такое же значение для прогноза рецидива рака желудка имеет и гистологическая форма опухоли: чем ниже дифференцирована опухоль, тем чаще рецидив. Однако, рецидив морфологически не всегда идентичен ранее существовавшей опухоли.

Повышение результативности лечения рецидива рака желудка во многом связывалось с улучшением диагностики и выявлением начальных стадий процесса,

что диктует необходимость поиска дополнительных критериев и методов диагностики рецидива рака желудка.

Улучшение ранней диагностики рецидива обуславливает необходимость поиска дополнительных критериев и методов диагностики. В последнее время, в связи достигнутым прогрессом в области изучения молекулярно-биологических и биохимических процессов опухолеобразования, в практической онкологии используются молекулярные и биохимические маркеры опухолевого роста.

Для своевременной диагностики важную роль приобретает адекватная трактовка морфологических перестроек, которые претерпевает слизистая желудка в ходе канцерогенеза и при предраковых изменениях, с использованием молекулярных исследований.

2.7.2. Характеристика молекулярных маркеров в определении прогноза рецидива рака желудка

Для оценки роли молекулярных изменений в развитии рецидива рака желудка проанализированы результаты лечения 103 больных, доступных для полноценного ретроспективного анализа, оперированных по поводу рака желудка, перенесших ранее различные виды резекции желудка. У 38,8 % (40) пациентов в процессе наблюдения в послеоперационном периоде кроме проведения стандартных исследований также определяли молекулярные маркеры в материале слизистой оболочки культи желудка, полученном при ЭГДС. В работе была использована панель молекулярных маркеров, которая включала определение аномального метилирования генов *CDH1*, *RASSF1A*, *MLH1*, *TUSC3*, *DAPK*, *RUNX3*.

Ниже представлены только некоторые особенности данной системы маркеров прогноза, отличающие ее от диагностической, описанной выше.

Как отмечалось ранее, аномальное метилирование генов-супрессоров является одним из ранних событий канцерогенеза и может выявляться задолго до клинической манифестации опухолевого роста. Аномальное метилирование *CDH1*, *RASSF1A*, *MLH1*, *TUSC3*, *DAPK*, *RUNX3* приводит к функциональной инактивации

этих генов.

Помимо генов *CDH1*, *RASSF1A*, *MLH1*, *TUSC3*, *DAPK*, функция которых описана выше, данная система была дополнена оценкой метилирования гена *RUNX3*.

Ген *RUNX3* кодирует белок, относящийся к семейству транскрипционных факторов, содержащих Runt-домен. Функция белка состоит в образовании комплекса, который связывается с определенной последовательностью ДНК, находящейся во многих энхансерных, запускающих транскрипцию, и промоторных, позволяющих РНК-полимеразе начать транскрипцию, областях различных генов, что приводит к активации или подавлению транскрипции этих генов. Этот белок также может взаимодействовать с другими транскрипционными факторами, усиливая генную экспрессию.

Все перечисленные гены обладают супрессорными свойствами, непосредственно влияя на сдерживание опухолевого роста. Их инактивация путем аномального метилирования способствует развитию опухоли. Аномальное метилирование определяется на уровне дисплазии II–III степени и связано с началом опухолевого роста, что делает данные маркеры высокочувствительными для раннего определения развития опухоли.

2.7.3. Анализ метилирования гена *RUNX3*

Метилирование CpG-островка промоторных областей гена *RUNX3* определялось при помощи метил-специфичной ПЦР (МС-ПЦР). Метод МС-ПЦР основан на модификации геномной ДНК бисульфитом натрия. В ходе такой обработки происходит химическое превращение неметилированных остатков цитозина в урацил, тогда как 5-метилцитозин остается в неизменном виде. По изменению нуклеотидного состава в результате обработки бисульфитом натрия можно судить о состоянии метилирования каждого цитозинового остатка на исследуемом фрагменте ДНК. Использование специфических праймеров позволяет разделить метилированную и неметилированную формы исследуемой ДНК.

Геномная ДНК денатурировалась с помощью NaOH (конечная концентрации 0,3 М) с последующей инкубацией при 65°C в течение 15 минут, и проводят бисульфитную модификацию при помощи бисульфита натрия (конечная концентрация 2 М) и гидрохинона (конечная концентрация 0,5 М) в течение 15 часов при 60°C. Очистка ДНК-бисульфитной смеси проводилась с помощью 750 мкл буфера для очистки (гуанидин гидрохлорид 7М, силикагель 17,5 мг/мл). Тщательно перемешивалась и центрифугировалась 4 мин при 13000 об/мин. Полученный осадок промывался изопропанолом (1 мл) и высушивался. К сухому осадку добавлялось 50 мкл деионизованной воды, ресуспензировалось и использовалось для проведения реакции МС-ПЦР.

МС-ПЦР проводилась при помощи специфических праймеров на метилированную (metRUNX3 F:ataatagcggtcgtagggcgctcg, metRUNX3 R:gcttctactttcccgcttctcgcg) и не метилированную (unmetRUNX3 F:ataatagtgggtgtaggggtgttg, unmetRUNX3 R;acttctactttccsacttctcaca). Фрагменты, полученные в результате ПЦР, разделялись посредством вертикального электрофореза в ПААГ. Результаты ПЦР оценивались при окраске геля нитратом серебра с последующим фотографированием или сканированием.

2.7.4. Получение тканевого материала для анализа системы маркеров

У 40 (38,8 %) из 103 пациентов группы исследования при контрольной ЭГДС в послеоперационном периоде из визуально интактной слизистой оболочки культи желудка был взят материал. В каждом из образцов исследовали аномальное метилирование генов *CDH1*, *RASSF1A*, *MLH1*, *TUSC3*, *DAPK* методом метил-чувствительной ПЦР с использованием рестрикционной эндонуклеазы HpaII, а также гена *RUNX3* методом метил-специфичной ПЦР.

При эндоскопическом заборе ткани полученный фрагмент разделяли скальпелем на две части, одну из которых использовали для определения молекулярных маркеров, вторую – направляли на гистологическое исследование.

2.8. Приборы, реактивы, компьютерные программы, оценка полученных данных

2.8.1. Приборы

УЗИ аппарат Acuson Sequoia («Siemens», Германия), УЗИ аппарат «Logic-750» («General Electric», США), мультиспиральный компьютерный томограф Aquilion ONE 320 («Toshiba», Япония), эндоскоп с торцевой оптикой («Olympus», Япония), рентгенографический аппарат «Legacy» («General Electric», США), центрифуга 5415, центрифуга с охлаждением 5417R («Eppendorf», Германия), вихревой смеситель VF1 Electronic, шейкер ИКА-VIBRAX-VXR («Jankeand Kunkel ИКА-Labortechnik», Германия), весы аналитические и лабораторные («Sartorius», Германия), спектрофотометр Gene Quant pro, прибор для горизонтального электрофореза GNA-100 («Pharmacia Biotech», Швеция), амплификатор 2720 («Applied Biosystems», США), магнитная мешалка MS-3000 («Biosan», Латвия), УФ-бокс («Биоком», Россия), прибор для вертикального электрофореза Mini-PROTEIN 3 cell («Bio-Rad», США), УФ-трансиллюминатор 2011 Macrovue («ЛКВ», Швеция), рН-метр рН 211 («HANNA Instruments», Германия), спектрофотометр Titertek Multiskan PLUS («Labsystem», Финляндия), спектрофлуориметр («Hoefer», Германия), цифровая камера DC120 ZOOM («Kodak», США).

2.8.2. Реактивы

В работе были использованы реактивы: акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, борная кислота, краситель OrangeG, детергент 3-[(3-холамидопропил)-диэтиламмоний]-1-пропансульфонат (CHAPS), динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), 1 М раствор магния хлорида, β-меркаптоэтанол, персульфат аммония (ПСА), N,N,N',N'-тетраметиленамин (ТЕМЕД), Трис, Трис-НСl, фенилметилсульфонилфторид (PMSF), фосфатно-солевой буфер (PBS) (рН 7,4), (этилендиокси)-диэтилендинитрилтетрауксусная

кислота (EGTA), бычий сывороточный альбумин (БСА), смесь фенола, хлороформа и изоамилового спирта (125:24:1), хлороформ-изоамиловый спирт (24:1), саркозил, натрия ацетат, диэтилпирокарбонат (ДЭПК), агароза (для электрофореза), дитиотрейтол, («Sigma», США), ингибитор РНКаз Ribo Lock, обратная транскриптаза Revert Aid H Minus M-Mu LV, маркер молекулярной массы O'Range Ruler 100 bpDNA Ladder («Fermentas», Литва), 10 x буфер для ПЦР, 50 mM раствор магния хлорида, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP), Taq ДНК-полимераза («Диалат», Россия), краситель Coomassie Brilliant Blue G-250, глицерин, натрия цитрат («Fluka», Швейцария), 85% ортофосфорная кислота («Merck», Германия), раствор бромистого этидия («Amresco», США), краситель SYBR Green I, краситель SYBR Green II, краситель SYBR Gold («Molecular Probes», США), гуанидинтиоцианат («ICN Biomedicals», США), олигонуклеотидные ДНК-праймеры («Синтол», Россия).

2.8.3. Компьютерные программы

Image J 1.35I («National Institute of Health», США), QuantityOne v.4.4.0 («Bio-Rad», США), OligoVer.6.67 («Molecular Biology Insights», США), Vector NTI v.7.1 («Infor Max, Inc.», США), PASW Statistics 18.0 (SPSS Inc, США), Microsoft Office-2013, Статистическая обработка материала выполнена на персональном компьютере на базе ОС «Windows-10» при помощи средств «Microsoft Office - 2013». База данных характеристик оперированных больных была создана на основе «PASW Statistics 18.0» (SPSS Inc, США).

2.8.4. Статистическая обработка результатов

Обработка полученных результатов проведена с использованием методов вариационной статистики и расчетом среднего квадратического отклонения, ошибок средней арифметической ($M \pm m$) и относительной величины ($P \pm m$). Для установления статистической достоверности различий в частотах отдельных

признаков между группами использовались таблицы сопряженности с использованием критерия χ^2 . Критерием достоверности различий считалось достижение уровня значимости $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Маркеры диагностики рака желудка

3.1.1. Анализ метилирования генов

Метилирование генов – это одно из наиболее ранних событий при переходе нормальной ткани в опухолевую. Потеря функциональной активности генов, контролирующих клеточный цикл, чаще всего происходит именно по данному механизму. При этом важно, что такие изменения не определяют воспалительные процессы, происходящие в тканях. Для анализа были выбраны следующие гены *CDH1*, *RASSF1A*, *MLH1*, *TUSC3*, *DAPK*. Ткань для анализа метилирования была взята как из самого первичного очага, так и на расстоянии от него, в тех точках, где происходит пересечение органа при его полном или парциальном удалении. С целью исключения влияния возрастного фактора на метилирование генов проведен анализ в разных возрастных группировках пациентов. Обязательно оценивалась связь метилирования генов с клиническими показателями: так проводилось сопоставление с морфотипом опухоли, размером первичного очага, степенью дифференцировки карциномы, распространением опухолевого процесса в виде отдаленных очагов и поражением регионарных лимфоколлекторов. Выявление данных взаимосвязей определяло в дальнейшем формирование диагностических показателей для системы молекулярных маркеров.

3.1.1.1. Определение метилирования генов в первой подгруппе пациентов

Метилирование генов выше указанной линейки оценивалось как непосредственно в опухоли, так и на прилежащих участках слизистой желудка, для этого был использован метод полимеразной цепной реакции. Данная оценка производилась для поиска связи между метилированием генов и инициацией опухолевого процесса.

По результатам оценки метилирования можно заключить, что отмечена дивергенция по данному показателю для генов *MLH1*, *RASSF1A* и генов *DAPK*, *TUSC3*, *CDH1*. Так для первых характерно повышение показателя именно в самой опухоли, а для вторых регистрировалось повышение как в опухоли, так и в отстоящей слизистой желудка. При этом статистически данная дивергенция также была подтверждена. Показатели по метилированию статистически значимых изменений представлены ниже в таблицах в соответствии с точками забора материала, указанными на Рисунке 2.3.

Вся линейка генов была проанализирована на возможную связь метилирования с возрастом, для чего пациенты были разделены на возрастные группировки, которые в свою очередь были сопоставлены между собой по уровню метилирования каждого из проанализированных генов. Результаты данного сравнения по значимым отклонениям показателей представлены ниже в Таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Возрастные группировки и метилирование генов в разных точках забора материала по анализируемым генам

Ген	Возрастные группировки			p^*		
	< 50 лет (1)	50–60 лет (2)	> 60 лет (3)	1 и 2	2 и 3	1 и 3
<i>MLH1</i>	33,3 ± 6,4	3,1 ± 2,7	20,8 ± 5,5	< 0,01	> 0,01	< 0,05
<i>TUSC3</i>	83,5 ± 5,0	64,7 ± 6,5	56,0 ± 6,7	< 0,05	< 0,05	> 0,01

Как показали результаты анализа для генов *MLH1* и *TUSC3* метилирование ассоциируется меньшим возрастом пациентов и значимо чаще выявлено в первой возрастной группировке, чего не отмечено для остальных генов, метилирование которых не показало зависимости от возраста.

Проведено сопоставление показателей метилирования всей линейки выбранных генов в группировках разделенными исходя из классификации P. Lauren для оценки связи данного показателя с клиническими показателями онкопроцесса. Статистически значимые изменения представлены в Таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Связь метилирования генов при делении по типу опухоли на кишечный и диффузный тип

Ген	Тип опухоли		P
	Кишечный	Диффузный	
<i>CDH1</i>	40,0 ± 6,7	64,0 ± 6,7	< 0,05

Только опухоли диффузного типа характеризовались повышением уровня метилирования и только по гену *CDH1*.

Проведен анализ метилирования линейки генов в группировках больных раком желудка, разделенных по распространенности опухолевого процесса на ранний, местно-распространенный и диссеминированный. Результаты данного сопоставления в статистически значимых изменениях представлены в Таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Распространенность опухолевого процесса и метилирование генов

Ген	Распространенность опухолевого процесса			P		
	Tis–T1N0–M0 (1)	T2–T4N0–N3M0 (2)	Любая/Любая M1 (3)	1 и 2	2 и 3	1 и 3
<i>CDH1</i>	33,3 ± 6,5	61,0 ± 6,7	35,7 ± 6,6	< 0,05	< 0,05	> 0,05
<i>TUSC3</i>	50,0 ± 6,8	61,0 ± 6,7	71,4 ± 6,2	> 0,05	> 0,05	< 0,05

Как видно из данных в таблицах, представленных выше, только для двух генов уровни метилирования статистически значимо менялись. Как видно из показателей, нарастание уровней метилирования связано с прогрессированием опухолевого процесса для данных генов.

Также отмечено, что с увеличением размера опухоли, т. е. массы опухолевой ткани, растут и уровни метилирования генов, что справедливо для практически всех генов линейки.

Проведено сопоставление уровней метилирования выше указанной линейки генов с опухолевым поражением регионарных лимфоколлекторов. Значимые различия в показателях указаны в Таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Связь метилирования генов с поражением регионарных лимфоколлекторов

Ген	Лимфоколлекторы		p
	N0	N–N3	
<i>DAPK</i>	44,2 ± 6,8	23,6 ± 5,8	< 0,05

Метилирование только одного гена статистически достоверно связано с поражением регионарных лимфоколлекторов, что отмечено в таблице выше. Метилирование остальных генов не сопряжено с поражением лимфатических коллекторов.

Также проведена оценка для всей первой группы двух комплексных показатели, а именно Индекса метилирования генов и Индекса метилирования образцов. Индекс метилирования генов характеризует метилирование генов в опухоли, Индекс метилирования образцов характеризует уровень метилирования во всех биоптатах, полученных от одного пациента. Индекс метилирования генов рассчитывается путем определения отношения количества метилированных генов в опухоли к числу всех анализируемых генов в опухоли. Индекс метилирования образцов рассчитывается путем отношения количества образцов с выявленным метилированием в генах к числу всех взятых у пациента биоптатов, в том числе и тех, что взяты из окружающей опухолевой локус визуально интактной слизистой. Оценка данных показателей реализовалась в возможности разделения профиля опухоли на высокий фенотип метилирования и низкий фенотип метилирования.

По Индексу метилирования образцов возможна оценка метилирования генов и в окружающей опухоль ткани. Таким образом возможно охарактеризовать рядом расположенную слизистую, оценить влияние первичного очага на окружение, заподозрить возможность рецидива.

Оценка Индексов метилирования по образцам и генам была сопоставлена по различным клиническим показателям, а также характеристикам первичного очага, распространенности опухолевого процесса. Статистически значимая взаимосвязь данных индексов была определена только для местно-распространенного и диссеминированного рака. Других статистически значимых связей для индексов

выявлено не было.

3.1.1.2. Метилирование генов у пациентов с раком желудка и больных желчнокаменной болезнью в отсутствие онкопроцесса

Помимо сравнения уровней метилирования непосредственно в опухолевом очаге и окружающей визуально интактной слизистой желудка произведено сопоставление показателей метилирования, взятых у больных раком, с уровнями метилирования в слизистой оболочке желудка у пациентов с желчнокаменной болезнью, в отсутствие любого онкопроцесса.

По уровням метилирования трех генов *DAPK*, *TUSC3*, *CDH1* отмечена достоверное отличие у пациентов с опухолевым процессом относительно больных желчнокаменной болезнью.

Также Индекс метилирования генов был значимо выше у пациентов с онкопроцессом ($0,4 \pm 0,04$), в отличии от пациентов с желчнокаменной болезнью ($0,1 \pm 0,08$) с интактной слизистой желудка ($p < 0,01$).

3.1.2. Экспрессия генов

Проведена оценка экспрессии генов *hTERT*, *MMP7*, *BIRC5*, *MMP9*, *TP53*, *PTGS2* у больных раком желудка как в первичном очаге, так и на отдаленных от опухоли участках слизистой. Показатели сопоставлены с клиническими характеристиками пациентов, распространенностью опухолевого процесса и данными по первичному очагу. Таким образом реализована задача поиска маркеров диагностики рака желудка.

Ниже в Таблице 3.5 представлены статистически значимые отличия показателей экспрессии генов в зависимости от точки забора материала.

Таблица 3.5 – Экспрессии генов в сопоставлении с областью забора биоптата

Ген	Точка забора 1	Точка забора 2	Точка забора 3	Точка забора 4
<i>hTERT</i>	0,2 ± 0,02	0,4 ± 0,04*	0,3 ± 0,04	0,3 ± 0,03
<i>PTGS2</i>	0,2 ± 0,03	0,5 ± 0,06*	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,03
<i>MMP7</i>	0,3 ± 0,06	0,8 ± 0,07*	0,3 ± 0,04	0,4 ± 0,07
<i>MMP9</i>	0,3 ± 0,04	0,7 ± 0,06*	0,4 ± 0,04	0,4 ± 0,05
<i>BIRC5</i>	0,6 ± 0,06	1,0 ± 0,06*	0,9 ± 0,08	0,6 ± 0,06

Экспрессия генов, указанных в Таблице 3.5, была достоверно выше в опухолевом очаге относительно остальных участков слизистой желудка, за исключением показателей экспрессии гена *TP53*, для которого достоверной разницы в первичном опухолевом локусе и на остальных участках слизистой желудка выявлено не было, поэтому для него было проведено исключение из линейки экспрессионных маркеров.

Также отмечено, что не важно, на сколько участок слизистой был отдален от первичного локуса опухоли, экспрессия по каждому их генов между собой в этих участках не отличалась достоверно.

Проведено сопоставление экспрессии генов *hTERT*, *MMP7*, *BIRC5*, *MMP9*, *PTGS2* с двумя типами опухоли: кишечный и диффузный, материал был взят из основного локуса опухоли. Ниже в Таблице 3.6 представлены достоверные отличия по данному показателю.

Таблица 3.6 – Экспрессия генов в опухолевом очаге и ее связь с кишечным и диффузными типами рака желудка

Ген	Тип опухоли		P
	Кишечный	Диффузный	
<i>hTERT</i>	0,5 ± 0,07	0,3 ± 0,05	< 0,05
<i>BIRC5</i>	1,1 ± 0,09	0,9 ± 0,07	< 0,05

Как можно отметить по двум генам, указанным в Таблице 3.6, имеется достоверная разница по показателю экспрессии для разных типов рака желудка.

Проведен анализ экспрессии линейки, выше обозначенных генов в группировках больных раком желудка, разделенных по распространенности

опухолевого процесса на ранний, местно-распространенный и диссеминированный. Результаты данного сопоставления в статистически значимых изменениях представлены в Таблице 3.6.

Достоверная разница по данному показателю на всех этапах прогрессирования опухолевого процесса отмечена только для одного гена *BIRC5*, при этом, как было сказано, эта разница достоверна как при начинающемся опухолевом процессе и его местном прогрессировании, так и при переходе от локо-регионарного процесса к диссеминированному, соответственно $p < 0,01$ и $p < 0,05$.

Для генов *PTGS2* и *MMP7* достоверная разница по данному показателю существует в переходе от инициации опухолевого процесса к локо-регионарному распространению.

Для других генов данный показатель не менялся в процессе изменения распространенности онкопроцесса.

Прослежена разница в изменении показателя экспрессии в зависимости от объема первичного очага для всех пяти анализируемых генов. Так для генов *BIRC5* и *PTGS2* достоверное изменение показателя происходило в момент значимого увеличения опухолевого объема первичного очага, тогда как для *MMP7*, достоверное изменение показателя происходило в моменте перехода от начала опухолевого процесса к некоторому увеличению объема первичного очага.

При оценке по всем пяти анализируемым генам уровень экспрессии в зависимости от поражения регионарных лимфоколлекторов не показал достоверных различий.

3.1.2.1. Экспрессия генов у пациентов с раком желудка и больных желчнокаменной болезнью в отсутствие онкопроцесса

Помимо сравнения уровней экспрессии генов непосредственно в опухолевом очаге и окружающей, визуально интактной, слизистой желудка произведено сопоставление показателей метилирования взятых у больных раком с уровнями экспрессии в слизистой оболочке желудка у пациентов с желчнокаменной

болезнью, в отсутствие любого онкопроцесса. Достоверные отличия по данным показателям приведены в Таблице 3.7.

Таблица 3.7 – Экспрессии генов у больных раком желудка и пациентов с желчнокаменной болезнью в слизистой желудка с учетом областей забора материала

Ген	Точка 1	Точка 2	Точка 3	Точка 4	Больные ЖКБ
<i>hTERT</i>	0,2 ± 0,02	0,4 ± 0,04*	0,3 ± 0,038	0,3 ± 0,028	0,2 ± 0,07
<i>BIRC5</i>	0,6 ± 0,06	1 ± 0,06*	0,8 ± 0,078	0,6 ± 0,06	0,5 ± 0,17
<i>MMP7</i>	0,3 ± 0,06	0,8 ± 0,07*	0,3 ± 0,04	0,4 ± 0,067	0,3 ± 0,06

В биоптатах слизистой желудка на отдаленных от опухолевого очага участках показатели экспрессии были сходными с этими же показателями в отсутствие опухолевого процесса у пациента, однако экспрессии трех указанных в таблице генов достоверно была выше в первичном опухолевом локусе ($p < 0,01$).

3.1.3. Активность теломеразы

Концевые отрезки хромосом – теломеры, которые редуцируются при каждом делении клетки – могут быть частично восстановлены при участии теломеразы. Активность данного фермента характеризует способность к дальнейшему делению клетки, повышение уровня активности данного фермента ассоциируется с онкопролиферативным процессом. Оценка по данному показателю проведена в зависимости от областей взятия биоптатов: непосредственно в опухолевом очаге, приближенных к нему участках слизистой желудка, а также на удаленных от первичного локуса участках. Учитывая возможное возрастное влияние на активность фермента анализ по данному показателю был произведен с учетом возрастных группировок. Также проведено сопоставление уровней активности фермента с типом опухолевого процесса, размером первичного очага и распространением опухолевого процесса в виде отдаленных очагов и поражением регионарных лимфоколлекторов.

3.1.3.1. Активность теломеразы у больных раком желудка

В ходе проведенного исследования выявлено, что активность фермента достоверно выше в биоптатах из опухолевого локуса нежели чем на остальных участках слизистой желудка как приближенных к самому локусу, так и на приближенных к краям резекции препарата ($p < 0,01$).

Сопоставление уровней активности фермента по возрастным группировкам у пациентов с онкопроцессом показало достоверное различие в возрасте до 50 лет, группировке 50—60 лет и старше 60 лет, при этом минимальные показатели определялись в последней группировке.

Достоверной зависимости изменения по показателю активности фермента с морфотипом опухоли отмечено не было.

Проведенное исследование уровней активности фермента в сопоставлении с распространением опухолевого процесса и поражением регионарных лимфоколлекторов достоверной разницы не показало по данному показателю.

При оценке активности фермента в зависимости от объеме первичного опухолевого локуса выявлено, что максимальный объем локуса достоверно сопряжен с большей активностью теломеразы.

3.1.3.2. Активность теломеразы у больных раком желудка и пациентов с желчнокаменной болезнью

Выявлена достоверная разница в активности фермента в биоптатах опухолевого локуса у онкопациентов и в неизменной слизистой желудка у больных желчнокаменной болезнью ($p < 0,01$). При этом биоптаты приближенных к опухоли участков слизистой желудка, так и приближенных к краю резекции органа участков слизистой по уровням экспрессии фермента не отличались от биоптатов слизистой желудка у пациентов с желчнокаменной болезнью.

3.1.4. Использование эндоскопического материала для анализа маркеров

Возможное использование маркеров для диагностики предполагает необходимым условием оценку уровней показателей на дооперационном этапе, то есть в образцах ткани, полученных при эндоскопическом исследовании, дополненном биопсией опухолевого очага. Малый объем образца, получаемый при эндоскопическом исследовании, в отличие от объема образца, получаемого при удалении всего препарата на операции, для оценки молекулярных маркеров потребовал оценки возможности определения маркеров в полученных дооперационно образцах. Также потребовалось доказать, что эндоскопически полученные образцы опухоли содержат необходимое количество опухолевой ткани, а диагностика, проведенная по данным образцам в рамках определения всех трех компонентов диагностической части панели, сопоставима, как если бы образец был получен интраоперационно в большем объеме. Также визуальная оценка опухоли при эндоскопическом исследовании несколько отличается от ее оценки *ad oculus* в резецированном или удаленном целиком желудке, что предположительно тоже могло повлечь определенные изменения в технологическом процессе определения уровней молекулярных маркеров.

Для этого у 53 пациентов первой группы на дооперационном этапе эндоскопически были взяты образцы опухоли и уровни показателей метилирования генов, экспрессии генов и активности фермента в данных образцах были сопоставлены с уровнями тех же показателей у всех 106 пациентов первой группы исследования, которые впоследствии были оперированы по поводу рака желудка и соответственно материал был получен интраоперационно.

3.1.4.1. Метилирование генов, экспрессия генов и активность фермента в образцах опухоли, полученных эндоскопически в сопоставлении с показателями маркеров, полученных интраоперационно

В Таблице 3.8 представлены результаты сопоставления уровней показателей метилирования, экспрессии генов, а также активности фермента, в эндоскопически полученных образцах ткани из опухоли с показателями тех же маркеров в операционном материале.

Таблица 3.8 – Показатели маркеров диагностической части панели в образцах, полученных на дооперационном этапе и в операционном материале

Показатель	Точка забора 2	Точка забора 2-э	P
<i>Метилирование MLH1</i>	15±3,7	15±4,7	>0,05
<i>Метилирование DAPK</i>	35±6,6	50±6,8	>0,05
<i>Метилирование CDH1</i>	53±6,8	63±6,6	>0,05
<i>Метилирование MLH1</i>	61±6,7	63±6,6	>0,05
<i>Метилирование RASSF1A</i>	14±4,7	13±4,3	>0,05
<i>Экспрессия PTGS2</i>	0,5±0,06	0,5±0,07	>0,05
<i>Экспрессия hTERT</i>	0,4±0,043	0,5±0,05	>0,05
<i>Экспрессия BIRC5</i>	1±0,06	0,9±0,05	>0,05
<i>Экспрессия MMP7</i>	0,8±0,07	0,8±0,06	>0,05
<i>Экспрессия MMP9</i>	0,7±0,06	0,7±0,05	>0,05
<i>Активность теломеразы</i>	66±5,8	62± 4,9	>0,05

Как можно отметить из данных Таблицы 3.8 достоверно значимой разницы по показателям маркеров, в дооперационно полученном материале и взятом в ходе оперативного лечения, не получено.

3.1.5. Оценка маркеров для диагностики онкопроцесса

Для оценки значения отдельных маркеров в диагностической части системы, а также всего диагностического компонента проведен анализ таких показателей, как специфичность, чувствительность, прогностическая ценность положительного результата, прогностическая ценность отрицательного результата, отношение правдоподобия, как отрицательного так и положительного, а также отношения шанса теста. Данные представлены в Таблице 3.9.

Таблица 3.9 – Значение маркеров в диагностике рака

Маркер	Чувствительность	Специфичность	ПЦПР	ПЦОР	Точность	ОППР	ОПОР	ОШДТ
<i>Метилирование MLH1</i>	16	98	100	58	54	8	0,9	10
<i>Метилирование RASSF1A</i>	16	98	100	58	53	8	0,9	9
<i>Экспрессия BIRC5</i>	70	88	79	61	80	6	0,4	16
<i>Экспрессия MMP7</i>	85	88	75	76	90	7	0,2	40
<i>Экспрессия hTERT</i>	62	99	100	56	74	6	0,4	164
АТ	67	97	100	58	77	22	0,3	65

Таким образом общая чувствительность системы 53 %, а специфичность 95%.

3.2. Молекулярные маркеры и лечение локализованных форм рака желудка

3.2.1. Связь характеристик опухолевого процесса с полиморфными вариантами генов, ферменты, кодируемые которыми, участвуют в метаболизме фторпиримидинов

Во второй группе исследования, составившей 80 больных раком желудка с локализованной формой онкопроцесса, при этом 58 из них была проведена химиотерапия в послеоперационном периоде, выполнено сопоставление наличия полиморфизмов генов (*TP53* и *TYMS*) с клинико-морфологическими характеристиками онкопроцесса с учетом результатов лечения данных пациентов по таким параметрам, как выживаемость и возникновение рецидива заболевания. Сравнение по отдельным полиморфизмам генов, объединявших группировки пациентов с выявленными полиморфизмами, осуществлялось с использованием точного критерия Фишера, также с помощью дисперсионного анализа Краскала-Уоллиса.

Достоверные различия выявлены по полиморфизмам гена *TYMS*. Так для дифференцированных опухолей характерно наличие полиморфизма А-6/А-6, что, в свою очередь, не характерно для низкодифференцированных опухолей, при этом при перстневидно-клеточном раке данный полиморфизм не выявлен ни у одного пациента. Также для данного полиморфизма выявлена достоверная связь с интестинальным типом опухоли. Соответственно выявлена достоверно значимая связь данного полиморфизма с более благоприятным течением заболевания.

Достоверной связи полиморфизмов генов с возрастом пациентов, с локализацией опухоли, с размером первичного очага не выявлено.

Определена достоверная связь генотип 3R/2R, варианта полиморфизма гена *TYMS* с метастатическим поражением регионарных лимфоколлекторов. Таким образом у пациентов, несущих данный полиморфизм, достоверно чаще встречается метастатическое поражение лимфатических узлов, что не определено для других полиморфизмов.

Наличие полиморфного варианта гена *TYMS* 2G/3C у пациентов достоверно связано с прогнозом и развитием рецидива в срок трех лет, несмотря на проведенное лечение.

У всех 80 пациентов с локорегионарным опухолевым поражением второй группы исследования проведен анализ полиморфизмов гена *TP53*. Достоверной связи наличия полиморфных вариантов данного гена и степени дифференцировки, вовлечения регионарных лимфоколлекторов, положения первичного опухолевого очага, возраста пациентов не определено. При этом для полиморфных вариантов данного гена, таких как Pro/Pro и Arg/Pro показана достоверная связь возникновением рецидива онкопроцесса в срок до трех лет, несмотря на проведенное лечение.

Так выявлены дополнительные показатели, которые необходимо использовать в определении тактики ведения пациента с целью персонализации его лечения.

3.2.2. Взаимосвязь полиморфизмов генов *TYMS* и *TP53* с эффективностью адьювантной химиотерапии на основе 5-фторурацила

Проведен статистический анализ частоты полиморфизмов генов *TYMS* и *TP53* и развития рецидива рака желудка в течение первых 3 лет после радикальной операции в сочетании с адьювантной химиотерапией на основе 5-ФУ. Пациенты были разделены на две группировки. В первую группировку вошло 30 больных, у которых за время наблюдения выявлен рецидив заболевания (местный рецидив, канцероматоз брюшины, отдаленные метастазы). Во вторую группировку включено 28 пациентов, у которых в процессе наблюдения заболевание не прогрессировало. Медиана наблюдения составила 33 месяца (диапазон 4–40 месяцев).

В результате проведенного исследования сочетанных полиморфизмов гена *TYMS* определено, что у больных с генотипом 3G/3G на фоне адьювантной химиотерапии на основе 5-ФУ в течение первых 3 лет после радикальной операции

статистически значимо чаще развивался рецидив заболевания ($p = 0,024$). При этом сочетанный генотип 2G/3C статистически значимо ($p=0,023$) чаще отмечался в группировке пациентов, у которых на фоне комбинированного лечения в течение первых 3 лет после операции не возникло рецидива заболевания. Среди полиморфизмов 5'UTR VNTR особого внимания заслуживает генотип 3R/2R, который чаще определялся у больных с отсутствием прогрессирования заболевания ($p = 0,078$), а среди полиморфизмов 5'UTR SNP – генотип G/G, который чаще всего встречается при рецидиве заболевания, ($p = 0,071$).

На Рисунке 3.1 представлена частота сочетанных полиморфизмов гена *TYMS* у больных местно-распространенным раком желудка в зависимости от возникновения рецидива заболевания в течение первых 3 лет после радикальной операции на фоне комбинированного лечения на основе производных фторпиримидинов.

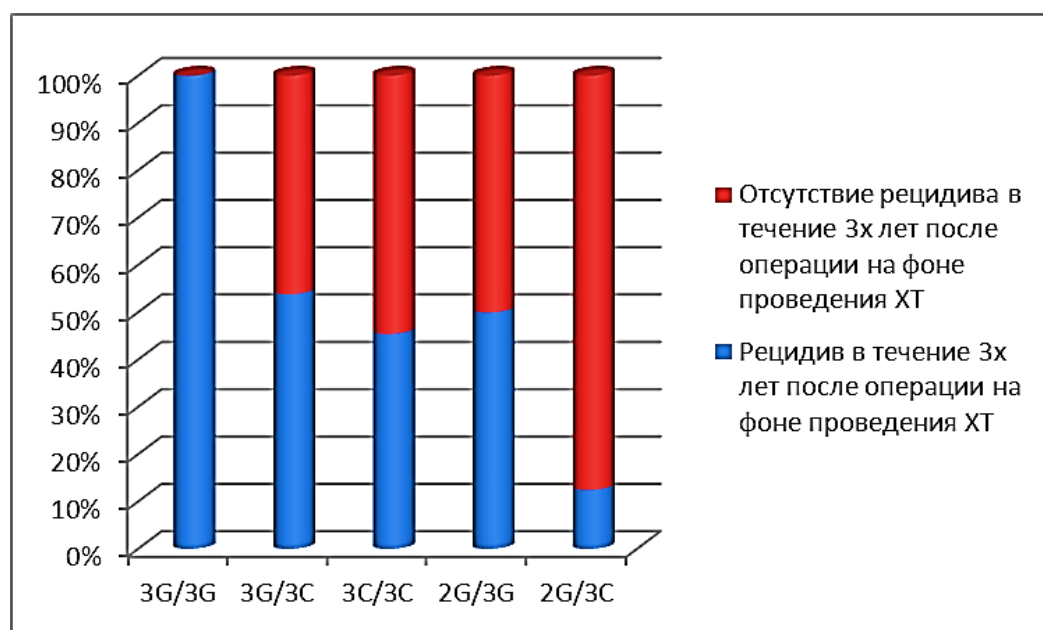


Рисунок 3.1 – Сравнение частоты полиморфизмов *TYMS* и возникновения рецидива рака желудка на фоне комбинированного лечения

Для остальных полиморфизмов гена *TYMS* статистически значимых различий между их частотой и рецидивированием не выявлено.

При исследовании частоты полиморфизмов гена *TP53* и частоты рецидива

рака желудка в течение первых 3 лет после операции также были изучены образцы опухолевой ткани у 58 больных, которым было проведено комбинированное лечение на основе 5-ФУ. Оценивалась возможность использовать полиморфизмы гена *TP53* в качестве дополнительного фактора, определяющего эффективность проводимого лечения у больных местно-распространенным раком желудка, а также индивидуальную чувствительность к химиотерапии. В результате проведенного анализа выявлено, что полиморфизм Arg/Pro статистически значимо чаще встречался у больных с отсутствием рецидива заболевания в течение первых 3 лет после операции на фоне адъювантной химиотерапии с 5-ФУ ($p = 0,054$), в то время как полиморфизм Pro/Pro статистически значимо чаще определялся у больных с рецидивом опухоли ($p = 0,031$).

На Рисунке 3.2 представлена частота полиморфизмов гена *TP53* в зависимости от частоты развития рецидива заболевания в течение первых 3 лет после радикальной операции на фоне комбинированного лечения с использованием схем химиотерапии на основе 5-ФУ у больных местно-распространенным раком желудка.

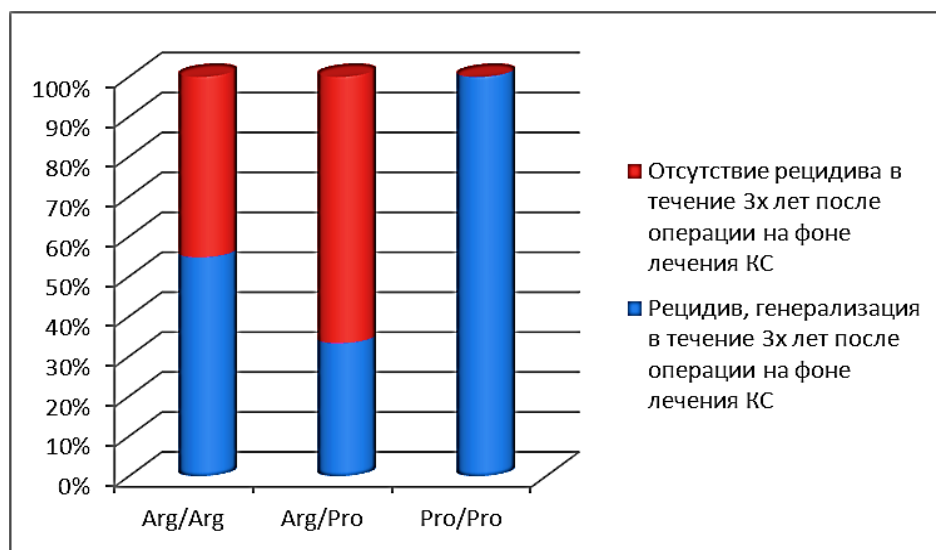


Рисунок 3.2 – Сравнение частоты полиморфизмов гена *TP53* и возникновения рецидива рака желудка

Статистически значимых связей между *ins 16 bp* в интроне 3 и частотой рецидивирования местно-распространенного рака желудка найдено не было.

3.2.3. Отдаленные результаты лечения больных местно-распространенным раком желудка с учетом молекулярных особенностей опухоли

Далее были изучены отдаленные результаты лечения с учетом генотипирования по полиморфизмам генов *TYMS* и *TP53* у больных ($n=58$), которым после радикальной операции по поводу местно-распространенного рака желудка проводилась адъювантная химиотерапия с применением схем на основе производных фторпиримидинов. Медиана длительности наблюдения за этими пациентами составила 33 месяца (от 4 до 40 месяцев). Из получавших комбинированное лечение 58 пациентов 58,0 % (34) оставались в живых в течение всего периода наблюдения. За это время рецидив заболевания (местный рецидив, канцероматоз брюшины, отдаленные метастазы) развился у 52,0 % (30) пациентов на фоне комбинированного лечения. 6 больных из числа больных с возникшим рецидивом рака желудка после адъювантной химиотерапии на момент окончания исследования были живы.

3.2.3.1. Взаимосвязь полиморфизмов гена *TYMS* с отдаленными результатами комбинированного лечения больных раком желудка

Проведен корреляционный анализ полиморфизмов гена *TYMS* с общей и безрецидивной выживаемостью пациентов, который показал наличие связи между безрецидивной выживаемостью, общей выживаемостью и полиморфизмами 5'UTR VNTR. Анализ безрецидивной выживаемости показал, что имеются статистически значимые различия между пациентами с генотипами 3R/3R и 3R/2R: безрецидивная выживаемость статистически значимо ниже у больных с генотипом 3R/3R по сравнению с 3R/2R ($p=0,049$, лог-ранговый тест) (Рисунок 3.3). Средняя безрецидивная выживаемость при генотипе 3R/3R составила $25,8 \pm 2,5$ месяца. (95%-й доверительный интервал [95% ДИ] 20,8–30,7), медиана выживаемости составила 30 месяцев. При генотипе 3R/2R средняя безрецидивная выживаемость

составила $34,6 \pm 2,2$ месяца (95% ДИ 30,4–38,9). При изучении взаимосвязи между общей выживаемостью и полиморфизмами гена *TYMS* установлено, что имеются статистически значимые различия между группировками 3R/3R и 3R/2R: общая выживаемость статистически значимо ниже у больных с генотипом 3R/3R по сравнению с 3R/2R ($p = 0,046$, лог-ранговый тест) (Рисунок 3.4) Выживаемость у пациентов с полиморфизмом гена *TYMS* 3R/3R составила 29 ± 2 месяца (95% ДИ 24–33), медиана выживаемости — 30 месяцев. Средняя общая выживаемость у пациентов с генотипом 3R/2R была $35 \pm 3,3$ месяца. (95% ДИ 30–40). Таким образом, увеличение количества повторов R фрагмента в полиморфизмах говорит в пользу увеличения активности фермента, что в свою очередь приводит к более быстрому метаболизму фторпиримидинов, при этом эффективность химиотерапевтического лечения снижается, выживаемость пациентов представляется худшими показателями. Статистически значимой взаимосвязи общей и безрецидивной выживаемости с остальными полиморфизмами гена *TYMS* в ходе исследования не выявлено.

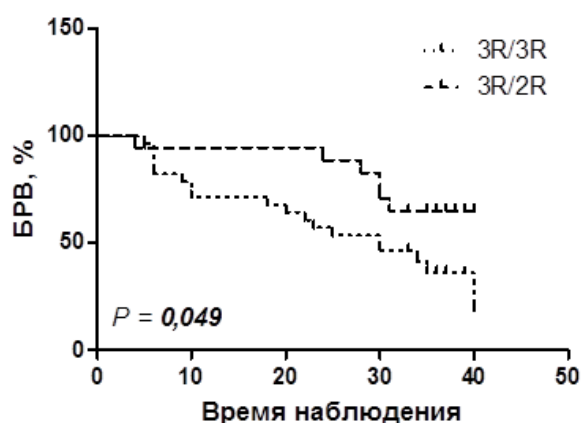


Рисунок 3.3 – Полиморфные формы гена *TYMS* и выживаемость больных с опухолевым локорегионарным поражением желудка в отсутствие рецидива

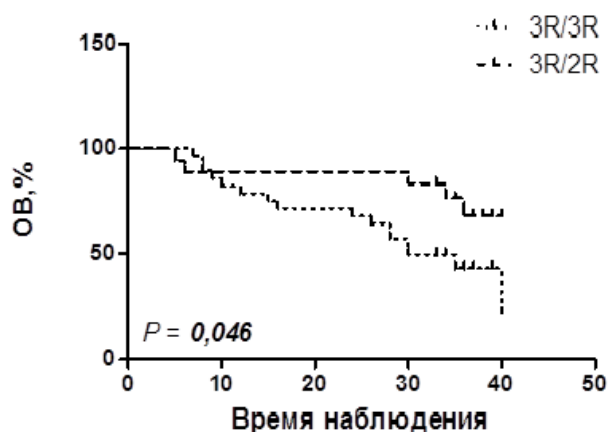


Рисунок 3.4 – Полиморфные формы гена *TUMS* и выживаемость больных с опухолевым локорегионарным поражением желудка

3.2.3.2. Взаимосвязь полиморфизмов гена *TP53* с отдаленными результатами комбинированного лечения больных раком желудка

Проведен анализ корреляции полиморфизмов гена *TP53* в кодоне 72, экзоне 4 (Arg>Pro) и в интроне 3 (ins 16 bp) с безрецидивной и общей выживаемостью пациентов. Безрецидивная выживаемость при генотипе Arg/Arg в среднем составила $29,1 \pm 2,2$ месяца. (95% ДИ 24,7–33,5), медиана выживаемости — 31 месяц; при генотипе Pro/Pro — $20,0 \pm 3,5$ месяца. (95% ДИ 13,2–26,8), медиана — 23 месяца (Рисунок 3.5). Средняя безрецидивная выживаемость при генотипе Arg/Pro составила $29,5 \pm 3,3$ месяца (95% ДИ 23,1–36,0), медиана выживаемости не достигнута. Не отмечено статистически значимой связи между полиморфизмом в интроне 3 (ins 16 bp) гена *TP53* и безрецидивной выживаемостью, а также между всеми исследуемыми полиморфизмами гена *TP53* и общей выживаемостью.

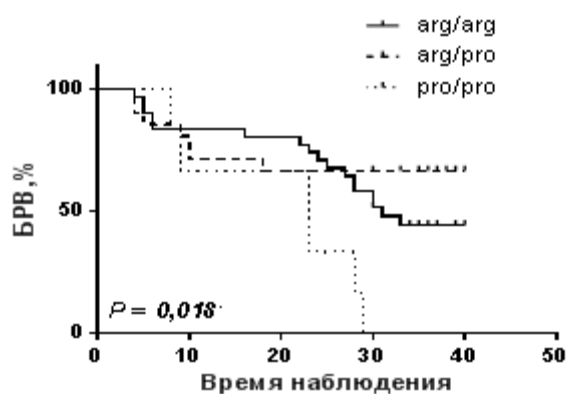


Рисунок 3.5 – Безрецидивная выживаемость больных местно-распространенным раком желудка с полиморфизмами гена *TP53* Arg>Pro в 72 кодоне

3.3. Молекулярные маркеры в определении прогноза рецидива рака желудка

3.3.1. Анализ выживаемости больных после резекции желудка

В третьей подгруппе исследования 103 больных показатель 2-летней выживаемости составил $98 \pm 0,06\%$, 3-летней — $97 \pm 0,09\%$. Результаты представлены на Рисунке 3.6.

Проанализированы основные факторы, влияющие на отдаленные результаты хирургического лечения, а также продолжительность жизни радикально оперированных больных.

В Таблице 3.10 приведены отдаленные результаты лечения в зависимости от стадии заболевания.

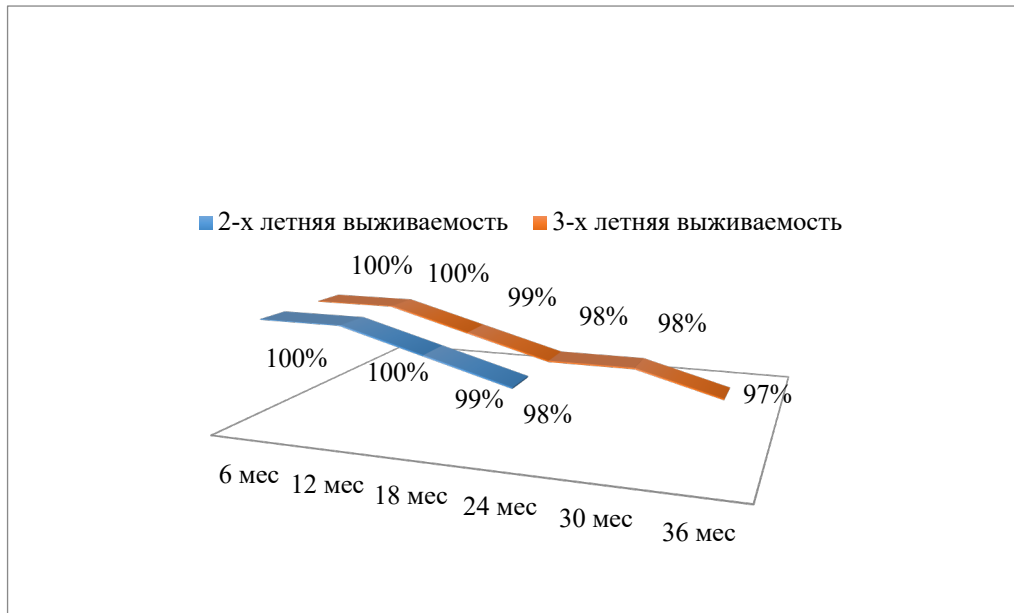


Рисунок 3.6 – Выживаемость больных, перенесших резекцию желудка по поводу рака (103 пациента третьей подгруппы исследования)

Таблица 3.10 – Анализ выживаемости больных в зависимости от стадии заболевания (103 пациента третьей подгруппы исследования)

Стадия	TNM	Число пациентов	Выживаемость		
			2-летняя	3-летняя	
0	TisN0M0	2	2	2	
I	IA T1N0M0	25	25	25	
	IB T2N0M0 T1N1M0	17 6	17 6	17 6	
II	IIA T3N0M0 T2N1M0 T1N2M0	7 12 1	7 12 1	7 12 1	
	IIВ T4aN0M0 T3N1M0 T2N2M0 T1N3aM0	0 1 3 1	0 1 3 1	0 0 3 1	
	III	IIIA T4aN1-2M0 T4bN0M0 T3N2M0 T2N3aM0	2 5 3	2 5 3	2 5 3
		IIIB T4bN1-2M0 T3-4aN3aM0 T1-2N3bM0	3 2 3	3 2 3	3 2 3
		IIIC T3-4aN3bM0 T4bN3a-bM0	2 2	2 2	2 2
		IV	ТлюбаяNлюбаяM1	6	4
Всего			103	101	100

3.3.2. Исследование молекулярных маркеров в слизистой оболочке культи желудка для определения их связи с рецидивом онкопроцесса

Из 103 пациентов, вошедших в третью подгруппу исследования, у 40 больных в послеоперационный период при контрольной ЭГДС отбирался материал, который в дальнейшем подвергался гистологическому исследованию и анализу на молекулярные маркеры. Во всех 40 биопсийных образцах из макроскопически неизменной слизистой оболочки культи желудка было подтверждено отсутствие опухолевых клеток, в ряде случаев определялся атрофический гастрит. С целью прогнозирования возможного рецидива рака желудка или генерализации опухолевого процесса у больных, ранее перенесших хирургическое лечение в объеме резекции желудка, исследована система молекулярных маркеров, которая включала определение аномального метилирования генов-супрессоров опухолевого роста *CDH1*, *RASSF1A*, *MLH1*, *TUSC3*, *DAPK*, *RUNX3*. Забор материала у пациентов осуществлялся в период 6–39 месяцев после операции. В момент забора материала для исследования первичная опухоль уже была удалена и, по показаниям, проведена химиотерапия. В послеоперационном периоде при контрольной ЭГДС отбирался биоптат слизистой оболочки культи желудка. У всех пациентов проведен морфологический контроль области ранее наложенного анастомоза, опухолевых клеток не обнаружено. При анализе данных пациенты были разделены на две группировки. К 1-й группировке (met+) отнесены пациенты, имеющие в слизистой оболочке аномальное метилирование 1, 2 или 3 генов, — 9 (22,5 %) из 40; ко 2-й группировке (met-) отнесены пациенты, в слизистой оболочке которых аномального метилирования выявлено не было, — 31 (77,5 %) из 40. У всех 40 больных при морфологическом исследовании биоптатов, полученных из слизистой оболочки культи желудка, опухолевых клеток в препаратах не обнаружено. Для определения возможной связи отсроченного метилирования в культе желудка с клинико-морфологическими характеристиками удаленных опухолей сравнивались клинические параметры опухолей в группировках с наличием и отсутствием отсроченного метилирования

в слизистой оболочке культи желудка. Результаты исследования представлены в Таблице 3.11. В группировке больных, имеющих аномальное метилирование хотя бы одного гена, двое умерли от генерализации заболевания через 2 года, 1 пациент имел генерализацию опухолевого процесса и был жив на момент проводимого исследования. Генерализация заболевания в этой группировке выявлена у 3 (33,3%) из 9 пациентов. В группировке пациентов, не имевших аномального метилирования исследуемых генов, генерализация процесса и смерть в течение 2 лет после операции зафиксированы у 1 (3,2 %) из 31 больного [63].

Таблица 3.11 – Клинико-морфологическая характеристики опухолевого процесса в зависимости от наличия аномального метилирования генов у пациентов в третьей подгруппе исследования

Показатель	Группы пациентов, <i>n</i>			<i>P</i>
	Всего	met+	met–	
Всего	40	9	31	
Метастазирование в регионарные лимфатические узлы				
Без поражения	31	4	25	—
Метастазы в лимфатических узлах	9	3	6	—
Отдаленные метастазы	—	2	—	0,0462
Исход				
Живы на момент исследования	37	7	30	—
Генерализация процесса	4	3	1	0,0290
Умерли	3	2	1	—
Сопутствующие заболевания желудка и двенадцатиперстной кишки				
Хронический атрофический гастрит	13	6	7	0,0378
Язвенная болезнь желудка	2	1	1	—
Язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки	1	—	1	—
Сопутствующие заболевания ЖКТ	13	7	6	0,0077

Еще одним значимым клиническим параметром, определяющим индивидуальную тактику ведения больного даже после удаления опухоли, является опухолевое поражение лимфатических узлов. В группировке met+ метастатическое поражение лимфатических узлов определялось у 3 (33,3 %) из 9 больных, во 2-й группировке (met–) – у 6 (19,4 %) из 31 (Таблица 3.11).

С учетом проведенного анализа 13 (32,5 %) из 40 больных страдали

хроническим атрофическим гастритом, в том числе у 6 (66,7 %) из 9 в группировке met+ ($p = 0,0378$). У 2 (5%) из 40 пациентов была язвенная болезнь желудка и у 1 (2,5%) из 40 — язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки. Таким образом у 7 (77,8 %) из 9 больных в группировке met+ имели место заболевания ЖКТ в виде хронического атрофического гастрита и язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, что подтверждает значение хронического воспаления в процессе онкогенеза. Метилирование по генам *TUSC3*, *CDH1*, *RUNX3* наблюдалось у 2 (5%) из 40 пациентов; по генам *TUSC3*, *CDH1* – у 2 (5%); по гену *RUNX3* – у 3 (7,5%); по гену *TUSC3* – у 1 (2,5%) и по гену *CDH1* – у 1 (2,5%). В группировке met+ с отсроченным метилированием возраст 7 из 9 пациентов составлял 55–65 лет, у 2 – 70–80 лет. В группировку met– входили больные такого же возраста: 22 из 31 пациента – 50–70 лет, 9—70 лет и старше. Такое распределение позволило исключить метилирование, связанное с возрастом и показать значение метилирования генов в определении прогноза развития рецидива в процессе динамического наблюдения за пациентами, получившими лечение по поводу первичного опухолевого процесса.

3.4. Алгоритм выбора персонализированного подхода к лечению больных раком желудка на основе молекулярных маркеров

На основании проведенных исследований разработан алгоритм персонализированного подхода к выбору тактики ведения больных с предполагаемым диагнозом Рак желудка, который представлен на Рисунках 3.7 – 3.9 [63].

В результате проведенного исследования выработан алгоритм персонализированного подхода к тактике ведения больных раком желудка на основе анализа показателей молекулярных маркеров, состоящий в следующем.

Пациенту с подозрением на рак желудка на первом этапе производится сбор жалобы, анамнеза, физикальное обследование. При ЭГДС проводится биопсия опухоли и материал направляется помимо стандартного морфологического

исследования (цитологическое и гистологическое) на определение молекулярных маркеров: метилирование генов *MLH1*, *RASSF1A*, *DAPK*, экспрессия генов *MMP7*, *hTERT*, *BIRC5*, активность фермента теломеразы, которые используются как дополнительные инструменты для установления диагноза [63].

При подтверждении диагноза Рак желудка пациент проходит дообследование в рамках клинических рекомендаций по данному заболеванию с целью определения стадии и распространенности опухолевого процесса, а также оценки общего состояния и выявления конкурирующих и сопутствующих заболеваний.

Анализируется семейный онкоанамнез пациента. В случае наличия у пациента двух и более родственников первой и второй линии родства, у которых был выявлен диффузный рак желудка в возрасте до 50 лет, пациенту проводится консультация медицинского генетика и последующее определение мутаций гена *CDH1*, при необходимости [63].

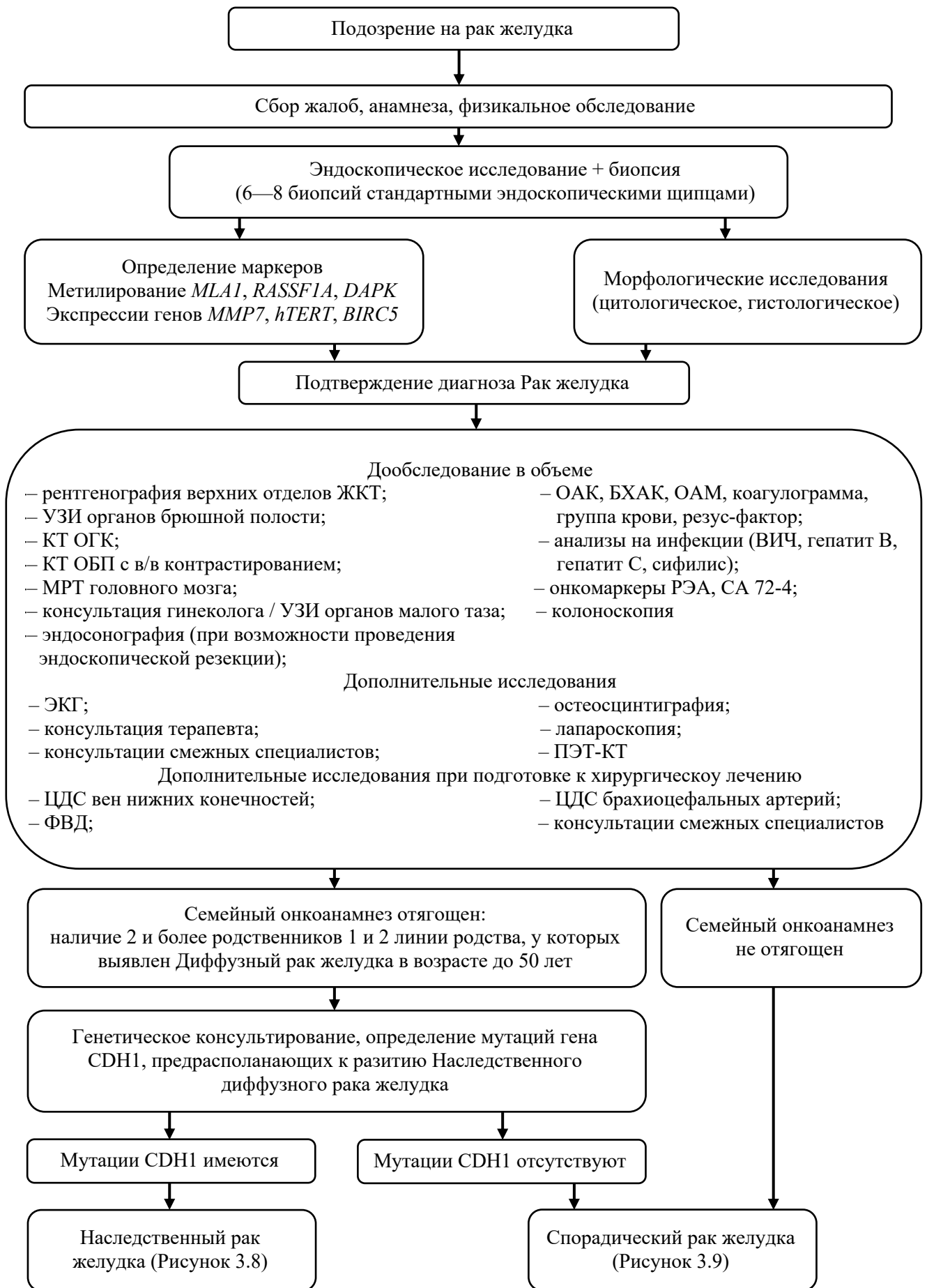


Рисунок 3.7 – Алгоритм персонализированного подхода к выбору тактики ведения больных с предполагаемым диагнозом Рак желудка

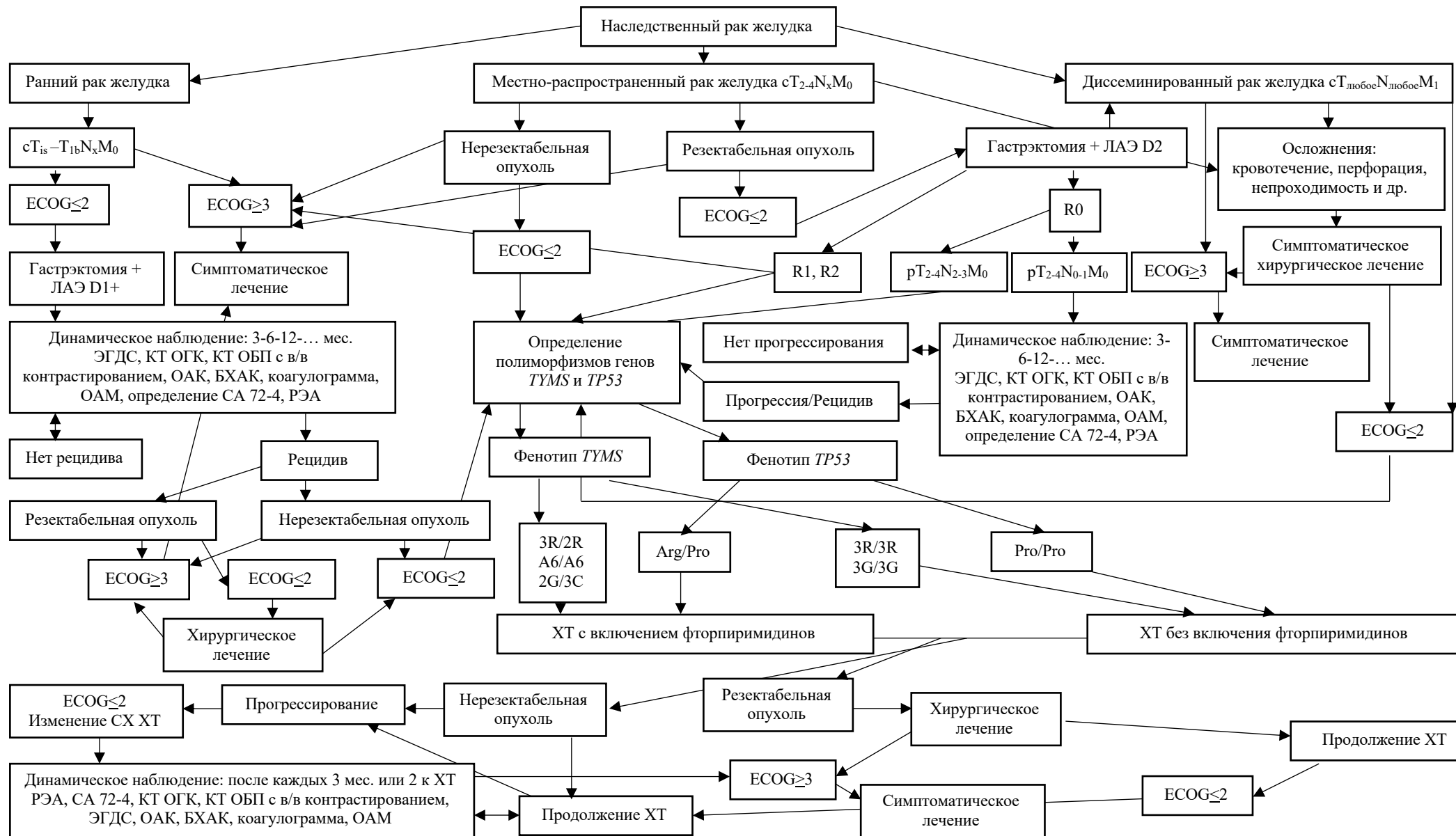


Рисунок 3.8 – Алгоритм персонализированного подхода к выбору тактики ведения больных с наследственным раком желудка

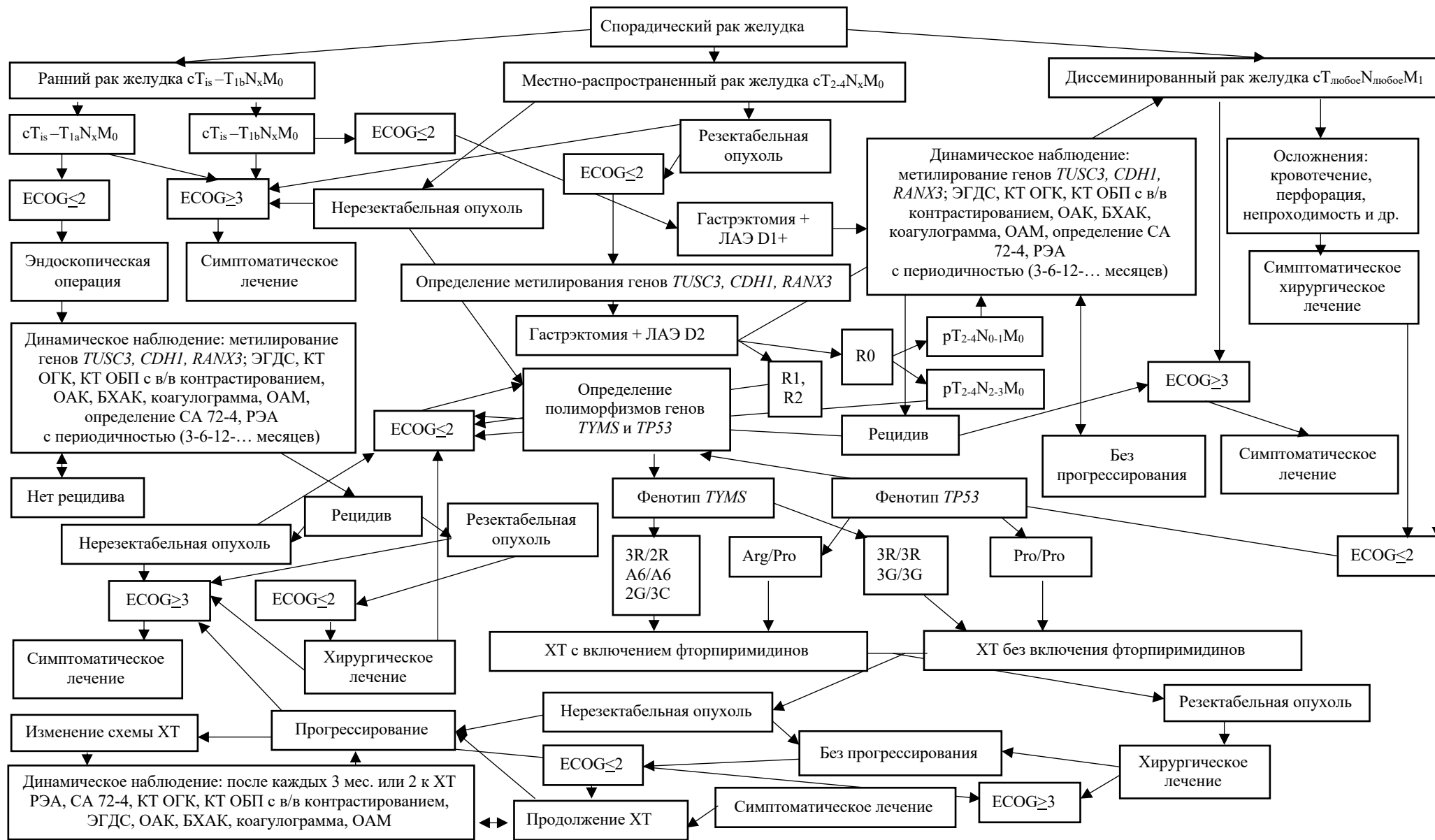


Рисунок 3.9 – Алгоритм персонализированного подхода к выбору тактики ведения больных со sporadicким раком желудка

В случае выявления мутаций гена *CDH1* подтверждается диагноз Наследственного диффузного рака желудка.

Учитывая распространенность онкопроцесса и общее состояние пациента с учетом конкурирующих и сопутствующих заболеваний тактика ведения определяется следующим образом.

При раннем раке желудка у соматически неотягощенных пациентов необходимо выполнять гастрэктомию и лимфаденэктомию в объеме D1+ [63].

Объясняется это тем, что с учетом наличия полей канцеризации и мультифокального развития опухолевого процесса необходимо удаление всей слизистой желудка. Объем же лимфаденэктомии может быть ограничен до D1+, так как при раннем раке процент поражения региональных лимфатических узлов невелик и в основном ограничивается лимфатическими узлами первого порядка. В дальнейшем такие пациенты в случае отсутствия рецидива заболевания должны оставаться под наблюдением онколога на диспансерном контроле и проходить обследования через три месяца после оперативного лечения, далее через шесть месяцев, через двенадцать месяцев, в последующем ежегодно. Объем обследования должен включать эндоскопическое исследование верхних отделов желудочно-кишечного тракта, компьютерную томографию органов грудной клетки, компьютерную томографию органов брюшной полости с внутривенным контрастированием, ОАК, БХАК, коагулограмму, ОАМ, определение уровней маркеров СА-72 и РЭА. В случае выявления рецидива онкопроцесса при очередном обследовании показано хирургическое лечение при условии, что опухоль резектабельна и соматический статус пациента позволяет произвести оперативное вмешательство, если же состояние пациента не дает возможности провести оперативное лечение, то показана симптоматическая терапия. При нерезектабельности опухоли и тяжелом соматическом состоянии пациента также показано симптоматическое лечение. Если же опухоль нерезектабельна, а соматический статус удовлетворительный, то показано определение полиморфизмов генов *TUMS* и *TP53*. При выявлении фенотипов 3R/2R, A6/A6, 2G/3C по гену *TUMS* и фенотипа Arg/Pro по гену *TP53* необходимо проведение

химиотерапевтического лечения с включением фторпиримидинов. При выявлении фенотипов 3R/3R, 3G/3G по гену *TYMS* и фенотипа Pro/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапии без включения фторпиримидинов. В случае регресса опухолевого процесса и возможности удаления опухоли показан переход к хирургическому лечению и дальнейшее химиотерапевтическое лечение по прежней схеме. В случае прогрессирования при сохранном соматическом статусе пациента пересмотр схемы химиотерапии, проведение химиотерапевтического лечения по новой схеме и контрольные обследования каждые три месяца или после каждых двух курсов химиотерапии. Контрольные обследования должны включать эндоскопическое исследование верхних отделов желудочно-кишечного тракта, компьютерную томографию органов грудной клетки, компьютерную томографию органов брюшной полости с внутривенным контрастированием, ОАК, БХАК, коагулограмму, ОАМ, определение уровней маркеров СА-72 и РЭА [63].

При местно-распространенном раке желудка cT2-4NxM0 в случае нерезектабельной опухоли и тяжелом соматическом статусе пациента показано проведение симптоматического лечения. При нерезектабельной опухоли и сохранном соматическом статусе пациента показано определение полиморфизмов генов *TYMS* и *TP53*. При выявлении фенотипов 3R/2R, A6/A6, 2G/3C по гену *TYMS* и фенотипа Arg/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапевтического лечения с включением фторпиримидинов. При выявлении фенотипов 3R/3R, 3G/3G по гену *TYMS* и фенотипа Pro/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапии без включения фторпиримидинов. В случае регресса опухолевого процесса и возможности удаления опухоли показан переход к хирургическому лечению и дальнейшее химиотерапевтическое лечение по прежней схеме. В случае прогрессирования при сохранном соматическом статусе пациента пересмотр схемы химиотерапии, проведение химиотерапевтического лечения по новой схеме и контрольные обследования каждые три месяца или после каждых двух курсов химиотерапии. Контрольные обследования должны включать эндоскопическое исследование верхних отделов желудочно-кишечного тракта, компьютерную томографию органов грудной клетки, компьютерную томографию органов

брюшной полости с внутривенным контрастированием, ОАК, БХАК, коагулограмму, ОАМ, определение уровней маркеров СА-72 и РЭА [63].

При местно-распространенном раке желудка сT2-4NxM0 резектабельной опухоли и сохранном соматическом статусе показано проведение гастрэктомии с лимфаденэктомией в объеме D2.

В зависимости от результатов послеоперационного гистологического исследования дальнейшая тактика ведения пациента будет определяться следующим образом. При выявлении диссеминированного опухолевого процесса дальнейшее ведение будет проводиться как при клинически выявленном диссеминированном раке желудка.

При наличии резидуальной опухоли, определяемой микро- и макроскопически после проведенного оперативного лечения и сохранном соматическом статусе пациента, показано определение полиморфизмов генов *TYMS* и *TP53*. При выявлении фенотипов 3R/2R, A6/A6, 2G/3C по гену *TYMS* и фенотипа Arg/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапевтического лечения с включением фторпиримидинов. При выявлении фенотипов 3R/3R, 3G/3G по гену *TYMS* и фенотипа Pro/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапии без включения фторпиримидинов. В случае регресса опухолевого процесса и возможности удаления опухоли показан переход к хирургическому лечению и дальнейшее химиотерапевтическое лечение по прежней схеме. В случае прогрессирования при сохранном соматическом статусе пациента показан пересмотр схемы химиотерапии, проведение химиотерапевтического лечения по новой схеме и контрольные обследования каждые три месяца или после каждых двух курсов химиотерапии. Контрольные обследования должны включать эндоскопическое исследование верхних отделов желудочно-кишечного тракта, компьютерную томографию органов грудной клетки, компьютерную томографию органов брюшной полости с внутривенным контрастированием, ОАК, БХАК, коагулограмму, ОАМ, определение уровней маркеров СА-72 и РЭА. При наличии резидуальной опухоли, определяемой микро- и макроскопически и тяжелом соматическом статусе пациента, показано симптоматическое лечение [63].

При отсутствии резидуальной опухоли после проведенного хирургического лечения, определяемой микро- и макроскопически, сохранном соматическом статусе пациента, морфологического стадирования pT2-4N0-1M0, показано динамическое наблюдение первые девять месяцев каждые три месяца, последующий год каждые шесть месяцев и далее ежегодно в случае отсутствия рецидива заболевания в следующем объеме: эндоскопическое исследование верхних отделов желудочно-кишечного тракта, компьютерная томография органов грудной клетки, компьютерная томография органов брюшной полости с внутривенным контрастированием, ОАК, БХАК, коагулограмма, ОАМ, определение уровней маркеров СА-72 и РЭА [63]. При выявлении рецидива или прогрессирования заболевания показано определение полиморфизмов генов *TYMS* и *TP53*. При выявлении фенотипов 3R/2R, A6/A6, 2G/3C по гену *TYMS* и фенотипа Arg/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапевтического лечения с включением фторпиримидинов. При выявлении фенотипов 3R/3R, 3G/3G по гену *TYMS* и фенотипа Pro/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапии без включения фторпиримидинов. В случае регресса опухолевого процесса и возможности удаления опухоли показан переход к хирургическому лечению и дальнейшее химиотерапевтическое лечение. В случае прогрессирования при сохранном соматическом статусе пациента проводится пересмотр схемы химиотерапии, проведение химиотерапевтического лечения по новой схеме и контрольные обследования каждые три месяца или после каждых двух курсов химиотерапии. Контрольные обследования должны включать эндоскопическое исследование верхних отделов желудочно-кишечного тракта, компьютерную томографию органов грудной клетки, компьютерную томографию органов брюшной полости с внутривенным контрастированием, ОАК, БХАК, коагулограмму, ОАМ, определение уровней маркеров СА-72 и РЭА [63].

При отсутствии резидуальной опухоли после проведенного хирургического лечения, определяемой микро- и макроскопически, сохранном соматическом статусе пациента, морфологического стадирования pT2-4N2-3M0, показано определение полиморфизмов генов *TYMS* и *TP53*. При выявлении фенотипов

3R/2R, A6/A6, 2G/3C по гену *TYMS* и фенотипа Arg/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапевтического лечения с включением фторпиримидинов. При выявлении фенотипов 3R/3R, 3G/3G по гену *TYMS* и фенотипа Pro/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапии без включения фторпиримидинов. В случае регресса опухолевого процесса и возможности удаления опухоли показан переход к хирургическому лечению и дальнейшее химиотерапевтическое лечение по прежней схеме. В случае прогрессирования при сохранном соматическом статусе пациента пересмотр схемы химиотерапии, проведение химиотерапевтического лечения по новой схеме и контрольные обследования каждые три месяца или после каждых двух курсов химиотерапии. Контрольные обследования должны включать эндоскопическое исследование верхних отделов желудочно-кишечного тракта, компьютерную томографию органов грудной клетки, компьютерную томографию органов брюшной полости с внутривенным контрастированием, ОАК, БХАК, коагулограмму, ОАМ, определение уровней маркеров СА-72 и РЭА [63].

При диссеминированном раке желудка и наличии осложнений, таких как перфорация, кровотечение, непроходимость и другие показано симптоматическое хирургическое лечение, если в дальнейшем соматический статус пациента определяется как тяжелый, показана дальнейшая симптоматическая терапия.

При диссеминированном раке желудка и сохранном соматическом статусе пациента, а также после ликвидации осложнений и сохранении удовлетворительного соматического статуса пациента показано определение полиморфизмов генов *TYMS* и *TP53*. При выявлении фенотипов 3R/2R, A6/A6, 2G/3C по гену *TYMS* и фенотипа Arg/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапевтического лечения с включением фторпиримидинов. При выявлении фенотипов 3R/3R, 3G/3G по гену *TYMS* и фенотипа Pro/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапии без включения фторпиримидинов. В случае регресса опухолевого процесса и возможности удаления опухоли показан переход к хирургическому лечению и дальнейшее химиотерапевтическое лечение по прежней схеме. В случае прогрессирования при сохранном соматическом статусе пациента пересмотр схемы химиотерапии, проведение химиотерапевтического

лечения по новой схеме и контрольные обследования каждые три месяца или после каждых двух курсов химиотерапии. Контрольные обследования должны включать эндоскопическое исследование верхних отделов желудочно-кишечного тракта, компьютерную томографию органов грудной клетки, компьютерную томографию органов брюшной полости с внутривенным контрастированием, ОАК, БХАК, коагулограмму, ОАМ, определение уровней маркеров СА-72 и РЭА [63].

Если семейный анамнез не отягощен и мутации гена *CDH1* не определяются при отягощенном онкологическом семейном анамнезе, то устанавливается диагноз Спорадического рака желудка.

Учитывая распространенность онкопроцесса и общее состояние пациента с учетом конкурирующих и сопутствующих заболеваний тактика ведения определяется следующим образом.

При раннем раке желудка у соматически отягощенных пациентов показано проведение симптоматической терапии [63].

При раннем раке желудка cTis–T1aNxM0 у соматически сохранного пациента показано при технической возможности выполнение эндоскопической операции и дальнейшее динамическое наблюдение в сроки три месяца, шесть месяцев, далее ежегодно, которое должно включать: метилирование генов *TUSC3*, *CDH1*, *RANX3*; ЭГДС, КТ ОГК, КТ ОБП с в/в контр., ОАК, БХАК, ОАМ, коагулограмму, РЭА, СА72-4. В случае возникновения рецидива и отягощенном статусе пациента показано проведение симптоматической терапии. В случае выявления рецидива заболевания при резектабельной опухоли и соматически удовлетворительном статусе показано хирургическое лечение и дальнейшее определение полиморфизмов генов *TUMS* и *TP53*. При выявлении фенотипов 3R/2R, A6/A6, 2G/3C по гену *TUMS* и фенотипа Arg/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапевтического лечения с включением фторпиримидинов. При выявлении фенотипов 3R/3R, 3G/3G по гену *TUMS* и фенотипа Pro/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапии без включения фторпиримидинов. В случае регресса опухолевого процесса и возможности удаления опухоли, показан переход к хирургическому лечению и дальнейшее химиотерапевтическое лечение по

прежней схеме. В случае прогрессирования при сохранном соматическом статусе пациента пересмотр схемы химиотерапии, проведение химиотерапевтического лечения по новой схеме и контрольные обследования каждые три месяца или после каждых двух курсов химиотерапии. Контрольные обследования должны включать эндоскопическое исследование верхних отделов желудочно-кишечного тракта, компьютерную томографию органов грудной клетки, компьютерную томографию органов брюшной полости с внутривенным контрастированием, ОАК, БХАК, коагулограмму, ОАМ, определение уровней маркеров СА-72 и РЭА [63]. В случае выявления рецидива заболевания при нерезектабельной опухоли и соматически удовлетворительном статусе показано определение полиморфизмов генов *TUMS* и *TP53*. При выявлении фенотипов 3R/2R, A6/A6, 2G/3C по гену *TUMS* и фенотипа Arg/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапевтического лечения с включением фторпиримидинов. При выявлении фенотипов 3R/3R, 3G/3G по гену *TUMS* и фенотипа Pro/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапии без включения фторпиримидинов. В случае регресса опухолевого процесса и возможности удаления опухоли, показан переход к хирургическому лечению и дальнейшее химиотерапевтическое лечение по прежней схеме. В случае прогрессирования при сохранном соматическом статусе пациента пересмотр схемы химиотерапии, проведение химиотерапевтического лечения по новой схеме и контрольные обследования каждые три месяца или после каждых двух курсов химиотерапии. Контрольные обследования должны включать эндоскопическое исследование верхних отделов желудочно-кишечного тракта, компьютерную томографию органов грудной клетки, компьютерную томографию органов брюшной полости с внутривенным контрастированием, ОАК, БХАК, коагулограмму, ОАМ, определение уровней маркеров СА-72 и РЭА [63].

При раннем раке желудка cT1bNxM0 у соматически сохранного пациента показано выполнение резекции желудка или гастрэктомии с лимфаденэктомией в объеме D1+. Объем лимфаденэктомии может быть ограничен до D1+, так как при раннем раке процент поражения региональных лимфатических узлов невелик и в основном ограничивается лимфатическими узлами первого порядка. В

последующем показано динамическое наблюдение в сроки три месяца, шесть месяцев, далее ежегодно, которое должно включать: метилирование генов *TUSC3*, *CDH1*, *RANX3*; ЭГДС, КТ ОГК, КТ ОБП с в/в контрастированием, ОАК, БХАК, ОАМ, коагулограмму, РЭА, СА72-4. В случае возникновения рецидива и отягощенном статусе пациента показано проведение симптоматической терапии. В случае выявления рецидива заболевания при резектабельной опухоли и соматически удовлетворительном статусе показано хирургическое лечение и дальнейшее определение полиморфизмов генов *TYMS* и *TP53*. При выявлении фенотипов 3R/2R, A6/A6, 2G/3C по гену *TYMS* и фенотипа Arg/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапевтического лечения с включением фторпиримидинов. При выявлении фенотипов 3R/3R, 3G/3G по гену *TYMS* и фенотипа Pro/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапии без включения фторпиримидинов. В случае регресса опухолевого процесса и возможности удаления опухоли показан переход к хирургическому лечению и дальнейшее химиотерапевтическое лечение по прежней схеме. В случае прогрессирования при сохранном соматическом статусе пациента – пересмотр схемы химиотерапии, проведение химиотерапевтического лечения по новой схеме и контрольные обследования каждые три месяца или после каждых двух курсов химиотерапии. Контрольные обследования должны включать эндоскопическое исследование верхних отделов желудочно-кишечного тракта, компьютерную томографию органов грудной клетки, компьютерную томографию органов брюшной полости с внутривенным контрастированием, ОАК, БХАК, коагулограмму, ОАМ, определение уровней маркеров СА-72 и РЭА [63]. В случае выявления рецидива заболевания при нерезектабельной опухоли и соматически удовлетворительном статусе показано определение полиморфизмов генов *TYMS* и *TP53*. При выявлении фенотипов 3R/2R, A6/A6, 2G/3C по гену *TYMS* и фенотипа Arg/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапевтического лечения с включением фторпиримидинов. При выявлении фенотипов 3R/3R, 3G/3G по гену *TYMS* и фенотипа Pro/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапии без включения фторпиримидинов. В случае регресса опухолевого процесса и

возможности удаления опухоли, показан переход к хирургическому лечению и дальнейшее химиотерапевтическое лечение по прежней схеме. В случае прогрессирования при сохранном соматическом статусе пациента пересмотр схемы химиотерапии, проведение химиотерапевтического лечения по новой схеме и контрольные обследования каждые три месяца или после каждых двух курсов химиотерапии. Контрольные обследования должны включать эндоскопическое исследование верхних отделов желудочно-кишечного тракта, компьютерную томографию органов грудной клетки, компьютерную томографию органов брюшной полости с внутривенным контрастированием, ОАК, БХАК, коагулограмму, ОАМ, определение уровней маркеров СА-72 и РЭА [63].

При местно-распространенном раке желудка cT2-4NxM0 в случае незезектабельной опухоли и тяжелом соматическом статусе пациента показано проведение симптоматического лечения. При нерезектабельной опухоли и сохранном соматическом статусе пациента показано определение полиморфизмов генов *TYMS* и *TP53*. При выявлении фенотипов 3R/2R, A6/A6, 2G/3C по гену *TYMS* и фенотипа Arg/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапевтического лечения с включением фторпиримидинов. При выявлении фенотипов 3R/3R, 3G/3G по гену *TYMS* и фенотипа Pro/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапии без включения фторпиримидинов. В случае регресса опухолевого процесса и возможности удаления опухоли показан переход к хирургическому лечению и дальнейшее химиотерапевтическое лечение по прежней схеме. В случае прогрессирования при сохранном соматическом статусе пациента пересмотр схемы химиотерапии, проведение химиотерапевтического лечения по новой схеме и контрольные обследования каждые три месяца или после каждых двух курсов химиотерапии. Контрольные обследования должны включать эндоскопическое исследование верхних отделов желудочно-кишечного тракта, компьютерную томографию органов грудной клетки, компьютерную томографию органов брюшной полости с внутривенным контрастированием, ОАК, БХАК, коагулограмму, ОАМ, определение уровней маркеров СА-72 и РЭА [63].

При местно-распространенном раке желудка cT2-4NxM0 резектабельной опухоли и сохранном соматическом статусе показано проведение гастрэктомии с лимфаденэктомией в объеме D2.

В зависимости от результатов послеоперационного гистологического исследования дальнейшая тактика ведения пациента будет определяться следующим образом. При выявлении диссеминированного опухолевого процесса дальнейшее ведение будет проводиться как при клинически выявленном диссеминированном раке желудка.

При наличии резидуальной опухоли, определяемой микро- и макроскопически и сохранном соматическом статусе пациента, показано определение полиморфизмов генов *TYMS* и *TP53*. При выявлении фенотипов 3R/2R, A6/A6, 2G/3C по гену *TYMS* и фенотипа Arg/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапевтического лечения с включением фторпиримидинов. При выявлении фенотипов 3R/3R, 3G/3G по гену *TYMS* и фенотипа Pro/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапии без включения фторпиримидинов. В случае регресса опухолевого процесса и возможности удаления опухоли показан переход к хирургическому лечению и дальнейшее химиотерапевтическое лечение по прежней схеме. В случае прогрессирования при сохранном соматическом статусе пациента показан пересмотр схемы химиотерапии, проведение химиотерапевтического лечения по новой схеме и контрольные обследования каждые три месяца или после каждых двух курсов химиотерапии. Контрольные обследования должны включать эндоскопическое исследование верхних отделов желудочно-кишечного тракта, компьютерную томографию органов грудной клетки, компьютерную томографию органов брюшной полости с внутривенным контрастированием, ОАК, БХАК, коагулограмму, ОАМ, определение уровней маркеров СА-72 и РЭА [63]. При наличии резидуальной опухоли, определяемой микро- и макроскопически, и тяжелом соматическом статусе пациента, показано симптоматическое лечение.

При отсутствии резидуальной опухоли, определяемой микро- и макроскопически, сохранном соматическом статусе пациента, морфологического

стадирования pT2-4N0-1M0, показано динамическое наблюдение через три месяца, шесть месяцев и далее ежегодно с случае отсутствия рецидива заболевания в следующем объеме: эндоскопическое исследование верхних отделов желудочно-кишечного тракта, компьютерная томография органов грудной клетки, компьютерная томография органов брюшной полости с внутривенным контрастированием, ОАК, БХАК, коагулограмма, ОАМ, определение уровней маркеров СА-72 и РЭА, а также метилирования генов *TUSC3*, *CDH1*, *RANX3* [63]. При выявлении рецидива или прогрессирования заболевания показано определение полиморфизмов генов *TYMS* и *TP53*. При выявлении фенотипов 3R/2R, A6/A6, 2G/3C по гену *TYMS* и фенотипа Arg/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапевтического лечения с включением фторпиримидинов. При выявлении фенотипов 3R/3R, 3G/3G по гену *TYMS* и фенотипа Pro/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапии без включения фторпиримидинов. В случае регресса опухолевого процесса и возможности удаления опухоли показан переход к хирургическому лечению и дальнейшее химиотерапевтическое лечение по прежней схеме. В случае прогрессирования при сохранном соматическом статусе пациента пересмотр схемы химиотерапии, проведение химиотерапевтического лечения по новой схеме и контрольные обследования каждые три месяца или после каждых двух курсов химиотерапии. Контрольные обследования должны включать эндоскопическое исследование верхних отделов желудочно-кишечного тракта, компьютерную томографию органов грудной клетки, компьютерную томографию органов брюшной полости с внутривенным контрастированием, ОАК, БХАК, коагулограмму, ОАМ, определение уровней маркеров СА-72 и РЭА [63].

При отсутствии резидуальной опухоли, определяемой микро- и макроскопически, сохранном соматическом статусе пациента, морфологического стадирования pT2-4N2-3M0, показано определение полиморфизмов генов *TYMS* и *TP53*. При выявлении фенотипов 3R/2R, A6/A6, 2G/3C по гену *TYMS* и фенотипа Arg/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапевтического лечения с включением фторпиримидинов. При выявлении фенотипов 3R/3R, 3G/3G по гену *TYMS* и фенотипа Pro/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапии без

включения фторпиримидинов. В случае регресса опухолевого процесса и возможности удаления опухоли показан переход к хирургическому лечению и дальнейшее химиотерапевтическое лечение по прежней схеме. В случае прогрессирования при сохранном соматическом статусе пациента пересмотр схемы химиотерапии, проведение химиотерапевтического лечения по новой схеме и контрольные обследования каждые три месяца или после каждых двух курсов химиотерапии. Контрольные обследования должны включать эндоскопическое исследование верхних отделов желудочно-кишечного тракта, компьютерную томографию органов грудной клетки, компьютерную томографию органов брюшной полости с внутривенным контрастированием, ОАК, БХАК, коагулограмму, ОАМ, определение уровней маркеров СА-72 и РЭА [63].

При диссеминированном раке желудка и наличии осложнений, таких как перфорация, кровотечение, непроходимость и другие, показано симптоматическое хирургическое лечение, если в дальнейшем соматический статус пациента определяется как тяжелый, показана дальнейшая симптоматическая терапия.

При диссеминированном раке желудка и сохранном соматическом статусе пациента, а также после ликвидации осложнений и сохранении удовлетворительного соматического статуса пациента показано определение полиморфизмов генов *TYMS* и *TP53*. При выявлении фенотипов 3R/2R, A6/A6, 2G/3C по гену *TYMS* и фенотипа Arg/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапевтического лечения с включением фторпиримидинов. При выявлении фенотипов 3R/3R, 3G/3G по гену *TYMS* и фенотипа Pro/Pro по гену *TP53* необходимо проведение химиотерапии без включения фторпиримидинов. В случае регресса опухолевого процесса и возможности удаления опухоли показан переход к хирургическому лечению и дальнейшее химиотерапевтическое лечение по прежней схеме. В случае прогрессирования при сохранном соматическом статусе пациента пересмотр схемы химиотерапии, проведение химиотерапевтического лечения по новой схеме и контрольные обследования каждые три месяца или после каждых двух курсов химиотерапии. Контрольные обследования должны включать эндоскопическое исследование верхних отделов желудочно-кишечного тракта,

компьютерную томографию органов грудной клетки, компьютерную томографию органов брюшной полости с внутривенным контрастированием, ОАК, БХАК, коагулограмму, ОАМ, определение уровней маркеров СА-72 и РЭА [63].

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Характеристика системы молекулярных маркеров в диагностике рака желудка

С учетом результатов настоящего исследования наибольшее значение в диагностике злокачественных поражений желудка имеет анализ метилирования генов *RASSF1A* и *MLH1*, так как их метилирование определялось преимущественно в опухолевой ткани, однако применение их в монорежиме нецелесообразно, так как частота их метилирования в опухоли составляет не более 20 % [5].

Высокая частота аномального метилирования генов *CDH1* и *DAPK* в опухоли и неопухолевой ткани желудка отмечалась и другими исследователями как для тканей желудка, так и пищевода [129, 165]. Помимо этого, в ряде публикаций показано повышение до 70 % частоты аномального метилирования *CDH1* в слизистой оболочке желудка при хроническом гастрите. Высокая частота метилирования генов *TUSC3*, *CDH1*, *DAPK* как в опухолевой, так и в морфологически неизменной ткани слизистой желудка не дает понимания, связано ли метилирование этих генов с опухолеобразованием или оно обусловлено другими процессами, происходящими в слизистой оболочке желудка [184]. К таким процессам можно отнести накопление возрастных изменений в слизистой оболочке желудка, появление в ней предраковых изменений на молекулярном уровне, которые еще не проявились в виде опухолевого роста. Необходимо отметить, что интактные ткани, полученные из края резекции, в которых наблюдалась высокая частота аномального метилирования генов *TUSC3*, *CDH1*, *DAPK*, являются лишь условно нормальными тканями. Все неопухолевые ткани слизистой желудка из области края резекции, в которых определено аномальное метилирование, характеризовались признаками хронического гастрита различной активности и формы, а также очагами кишечной метаплазии. Такие изменения рассматриваются как предраковые состояния и могут объяснять повышенную частоту аномального метилирования [4].

Метилирование генов может быть связано с возрастом (тип А) или непосредственно с опухолевым процессом (тип С).

Аномальное метилирование генома типа А появляется в результате возрастных изменений в нормальных клетках и ему подвергаются в том числе гены, регулирующие рост и дифференцировку клеток. Такое метилирование сдерживает гиперпролиферативные изменения, которые предшествуют образованию опухоли. В противоположность этому метилирование генома типа С существует только в опухоли, приводя к глобальному гиперметилированию генов-супрессоров. Предлагается несколько гипотез, которые могут объяснить аномальное метилирование, связанное с возрастом и опухолеобразованием, для генов-супрессоров при раке желудка, а также возможную корреляцию между ними [4].

Одно из предположений состоит в том, что при опухолеобразовании и возрастной инактивации метилирование затрагивает различные сайты в CpG-островках генов. Метилирование типа А может распространяться по промотору, а при превышении некоторого порогового уровня приводит к инактивации гена и переходить в метилирование типа С, поэтому аномальное метилирование одних и тех же генов может присутствовать как в неопухолевых тканях, так и в опухолях [206]. Эта гипотеза может объяснить возникновение опухолей с интенсивно метилированным фенотипом. Однако такие опухоли отмечаются как в зрелом, так и молодом возрасте. Другая гипотеза предполагает, что инактивация генов-супрессоров с возрастом служит одной из причин образования полей канцеризации, которые затем становятся субстратом для образования опухолевого клона [244, 262]. Таким образом, принимая во внимание теорию полей канцеризации, возрастная инактивация является фактором риска для появления опухоли; возможно, существует связь между возрастными изменениями клеточного генома и опухолеобразованием. В этом случае дополнительные повреждения в генах-супрессорах и генах, связанных с развитием опухоли, накапливающиеся в клетках поля канцеризации, приведут к появлению опухолевого клона [4].

Анализ метилирования генов в группировках, разделенных по

классификации P. Lauren, не выявил существенных различий в показателях, за исключением гена *CDH1*, частота метилирования которого статистически значимо выше в опухолях диффузного типа [4]. Речь в данном случае идет не о наследственном диффузном раке желудка (опухоль 1-го типа), а о спорадическом варианте заболевания (опухоль 3-го типа). Следует отметить, что ген *CDH1* кодирует белок E-кадгерин, который отвечает за адгезию клеток, а снижение его активности приводит к утрате клеточных контактов и приобретению опухолевой клеткой способности к инвазии и метастазированию. Таким образом, становится понятно, почему диффузный тип рака характеризуется отсутствием четких границ опухоли, «рассыпным» типом роста, слабым взаимодействием клеток друг с другом и почему для раннего рака диффузного типа характерен стелющийся инфильтрирующий рост в слизистой оболочке [216]. Утверждение, что инактивация гена *CDH1* наиболее характерна для диффузного типа опухоли, подтверждается работами некоторых других исследователей; кроме того, при диффузном типе рака отмечено повышение частоты структурных мутаций этого гена до 50 % [4].

Определено, что интестинальный и диффузный типы рака различаются по биологическому поведению, морфогенезу, гистологической структуре, фенотипу, таким образом, полученные результаты косвенно подтверждают это [219].

Проведенный анализ метилирования генов в различных возрастных группировках показал, что гены *TUSC3* и *MLH1* статистически значимо чаще метилируются в опухолях ранней возрастной группировки до 50 лет, что исключает для этих генов метилирование типа А [4].

Анализ частоты метилирования генов в зависимости от распространенности опухоли показал отсутствие различий между группировками раннего, местно-распространенного и генерализованного рака у всех генов, за исключением *TUSC3*, частота метилирования которого постепенно нарастает по мере прогрессирования опухолевого процесса. Частота метилирования гена *CDH1* также статистически значимо выше при местно-распространенном раке, то есть инактивация гена посредством метилирования выше на том уровне, когда опухоль начинает

метастазировать в лимфатические узлы. Таким образом, данные свидетельствуют, что аномальное метилирование генов *TUSC3* и *CDH1* связано с прогрессом опухолевого процесса и появлением метастазов [4].

Анализ частоты метилирования генов в зависимости от размера опухоли показал статистически значимые различия между опухолями размером до 2 и более 4 см для *DAPK*; до 2 и 2–4 см для генов *TUSC3*, *CDH1*, *RASSF1A*; 2–4 и более 4 см — для генов *CDH1*, *RASSF1A*, *MLH1*.

Учитывая тенденции изменения частот метилирования по всем анализируемым генам, кроме *DAPK*, можно сделать вывод, что в целом с увеличением опухоли до 2–4 см повышается и частота метилирования генов. Однако в дальнейшем, по мере прогрессирования опухолевого процесса, частота метилирования снижается, что объясняется тем, что инактивация генов происходит другими путями, например, в результате структурного повреждения посредством обширных делеций или мутаций [4].

Помимо этого, данные изменения метилирования соответствуют клиническим, происходящим в опухоли: по мере ее увеличения наблюдается увеличение массы опухоли с последующим некрозом и образованием изъязвления в связи с недостаточностью трофики [4].

Важным клиническим параметром, определяющим тактику ведения больного, является лимфогенное метастазирование опухоли. Информация о поражении лимфатических узлов на дооперационном этапе позволяет планировать объем оперативного вмешательства. Поэтому изучена возможность использования эпигенетической части панели маркеров для оценки вероятности метастазирования рака желудка в регионарные лимфатические узлы [4].

Анализ метилирования генов в зависимости от поражения лимфатических узлов показал отсутствие статистически значимых различий между исследуемыми группировками по всем генам, за исключением *DAPK*. Однако обращает на себя внимание, что наибольшая частота метилирования исследуемых генов определяется у пациентов без метастазирования в лимфатические узлы, а это еще раз подтверждает, что аномальное метилирование генов-супрессоров является

ранним событием канцерогенеза и частота его снижается по мере развития опухолевого процесса. При поражении лимфатических узлов выявлено статистически значимое уменьшение частоты метилирования гена *DAPK*, что достаточно трудно объяснить, исходя из функции этого гена. В норме его функция связана со стабилизацией клеточных контактов и стимулированием апоптоза, поэтому его инактивация должна приводить к потере этих контактов и метастазированию, а также отмене апоптоза поврежденных клеток, но ген инактивируется другими механизмами [4].

С целью определения частоты метилирования у каждого из 106 пациентов первой подгруппы исследования были рассчитаны комплексные показатели: индекс метилирования генов (ИМГен) и индекс метилирования образцов (ИМОбр).

Введение этих единиц позволило разделить исследуемые опухоли желудка на рак с высоким фенотипом метилирования (СИМР+) и низким фенотипом метилирования (СИМР-). Подобное разделение предложено для колоректального рака и связано с различным типом молекулярного патогенеза его опухолей и, как следствие, с различным клиническим поведением этих опухолей. Показано, что опухоли СИМР+ имеют более благоприятное течение и характеризуются лучшим ответом на лечение [4].

В исследовании удалось оценить частоту метилирования генов не только в опухоли, но и в окружающей пограничной ткани желудка (ИМОбр). Инактивация генов-супрессоров в пограничной ткани свидетельствует о влиянии опухоли на рядом расположенные ткани и является причиной развития рецидивов после хирургического лечения.

Проведено исследование среднего значения ИМ по генам и образцам в разных возрастных группировках, а также в группировках, разделенных по классификации P. Lauren, и в группировках в зависимости от поражения лимфатических узлов, при этом не было выявлено статистически значимых различий. Однако при анализе средних значений ИМ в группировках раннего, местно-распространенного и генерализованного рака определены статистически значимые различия по ИМОбр в первых двух группировках, а также во 2-й и 3-й

группировках. Это дает возможность считать, что по мере прогрессирования опухолевого процесса частота метилирования всей слизистой оболочки сначала постепенно снижается и затем вновь возрастает, следовательно, подвергается функциональным изменениям не только опухолевая ткань, но и окружающая ее слизистая [4].

Полученные результаты довольно четко обозначили вопрос о вовлеченности окружающей неопухолевогой ткани в процесс канцерогенеза. Поэтому пограничная с опухолевой морфологически нормальная ткань не должна служить контролем для эпигенетической части панели маркеров, основанной на исследовании аномального метилирования генов *CDH1*, *RASSF1A*, *MLH1*, *TUSC3*, *DAPK* при раке желудка [4].

В процессе исследования изучено метилирование генов как в опухоли и пограничной, морфологически неизменной неопухолевогой ткани, полученной от пациента, так и в биоптатах слизистой ткани желудка, полученных от пациентов с неопухолевыми заболеваниями желудочно-кишечного тракта, в частности с ЖКБ (группа контроля).

Выявленная разница в частоте метилирования генов *TUSC3*, *CDH1*, *DAPK* в первой подгруппе исследования и отсутствие метилирования генов *RASSF1A*, *MLH1* в группе контроля, что следует использовать в диагностике рака желудка.

Различие по показателю ИМГен между первой подгруппой исследования и группой контроля свидетельствует о наличии в опухоли функциональных изменений генов-супрессоров, отличающихся от слизистой в отсутствие опухолевого процесса, что также следует использовать в диагностике рака.

Для оценки возможной связи экспрессии генов *hTERT*, *MMP7*, *MMP9*, *TP53*, *PTGS2*, *BIRC5* с развитием рака желудка изучена экспрессия этих генов в опухоли и неопухоловом эпителии слизистой желудка методом ПЦР с обратной транскрипцией у 106 пациентов с раком желудка первой подгруппы исследования.

Согласно результатам анализа, показатели экспрессии генов *hTERT*, *MMP7*, *MMP9*, *BIRC5*, *PTGS2* в точке 2 (опухоль) (Рисунок 2.3) имели существенно большую величину по сравнению с точками 1, 3, 4 (слизистая близлежащих и

отдаленных от опухоли участков желудка), следовательно, в опухоли количества белков, синтезируемых в результате возможной экспрессии генов *hTERT*, *MMP7*, *MMP9*, *BIRC5*, *PTGS2*, будет значимо больше, чем в окружающей неопухолеевой слизистой желудка [4].

Таким образом, по экспрессии исследуемых генов опухоль отличается от окружающей слизистой даже на незначительном расстоянии от ее края, что необходимо оценивать при исследовании зарубцевавшейся язвы, которая может представлять собой эпителизированный ранний рак.

Результаты анализа экспрессии генов *hTERT*, *MMP7*, *MMP9*, *BIRC5*, *PTGS2* в группировках, разделенных по классификации P. Lauren, продемонстрировали наличие различий только между показателями экспрессии генов *hTERT* и *BIRC5*. Экспрессия этих генов при интестинальном типе опухоли статистически значимо выше, чем при диффузном, что связано с различиями этих типов рака [4].

Известно, что диффузный и интестинальный типы рака различаются по морфогенезу, гистологической структуре, фенотипу, биологическому поведению. Таким образом, полученные результаты косвенно подтверждают это утверждение, а также говорят о генетически разной природе данных типов рака желудка [4].

При сопоставлении экспрессии генов *hTERT*, *MMP7*, *MMP9*, *BIRC5*, *PTGS2* с клиническими параметрами, характеризующими опухоль в группировках раннего, местно-распространенного и генерализованного рака получена статистически значимая разница между уровнями экспрессии гена *BIRC5* в группировках раннего и местно-распространенного рака, а также в группировках местно-распространенного и генерализованного рака, что, говорит о его роли как в инициации канцерогенеза, увеличении объема опухоли, так и при метастазировании [4]. Это необходимо использовать для верификации скрытой генерализации опухолевого процесса.

Выявленное различие в уровнях экспрессии генов *PTGS2* и *MMP7* в группировках раннего и местно-распространенного рака свидетельствует об их роли как в инициации канцерогенеза, так и в увеличении объема опухоли.

В исследуемых группировках не выявлено статистически значимых различий

по экспрессии генов *hTERT* и *MMP9*, во всех клинических группировках уровень экспрессии этих генов был одинаковым, что свидетельствует о том, что экспрессия этих генов повышается на начальном этапе канцерогенеза и остается «поддерживающей» при дальнейшем развитии опухоли.

Проведенный анализ уровней экспрессии генов в зависимости от размера опухоли показал наличие статистически значимых различий между опухолями размером до 2 см и более 4 см для гена *BIRC5*, до 2 и 2–4 см для гена *MMP7*, а также до 2 см и более 4 см для гена *PTGS2*. Таким образом, увеличение опухоли сочетается и определяется блокированием апоптоза, разрушением структурных компонентов внеклеточного матрикса и увеличением темпа неоангиогенеза [4].

Сравнение уровней экспрессии отдельных генов (*hTERT*, *MMP7*, *MMP9*, *BIRC5*, *PTGS2*) в разных точках забора материала в первой подгруппе исследования и в группе контроля (больные ЖКБ) показало существенно более высокую экспрессию генов при раке, чем в интактной слизистой желудка при ЖКБ, что позволяет использовать оценку экспрессии в диагностике рака желудка, а также в дифференциальной диагностике относительно воспалительных заболеваний гастродуоденальной зоны.

Анализ активности фермента теломеразы показал, что на прилежащих к опухоли слизистой и отдаленных от нее участках уровни ее активности не отличаются.

Определена разница в показателях активности теломеразы в зависимости от возраста. Наименьшая активность отмечена у пациентов в возрасте старше 60 лет, что объясняется снижением регенераторного потенциала слизистой оболочки в условиях естественного старения организма.

Различий по активности теломеразы в группировках у пациентов с интестинальным и диффузным типами рака желудка не отмечено, то есть, от этих типов рака активность теломеразы существенно не зависит и другие гены обуславливают различие в их молекулярном патогенезе.

Анализ результатов не выявил существенных различий в активности теломеразы у пациентов с ранним, местно-распространенным и

диссеминированным раком в зависимости от распространенности опухолевого процесса, что говорит о важной роли фермента на всех этапах канцерогенеза.

С увеличением размера опухоли активность теломеразы повышается, что можно объяснить увеличением клеточной массы опухоли, следовательно, и большей активностью необходимого для поддержания стабильности хромосом в процессе деления клетки фермента.

Активность теломеразы не зависит от поражения лимфатических узлов, что исключает возможность использования ее для прогнозирования регионарного метастазирования.

Расположенная рядом опухоль не влияет на активность теломеразы в пограничной ткани желудка, поскольку значимых различий у пациентов первой подгруппы исследования и группы контроля (пациенты с ЖКБ, имеющие интактную слизистую желудка) по этому показателю выявлено не было. Повышение активности теломеразы в опухоли позволяет использовать ее оценку в диагностике рака желудка. Таким образом, полученные результаты дополняют данные других исследователей [267].

С целью определения возможности использования молекулярных маркеров на этапе дооперационной диагностики проведено сопоставление частоты метилирования генов *CDH1*, *RASSF1A*, *MLH1*, *TUSC3*, *DAPK*, экспрессии генов *hTERT*, *PTGS2*, *MMP7*, *MMP9*, *BIRC5* и АТ в образцах биоптатов опухоли, полученных в дооперационном периоде в ходе ЭГДС у 53 больных раком желудка первой подгруппы исследования, с результатами молекулярной диагностики опухолевой ткани, полученной у тех же пациентов при изучении послеоперационного материала.

В результате проведенного исследования удалось показать возможность определения метилирования генов *CDH1*, *RASSF1A*, *MLH1*, *TUSC3*, *DAPK* и экспрессии *hTERT*, *BIRC5*, *MMP9*, *MMP7*, *PTGS2* генов, активности теломеразы в слизистой желудка на дооперационном этапе. Полученный в результате эндоскопического исследования материал является достаточным по объему для осуществления молекулярных исследований диагностических маркеров.

Использование для этой цели образцов, полученных при эндоскопическом исследовании, позволяет производить оценку данных показателей с той же достоверностью, что и при анализе образцов, полученных интраоперационно. Определение молекулярных параметров в материале биопсии в спорных случаях дополняет результаты гистологического исследования и дает дополнительную информацию о клинических характеристиках опухоли, имеющих значение для определения тактики ведения и прогноза [5].

В окончательный анализ вошло исследование аномального метилирования генов *RASSF1A*, *MLH1*, исследование экспрессии генов *BIRC5*, *MMP7*, *hTERT* и активности теломеразы.

4.2. Возможности использования молекулярных маркеров в определении тактики комбинированного лечения больных раком желудка

Во второй подгруппе исследования выявлены различия у больных, имеющих полиморфизмы в 3'UTR гена *TYMS*, так генотип А-6/А-6 чаще встречается у пациентов с высоко- и умереннодифференцированными аденокарциномами, а также при интестинальном типе рака желудка.

Формы рака желудка с более благоприятным течением чаще выявляются у пациентов с генотипом А-6/А-6. Есть данные, что делеция 6 нуклеотидов 3'UTR гена *TYMS* приводит к дестабилизации его РНК и связана с низкой экспрессией ТС [67, 195]. В работах, посвященных изучению взаимосвязи экспрессии ТС с клинико-морфологическими характеристиками рака желудка, показано, что у пациентов с высокодифференцированным раком экспрессия фермента ниже, что косвенно подтверждает собственные результаты [220].

Анализ полиморфизмов гена *TYMS* показал, что у пациентов, имеющих генотип 2R/2R, чаще выявляется метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов.

В ходе исследования впервые удалось показать, что определенные полиморфные варианты гена *TYMS*, в частности наличие тандемного повтора

2R/2R, связаны с метастазированием в регионарные лимфатические узлы [6]. В работах других исследователей, изучавших взаимосвязь полиморфизмов и экспрессии ТС с клинико-морфологическими характеристиками опухоли, в частности с метастатическим поражением лимфатических узлов, не было получено статистически значимых различий [107].

Метастазирование является процессом, в котором участвует несколько генных сетей. Низкий уровень экспрессии ТС, проявляющийся при полиморфизме 2R/2R, играет роль в развитии метастатического поражения и в более агрессивном поведении опухоли.

Полученные данные свидетельствуют, что генотип 2R/2R гена *TYMS* следует расценивать как фактор неблагоприятного прогноза при раке желудка и большого риска регионарных метастазов у пациентов. В этой связи сочетание у пациента генотипа 2R/2R с другими маркерами и клиническими факторами говорит о необходимости выполнения лимфаденэктомии в расширенном объеме и проведения химиотерапии в послеоперационный период.

Поскольку полиморфные замены в ДНК гена определяют активность ТС, а она, в свою очередь, влияет на чувствительность к химиотерапии, проведено исследование у пациентов, которые проходили комбинированное лечение. Оценивалась возможность использования полиморфизмов генов *TYMS* и *TP53* в качестве дополнительного фактора, определяющего эффективность проводимого лечения у больных местно-распространенным раком желудка, а также индивидуальная чувствительность к химиотерапии.

У пациентов с генотипом 3G/3G гена *TYMS* на фоне адъювантной химиотерапии на основе 5-ФУ в течение первых 3 лет после радикальной операции рецидив заболевания развивался чаще. Сочетанный генотип 2G/3C чаще определялся у пациентов, у которых на фоне комбинированного лечения не возникло рецидива заболевания в течение первых 3 лет после операции. Также необходимо обратить внимание на генотип 3R/2R, который чаще определялся у больных без прогрессирования заболевания, и генотип G/G, который наиболее часто встречается при рецидиве заболевания.

Полученные результаты согласуются с данными других исследований, так как генотипы 3G/3G и G/G относятся к неблагоприятным, с высоким уровнем экспрессии ТС, что связано с худшим ответом на химиотерапию 5-ФУ и, соответственно, худшим прогнозом заболевания, в то время как генотипы 2G/3C и 2R/2R коррелируют с низким уровнем экспрессии ТС и с лучшим прогнозом [67].

Полиморфизм Arg/Pro гена *TP53* чаще встречался у больных с отсутствием рецидива заболевания в течение первых 3 лет после операции на фоне адъювантной химиотерапии с 5-ФУ, а полиморфизм Pro/Pro чаще определялся у больных с рецидивом опухоли.

Активация гена *TP53* наступает при повреждении ДНК клетки. Если репарация ДНК невозможна, продукт гена инициирует апоптоз, что приводит к гибели клетки. Это существенная функция белка при химиотерапии, при которой поврежденные препаратом опухолевые клетки подвергаются апоптозу. На активность белка влияют полиморфные варианты в ДНК гена, которые располагаются в его кодирующих и регуляторных областях. Формы белка с Pro и Arg обладают различной электрофоретической активностью, различными биохимическими и биологическими свойствами. Форма белка с Pro менее эффективна в индукции апоптоза и не обеспечивает адекватной гибели опухолевых клеток в отсутствие формы с Arg [67, 146].

По результатам собственных исследований выявлено, что генотип Pro/Pro связан с худшей эффективностью адъювантной химиотерапии на основе производных фторпиримидинов, тогда как полиморфизм Arg/Pro связан с большей эффективностью химиотерапии на основе 5-ФУ.

Проведен анализ корреляции полиморфизмов гена *TUMS* с безрецидивной и общей выживаемостью пациентов, который показал связь между безрецидивной выживаемостью, общей выживаемостью и полиморфизмами 5'UTR VNTR.

Исходя из результатов, генотип 3R/3R является фактором повышенного риска рецидивирования, худшей выживаемости и плохой восприимчивости к химиотерапии с использованием производных фторпиримидинов у больных с местно-распространенным раком желудка после радикальной операции. При этом

генотип 3R/2R служит фактором сниженного риска рецидивирования и связан с лучшим ответом на лечение.

Проведен анализ корреляции полиморфизмов гена *TP53* с безрецидивной и общей выживаемостью пациентов и получены результаты, которые согласуются с данными других авторов при изучении злокачественных опухолей других локализаций. Так при раке толстой кишки и раке легкого генотип Pro/Pro связан с худшей выживаемостью. При анализе взаимосвязи между наличием полиморфизмов *TP53* и эффективностью химиотерапии было показано, что на фоне адъювантной химиотерапии с применением цисплатина, паклитаксела, антрациклинов при раке молочной железы генотип Arg/Arg коррелирует с лучшей выживаемостью по сравнению с Pro/Pro [265]. Показано, что безрецидивная выживаемость больных статистически значимо связана с наличием полиморфных вариантов в гене *TP53* в кодоне 72. У пациентов с генотипом Pro/Pro повышен риск прогрессирования заболевания, в данной группировке самая низкая средняя безрецидивная выживаемость, соответственно, в этой группировке ниже и эффективность химиотерапии на основе 5-ФУ. В то же время гетерозиготы Arg/Pro имеют самую высокую среднюю безрецидивную выживаемость, что свидетельствует о том, что у пациентов с данным генотипом ниже вероятность развития рецидива опухоли и лучше восприимчивость к химиотерапии с использованием производных фторпиримидинов. Полиморфизмы гена *TP53* SNP в кодоне 72 следует считать молекулярными факторами, определяющими эффективность лечения на основе 5-ФУ у больных местно-распространенным раком желудка.

В ходе собственных исследований заключено, что для улучшения результатов лечения больных местно-распространенным раком желудка целесообразна оценка некоторых молекулярных факторов, которые определяют индивидуальные различия в фармакодинамике и фармакокинетики лекарственных средств, а также связаны с течением заболевания, прогнозом и ответом на лечение, что позволяет осуществлять оптимальный подход к выбору схемы химиотерапии. При изучении взаимосвязи полиморфизмов с клинико-морфологическими

характеристиками рака желудка у больных выявлены генотипы, статистически значимо коррелирующие с благоприятным клиническим течением опухолевого процесса. К таким генотипам гена *TYMS* относятся А-6/А-6, 2G/3C, а гена *TP53* — Arg/Pro. Генотип А-6/А-6 статистически значимо чаще встречается у больных с высоко- и умереннодифференцированной аденокарциномой и с интестинальным типом рака желудка. Генотипы 2G/3C и Arg/Pro статистически значимо чаще выявляются у больных с отсутствием рецидива рака желудка в течение первых 3 лет после радикальной операции на фоне адъювантной химиотерапии с применением схем на основе 5-ФУ. С неблагоприятным течением связаны генотипы 2R/2R, 3G/3G (*TYMS*) и Pro/Pro (*TP53*). Генотип 2R/2R чаще определяется при метастатическом поражении регионарных лимфатических узлов, а генотипы 3G/3G и Pro/Pro — у больных с возникшим рецидивом рака в течение 3 лет после радикальной операции на фоне адъювантной химиотерапии на основе 5-ФУ. С целью изучения возможности использования полиморфизмов генов *TYMS* и *TP53* в качестве критериев выбора терапии исследовали взаимосвязь между определенным генотипом и отдаленными результатами комбинированного лечения у больных местно-распространенным раком желудка, которым после радикальной операции проведена химиотерапия с применением схем на основе фторпиримидинов. В результате исследования показано, что 3-х летняя безрецидивная и общая выживаемость больных раком желудка статистически значимо ниже у пациентов с генотипом 3R/3R по сравнению с 3R/2R гена *TYMS*. По полиморфизмам гена *TP53* наблюдается значимое снижение 3-летней безрецидивной выживаемости больных с генотипом Pro/Pro по сравнению с Arg/Arg и Arg/Pro, статистической значимой связи с общей выживаемостью не установлено. Исходя из полученных результатов, генотипы 3R/2R (*TYMS*) и Arg/Arg и Arg/Pro (*TP53*) можно отнести к факторам, связанным с более высокой эффективностью лечения больных местно-распространенным раком желудка препаратами фторпиримидинов после радикальной операции в рамках комбинированного лечения, и их можно рассматривать как факторы высокой чувствительности опухоли к химиопрепаратам. В свою очередь, генотипы 3R/3R (*TYMS*) и Pro/Pro (*TP53*) служат

факторами более низкой эффективности адъювантной химиотерапии и связаны с низкой чувствительностью опухоли к лекарственной терапии на основе 5-ФУ. Оценка полиморфизмов генов *TYMS* (R2/R3, G>C, del 6 bp) и *TP53* (72 Arg>Pro, ins 16 bp) доступна для определения на дооперационном этапе. Для генотипирования пациентов выделение ДНК можно осуществлять не только из опухолевой ткани, но и из лимфоцитов периферической крови, что позволяет корректировать тактику лечения больного уже на дооперационном этапе. Дооперационное генотипирование можно использовать для определения эффективности адъювантной химиотерапии на основе фторпиримидинов после радикального хирургического лечения у больных местно-распространенным раком желудка, что лежит в основе выбора оптимальной тактики лечения больного, так как генотипы 2R/3R, Arg/Pro и Arg/Arg связаны с высокой эффективностью схем химиотерапии на основе 5-ФУ, а генотипы 3R/3R и Pro/Pro — с низкой, что было показано в результате исследования [6].

4.3. Роль молекулярных маркеров в определении прогноза рецидива рака желудка

Известно, что на выживаемость больных после радикальных операций по поводу рака желудка в первую очередь влияет ряд факторов, таких как стадия заболевания, анатомическая форма опухоли, метастазы в лимфатических узлах, глубина опухолевой инвазии, локализация опухоли и объем выполненного оперативного вмешательства [69].

При анализе 2- и 3-летней выживаемости оперированных пациентов установлено, что чем выше стадия заболевания, тем меньше продолжительность жизни. Кроме того, продолжительность жизни больше у больных с гистологически интактными краями резекции [69].

В ходе исследования не удалось выявить статистически значимых корреляций между клиническими характеристиками удаленных опухолей, такими как опухолевая локализация, размер, наличие инвазивного роста, чистота линии

резекции и наличие метастазов в лимфатических узлах с отсроченным метилированием в культе желудка [6].

Определено, что неблагоприятный исход заболевания чаще возникает в группе *met+*, чем в группе *met-*, что позволяет рассматривать наличие метилирования генов в качестве маркера плохого прогноза, а точнее — генерализации опухолевого процесса.

Другим важным клиническим параметром, определяющим индивидуальную тактику ведения больного даже после удаления опухоли, является опухолевое поражение лимфатических узлов. В группировках *met+* и *met-* по показателю метастатического поражения лимфатических узлов разницы не получено, что исключает связь между наличием отсроченного метилирования в культе желудка и метастазированием в лимфатические узлы. Однако при сравнении пациентов с наличием или отсутствием отдаленных метастазов удалось выявить, что у пациентов с отдаленными метастазами отсроченное метилирование определяется чаще. Очевидно, что у пациентов без отдаленных метастазов отсроченное метилирование не определялось [6, 63].

При работе над системой молекулярных маркеров особое внимание уделялось подбору генов, ее составляющих. Все выбранные гены имеют большое значение в канцерогенезе желудка. Из шести исследуемых генов аномальное метилирование в биоптатах слизистой желудка было определено только для трех — *TUSC3*, *CDH1*, *RUNX3*. Метилирование генов *RASSF1A*, *MLH1*, *DAPK* не было выявлено ни в одном из случаев. Отсутствие изменения этих генов можно объяснить тем, что их аномальное метилирование происходит в уже растущей опухоли и определяет клинические черты опухолевого роста. Гиперметилирование *RUNX3*, *CDH1*, *TUSC3* определяется при предраковых изменениях слизистой желудка, таких как кишечная метаплазия и аденома желудка; это указывает на то, что инактивация данных генов — одно из важнейших событий в канцерогенезе желудка [241]. Отсроченное метилирование генов в морфологически нормальной культе желудка может происходить по разным причинам. Это может быть связано с развитием опухолевого процесса, формированием возможного рецидива или

генерализацией заболевания, быть как отражением его молекулярных характеристик, так и свойством организма пациента, у которого развивается опухоль, а также связано с возрастом, диетой или другими факторами [63].

Суммируя все вышесказанное, можно заключить, что оценка молекулярных маркеров у больных, перенесших различные виды резекции желудка по поводу рака, имеет большое значение и позволяет прогнозировать возможность генерализации опухолевого процесса. Это диктует необходимость внедрения в рутинную практику оценки прогностических маркеров у пациентов после резекции желудка.

В ходе исследования заключено, что для послеоперационного наблюдения за больными, оперированными по поводу рака желудка в объеме резекции, целесообразно проводить исследование прогностических молекулярных маркеров с целью предсказания возможного рецидива и генерализации опухолевого процесса до появления инструментальных признаков [63].

Проведена оценка молекулярных изменений в послеоперационных биоптатах морфологически неизменной слизистой оболочки, полученных при ЭГДС в срок от 6 до 39 месяцев после первичного хирургического лечения. Было проведено исследование аномального метилирования генов-супрессоров опухолевого роста *CDH1*, *RASSF1A*, *MLH1*, *TUSC3*, *DAPK*, *RUNX3* [4, 6]. Известно, что эпигенетические изменения ДНК, к которым относится нарушение метилирования регуляторных районов генов, являются самыми ранними событиями в процессе канцерогенеза, приводящими к повреждению экспрессии генов, ответственных за регуляцию клеточного цикла, пролиферацию и дифференцировку. Эти изменения создают потенциал молекулярно-генетической нестабильности, который в течение времени может реализоваться в виде опухолевого роста [73]. В настоящее время аномальное метилирование представляется опухолевым маркером, который появляется до клинической манифестации заболевания [69, 279].

Из шести исследуемых генов (*CDH1*, *RASSF1A*, *MLH1*, *TUSC3*, *DAPK*, *RUNX3*) аномальное метилирование в послеоперационных биоптатах из слизистой

оболочки культи желудка определено только для генов *TUSC3*, *CDH1*, *RUNX3*; аномальное метилирование генов *RASSF1A*, *MLH1*, *DAPK* в морфологически интактной ткани слизистой желудка не определялось [6].

Отсроченное метилирование в культе желудка не связано с локализацией опухоли, ее размером, наличием инвазивного роста, опухолевой дифференцировкой, чистотой линии резекции и метастазами в лимфатические узлы. Однако отсроченное метилирование статистически значимо коррелирует с наличием отдаленных метастазов, сопутствующими заболеваниями ЖКТ и генерализацией опухолевого процесса.

Исследование аномального метилирования генов *CDH1*, *TUSC3*, *RUNX3* следует использовать для оценки состояния морфологически неизменной слизистой оболочки культи желудка для динамического наблюдения за больными с целью выявления генерализации опухолевого процесса еще до инструментального ее подтверждения и для своевременной коррекции химиотерапии.

Таким образом, в окончательном варианте система предиктивных маркеров рецидива и генерализации рака желудка включила определение метилирования только генов *CDH1*, *TUSC3*, *RUNX3* как самых ранних событий в процессе канцерогенеза, приводящих к эпигенетическому изменению генов, создающих потенциал нестабильности при рецидиве и генерализации опухолевого процесса [6].

По результатам проведенной работы с оценкой молекулярных маркеров достоверно подтверждено, что выполнение органосохраняющих операций в объеме резекции органа в сочетании с радикальной лимфодиссекцией при условии чистоты краев резекции является адекватным лечением, ведет к увеличению случаев реконвалесценции и снижает возможность диссеминации опухолевого процесса.

Анализ молекулярных маркеров в послеоперационных биоптатах слизистой оболочки культи желудка, полученных при эндоскопическом исследовании, является дополнительным фактором прогноза для ранее оперированных больных.

Аномальное метилирование генов *TUSC3*, *CDH1*, *RUNX3* служит маркером неблагоприятного прогноза и связано с генерализацией опухолевого процесса у оперированных больных еще на субклиническом этапе, что делает маркеры значимыми для прогнозирования течения заболевания в послеоперационный период [4, 63].

4.4. Эффективность применения алгоритма, основанного на использовании молекулярных маркеров, для персонализированного ведения больных с предполагаемым диагнозом Рак желудка

По результатам проведенной работы в группу исследования было дополнительно введено 150 пациентов с предполагаемым диагнозом Рак желудка, находившихся на лечении и последующем наблюдении в УКБ №1 ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), а также в химиотерапевтическом отделении №2 отдела лекарственного лечения НИИ Клинической онкологии имени Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2016 по 2021 годы, таким образом, групп исследования к 2021 году составила 950 пациентов.

Данные 150 пациентов были определены как экспериментальная группа, решение о тактике ведения этих пациентов было проведено с использованием разработанного алгоритма персонализированного подхода к лечению больных раком желудка на основе молекулярных маркеров с целью оценки эффективности применения алгоритма на этапах диагностики, лечения и динамического наблюдения. В последующем в экспериментальной группе из 150 пациентов для оценки каждого из компонентов алгоритма было выделено три экспериментальных подгруппы: в первую экспериментальную подгруппу вошло 50 пациентов, у которых маркеры определялись на этапе диагностики из материала полученного при эндоскопическом исследовании; во вторую экспериментальную подгруппу вошли 50 пациентов, которым проведено определение маркеров, и в последующем им было выполнено комбинированное лечение по поводу рака желудка с учетом

показателей маркеров; в третью экспериментальную группу включено 50 пациентов оперированных по поводу первичной опухоли желудка в объеме резекции желудка, а в ходе последующего мониторинга за данными пациентами помимо стандартных исследований выполнялось определение молекулярных маркеров в материале полученном при эндоскопическом исследовании слизистой культи желудка.

В качестве группы сравнения для экспериментальной группы из группы исследования 800 пациентов, проходивших лечение в ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), а также в химиотерапевтическом отделении №2 отдела лекарственного лечения НИИ Клинической онкологии имени Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2008 по 2016 год было отобрано 511 пациентов, у которых в ходе обследования, лечения и мониторинга не проводилось исследование молекулярных маркеров, а диагностика, лечение и мониторинг проводились только исходя из клинических рекомендаций.

Соответственно далее для каждой экспериментальной подгруппы из группы сравнения (511 пациентов) были сформированы сравнительные подгруппы: в первую сравнительную подгруппу вошло 50 пациентов, у которых на этапе диагностики исследование молекулярных маркеров не проводилось; во вторую сравнительную подгруппу выделено 50 пациентов, им в дальнейшем проводилось комбинированное лечение по поводу рака желудка, однако исследование молекулярных маркеров не проводилось; в третью сравнительную подгруппу вошло 50 пациентов, которым проведена резекция желудка по поводу первичного опухолевого процесса, и в последующем они находились под динамическим наблюдением, при этом исследование молекулярных маркеров в слизистой культи желудка им не проводилось. Таким образом всем пациентам сравнительных подгрупп не проводилось исследование молекулярных маркеров, которое могло повлиять на тактику ведения.

4.4.1. Эффективность применения алгоритма для персонализированной диагностики рака желудка

С целью оценки компонента алгоритма, используемого для персонализации диагностики, проведено сопоставление показателей в первой экспериментальной подгруппе и первой подгруппе сравнения. Ниже в Таблице 4.1 представлено описание и сопоставление данных подгрупп по основным признакам.

Таблица 4.1 – Сопоставление третьей экспериментальной подгруппы и третьей подгруппы сравнения по основным признакам

Признак	Разделение по признаку	Первая экспериментальная подгруппа (n=50)		Первая подгруппа сравнения (n=50)	
		Абсолютное число	Процент	Абсолютное число	Процент
Сопутствующие заболевания	ИБС	9	18	8	16
	ГБ	6	12	7	14
	ХОБЛ	5	10	4	8
	СД	5	10	6	12
	Вирусный гепатит	2	4	1	2
	Заболевание МВС	1	2	2	4
	Ожирение	2	4	2	4
Пол	Мужской	28	56	27	54
	Женский	22	44	23	46
Возраст	<50 лет	6	12	7	14
	50-60 лет	17	34	17	34
	>60 лет	27	54	26	52
Размер опухоли	<2 см	12	24	10	20
	2-4 см	8	16	8	16
	>4 см	30	60	32	64
Поражение лимфоузлов	Есть	25	50	24	48
	Нет	25	50	26	52
Вариант гистологического строения опухоли	ВДАК	8	16	9	18
	УДАК	15	30	16	32
	НДАК	16	32	15	30
	ПКР	9	18	8	16
	НР	2	4	2	4
Вариант опухоли по классификации P.Lauren	Интестинальный	26	52	24	48
	Диффузный	24	48	26	52

Продолжение Таблицы 4.1

TNM	0	1	2	1	2
	IA	8	16	7	14
	IB	8	16	9	18
	IIA	5	10	4	8
	IIB	6	12	7	14
	IIIA	5	10	5	10
	IIIB	5	10	5	10
	IIIC	7	14	6	12
	IV	5	10	6	12

Основным критерием оценки эффективности диагностики с применением молекулярных маркеров был избран срок установления клинического диагноза. Проведено сравнение по данному показателю в первой экспериментальной подгруппе и первой сравнительной подгруппе (Таблица 4.2).

Таблица 4.2 – Влияние определения маркеров в рамках алгоритма персонализированного подхода на сроки установления диагноза

Группа	Мак. срок установления диагноза	Мин. срок установления диагноза	Средний срок установления диагноза	Медиана	Достоверность различия по показателю
Первая экспериментальная подгруппа (50 пациентов)	15	6	9,8±0,9	10	p < 0,05
Первая сравнительная подгруппа (50 пациентов)	21	10	16,4±2,1	14	

В ходе оценки эффективности диагностики рака желудка путем применения алгоритма персонализированного подхода, в основе которого лежало определение молекулярных маркеров, отмечено, что срок установления клинического диагноза достоверно уменьшился, в среднем по медиане он уменьшился на 4 дня по сравнению со стандартным обследованием данной категории пациентов, это свидетельствует об эффективности диагностического компонента предложенного алгоритма и обеспечивает пациенту возможность получения специализированную или высокотехнологичную помощь раньше.

4.4.2. Эффективность применения алгоритма для персонализированного подхода к комбинированному лечению больных раком желудка

С целью оценки компонента алгоритма, используемого для персонализации подхода к комбинированному лечению, проведено сопоставление показателей во второй экспериментальной подгруппе и второй подгруппе сравнения. Ниже в Таблице 4.3 представлено описание и сопоставление данных подгрупп по основным признакам.

Таблица 4.3 – Сопоставление второй экспериментальной подгруппы и второй подгруппы сравнения по основным признакам

Признак	Разделение по признаку	Вторая экспериментальная подгруппа (n=50)		Вторая подгруппа сравнения (n=50)	
		Абсолютное число	Процент	Абсолютное число	Процент
Сопутствующие заболевания	ИБС	11	22	10	20
	ГБ	8	16	9	18
	ХОБЛ	6	12	7	14
	СД	4	8	3	6
	Вирусный гепатит	3	6	3	6
	Заболевание МВС	1	2	2	4
	Ожирение	2	4	2	4
Пол	Мужской	30	60	31	62
	Женский	20	40	19	38
Возраст	<50 лет	8	16	7	14
	50—60 лет	10	20	9	18
	>60 лет	32	64	34	68
Объем операции на желудке	Гастрэктомия	28	56	27	54
	Резекция желудка	32	44	33	46
Объем лимфаденэктомии	D1	3	6	4	8
	D2	45	90	44	88
	D3	2	4	2	4
Размер опухоли	<2 см	16	32	15	30
	2—4 см	26	52	25	50
	>4 см	8	16	10	20
Поражение лимфоузлов	Есть	30	60	31	62
	Нет	20	40	19	38

Продолжение Таблицы 4.3

Вариант гистологического строения опухоли	ВДАК	6	12	6	12
	УДАК	16	32	16	32
	НДАК	19	38	18	36
	ПКР	8	16	9	18
	НР	1	2	1	2
Вариант опухоли по классификации P.Lauren	Интестинальный	24	48	25	50
	Диффузный	26	52	25	50
TNM	ПА	12	24	11	22
	ПВ	11	22	12	24
	ША	7	14	8	16
	ШВ	9	18	8	16
	ШС	11	22	11	22

Основными критериями оценки эффективности комбинированного лечения рака желудка с применением молекулярных маркеров были избраны показатели время пребывания в стационаре (Таблица 4.4), время пребывания в ОРИТ (Таблица 4.4), безрецидивная выживаемость за три года (Таблица 4.5) и общая выживаемость за три года (Таблица 4.6). Проведено сравнение по данным показателям во второй экспериментальной подгруппе и второй сравнительной подгруппе.

При сравнении результатов лечения пациентов второй экспериментальной подгруппы и второй подгруппы сравнения сроки пребывания в стационаре и ОРИТ для экспериментальной подгруппы достоверно меньше, что характеризует эффективность тактики, определяемой дополнительным исследованием молекулярных маркеров в рамках персонализированного подхода к лечению.

Таблица 4.4 – Влияние определения маркеров в рамках алгоритма персонализированного подхода на общее время пребывания в стационаре и ОРИТ при проведении комбинированного лечения больных раком желудка

Группа	Время пребывания в стационаре				p	Время пребывания в ОРИТ				p
	Макс	Мин	М	Ме		Макс	Мин	М	Ме	
Вторая экспериментальная подгруппа (50 пациентов)	36	12	24,5	21,2	p<0,05	5	2	3,9	3,4	p<0,05
Вторая сравнительная подгруппа (50 пациентов)	63	14	36,4	41,5		10	3	5,8	6,7	

Примечание: М – среднее значение, Ме – медиана, p – достоверность различия по показателю

Таблица 4.5 – Влияние определения маркеров в рамках алгоритма персонализированного подхода на трехлетнюю безрецидивную выживаемость пациентов при проведении комбинированного лечения больным раком желудка (в месяцах)

Группа	Максимальная	Минимальная	Средняя	Медиана	Достоверность различия по показателю
Вторая экспериментальная подгруппа (50 пациентов)	35	24	29,7±1,5	31	p<0,05
Вторая сравнительная подгруппа (50 пациентов)	31	20	22,8±2,8	24	

Таблица 4.6 – Влияние определения маркеров в рамках алгоритма персонализированного подхода на трехлетнюю общую выживаемость пациентов при проведении комбинированного лечения больным раком желудка (в месяцах)

Группа	Максимальная	Минимальная	Средняя	Медиана	Достоверность различия по показателю
Вторая экспериментальная подгруппа (50 пациентов)	38	29	33,4±2,4	33	p<0,05
Вторая сравнительная подгруппа (50 пациентов)	34	21	26,7±2,0	27	

Достоверное итоговое увеличение трехлетней безрецидивной выживаемости и общей выживаемости для пациентов, у которых тактику лечения определяли с использованием показателей молекулярных маркеров, говорит в пользу повышения эффективности лечения на основе персонализированного подхода, в основу которого заложено исследование молекулярных маркеров.

4.4.3. Эффективность применения алгоритма для персонализированного мониторинга и диагностики рецидива заболевания

С целью оценки компонента алгоритма, используемого для персонализации мониторинга и выявления рецидива заболевания, проведено сопоставление показателей в третьей экспериментальной подгруппе и третьей подгруппе сравнения. Ниже в Таблице 4.7 представлено описание и сопоставление данных подгрупп по основным признакам.

Таблица 4.7 – Сопоставление третьей экспериментальной подгруппы и третьей подгруппы сравнения по основным признакам

Признак	Разделение по признаку	Третья экспериментальная подгруппа (n=50)		Третья подгруппа сравнения (n=50)	
		Абсолютное число	Процент	Абсолютное число	Процент
Сопутствующие заболевания	ИБС	10	20	9	18
	ГБ	8	16	9	18
	ХОБЛ	5	10	5	10
	СД	4	8	3	6
	Вирусный гепатит	2	4	3	6
	Заболевание МВС	1	2	1	2
	Ожирение	2	4	2	4
Пол	Мужской	26	52	25	50
	Женский	24	48	25	50
Возраст	<50 лет	3	6	4	8
	50-60 лет	10	20	9	18
	>60 лет	37	74	37	74
Объем операции на желудке	Резекция желудка	50	100	50	100
Объем лимфаденэктомии	D1	5	10	4	8
	D2	41	82	42	84
	D3	4	8	4	8

Продолжение Таблицы 4.7

Размер опухоли	<2 см	10	20	11	22
	2-4 см	10	20	10	20
	>4 см	30	60	29	58
Поражение лимфоузлов	Есть	21	42	20	40
	Нет	29	58	30	60
Вариант гистологического строения опухоли	ВДАК	3	6	4	8
	УДАК	16	32	15	30
	НДАК	20	40	21	42
	ПКР	9	18	8	16
	НР	2	4	2	4
Вариант опухоли по классификации P. Lauren	Интестинальный	18	36	19	38
	Диффузный	32	64	31	62
TNM	0	1	2	1	2
	IA	11	22	12	24
	IB	11	22	10	20
	IIA	9	18	9	18
	IIB	4	8	4	8
	IIIA	5	10	5	10
	IIIB	4	8	3	6
	IIIC	3	6	4	8
	IV	2	4	2	4

Основным критерием оценки эффективности диагностики рецидива заболевания с применением молекулярных маркеров был избран срок установления рецидива от момента проведения лечения по поводу первичного опухолевого процесса (Таблица 4.8) в сопоставлении с трехлетней общей выживаемостью (Таблица 4.9). Проведено сравнение по данным показателям в третьей экспериментальной подгруппе и третьей сравнительной подгруппе.

Таблица 4.8 – Влияние определения маркеров в рамках алгоритма персонализированного подхода на сроки установления рецидива заболевания от момента проведения лечения по поводу первичного опухолевого процесса (в месяцах)

Группа	Максимальная	Минимальная	Средняя	Медиана	Достоверность различия по показателю
Третья экспериментальная подгруппа (50 пациентов)	15	7	11,5±2,9	9	p<0,05
Третья сравнительная подгруппа (50 пациентов)	30	10	20,4±3,1	24	

Таблица 4.9 – Влияние определения маркеров в рамках алгоритма персонализированного подхода на этапе мониторинга, после лечения полученного по поводу первичной опухоли, на трехлетнюю общую выживаемость больных раком желудка (в месяцах)

Группа	Максимальная	Минимальная	Средняя	Медиана	Достоверность различия по показателю
Третья экспериментальная подгруппа (50 пациентов)	36	27	33,5	32	p<0,05
Третья сравнительная подгруппа (50 пациентов)	31	22	25,9	27	

В ходе оценки эффективности мониторинга рецидива рака желудка путем применения алгоритма персонализированного подхода, в основе которого лежало определение молекулярных маркеров отмечено, что срок установления рецидива заболевания достоверно уменьшился, в сравнении со стандартным обследованием у данной категории пациентов, учитывая увеличение трехлетней общей выживаемости пациентов, для мониторинга которых использовались маркеры помимо стандартного обследования, можно сделать заключение об эффективности прогностического компонента предложенного алгоритма. Учитывая более ранний срок выявления предполагаемого рецидива заболевания, пациент может раньше

получить специализированное или высокотехнологическое лечение, что приводит к увеличению общей выживаемости больных раком желудка.

Подытоживая все выше сказанное, алгоритм, основанный на использовании молекулярных маркеров для персонализированного ведения больных с предполагаемым диагнозом Рак желудка, улучшает эффективность ведения как на этапе диагностики, так на этапах лечения и мониторинга.

ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

5.1. Персонализация диагностики и хирургической тактики у больных раком желудка

Учитывая наличие статистически значимой разницы в показателях системы маркеров, представленной определением метилирования и экспрессии генов, а также активности теломеразы в опухолевом материале по отношению к данным показателям, определяемым в биоптатах слизистой оболочки желудка у больных ЖКБ, можно утверждать, что опухоль отличается наличием определенных изменений, которые не происходят в слизистой оболочке желудка в отсутствие ракового поражения. Определив порог этих изменений на наноуровне, можно выявить относительную границу между опухолью и нормальной слизистой оболочкой и уточнить края резекции при хирургическом лечении.

Из проведенного исследования следует, что морфологически нормальная слизистая оболочка желудка, отдаленная от опухоли, у некоторых больных раком желудка характеризуется наличием эпигенетических изменений, свойственных больше для опухолевой ткани, чем для нормальной (слизистая желудка у больных ЖКБ). Высокий уровень метилирования генов *CDH1*, *TUSC3*, *DAPK* в морфологически нормальной ткани, пограничной с опухолевой, у некоторых больных раком желудка косвенно указывает на вовлеченность этой ткани в опухолевый процесс, процесс канцеризации, и требует контроля в послеоперационном периоде. Таким образом, уровень метилирования генов *CDH1*, *TUSC3*, *DAPK* в настоящее время нельзя использовать в системе для определения границы резекции. Для этой цели подходят экспрессионные маркеры *hTERT*, *MMP7*, *BIRC5*, а также определение активности теломеразы, уровень которых поднимается только в опухоли и статистически значимо снижается в окружающей слизистой оболочке, расположенной на 5 см ниже и выше первичного опухолевого очага. Исследуемые точки морфологически неизменной слизистой на расстоянии 5 см от опухоли находятся ближе к опухолевому очагу, чем проксимальная и

дистальная линии резекции. Отсутствие изменений экспрессионных маркеров позволяет заключить, что операции (субтотальная дистальная резекция или проксимальная резекция желудка), выполняемые при ограниченном антральном или проксимальном росте опухоли, вполне обоснованы, поскольку выполняются в пределах не только морфологически сохранных тканей, но и на фоне незначимых молекулярных изменений. С учетом полученных данных по использованию молекулярных маркеров можно утверждать, что объемы операции (субтотальная дистальная резекция и проксимальная резекция) являются адекватными и не требуют увеличения, а сами маркеры служат дополнительными показателями молекулярной чистоты линии резекции, коррелирующими с данными гистологического исследования.

Хотя молекулярные маркеры не позволяют со 100% точностью дифференцировать доброкачественное и злокачественное поражение желудка, они являются весьма ценным дополнительным диагностическим инструментом для уточнения характера поражения в сложных диагностических случаях, таких как несоответствие клинических и инструментальных, а также лабораторных данных результатам дооперационного цитологического и гистологического исследований.

Таким образом, можно заключить, что для адекватной дооперационной оценки молекулярных изменений слизистой у больных раком желудка целесообразно использовать маркеры различных стадий канцерогенеза. Определение метилирования генов *RASSF1A*, *MLH1*, экспрессии генов *MMP7*, *hTERT*, *BIRC5*, а также активности теломеразы целесообразно использовать для персонализированной диагностики рака желудка в сочетании с другими методами исследования, что было доказано введением данных показателей в диагностический компонент алгоритма выбора персонализированного подхода к лечению больных раком желудка на основе молекулярных маркеров и достоверно привело к уменьшению срока установления клинического диагноза, что в дальнейшем повлияло на эффективность лечения.

5.2. Персонализация комбинированного лечения больных раком желудка

В ходе исследований выявлено, что для улучшения результатов лечения больных местно-распространенным раком желудка целесообразна оценка молекулярных факторов, которые определяют индивидуальные различия в фармакодинамике и фармакокинетике лекарственных средств, а также связаны с течением заболевания, прогнозом и ответом на лечение, что позволяет осуществлять оптимальный подход к персонализированному выбору схемы химиотерапии.

При изучении взаимосвязи полиморфизмов генов с клинико-морфологическими характеристиками рака желудка у больных выявлены генотипы, статистически значимо коррелирующие с благоприятным клиническим течением опухолевого процесса. К таким генотипам гена *TYMS* относятся А-6/А-6, 2G/3C, а гена *TP53* — Arg/Pro. Генотип А-6/А-6 статистически значимо чаще встречается у больных с высоко- и умереннодифференцированной аденокарциномой и с интестинальным типом рака желудка. Генотипы 2G/3C и Arg/Pro статистически значимо чаще выявляются у больных с отсутствием рецидива рака желудка в течение первых 3 лет после радикальной операции на фоне адъювантной химиотерапии с применением схем на основе 5-ФУ. С неблагоприятным течением связаны генотипы 3R/3R, 3G/3G (*TYMS*) и Pro/Pro (*TP53*). Генотип 3R/3R чаще определяется при метастатическом поражении регионарных лимфатических узлов, а генотипы 3G/3G и Pro/Pro — у больных с возникшим рецидивом рака в течение 3 лет после радикальной операции на фоне адъювантной химиотерапии на основе 5-ФУ.

С целью изучения возможности использования полиморфизмов генов *TYMS* и *TP53* в качестве критериев выбора терапии исследована взаимосвязь между определенным генотипом и отдаленными результатами комбинированного лечения больных местно-распространенным раком желудка, которым после радикальной операции проведена химиотерапия с применением схем на основе

фторпиримидинов.

В результате исследования показано, что 3-летняя безрецидивная и общая выживаемость больных раком желудка статистически значимо ниже у пациентов с генотипом 3R/3R по сравнению с 3R/2R гена *TYMS*. По полиморфизмам гена *TP53* наблюдается значимое снижение 3-летней безрецидивной выживаемости больных с генотипом Pro/Pro по сравнению с Arg/Arg и Arg/Pro, статистической значимой связи с общей выживаемостью не установлено.

В ходе исследования достоверно подтверждена связь между наличием у пациента отдельных полиморфизмов генов и выбранных планов лечения, при которых сочетание химиотерапии с включением 5-ФУ и его аналогов в комбинации с оперативным лечением при локорегионарном поражении желудка дает больший эффект и меньший эффект, соответственно для 3R/2R, Arg/Arg, Arg/Pro и 3R/3R и Pro/Pro, генов, указанных выше.

Проведение типирования на полиморфные варианты генов, R2/R3 и Arg/Pro, для соответствующих генов, указанных выше, возможно в рамках догоспитального этапа, в материале, полученном при эндоскопической биопсии, а не только непосредственно в препарате, полученном интраоперационно, что дает возможность уже до оперативного лечения изменять тактику ведения пациента.

Дооперационное генотипирование нужно использовать для определения эффективности адъювантной химиотерапии на основе фторпиримидинов после радикального хирургического лечения у больных местно-распространенным раком желудка, что лежит в основе выбора оптимальной персонализированной тактики лечения больного, так как генотипы 2R/3R, Arg/Pro и Arg/Arg связаны с лучшей эффективностью схем химиотерапии на основе 5-ФУ, а генотипы 3R/3R и Pro/Pro — с худшей, что было показано в результате исследования.

Оценка полиморфизмов генов *TYMS* и *TP53* в качестве критерия выбора терапии в рамках алгоритма персонализированного ведения больных раком желудка в сочетании с другими оценочными факторами является целесообразной, что было доказано введением данных показателей в алгоритм и достоверно привело к уменьшению количества осложнений, уменьшению срока

госпитализации и пребывания пациента в ОРИТ, а также достоверно увеличило трехлетнюю безрецидивную выживаемость и трехлетнюю общую выживаемость больных раком желудка.

5.3. Персонализация прогноза рецидива рака желудка

В ходе собственного исследования заключено, что для послеоперационного наблюдения за больными, оперированными по поводу рака желудка в объеме резекции, целесообразно проводить оценку прогностических молекулярных маркеров с целью предсказания возможного рецидива и генерализации опухолевого процесса в рамках персонализированного подхода к мониторингу в послеоперационном периоде.

В работе проведена оценка молекулярных изменений в материале послеоперационных биоптатов морфологически неизменной слизистой оболочки желудка, полученных при ЭГДС в срок от 6 до 39 месяцев после первичного хирургического лечения.

Было исследовано аномальное метилирование генов-супрессоров опухолевого роста *CDH1*, *RASSF1A*, *MLH1*, *TUSC3*, *DAPK*, *RUNX3*. Эпигенетические изменения ДНК являются самыми ранними событиями в процессе канцерогенеза, приводящими к повреждению экспрессии генов, ответственных за регуляцию клеточного цикла, пролиферацию и дифференцировку. Эти изменения создают потенциал молекулярно-генетической нестабильности, который с течением времени может реализоваться в виде опухолевого роста.

Из шести исследованных генов — *CDH1*, *RASSF1A*, *MLH1*, *TUSC3*, *DAPK*, *RUNX3* – аномальное метилирование в послеоперационных биоптатах слизистой оболочки культи желудка определено только для генов *TUSC3*, *CDH1*, *RUNX3*. Аномальное метилирование генов *RASSF1A*, *MLH1*, *DAPK* в морфологически интактной слизистой желудка не выявлено.

Отсроченное метилирование в культе желудка не связано с локализацией

опухоли, ее размером, наличием инвазивного роста, опухолевой дифференцировкой, чистотой линии резекции и метастазами в лимфатических узлах. Однако отсроченное метилирование статистически значимо коррелирует с наличием отдаленных метастазов и генерализацией опухолевого процесса.

Исследование аномального метилирования генов *CDH1*, *TUSC3*, *RUNX3* необходимо использовать для оценки состояния морфологически неизменной слизистой оболочки культи желудка для динамического наблюдения за больными с целью раннего выявления рецидива опухолевого процесса еще до инструментального его подтверждения, приводит к более частым контрольным обследованиям пациента, помогает проведению своевременной коррекции химиотерапии в рамках персонализированного подхода к мониторингу пациентов в послеоперационном периоде.

Таким образом, в окончательном варианте предиктивными маркерами рецидива и генерализации рака желудка является метилирование генов *CDH1*, *TUSC3*, *RUNX3*, как самое раннее событие в процессе канцерогенеза, приводящее к эпигенетическому изменению генов, создающих определенный потенциал нестабильности, но способных и не реализоваться в виде роста опухоли и генерализации опухолевого процесса.

С учетом проведенной оценки уровней молекулярных маркеров в сопоставлении с отдаленными результатами лечения в рамках проведенной работы установлено, что следует проводить органосохраняющие операции с удалением части желудка, соблюдая чистоту краев линии резекции, сочетая их с расширенной лимфодиссекцией, так как данный объем оперативного лечения не повышает частоту осложнений, не ведет к возобновлению локального опухолевого процесса, а также не приводит диссеминации.

Оценка молекулярных маркеров в послеоперационных биоптатах слизистой оболочки культи желудка, полученных при эндоскопическом исследовании, является персонализирующим фактором прогноза для ранее оперированных больных. Аномальное метилирование генов *TUSC3*, *CDH1*, *RUNX3* служит маркером неблагоприятного прогноза и связано с генерализацией опухолевого

процесса у оперированных больных еще на субклиническом этапе, что определяет значение данных маркеров в прогнозировании течения заболевания в послеоперационном периоде.

Определение метилирования генов *TUSC3*, *CDH1*, *RUNX3* в качестве критерия возможного показателя рецидива болезни после проведенного лечения по поводу первичного опухолевого процесса в рамках алгоритма персонализированного ведения больных раком желудка в сочетании с другими оценочными факторами является целесообразным, что было доказано введением данных показателей в алгоритм и достоверно привело к уменьшению срока выявления рецидива заболевания, достоверно увеличило трехлетнюю общую выживаемость больных раком желудка.

5.4. Персонализация лечения больных раком желудка

На настоящем уровне развития медицины улучшение результатов лечения больных раком желудка во многом связано с применением персонализированного подхода. Данный подход должен быть применен как на этапе диагностики заболевания, использован в ходе лечения, а также быть осуществлен при дальнейшем наблюдении за пациентом. Одним из основных инструментов данного персонализированного подхода являются молекулярные маркеры, основанные на использовании ДНК-технологий. Это новый уровень организации диагностики и оценки качества проводимого лечения, не цитологический, на отдельных клетках, или гистологический, по структуре ткани, а наноуровень, по отдельным генам, их мутациям, экспрессии, продуктам их биосинтеза – белкам, активности ферментов или молекулярным рецепторам.

В ходе собственного исследования разработана система маркеров для реализации персонализированного подхода к лечению больных раком желудка, которая внедрена в практику и заложена в алгоритм ведения пациентов.

Данная система хорошо зарекомендовала себя на всех этапах ведения пациента, от момента диагностики, проводимого лечения и до последующего мониторинга в отдаленном послеоперационном периоде.

В окончательном варианте в данную систему вошли следующие показатели: метилирование генов *RASSF1A*, *MLH1*, экспрессия генов *MMP7*, *hTERT*, *BIRC5*, а также активность теломеразы, определяемые при подозрении на рак желудка с целью улучшения диагностики, оценка полиморфизмов генов *TYMS* и *TP53*, при подтверждении диагноза Рак желудка с целью выбора адекватной комбинированной терапии; метилирование генов *CDH1*, *TUSC3*, *RUNX3*, определяемые в рамках динамического наблюдения за пациентами, которым проведено лечение по поводу рака желудка, с целью оценки прогноза, исключения рецидива и генерализации опухолевого процесса в отдаленном послеоперационном периоде для более раннего выявления рецидива. Данные маркеры легли в основу алгоритма выбора персонализированного подхода к ведению больных раком желудка и повысили эффективность лечения данной категории больных путем его использования.

ВЫВОДЫ

1. Проведен анализ молекулярных маркеров, используемых в определении тактики ведения пациентов с онкологическими заболеваниями, выбраны маркеры, которые возможно использовать у пациентов с предполагаемым диагнозом Рак желудка.

2. Разработана методология использования маркеров для оценки молекулярных изменений с целью персонализации хирургического и комбинированного методов лечения больных с предварительным диагнозом Рак желудка, включающая метилирование генов *RASSF1A*, *MLH1*, а также экспрессию генов *hTERT*, *MMP7*, *BIRC5*, активность теломеразы, исследуемых в биоптатах полученных при эндоскопическом исследовании, на этапе дооперационного обследования, оценку полиморфных вариантов генов *TYMS* и *TP53* на этапе установления диагноза Рак желудка, и определения метилирования генов *TUSC3*, *CDH1* и *RUNX3* в слизистой культи желудка на этапе послеоперационного мониторинга.

3. В ходе проведенного исследования определено, что уровни метилирования генов *RASSF1A*, *MLH1*, экспрессии генов *hTERT*, *MMP7*, *BIRC5*, активности теломеразы в опухоли желудка достоверно выше, чем в морфологически нормальной окружающей слизистой желудка, а также по отношению к группе контроля (биоптаты пациентов с ЖКБ), и ассоциированы с клинико-морфологическими характеристиками, такими как размер опухоли, степень ее дифференцировки и стадия онкопроцесса, что на молекулярном уровне отличает опухолевую ткань от нормальной слизистой желудка.

4. Исследование отсроченного метилирования генов *TUSC3*, *CDH1* и *RUNX3* показало достоверную связь на молекулярном уровне данных показателей с риском рецидива онкопроцесса, что является ранним предвестником плохого прогноза до этапа клинических проявлений рецидива заболевания.

5. Метилирование гена *DAPK* статистически достоверно связано с поражением лимфатических узлов, полиморфные варианты генов *TYMS* (3R/3R) и

TP53 (Pro/Pro) статистически достоверно чаще встречаются у пациентов с рецидивом заболевания в течение 3-х лет после проведенного лечения, метилирование генов *TUSC3*, *CDH1* и *RUNX3* статистически достоверно связано с возникновением рецидива заболевания после проведенного лечения, что следует учитывать при определении тактики ведения больных раком желудка.

6. Полиморфизмы генов, отвечающих за синтез ферментов, метаболизирующих фторпиримидины, у больных местно-распространенным раком желудка достоверно связаны с характеристиками первичной опухоли желудка, вторичным поражением локо-регионарных лимфатических узлов, а также с выживаемостью пациентов, которым проведено комбинированное лечение, сочетающее использование схем химиотерапевтического лечения с включением в них фторпиримидинов и хирургическое лечение R0, что следует использовать в рамках персонализированного подхода в лечении больных раком желудка.

7. Для оценки изменений слизистой оболочки желудка с целью персонализации диагностики, лечения и мониторинга пациентов с диагнозом Рак желудка разработана система молекулярных маркеров, включающая следующие маркеры: метилирование генов *RASSF1A*, *MLH1*, *DAPK*, *TUSC3*, *CDH1*, *RUNX3*, экспрессия генов *hTERT*, *MMP7*, *BIRC5*, активность теломеразы.

8. Для предоперационной диагностики рака желудка с использованием молекулярных маркеров целесообразно использовать биопсийный материал, полученный в результате дооперационного эндоскопического исследования. Количество ДНК, РНК и белка, получаемое из эндоскопически взятого образца, достаточно для проведения серии молекулярных исследований.

9. Разработан алгоритм выбора персонализированного подхода к лечению больных раком желудка на основе использования созданной панели молекулярных маркеров, включающей метилирование генов *RASSF1A*, *MLH1*, а также экспрессию генов *hTERT*, *MMP7*, *BIRC5*, активность теломеразы, исследуемых в биоптатах, полученных при эндоскопическом исследовании, на этапе дооперационного обследования, оценку полиморфных вариантов генов *TYMS* и *TP53* на этапе установления диагноза Рак желудка и определение метилирования генов *TUSC3*,

CDH1 и *RUNX3* в слизистой культи желудка на этапе послеоперационного мониторинга.

10. Апробирован и внедрен в клиническую практику унифицированный алгоритм персонализированного подхода, основанный на молекулярных маркерах диагностики, лечения и мониторинга больных раком желудка, при этом показано, что его использование улучшает результаты лечения больных раком желудка, повышая его эффективность.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. У пациентов с предварительным диагнозом Рак желудка параллельно с морфологическим исследованием тканевого материала, полученного при эндоскопическом исследовании, необходимо проводить анализ молекулярных маркеров, что является основой для персонализированного подхода к определению тактики ведения пациента. При этом возможно получение дополнительной диагностической информации в сомнительной клинической ситуации, что достоверно сокращает сроки постановки клинического диагноза.

2. Для дооперационной дифференциальной диагностики у пациентов с предварительным диагнозом Рак желудка могут быть использованы следующие молекулярные маркеры — метилирование генов *RASSF1A*, *MLH1*, экспрессия генов *MMP7*, *hTERT*, *BIRC5* и активность теломеразы.

3. Определение экспрессии генов *hTERT*, *BIRC5*, а также активности теломеразы являются наиболее информативными тестами в диагностике рака желудка, а определение экспрессии *MMP7* — наиболее перспективно при диагностике онкопроцесса этой локализации.

4. Экспрессия гена *hTERT* показывает наибольшую вероятность злокачественного заболевания у пациентов с положительным результатом теста.

5. У соматически отягощённых пациентов с локорегионарным опухолевым поражением желудка можно проводить органосохраняющую операцию в объеме удаления части желудка в сочетании с лимфаденэктомией в объеме D2 при условии частоты краев резекции для уменьшения количества осложнений, что доказано использованием алгоритма персонализированного подхода, основанного на применении молекулярных маркеров.

6. Проведение органосохраняющих операций в объеме удаления части желудка в сочетании с лимфаденэктомией в объеме D2 при условии частоты краев резекции у соматически отягощённых пациентов с локорегионарным опухолевым поражением, увеличивает продолжительности жизни и трехлетнюю выживаемость, что доказано использованием алгоритма персонализированного

подхода, основанного на применении молекулярных маркеров.

7. Сочетание показателей, описывающих онкопроцесс, как то, структура и типирование первичной опухоли, в сочетании соматическими характеристиками пациента и генотипированием, являются маркерами прогноза индивидуального течения онкопроцесса у пациентов с локорегионарным поражением желудка, получивших радикальное хирургическое лечение.

8. Генотипирование можно использовать для определения эффективности адъювантной химиотерапии на основе фторпиримидинов после радикально выполненного хирургического лечения у больных местно-распространенным раком желудка, что лежит в основе персонализированного подхода в выборе оптимальной тактики комбинированного лечения больного, данное положение доказано использованием алгоритма персонализированного подхода, основанного на применении молекулярных маркеров.

9. Комбинированное лечение в объеме удаления части органа в сочетании с радикальной лимфодиссекцией и адъювантная химиотерапия после соответствующей подготовки у соматически отягощенных пациентов статистически доказано увеличивает продолжительность жизни пациента, что доказано использованием алгоритма персонализированного подхода, основанного на применении молекулярных маркеров.

10. Аномальное метилирование *TUSC3*, *CDH1* и *RANX3* генов в послеоперационном периоде является основой для прогнозирования рецидива и генерализации опухолевого процесса у каждого отдельного пациента после оперативного лечения по поводу первичной опухоли желудка в объеме его резекции.

11. Отсроченное метилирование генов достоверно связано с генерализацией опухолевого процесса, наличием отдаленных метастазов, но не связано с такими характеристиками первичной опухоли как локализация, размер, дифференцировка, инвазивный рост, чистота линии резекции и метастатическим поражением регионарных лимфоузлов.

12. Исследование аномального метилирования генов *CDH1*, *TUSC3* и *RANX3* следует использовать для оценки состояния морфологически неизменной

слизистой оболочки культи желудка для персонализированного мониторинга у больных с целью диагностики генерализации опухолевого процесса еще при отсутствии видимых проявлений опухоли и своевременной коррекции адьювантной химиотерапии.

13. Метилирование гена *DAPK*, полиморфные варианты генов *TYMS* (3R/3R) и *TP53* (Pro/ Pro), метилирование генов *TUSC3*, *CDH1* и *RUNX3* могут служить дополнительным фактором расширения объема оперативного лечения у больных раком желудка, при определении данных маркеров целесообразно расширять объем операции на желудке до гастрэктомии, а лимфаденэктомию в объеме не менее, чем D2.

14. Использование разработанного алгоритма персонализированного подхода, основанного на молекулярных маркерах диагностики, лечения и мониторинга больных раком желудка, улучшает результаты лечения больных раком желудка, что диктует необходимость его использования в клинической практике.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

5-ФУ – 5-фторурацил

CIMP- – низкий фенотип метилирования

CIMP+ – высокий фенотип метилирования

EBV – вирус Эпштейна-Барр

ECOG – The Eastern Cooperative Oncology Group, шкала Карновского

EGF – эпидермальный фактор роста

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста

EGTA – (этилендиокси)-диэтилендинитрилтетрауксусная

IARC – Международный институт по исследованию рака

KW – дисперсионный анализ Краскала—Уоллиса

MMP – матриксная металлопротеиназа

NBI – Narrow-Band Imaging

NGS – секвенирование нового поколения

PBS – фосфатно-солевой буфер

PMSF – фенилметилсульфонилфторид

PV⁻ – отрицательная предиктивная оценка

PV⁺ – положительная предиктивная оценка

TGF – трансформирующий фактор роста

TIMP – тканевые ингибиторы металлопротеиназ

TNM – классификация распространенности онкологического процесса

USF – up stimulating factor

VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста

АД – артериальное давление

APC – ген наследственного полипоза толстой кишки

БСА – бычий сывороточный альбумин

БХАК – биохимический анализ крови

БЭН – белково-энергетическая недостаточность

ВАК – высший аттестационный комитет

ВГЧ – вирус герпеса человека
ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
дАТФ – дезоксиаденинтрифосфат
дГТФ – дезоксигуанозинтрифосфат
ДИ – доверительный интервал
ДН – дыхательная недостаточность
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ДПК – двенадцатиперстная кишки
дТМФ – дезокситимидинмонофосфат
дУМФ – дезоксиуридинмонофосфата
дЦТФ – дезоксицитидинтрифосфат
ДЭПК – диэтилпиروкарбонат
ЖКБ – желчнокаменная болезнь
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
ИБС – ишемическая болезнь сердца
ИВЛ – искусственная вентиляция легких
ФК – функциональный класс
ИМГен – индекс метилирования генов
ИМобр – индекс метилирования образцов
ИМТ – индекса массы тела
ИОР – истинно-отрицательный результат
ИОУЗИ – интраоперационное ультразвуковое исследование
ИПР – истинно-положительный результат
КОС – кислотно-основное состояние
КТ – компьютерная томография
КФК – креатинфосфокиназа
ЛДГ – лактатдегидрогеназа
ЛОР – ложно-отрицательный результат
ЛПР – ложно-положительный результат

МРТ – магнитно-резонансная томография
МСКТ – мультиспиральную компьютерную томографию
МЭС – медико-экономический стандарт
ОАК – общий анализ крови
ОАМ – общий анализ мочи
ОБП – органы брюшной полости
ОГК – органы грудной клетки
ОПОР – отношение правдоподобия отрицательного результата
ОППР – отношение правдоподобия положительного результата
ОПСС – общего периферического сопротивления сосудов
ОриИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии
ОЦК – объем циркулирующей крови
ОЦП – объем циркулирующей плазмы
ОЦЭ – объем циркулирующих эритроцитов
ОШДТ – отношение шансов диагностического теста
ПААГ – полиакриламидный гель
ПКА – пищеводно-кишечный анастомоз
ПКР – перстневидно-клеточный рак
ПСА – персульфат аммония
ПЦОР — прогностическая ценность отрицательного результата
ПЦПР — прогностическая ценность положительного результата
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография
РНК – рибонуклеиновая кислота
РТВ – рентген-телевидение
РФФИ – российский фонд фундаментальных исследований
РЭА – раковый эмбриональный антиген
СА-19-9 – раковый антиген
СА-72-4 – раковый антиген
СКФ – скорость клубочковой фильтрации

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

США – Соединенные штаты Америки

ТЕМЕД - N,N,N',N'-тетраметилендиамин

ТС – тимидилатсинтазы

ТЭЛА – тромбоз эмболия легочной артерии

УЗИ – ультразвуковое исследование

УКБ №1 – университетская клиническая больница №1

ФВД – функции внешнего дыхания

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь сердца

ЦВД – центральное венозное давление

ЦДС – цветное дуплексное сканирование

ЧСС – частота сердечных сокращений

ЭГДС – эзофагогастродуоденоскопия

ЭДТА – динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты

ЭКГ – электрокардиограмма

ЭХОкг – эхокардиография

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алешин, В.А. Индивидуализация лечения пациентов с церебральными метастазами злокачественных опухолей. Прогностическая шкала TuNS / В.А. Алешин, А.Х. Бекашев, Д.М. Белов [и др.] // Злокачественные опухоли. – 2017. – № 7 (4). – С. 48—52.
2. Белковец, А.В. Биомаркеры желудочной атрофии у пациентов с раком желудка / А.В. Белковец, С.А. Курилович, Ю.И. Рагино [и др.] // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2018. – № 28 (2). – С. 24—32.
3. Бриллиант, Ю.М. Эпителиальные кадгерини и ассоциированные с ними молекулы при инвазивном дольковом раке молочной железы / Ю.М. Бриллиант, А.А. Бриллиант, С.В. Сазонов // Архив патологии. – 2017. – № 79 (1). – С. 12—18.
4. Быков, И.И. Роль молекулярно-генетических маркеров в определении тактики хирургического лечения больных раком желудка: дисс. ... канд. мед. наук : 14.01.17, 03.02.07 / Игорь Игоревич Быков. – Москва, 2011. – 160 с.
5. Быков, И.И. Роль молекулярно-генетических маркеров в определении тактики хирургического лечения больных раком желудка / И.И. Быков // Сеченовский вестник. – 2012. – № 1 (7). – С. 59—66.
6. Быков, И.И. Персонализация лечения больных раком желудка путем использования молекулярно-генетических маркеров / И.И. Быков, М.В. Немцова, Т.В. Хоробрых, М.С. Микерова, А.С. Мишин // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2018. – № 7 (4). – С. 20—25.
7. Быков, И.И. Тактика ведения пациентов с диффузным раком желудка, обусловленным наследственными мутациями / И.И. Быков, М.В. Немцова, Т.В. Хоробрых // В мире научных открытий. – 2018. – № 10 (4). – С. 88—110.
8. Волкоморов, В.В. Идентификация маркеров аденокарциномы желудка на основе биоинформатического поиска и анализа генной экспрессии / В.В. Волкоморов, Е.С. Григорьева, Г.В. Краснов [и др.] // Успехи молекулярной онкологии. – 2017. – Т. 4. – № 1. – С. 40—45.

9. Волченко, Н.Н. Срочная морфологическая диагностика в онкологии / Н.Н. Волченко, О.В. Борисова, В.Ю. Мельникова [и др.] // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2020. – № 9 (1). – С. 5—13.
10. Воропаева, Е.Н. Сравнительный анализ мутаций в гене TP53 у больных ДВККЛ г. Новосибирска с данными, представленными в IARC TP53 mutation database / Е.Н. Воропаева, Т.И. Поспелова, М.И. Воевода, В.Н. Максимов // Медицинская генетика. – 2016. – № 15 (4). – С. 17–20.
11. Вусик, М.В. Особенности гуморальных иммунных реакций к вирусу Эпштейна-Барр у больных с предопухолевыми изменениями слизистой оболочки и раком желудка разной локализации и гистотипа / М.В. Вусик, Р.И. Плешко, Т.В. Авдеенко [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2016. – № 15 (5). – С. 40—46.
12. Высоцкая, И.В. Актуальные вопросы канцерогенеза / И.В. Высоцкая, В.П. Летягин, М.А. Шабанов [и др.] // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2019. – № 12 (1). – С. 101–106.
13. Генетика в практике хирургического лечения рака желудка [Текст] : [монография] / А.Ф. Черноусов, Т.В. Хоробрых, М.В. Немцова, И.И. Быков. – Москва: Практическая медицина, 2017. – 127 с.
14. Герштейн, Е.С. Иммуноферментное исследование матриксных металлопротеиназ 2, 7, 9 и их тканевого ингибитора 2-го типа в опухолях больных раком желудка: клинико-морфологические корреляции / Е.С. Герштейн, А.А. Иванников, В.Л. Чанг [и др.] / Альманах клинической медицины. – 2018. – № 46 (4). – С. 323–329.
15. Глухов, А.И. Теломераза — потенциальный опухолевый маркер / А.И. Глухов, О.В. Зимник, Р.М. Хайтов, С.Е. Северин // Российский онкологический журнал. – 2003. – № 2. – С. 53–57.
16. Глухов, А.И. Антиапоптотические факторы сервивин и теломераза в диагностике рака желудка / А.И. Глухов, О.В. Высоцкая, Л.В. Свиная, О.В. Зимник, И.И. Быков, Т.В. Хоробрых // Молекулярная медицина. – 2011. – № 1. – С. 35—40.

17. Глушанкова, Н.А. Роль E-кадхерина в неопластической эволюции эпителиальных клеток / Н.А. Глушанкова, И.Ю. Житняк, Д.В. Айолло, С.Н. Рубцова // Успехи молекулярной онкологии. – 2014. – № 1 (1). – С. 12—17.
18. Гнатенко, Д.А. Роль сигнального пути FGF/FGFR в канцерогенезе поджелудочной железы / Д.А. Гнатенко, Е.П. Копанцев, Е.Д. Свердлов // Биомедицинская химия. – 2016. – № 62 (6). – С. 622—629.
19. Землякова, В.В. Аномальное метилирование некоторых генов-супрессоров при спорадическом раке молочной железы / В.В. Землякова, А.И. Жевлова, В.В. Стрельников [и др.] // Молекулярная биология. – 2003. – № 37(4). – С. 696–703.
20. Иванов, М.В. Опыт использования высокопроизводительного секвенирования (NGS) для подбора таргетной терапии при немелкоклеточном раке легкого: преимущества и ограничения / М.В. Иванов, Е.И. Новикова, А.В. Баранова, В.А. Милейко // Злокачественные опухоли. – 2015. – №4s2. – С. 310—311.
21. Ивашкин, В.Т. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению инфекции *Helicobacter pylori* у взрослых / В.Т. Ивашкин, И.В. Маев, Т.Л. Лапина [и др.] // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2018. – № 28 (1). – С. 55–70.
22. Имянитов, Е.Н. Фундаментальная онкология в 2016 году: обзор наиболее интересных открытий / Е.Н. Имянитов // Практическая онкология. – 2017. – № 18 (1). – С. 85—92.
23. Кипкеева, Ф.М. Профили экспрессии потенциальных генов-мишеней при диссеминированном раке желудка / Ф.М. Кипкеева, Т.А. Музаффарова, М.Н. Нариманов [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – № 16 (4). – С. 25—28.
24. Кит, О.И. Рак желудка: современные направления фундаментальных исследований / О.И. Кит, Н.С. Самойленко, Е.М. Франциянц [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – № 4. – С. 136.

25. Киселева, А.Э. Клиническое значение мутации гена CDH1 при раке желудка / А.Э. Киселева, А.Ф. Зезюлина, М.С. Микерова, И.И. Быков, И.В. Решетов // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2022. – № 11(2). – С. 74—79.
26. Клиническая хирургия: национальное руководство: в 3 т. / [Савельев В.С., Кириенко А.И., сост.]; под ред. В.С. Савельева, А.И. Кириенко. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – Т. 2. – 2009. – 825 с.
27. Колобовникова, Ю.В. Галектин-1-опосредованная экспрессия белков-регуляторов клеточного цикла и ростовых факторов при раке желудка / Ю.В. Колобовникова, А.И. Дмитриева, К.И. Янкович [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2017. – № 16 (4). – С. 165–172.
28. Кораблёва, Э.В. Клинико-эпидемиологические особенности *Helicobacter pylori* инфекции у детей и подростков: дисс. ... канд. мед. наук : 14.01.08 / Элеонора Владимировна Кораблёва – Владивосток. – 2010. – 161 с.
29. Корженевская, М.А. Генетика в клинической практике [Текст]: руководство для врачей / под ред. В.Н. Горбуновой, М.А. Корженевской. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2015. – С. 293—305.
30. Кушлинский, Н.Е. Биологические маркеры опухолей в клинике – достижения, проблемы, перспективы / Н.Е. Кушлинский, Е.С. Герштейн // Молекулярная медицина. – 2008. – № 3. – С. 48–55.
31. Лаптиева, С.А. Молекулярно-генетический «портрет» рака молочной железы / С.А. Лаптиева, М.А. Корженевская, Е.Н. Имянитов // Ученые записки Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И. П. Павлова. – 2017. – № 24 (2). – С. 12—22.
32. Лыжко, Н.А. Молекулярно-генетические механизмы инициации, промоции и прогрессии опухолей / Н.А. Лыжко // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – № 16 (4). – С. 7—17.
33. Любченко, Л.Н. Ранняя диагностика и тотальная гастрэктомия при наследственном диффузном раке желудка / Л.Н. Любченко, М.Г. Филиппова, О.А. Анурова [и др.] // Успехи молекулярной онкологии. – 2017. – № 4 (4). – С. 32—36.

34. Маршутина, Н.В. Клиническая значимость биологических маркеров при раке яичников, раке предстательной железы, колоректальном раке / Н.В. Маршутина, М.П. Солохина, И.И. Алентов, Н.С. Сергеева // Исследования и практика в медицине. – 2016. – № 3 (1). – С. 46—57.
35. Материалы X Российского онкологического конгресса / Издательская группа ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – Москва, 2006.
36. Материалы XII Российского онкологического конгресса / Издательская группа ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – Москва, 2008. – 220 с.
37. Мисюрин, В.А. Структура и свойства основных рецепторов и лигандов внешнего пути апоптоза / В.А. Мисюрин // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – № 14 (2). – С. 23—30.
38. Михалева, Л.М. Морфологические и иммуногистохимические особенности тяжелой дисплазии и раннего рака желудка / Л.М. Михалева, А.Е. Бирюков // Архив патологии. – 2017. – № 79 (4). – С. 22—28.
39. Мозговой, С.И. Кишечная метаплазия слизистой оболочки желудка: классификация, методика детекции и сложности гистопатологической интерпретации с позиции современной практической гистохимии / С.И. Мозговой, Э.В. Яковлева, Д.А. Лининг [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2004. – №1. – С. 114–125.
40. Мокрышева, Н.Г. Персонализированная медицина – этапы формирования концепции и пути практической ее реализации / Н.Г. Мокрышева, Г.А. Мельниченко // Российский журнал персонализированной медицины. – 2021. – № 1 (1). – С. 43—58.
41. Москалев, Е.А. Метилирование отдельных CpG-нуклеотидов в генах сигнального пути WNT как потенциальный эпигенетический маркер злокачественных новообразований молочной железы / Е.А. Москалев, В.В. Бубнов, И.Н. Лебедева // Медицинская генетика. – 2016. – Т. 15. – № 5 (167). – С. 18—23.
42. Москвина, Л.В. Современные представления о молекулярных механизмах прогрессии рака желудка: научное издание / Л.В.Москвина, П.Г. Мальков // Архив патологии. – 2010. – Т. 72. – № 4. – С. 58—61.

43. Наумова, Л.А. Рак желудка: отдельные механизмы патогенеза / Л.А. Наумова, О.Н. Осипова // *Фундаментальные исследования*. – 2015. – № 1—5. – С. 1072—1079.
44. Немцова, М.В. Аномальное метилирование генов *CDH1*, *RASSF1A*, *MLH1*, *N33*, *DAPK* в опухолевом и морфологически неизменном (неопуховом) эпителии желудка / М.В. Немцова, А.В. Бабаян, И.И. Быков, М.В. Майорова, Т.В. Хоробрых, А.Ф. Черноусов, Д.В. Залетаев // *Российский онкологический журнал*. – 2011. – № 5. – С. 21—25.
45. Немцова, М.В. Аллельный дисбаланс локусов 17P13.1 (*TP53*), 1P36.1 (*RUNX3*), 16P22 (*CDH1*) и микросателлитная нестабильность при раке желудка / М.В. Немцова, И.И. Быков, А.А. Удилова, Д.В. Залетаев, Т.В. Хоробрых // *Молекулярная биология*. – 2013. – № 47 (5). – С. 835.
46. Немцова, М.В. Молекулярно-генетическая патология при раке желудка / М.В. Немцова, И.И. Быков, Н.В. Чекунова, Д.В. Залетаев, А.И. Глухов, Т.В. Хоробрых // *Технологии живых систем*. – 2013. – № 10 (3). – С. 036—047.
47. Немцова, М.В. Системы молекулярно-генетических маркеров при раке желудка / М.В. Немцова, И.И. Быков, Н.В. Чекунова, Д.В. Залетаев, А.И. Глухов, Т.В. Хоробрых // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2013. – № 11. – С. 12—15.
48. Немцова, М.В. Клинико-молекулярные аспекты канцерогенеза желудка / М.В. Немцова // *Молекулярная медицина*. – 2015. – № 2. – С. 36—39.
49. Немцова, М.В. Соматические и герминальные мутации при раке желудка / М.В. Немцова, А.С. Танас, Е.А. Алексеева, И.И. Быков, Д.В. Залетаев, А.И. Глухов, Т.В. Хоробрых, В.В. Стрельников // *Молекулярная медицина*. – 2015. – № 4. – С. 28—34.
50. Немцова, М.В. Спектры герминальных и соматических мутаций при диффузном и интерстициальном типах рака желудка / М.В. Немцова, А.И. Калинин, А.С. Танас, Т.В. Хоробрых, И.И. Быков, К.И. Кириллова, Е.А. Алексеева, Е.Б. Кузнецова, Д.В. Залетаев, В.В. Стрельников // *Медицинская генетика*. – 2018. – № 17 (11). – С. 11—14.

51. Немцова, М.В. Инактивация эпигенетических регуляторов вследствие мутаций в солидных опухолях / М.В. Немцова, Д.С. Михайленко, Е.Б. Кузнецова, И.И. Быков, А.А. Замятнин // Биохимия. – 2020. – № 85 (7). – С. 863—878.
52. Нефедова, Н.А. Роль сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и гипоксия индуцибельного фактора (HIF) в опухолевом ангиогенезе / Н.А. Нефедова, С.Ю. Давыдова // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3. – С. 51.
53. Павленко, И.А. Амплификация гена HER2/neu как механизм возникновения клональной гетерогенности при раке молочной железы / И.А. Павленко, Л.Э. Завалишина, П.Е. Повилайтите // Архив патологии. – 2019. – № 81(6). – С. 49—55.
54. Пирогов, С.С. Ранний рак желудка: современный взгляд на проблему / С.С. Пирогов, В.В. Соколов, М.М. Беляков, А.Д. Каприн // Сибирский онкологический журнал. – 2017. – № 16 (5). – С. 71–86.
55. Рак молочной железы [Текст] : практическое руководство для врачей : [морфологическая диагностика и генетика] / [Андреева Ю.Ю. и др.] ; под ред. Г.А. Франка, Л.Э. Завалишиной, К.М. Пожарисского. – Москва: Практическая медицина, 2014. – 171 с.
56. Раскина, К.В. От персонализированной к точной медицине / К.В.Раскина, Е.Ю. Мартынова, А.В. Перфильев [и др.] // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2017. – № 13 (1). – С. 69—79.
57. Рева, И.В. Апоптоз и его роль в нарушении функций нейронов / И.В. Рева, Т.Т. Ямамото, И.А. Одинцова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6. – С. 36.
58. Решетов, И.В. Оценка молекулярных изменений в слизистой оболочке, приближенной к краю резекции, после оперативного лечения по поводу рака желудка / И.В. Решетов, И.И. Быков, М.С. Микерова, М.В. Немцова // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2020. – № 4 (82). – С. 73—75.
59. Семьянихина, А.В. Молекулярно-генетические особенности рака толстой кишки у больных молодого возраста / А.В. Семьянихина, Н.И. Поспехова // Современные проблемы науки и образования. – 2018. – № 6. – С. 126.

60. Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических заболеваний [учебник] : для студентов медицинских вузов / [Залетаев Д.В. и др.] ; под ред. М.А. Пальцева и Д.В. Залетаева. – Москва: «Медицина», 2009. – 384 с.
61. Слепов, Е.В. Характеристика апоптоза, некроза и особенностей клеточного цикла в опухолевой ткани при уротелиальной карциноме / Е.В. Слепов, Э.В. Семенов, А.В. Мазаев [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2016. – № 6 (102). – С. 17—24.
62. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году [Текст] / М-во здравоохранения Рос. Федерации. Рос. Центр информ. технологий и эпидемиол. Исслед. в обл. онкологии, Научно-исследовательский онкологический ин-т им. П.А. Герцена; под ред. А.Д. Каприна [и др.]. – 2019. – 236 с.
63. Способ персонализации медицинской помощи пациентам с раком желудка. Быков И.И., Решетов И.В., Немцова М.В. Патент на изобретение RU 2713907 С1, 11.02.2020. Заявка № 2019138059 от 26.11.2019.
64. Сучков, С.В. Персонализированная медицина как обновляемая модель национальной системы здравоохранения. Часть 1. Стратегические аспекты инфраструктуры / С.В. Сучков, Х. Абэ, Е.Н. Антонова [и др.] // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2017. – № 62 (3). – С. 7—14.
65. Тюляндин С.А. Адьювантная терапия рака желудка: время менять взгляды / С.А. Тюляндин // Газета Российского общества клинической онкологии (RUSSCO). – 2014. – № 2. – С. 5—6.
66. Тюляндин С.А. Химиотерапия рака желудка / С.А. Тюляндин // Практическая онкология. – 2001. – Т. 2. – № 3 (07). – С. 44—51.
67. Удилова, А.А. Хирургическое лечение больных местно-распространенным раком желудка, с учетом клинико-морфологических и молекулярно-генетических факторов: дисс. ... канд. мед. наук: 14.01.17; 03.02.07 / Анастасия Андреевна Удилова. – Москва. – 2015. – 176 с.
68. Цуканов, В.В. Показатели клеточного обновления эпителиоцитов желудка у коренных и пришлых жителей Республики Тыва с атрофическим гастритом / В.В.

Цуканов, О.В. Перетяцько, А.В. Васютин [и др.] // Доктор.Ру. – 2022. – № 21 (2). – С. 30–33.

69. Чекунова, Н.В. Молекулярно-генетическая диагностика изменений слизистой культуры желудка у больных, оперированных по поводу рака: дисс. ... канд. мед. наук: 14.01.17; 03.02.07 / Наталия Валерьевна Чекунова. – Москва. – 2014. – 139 с.

70. Чекунова, Н.В. Молекулярно-генетические изменения в слизистой культуры желудка больных, перенесших субтотальную дистальную резекцию желудка по поводу рака / Н.В. Чекунова, И.И. Быков, Т.В. Хоробрых, М.В. Немцова // Технологии живых систем. – 2014. – № 11 (3). – С. 46—51.

71. Черноусов, А.Ф. Первый опыт использования маркеров молекулярно-генетической нестабильности слизистой в диагностике рака желудка / А.Ф. Черноусов, Т.В. Хоробрых, И.И. Быков, М.В. Немцова, А.И. Глухов, Л.В. Свиная // Вестник хирургической гастроэнтерологии. – 2011. – № 4. – С. 13.

72. Черноусов, А.Ф. Молекулярно-генетическая диагностика изменений слизистой культуры желудка у больных, перенесших его резекцию по поводу рака в прогнозе генерализации опухолевого процесса / А. Черноусов, Т. Хоробрых, М. Немцова, И. Быков, Н. Чекунова // Вестник хирургической гастроэнтерологии. – 2013. – № 3. – С. 14—19.

73. Черноусов, А.Ф. Онкомаркеры в лечении больных раком желудка / А.Ф. Черноусов, Т.В. Хоробрых, И.И. Быков, М.В. Немцова, А.А. Удилова, А.Б. Бекшоков // Сеченовский вестник. – 2013. – № 2 (12). – С. 21—26.

74. Чуруксаева, О.Н. Прогностическое значение Ki67, циклооксигеназы-2 (COX-2) и p16ink4a у больных местнораспространенным раком шейки матки / О.Н. Чуруксаева, Л.А. Коломиец, О.В. Савенкова [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2016. – № 15 (5). – С. 25—32.

75. Шляхто, Е.В. Персонализированная медицина. История, современное состояние проблемы и перспективы внедрения / Е.В. Шляхто, А.О. Конради // Российский журнал персонализированной медицины. – 2021. – № 1 (1). – С. 6—20.

76. Шушвал, М.С. Предопухолевые и интраэпителиальные неопластические процессы при развитии карциномы желудка / М.С. Шушвал, Л.В. Волкова, Л.М.

- Ныжник, А.А. Мусатов // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – № 4. – С. 147.
77. Aboukheyr, Es. H. Personalized Cancer Medicine: An Organoid Approach / Es. H. Aboukheyr, L. Montazeri, A.R. Aref [et al.] // Trends Biotechnol. – 2018. – № 36 (4). – P. 358—371.
78. Ahn, S. Practical Points in Gastric Pathology / S. Ahn, D.Y. Park // Arch Pathol Lab Med. – 2016. – № 140 (5). – P. 397—405.
79. Alexanian, A. Cyclooxygenase 2: protein-protein interactions and posttranslational modifications. / A. Alexanian, A. Sorokin // Physiol Genomics. – 2017. – № 49 (11). – P. 667–681.
80. Alipour, M. Molecular Mechanism of Helicobacter pylori-Induced Gastric Cancer / M. Alipour // J Gastrointest Cancer. – 2021. – № 52 (1). – P. 23—30.
81. Almazar, A.E. Survival Times of Patients With Menetrier's Disease and Risk of Gastric Cancer / A.E. Almazar, J.D. Penfield, Y.A. Saito, N.J. Talley // Clin Gastroenterol Hepatol. – 2021. – № 19 (4). – P. 707—712.
82. Amieva, M. Pathobiology of Helicobacter pylori-Induced Gastric Cancer / M. Amieva, R.M. Peek Jr // Gastroenterology. – 2016. – № 150 (1). – P. 64–78.
83. Annibale, B. A current clinical overview of atrophic gastritis / B. Annibale, G. Esposito, E. Lahner // Expert Rev Gastroenterol Hepatol. – 2020. – № 14 (2). – P. 93—102.
84. Avila, M. Next-generation sequencing for the general cancer patient / M. Avila, F. Meric-Bernstam // Clin Adv Hematol Oncol. – 2019. – № 17 (8). – P. 447–454.
85. Bae, J.M. Human papillomavirus infection and gastric cancer risk: A meta-epidemiological review / J.M Bae // World J Virol. – 2021. – № 10 (5). – P. 209—216.
86. Baj, J. Mechanisms of the Epithelial-Mesenchymal Transition and Tumor Microenvironment in *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Cancer / J. Baj, I. Korona-Głowniak, A. Forma [et al.] // Cells. – 2020. – № 9 (4). – P. 1055.
87. Barron, G.A. Circulating levels of angiogenesis-related growth factors in breast cancer: A study to profile proteins responsible for tubule formation / G.A. Barron, M. Goua, K.W.J. Wahle, G. Bermano // Oncol. Rep. – 2017. – № 38 (3). – P. 1886–1894.

88. Berke, T.P. Role of Reactivating Mutant p53 Protein in Suppressing Growth and Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer / T.P. Berke, S.H. Slight, S.M. Hyder // *Onco Targets Ther.* – 2022. – № 15. – P. 23—30.
89. Bernkopf, D.B. An aggregon in conductin/axin2 regulates Wnt/ β -catenin signaling and holds potential for cancer therapy / D.B. Bernkopf, M. Brückner, M.V. Hadjihannas, J. Behrens // *Nat Commun.* – 2019. – № 10 (1). – P. 4251.
90. Bernstein, C. Field defects in progression to gastrointestinal tract cancers / C. Bernstein, H. Bernstein, C.M. Payne [et al.] // *Cancer Lett.* – 2008. – № 260 (1-2). – P. 1—10.
91. Blackburn, E.H. Structure and function of telomeres / E.H. Blackburn // *Nature.* 1991. – № 350 (6319). – P. 569–573.
92. Brazvan, B. Telomerase activity and telomere on stem progeny senescence / B. Brazvan, A. Ebrahimi-Kalan, K. Velaei [et al.] // *Biomed. Pharmacother.* – 2018. – № 102. – P. 9–17.
93. Bruner, H.C. Loss of E-Cadherin-Dependent Cell–Cell Adhesion and the Development and Progression of Cancer / H.C. Bruner, P.W.B. Derksen // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2018. – № 10 (3). – a029330.
94. Bykov, I. Personalization of treatment for patients with stomach using molecular genetic markers / I. Bykov, M. Mikerova, M. Nemtsova, T. Kchorobryh // *Ann Oncol.* – 2018. – № 29 (Suppl. 5). – P—006.
95. Cai, L. The Better Survival of MSI Subtype Is Associated With the Oxidative Stress Related Pathways in Gastric Cancer / L. Cai, Y. Sun, K. Wang [et al.] // *Front Oncol.* – 2020. – № 10. – P. 1269.
96. Caldas, H. Survivin splice variants regulate the balance between the proliferation and cell death / H. Caldas, Y. Jiang, M.P. Holloway [et al.] // *Oncogene.* – 2005. – № 24 (12). – P. 1994–2007.
97. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. – *Nature.* – 2014. – № 513 (7517). – P. 202–209.
98. Cannataro, V.L. Neutral Theory and the Somatic Evolution of Cancer / V.L. Cannataro, J.P. Townsend // *Mol Biol Evol.* – 2018. – № 35 (6). – P. 1308–1315.

99. Ceyhan-Birsoy, O. Paired Tumor-Normal Sequencing Provides Insights into TP53-Related Cancer Spectrum in Li-Fraumeni Patients / O. Ceyhan-Birsoy, P. Selenica, M.H. Chui [et al.] // *J Natl Cancer Inst.* – 2021. – djab117.
100. Chai, D. CDX2 and Reg IV expression and correlation in gastric cancer / D. Chai, H. Du, K. Li [et al.] // *BMC Gastroenterol.* – 2021. – № 21 (1). – P. 92.
101. Chakravarthi, B.V. Genomic and Epigenomic Alterations in Cancer / B.V. Chakravarthi, S. Nepal, S. Varambally // *Am J Pathol.* – 2016. – № 186 (7). – P. 1724—1735.
102. Chen, B.J. hTERT promotes gastric intestinal metaplasia by upregulating CDX2 via NF- κ B signaling pathway / B.J. Chen, S. Zeng, R. Xie [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – № 8 (16). – P. 26969—26978.
103. Chen, Y. Advances in HER2 testing / Y. Chen, L. Liu, R. Ni, W. Zhou // *Adv Clin Chem.* – 2019. – № 91. – P. 123—162.
104. Chmelarova, M. Epigenetics in cancer: a promising path to follow? / M. Chmelarova, V. Palicka // *Clin Chem Lab Med.* – 2019. – № 57 (7). – P. 927—931.
105. Choi, H.B. Diagnostic and Prognostic Roles of CDX2 Immunohistochemical Expression in Colorectal Cancers / H.B. Choi, J.S. Pyo, S. Son [et al.] // *Diagnostics.* – 2022. – № 12 (3). – P. 757.
106. Choi, I.S. Epigenetic alterations in gastric carcinogenesis / I.S. Choi, T.T. Wu // *Cell Res.* – 2005. – № 15 (4). – P. 247–254.
107. Choi, J. Expression of thymidylate synthase in gastric cancer patients treated with 5-fluorouracil and doxorubicin-based adjuvant chemotherapy after curative resection / J. Choi, H. Lim, D.K. Nam [et al.] // *Br J Cancer.* – 2001. – № 84 (2). – P. 186—192.
108. Choi, R.S. Current and future molecular diagnostics of gastric cancer / R.S. Choi, W.Y.X. Lai, L.T.C. Lee [et al.] // *Expert Rev Mol Diagn.* – 2019. – № 19 (10). – P. 863—874.
109. Choi, S.J. DNA hypermethylation induced by Epstein-Barr virus in the development of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma / S.J. Choi, Y.S. Shin, B.W. Kang [et al.] // *Arch Pharm Res.* – 2017. – № 40 (8). – P. 894–905.

110. Choi, W.T. Diagnosis and risk stratification of Barrett's dysplasia by flow cytometric DNA analysis of paraffin-embedded tissue / W.T Choi, J.H. Tsai, P.S. Rabinovitch [et al.] // *Gut*. – 2018. – № 67 (7). – P.1229—1238.
111. Cisło, M. Distinct molecular subtypes of gastric cancer: from Laurén to molecular pathology / M. Cisło, A.A. Filip, G.J.A. Offerhaus [et al.] // *Oncotarget*. – 2018. – № 9 (27). – P. 19427—19442.
112. Clarke, M.F. Stemcell sand cancer: two faces of eve / M.F. Clarke, M. Fuller // *Cell*. – 2006. – № 124 (6). – P. 1111-1115.
113. Coccolini, F. Advanced gastric cancer: the value of systemic and intraperitoneal chemotherapy / F. Coccolini, P. Fugazzola, L. Ansaloni [et al.] // *ActaBiomed*. – 2018. – № 89 (8-S). – P. 104—109.
114. Coccolini, F. Neoadjuvant chemotherapy in advanced gastric and esophago-gastric cancer. Meta-analysis of randomized trials / F. Coccolini, M. Nardi, G. Montori [et al.] // *Int J Surg*. – 2018. – № 51. – P. 120–127.
115. Colebatch, A.J. TERT gene: its function and dysregulation in cancer / A.J. Colebatch, A. Dobrovic, W.A. Cooper // *J Clin Pathol*. – 2019. – № 72 (4). – P. 281—284.
116. Conlon, G.A. Recent advances in understanding the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis / G.A. Conlon, G.I. Murray // *J Pathol*. – 2019. – № 247 (5). – P. 629—640.
117. Darriba, D. The state of software for evolutionary biology / D. Darriba, T. Flouri, A. Stamatakis // *Mol Biol Evol*. – 2018. – № 35 (5). – P. 1037–1046.
118. de Martel, C. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis / C. de Martel, D. Georges, F. Bray [et al.] // *Lancet Glob Health*. – 2020. – № 8 (2). – P. e180-e190.
119. de Mello, R.A. Current and potential biomarkers in gastric cancer: a critical review of the literature / R.A. de Mello, G.A. Amaral, N.M. Neves [et al.] // *Future Oncol*. – 2021. – № 17 (25). – P. 3383—3396.

120. DeVita V.T., Lawrence T.S., Rosenberg S.A. (Eds.) DeVita, Hellman and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of oncology. – 8th ed. – Philadelphia: Wolters Kluwer / Lippincott Williams & Wilkins, 2008. – 355 p.
121. Dizdar, L. Survivin and XIAP expression in distinct tumor compartments of surgically resected gastric cancer: XIAP as a prognostic marker in diffuse and mixed type adenocarcinomas / L. Dizdar, M. Tomczak, T.A. Werner [et al.] // *Oncol Lett.* – 2017. – № 14 (6). – P. 6847—6856.
122. Dong, M.Y. Significant function and research progress of biomarkers in gastric cancer / M.Y. Dong, X. Gaosheng, M. Wei [et al.] // *Oncol Lett.* – 2020. – № 19 (1). – P. 17–29.
123. Du, J. Prognostic and Clinical Significance of COX-2 Overexpression in Laryngeal Cancer: A Meta-Analysis / J. Du, J. Feng, D. Luo, L. Peng // *Front Oncol.* – 2022. – № 12. – P. 854946.
124. Eatemadi, A. Role of protease and protease inhibitors in cancer pathogenesis and treatment / A. Eatemadi, H.T. Aiyelabegan, B. Negahdari [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2017. – № 86. – P. 221–231.
125. Echizen, K. The inflammatory microenvironment that promotes gastrointestinal cancer development and invasion / K. Echizen, H. Oshima, M. Nakayama // *Adv Biol Regul.* – 2018. – № 68. – P. 39—45.
126. Efimova, I.U. Identification of a spectrum of germline mutations for hereditary diffuse gastric cancer in the Russian population by next-generation sequencing / I.U. Efimova, E. Ignatova, I. Bykov, A.I. Kalinkin, A.S. Tanas, E.A. Alekseeva, V.V. Strelnikov, A. Alakunov, E. Kuznetsova, M.V. Nemtsova // *Ann Oncol.* – 2019. – № 30 (Suppl. 5). – v253—v324.
127. Egger, G. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy / G. Egger, G. Liang, A. Aparicio // *Nature.* – 2004. – № 429 (6990). – P.457–463.
128. Engel, C. Associations of Pathogenic Variants in MLH1, MSH2, and MSH6 With Risk of Colorectal Adenomas and Tumors and With Somatic Mutations in Patients With Lynch Syndrome / C. Engel, A. Ahadova, T.T. Seppälä [et. al.] // *Gastroenterology.* – 2020. – № 158 (5). – P. 1326—1333.

129. Eyvazi, S. CpG Islands Methylation Analysis of CDH11, EphA5, and HS3ST2 Genes in Gastric Adenocarcinoma Patients / S. Eyvazi, A.M. Khamaneh, V. Tarhriz [et al.] // *J Gastrointest Cancer*. – 2020. – № 51 (2). – 579—583.
130. Ferlay, J. Global Cancer Observatory: Cancer Today / J. Ferlay, M. Ervik, F. Lam [et al.] // Lyon: International Agency for Research on Cancer. – 2020. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>, accessed 9 June 2022.
131. Figueroa, M.E. MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation / M E. Figueroa, L. Skrabanek, Y. Li [et al.] // *Blood*. – 2009. – № 114 (16). – P. 3448—3458.
132. Fontana, E. Novel targets in the treatment of advanced gastric cancer: a perspective review / E. Fontana, E.C. Smyth // *Ther Adv Med Oncol*. – 2016. – № 8 (2). – P. 113—125.
133. Frank, G. Immunohistochemical study of squamous and adenosquamous cancer of lungs / G. Frank, L. Zavalishina, Ju. Andreeva // *Virchows Archiv*. – 2003. – № 443 (3). – P. 334.
134. Fukushima, R. Overexpression of Translocation Associated Membrane Protein 2 Leading to Cancer-Associated Matrix Metalloproteinase Activation as a Putative Metastatic Factor for Human Oral Cancer / R. Fukushima, A. Kasamatsu, D. Nakashima [et al.] // *J Cancer*. – 2018. – № 9 (18). – P. 3326—3333.
135. Gamble, L.A. Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome and the Role of CDH1: A Review / L.A. Gamble, T. Heller, J.L. Davis // *JAMA Surg*. – 2021. – № 156 (4). – P. 387—392.
136. George, R. Advances in nanotechnology-based platforms for survivin-targeted drug discovery / R. George, S. Hehlhans, M. Fleischmann [et al.] // *Expert Opin Drug Discov*. – 2022. – P. 1—22.
137. Ghatak, S. Novel APC gene mutations associated with protein alteration in diffuse type gastric cancer / S. Ghatak, P. Chakraborty, S.R. Sarkar [et al.] // *BMC Medical Genetics*. – 2017. – № 18 (1). – P. 61.

138. Gjyshi, O. Therapeutic and prophylactic gastrectomy in a family with hereditary diffuse gastric cancer secondary to a CDH1 mutation: a case series / O. Gjyshi, P. Vashi, L. Seewald [et al.] // *World J Surg Oncol.* – 2018. – № 16 (1). – P. 143.
139. Glukhov, A.I. Inhibition of telomerase activity of Melanoma cells in vitro by antisense oligonucleotides / A.I. Glukhov, O.V. Zimnik, S.A. Gordeev, S.E. Severin // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1998. – № 248 (2). – P. 368—371.
140. Gong, H. E2F transcription factor 1 (E2F1) enhances the proliferation, invasion and EMT of trophoblast cells by binding to Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1 (ZEB1) / H. Gong, F. Lu, X. Zeng, Q. Bai // *Bioengineered.* – 2022. – № 13 (2). – P. 2360—2370.
141. Gonzalez-Hormazabal, P. IL-8-251T>A (rs4073) Polymorphism Is Associated with Prognosis in Gastric Cancer Patients / P. Gonzalez-Hormazabal, S. Romero, M. Musleh [et al.] // *Anticancer Res.* – 2018. – № 38 (10). – P. 5703–5708.
142. Guidry, J.T. The interaction between human papillomavirus and other viruses / J.T. Guidry, R.S. Scott // *Virus Res.* – 2017. – № 231. – P.139–147.
143. Gunaldi, M. The value of serum survivin level in early diagnosis of cancer / M. Gunaldi, N. Isiksacan, H. Kocoglu [et al.] // *J Cancer Res Ther.* – 2018. – № 14 (3). – P. 570—573.
144. Guo, L. Aberrant promoter hypermethylation of p16, survivin, and retinoblastoma in gastric cancer / L. Guo, C. Huang, Q.J. Ji // *Bratis Lek Listy.* – 2018. – № 118 (3). – P. 164–168.
145. Hamashima, C. Cancer screening guidelines and policy making: 15 years of experience in cancer screening guideline development in Japan / C. Hamashima // *Jpn J Clin Oncol.* – 2018. – № 48 (3). – P. 278–286.
146. Hedayatizadeh-Omran, A. Association of P53 gene polymorphism with gastric cancer in Northern Iran as a high-risk region / A. Hedayatizadeh-Omran, R. Alizadeh-Navaei, G. Janbabaie [et al.] // *Biomed Rep.* – 2018. – № 8 (5). – P. 433—438.
147. Hideura, E. Blood Free-Circulating DNA Testing of Methylated RUNX3 Is Useful for Diagnosing Early Gastric Cancer / E. Hideura, Y. Suehiro, J. Nishikawa [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2020. – № 12 (4). – P. 789.

148. Hirpara, A. Speciation Theory of Carcinogenesis Explains Karyotypic Individuality and Long Latencies of Cancers / A. Hirpara, M. Bloomfield, P. Duesberg // *Genes (Basel)*. – 2018. – № 9 (8). – P. 402.
149. Holleczeck, B. *Helicobacter pylori* infection, chronic atrophic gastritis and risk of stomach and esophagus cancer: Results from the prospective population-based ESTHER cohort study / B. Holleczeck, B. Schöttker, H. Brenner // *Int J Cancer*. – 2020. – № 146 (10). – P. 2773—2783.
150. Hu, C.F. Regional distribution and clinicopathological characteristics of Epstein-Barr virus associated gastric cancer [Article in Chinese] / C.F. Hu, H. Lin, Y.J. Chen [et al.] // *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. – 2020. – № 42 (11). – P. 943—948.
151. Hu, Z. Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer / Z. Hu, P.A. Ott, C.J. Wu // *Nat Rev Immunol*. – 2018. – № 18 (3). – P. 168–182.
152. Huang, R.J. Diagnosis and Management of Gastric Intestinal Metaplasia: Current Status and Future Directions / R.J. Huang, A.Y. Choi, C.D. Truong [et al.] // *Gut Liver*. – 2019. – № 13 (6). – P. 596–603.
153. Ichiyasu, H. Matrix metalloproteinase-9-deficient dendritic cells have impaired migration through tracheal epithelial tight junctions / H. Ichiyasu, J.M. McCormack, K.M. McCarthy [et al.] // *Am J Respir Cell Mol Biol*. – 2004. – № 30 (6). – P. 761—770.
154. Iengar, P. Identifying pathways affected by cancer mutations / P. Iengar // *Genomics*. – 2018. – № 110 (5). – P. 318—328.
155. Ilson, D.H. Emerging evidence for VEGF and immune checkpoint inhibition in oesophagogastric cancer / D.H. Ilson // *Lancet Gastroenterol Hepatol*. – 2022. – № 7 (3). – P. 200—201.
156. Ishibashi, Y. Serum TFF1 and TFF3 but not TFF2 are higher in women with breast cancer than in women without breast cancer / Y. Ishibashi, H. Ohtsu, M. Ikemura [et al.] // *Sci Rep*. – 2017. – № 7 (1). – P. 4846.
157. Ito, M. Characteristics and Early Diagnosis of Gastric Cancer Discovered after *Helicobacter pylori* Eradication / M. Ito, S. Tanaka, K. Chayama // *Gut Liver*. – 2021. – № 15 (3). – P. 338—345.

158. Ito, K. Cellular reprogramming technology for dissecting cancer epigenome in vivo / K. Ito, Y. Yamada // *Epigenomics*. – 2017. – № 9 (7). — P. 997–1011.
159. Jafari, N. Expression patterns of seven key genes, including β -catenin, Notch1, GATA6, CDX2, miR-34a, miR-181a and miR-93 in gastric cancer / N. Jafari, S. Abediankenari, Z. Hosseini-Khah [et al.] // *Sci Rep*. – 2020. – № 10 (1). – P. 12342.
160. Jafri, M.A. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies / M.A. Jafri, S.A. Ansari, M.H. Alqahtani, J.W. Shay // *Genome Med*. – 2016. – № 8 (1). – P. 69.
161. Jang, B.G. Molecular Pathology of Gastric Carcinoma / B.G. Jang, W.H. Kim // *Pathobiology*. – 2011. – № 78 (6). – P. 302–310.
162. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese Classification of Gastric Carcinoma - 2nd English Edition // *Gastric Cancer*. – 1998. – № 1 (1). – P. 10—24.
163. Jencks, D.S. Overview of Current Concepts in Gastric Intestinal Metaplasia and Gastric Cancer / D.S. Jencks, J.D. Adam, M.L. Borum // *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. – 2018. – № 14 (2). – P. 92–101.
164. Ji, X.K. Genetic variant of cyclooxygenase-2 in gastric cancer: More inflammation and susceptibility / X.K. Ji, S.V. Madhurapantula, G. He [et al.] // *World J Gastroenterol*. – 2021. – № 27 (28). – P. 4653—4666.
165. Jia, W. Clinical effect of DAPK promoter methylation in gastric cancer / W. Jia, T. Yu, X. Cao [et al.] // *Medicine (Baltimore)*. – 2016. – № 95 (43). – P. e5040.
166. Ju, L. Autocrine VEGF and IL-8 Promote Migration via Src/Vav2/Rac1/PAK1 Signaling in Human Umbilical Vein Endothelial Cells / L. Ju, Z. Zhou, B. Jiang [et al.] // *Cell Physiol Biochem*. – 2017. – № 41 (4). – P. 1346–1359.
167. Jung, H. DNA methylation loss promotes immune evasion of tumours with high mutation and copy number load / H. Jung, H.S. Kim, J.Y. Kim [et al.] // *Nat Commun*. – 2019. – № 10 (1). – P. 1—12.
168. Katoh, H. Genomic pathobiology of gastric carcinoma / H. Katoh, S. Ishikawa // *Pathol Int*. – 2017. – № 67 (2). – P. 63–71.

169. Ke, B. Sonic Hedgehog/Gli1 Signaling Pathway Regulates Cell Migration and Invasion via Induction of Epithelial-to-mesenchymal Transition in Gastric Cancer / B. Ke, X.N. Wang, N. Liu [et al.] // *J Cancer*. – 2020. – № 11 (13). – P. 3932—3943.
170. Kennedy, S.R. Cancer-Associated Mutations but No Cancer: Insights into the Early Steps of Carcinogenesis and Implications for Early Cancer Detection / S.R. Kennedy, Y. Zhang, R.A. Risques // *Trends Cancer*. – 2019. – № 5 (9). – P. 531—540.
171. Kim, J. Helicobacter pylori and Gastric Cancer / J. Kim, T.C. Wang // *Gastrointest Endosc Clin N Am*. – 2021. – № 31 (3). – P. 451—465.
172. Kim, N.W. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer / N.W. Kim, M.A. Piatyszek, K.R. Prowse [et al.] // *Science*. – 1994. – № 266 (5193). – P. 2011—2015.
173. Kinoshita, H. Metaplasia in the Stomach—Precursor of Gastric Cancer? / H. Kinoshita, Y. Hayakawa, K. Koike // *Int J Mol Sci*. – 2017. – № 18 (10). – P. 2063—2079.
174. Knudson, A.G. Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma / A.G. Knudson Jr. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1971. – № 68 (4). – P. 820—823.
175. Kolev, Y. Prognostic significance of VEGF expression in correlation with COX-2, microvessel density, and clinicopathological characteristics in human gastric carcinoma / Y. Kolev, H. Uetake, S. Iida [et al.] // *Ann Surg Oncol*. – 2007. – № 14 (10). – P. 2738—2747.
176. Kugaevskaya, E.V. [The urokinase-type plasminogen activator system and its role in tumor progression] [Article in Russian] / E.V. Kugaevskaya, T.A. Gureeva, O.S. Timoshenko, N.I. Solovyeva // *Biomed Khim*. – 2018. – № 64 (6). – P. 472—486.
177. Kumar, S. Risk Factors and Incidence of Gastric Cancer After Detection of Helicobacter pylori Infection: A Large Cohort Study / S. Kumar, D.C. Metz, S. Ellenberg [et al.] // *Gastroenterology*. – 2020. – № 158 (3). – P. 527—536.e7.
178. Lam, S.Y. The gastrointestinal microbiota and its role in oncogenesis / S.Y. Lam, J. Yu, S.H. Wong [et al.] // *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. – 2017. – № 31 (6). – P. 607—618.

179. Laptiev, S.A. Molecular-genetic «portrait» of breast cancer / S.A. Laptiev, M.A. Korzhenevskaja, E.N. Imyanitov // *The Scientific Notes of IPP-SPSMU*. – 2017. – № 24 (2). – P. 12—22.
180. Lauren, P. Two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification / P. Lauren // *Acta Pathol.* – 1965. – № 64. – P. 31–42.
181. Lee, D.D. DNA hypermethylation within TERT promoter upregulates TERT expression in cancer / D.D. Lee, R. Leão, M. Komosa [et al.] // *J Clin Invest.* – 2019. – № 129 (1). – P. 223—229.
182. Legras, A. Validity of Targeted Next-Generation Sequencing in Routine Care for Identifying Clinically Relevant Molecular Profiles in Non-Small-Cell Lung Cancer: Results of a 2-Year Experience on 1343 Samples / A. Legras, M. Barritault, A. Tallet [et al.] // *J Mol Diagn.* – 2018. – № 20 (4). – P. 550—564.
183. Leja, M. Early detection of gastric cancer beyond endoscopy – new methods / M. Leja, A. Linē // *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* – 2021. – № 50—51. – P. 101731.
184. Leung, W.K. Concurrent hypermethylation of multiple tumor-related genes in gastric carcinoma and adjacent normal tissues / W.K. Leung, J. Yu, E.K. Ng [et al.] // *Cancer.* – 2001. – № 91 (12). – P. 2294–301.
185. Li, L. Cancer type-dependent correlations between TP53 mutations and antitumor immunity / L. Li, M. Li, X. Wang // *DNA Repair (Amst).* – 2020. – № 88. – P. 102785.
186. Li, E. DNA methylation in mammals / E. Li, Y. Zhang // *Cold Spring Harbor Prospect Biol.* – 2014. – № 6 (5). – a019133.
187. Li, H.L. PinX1: structure, regulation and its functions in cancer / H.L. Li, J. Song, H.M. Yong [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. – № 7 (40). – P. 66267—66275.
188. Li, W. IL-8 interacts with metadherin promoting proliferation and migration in gastric cancer / W. Li, S. Lin, W. Li [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2016. – № 478 (3). – P. 1330–1337.
189. Lin, L. MMP-9 secreted by tumor associated macrophages promoted gastric cancer metastasis through a PI3K/AKT/Snail pathway / L. Lin, Y. Ye, X. Zhu // *Biomed Pharmacother.* – 2019. – № 117. – P. 109096.

190. Liu, L. *TERT* Promoter Hypermethylation in Gastrointestinal Cancer: A Potential Stool Biomarker / L. Liu, C. Liu, O. Fotouhi [et al.] // *Oncologist*. – 2017. – № 22 (10). – P. 1178–1188.
191. Lotem, J. *Runx3* in Immunity, Inflammation and Cancer / J. Lotem, D. Levanon, V. Negreanu [et al.] // *Adv Exp Med Biol*. – 2017. – № 962. – P. 369–393.
192. Louie, A.D. Integrating Molecular Biomarker Inputs Into Development and Use of Clinical Cancer Therapeutics / A.D. Louie, K. Huntington, L. Carlsen [et al.] // *Front Pharmacol*. – 2021. – № 12. – P. 747194.
193. Macedo, F. Gastric Cancer and Angiogenesis: Is VEGF a Useful Biomarker to Assess Progression and Remission? / F. Macedo, K. Ladeira, A. Longatto-Filho, S.F. Martins // *J Gastric Cancer*. – 2017. – № 17 (1). – P. 1–10.
194. Maeda, M. Mechanisms for the induction of gastric cancer by *Helicobacter pylori* infection: aberrant DNA methylation pathway / M. Maeda, H. Moro, T. Ushijima // *Gastric Cancer*. – 2017. – № 20 (Suppl 1). – P. 8–15.
195. Mandola, M.V. A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels / M.V. Mandola, J. Stoehlmacher, W. Zhang [et al.] // *Pharmacogenetics*. – 2004. – № 14 (5). – P. 319–327.
196. Martincorena, I. Somatic mutation in cancer and normal cells / I. Martincorena, P.J. Campbell // *Science*. – 2015. – № 349 (6255). – P. 1483–1489.
197. Mateo, J. A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO scale for clinical actionability of molecular targets (ESCAT) / J. Mateo, D. Chakravarty, R. Dienstmann [et al.] // *Ann Oncol*. – 2018. – № 29 (9). – P. 1895–1902.
198. Maurya, S.K. Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Cancer Initiation and Progression [Text] / S.K. Maurya, N. Poddar, P. Tandon, A.K. Yadav // In: Chakraborti S., Dhalla N. (Eds). *Pathophysiological Aspects of Proteases*. – Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2017. – P. 207–236.
199. Melino, G. p73, the "assistant" guardian of the genome? / G. Melino // *Ann N Y Acad Sci*. – 2004. – № 1010. – P. 9–15.

200. Melo, S. Predicting the Functional Impact of CDH1 Missense Mutations in Hereditary Diffuse Gastric Cancer / S. Melo, J. Figueiredo, M.S. Fernandes [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2017. – № 18 (12). – P. 1—18.
201. Merchant, J.L. Hedgehog Signaling Links Chronic Inflammation to Gastric Cancer Precursor Lesions / J.L. Merchant, L. Ding // *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* – 2017. – № 3 (2). – P. 201–210.
202. Morak, M. Comprehensive analysis of the *MLH1* promoter region in 480 patients with colorectal cancer and 1150 controls reveals new variants including one with a heritable constitutional *MLH1* epimutation / M. Morak, A. Ibisler, G. Keller [et al.] // *J Med Genet.* – 2018. – № 55 (4). – P. 240—248.
203. Mosele, F. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: A report from the ESMO Precision Medicine Working Group / F. Mosele, J. Remon, J. Mateo [et al.] // *Ann Oncol.* – 2020. – № 31 (11). – P. 1491–1505.
204. Murakami, K. Chronology of gastrointestinal cancer / K. Murakami, H. Matsubara // *Surg Today.* – 2018. – № 48 (4). – P. 365—370.
205. Nagasaka, T. Methylation pattern of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene in colon during progressive colorectal tumorigenesis / T. Nagasaka, A. Goel, K. Notohara [et al.] // *Int J Cancer.* – 2008. – № 122 (11). – P. 2429—2436.
206. Nakagawa, H. Age-related hypermethylation of the 5' region of *MLH1* in normal colonic mucosa is associated with microsatellite-unstable colorectal cancer development / H. Nakagawa, G.J. Nuovo, E.E. Zervos [et al.] // *Cancer Res.* – 2001. – № 61 (19). – P. 6991–6995.
207. Naseem, M. Outlooks on Epstein-Barr virus associated gastric cancer / M. Naseem, A. Barzi, C. Brezden-Masley [et al.] // *Cancer Treat Rev.* – 2018. – № 66. – P. 15–22.
208. National Cancer Institute. Cancer statistics (2018), Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics> , accessed 9 June 2022.
209. Nemtsova, M.V. Implication of Gastric Cancer Molecular Genetic Markers in Surgical Practice / M.V. Nemtsova, V.V. Strelnikov, A.S. Tanas, I.I. Bykov, D.V

- Zaletaev, V.V. Rudenko, A.I. Glukhov, T.V. Kchorobrich, Y. Li, V.V. Tarasov, G.E. Barreto, G. Aliev // *Curr Genomics*. – 2017. – № 18 (5). – P. 408—415.
210. Nemtsova, M.V. Clinical relevance of somatic mutations in main driver genes detected in gastric cancer patients by next-generation DNA sequencing / M.V. Nemtsova, A.I. Kalinkin, E.B. Kuznetsova, I.V. Bure, E.A. Alekseeva, I.I. Bykov, T.V. Khorobrykh, D.S. Mikhaylenko, A.S. Tanas, S.I. Kutsev, D.V. Zaletaev, V.V. Strelnikov // *Sci Rep*. – 2020. – № 10 (1). – P. 504.
211. Nemtsova, M.V. Mutations in Epigenetic Regulation Gens in Gastric Cancer / M.V. Nemtsova, A.I. Kalinkin, E.B. Kuznetsova, I.V. Bure, E.A. Alekseeva, I.I. Bykov, T.V. Khorobrykh, D.S. Mikhaylenko, A.S. Tanas, V.V. Strelnikov // *Cancers (Basel)*. – 2021. – № 13 (18). – P. 4586.
212. Ni, H.K. The relationship between gastric cancer and Helicobacter pylori cytotoxin-related gene A genotypes / H.K. Ni, L.M. Liao, R.L. Huang, W. Zhou // *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. – 2020. – № 66 (7). – P. 1—4.
213. Niclauss, N. Novel Biomarkers of Gastric Adenocarcinoma: Current Research and Future Perspectives / N. Niclauss, I. Gütgemann, J. Dohmen [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2021. – № 13 (22). – P. 5660.
214. Nie, S. Current Molecular Targeted Agents for Advanced Gastric Cancer / S. Nie, G. Yang, H. Lu // *OncoTargets Ther*. – 2020. – № 13. – P. 4075–4088.
215. Ohgaki, H. Genetic pathway to human cancer [Text] / H. Ohgaki, W. Yasui, J. Yokota // In: *Handbook of experimental pharmacology. Mechanisms in carcinogenesis and cancer research* / Vainio H., Hietanen E. (Eds). – Heidelberg, 2003. – P. 25—39.
216. Oue, N. DNA methylation of multiple genes in gastric carcinoma: Association with histological type and CpG island methylator phenotype / N. Oue, Y. Oshimo, H. Nakayama [et al.] // *Cancer Sci*. – 2003. – № 94 (10). – P. 901–905.
217. Padda, J. Association Between Helicobacter pylori and Gastric Carcinoma / J. Padda, K. Khalid, A. Cooper, G. Jean-Charles // *Cureus*. – 2021. – № 13 (5). – P. e15165.
218. Pahlavan, Y. Survivin modulatory role in autoimmune and autoinflammatory diseases / Y. Pahlavan, H. Kahroba, N. Samadi [et al.] // *J Cell Physiol*. – 2019. – № 234 (11). – P. 19440—19450.

219. Pandit, R. Mixed type of gastric carcinoma as a new addition to Lauren's classification / R. Pandit. – Sofia: ICMS, 2008. – 68 p.
220. Pereira, M.A. Immunohistochemical expression of thymidylate synthase and prognosis in gastric cancer patients submitted to fluoropyrimidine-based chemotherapy / M.A. Pereira, M. Ramos, A.R. Dias [et al.] // Chin J Cancer Res. – 2018. – № 30 (5). – P. 526—536.
221. Pfeffer, C.M. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy / C.M. Pfeffer, T.K.A. Singh // Int J Mol Sci. – 2018. – № 19 (2). – P. 448.
222. Pfeifer, G. Defining Driver DNA Methylation Changes in Human Cancer / G. Pfeifer // Int J Mol Sci. – 2018. – № 19 (4). – P. 1166.
223. Piscione, M. Eradication of *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: A Controversial Relationship / M. Piscione, M. Mazzone, M.C. Di Marcantonio [et al.] // Front Microbiol. – 2021. – № 12. – P. 630852.
224. Puneet. Epigenetic Mechanisms and Events in Gastric Cancer-Emerging Novel Biomarkers / Puneet, H.R. Kazmi, S. Kumari [et al.] // Pathol Oncol Res. – 2018. – № 24 (4). – P. 757–770.
225. Rashed, H.E. Prognostic significance of the genetic and the immunohistochemical expression of epithelial-mesenchymal-related markers in colon cancer / H.E. Rashed, S. Hussein, H. Mosaad [et al.] // Cancer Biomarkers. – 2017. – № 20 (1). – P. 107—122.
226. Ratti, M. Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches / M. Ratti, A. Lampis, J.C. Hahne [et al.] // Cell Mol Life Sci. – 2018. – № 75 (22). – P. 4151—4162.
227. Rivas-Ortiz, C.I. Genetic Alterations in Gastric Cancer Associated with *Helicobacter pylori* Infection / C.I. Rivas-Ortiz, Y. Lopez-Vidal, L.J.R. Arredondo-Hernandez [et al.] // Front Med (Lausanne). – 2017. – № 4 (47). – P. 1—12.
228. Roesch-Dietlen, F. Frequency of human papillomavirus infection in patients with gastrointestinal cancer / F. Roesch-Dietlen, A.D. Cano-Contreras, Y.J. Sánchez-Maza [et al.] // Rev Gastroenterol Mex (Engl Ed). – 2018. – № 83 (3). – P. 253—258.

229. Sahgal, P. Early *TP53* Alterations Shape Gastric and Esophageal Cancer Development / P. Sahgal, B.M. Huffman, D.T. Patil [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2021. – № 13 (23). – P. 5915.
230. Saito, M. CDX2 is involved in microRNA-associated inflammatory carcinogenesis in gastric cancer / M. Saito, H. Okayama, K. Saito [et al.] // *Oncol Lett*. – 2017. – № 14 (5). – P. 6184—6190.
231. Saitoh, T. Endoscopic and clinicopathological features of intramucosal, histologically mixed-type, low-grade, well-differentiated gastric tubular adenocarcinoma with the potential for late-onset lymph node metastasis / T. Saitoh, A. Takamura, G. Watanabe // *BMC Gastroenterology*. – 2018. – № 18 (1). – P. 189.
232. Saliminejad, K. Methylation Analysis of *P16*, *RASSF1A*, *RPRM*, and *RUNX3* in Circulating Cell-Free DNA for Detection of Gastric Cancer: A Validation Study / K. Saliminejad, S. Soleymani Fard, H.R. Khorram Khorshid [et al.] // *Avicenna J Med Biotechnol*. – 2020. – № 12 (2). – P. 99—106.
233. Samadani, A.A. CDX1/2 and KLF5 Expression and Epigenetic Modulation of Sonic Hedgehog Signaling in Gastric Adenocarcinoma / A.A. Samadani, N. Nikbakhsh, H. Taheri [et al.] // *Pathol Oncol Res*. – 2019. – № 25 (3). – P. 1215—1222.
234. Sexton, R.E. Gastric cancer heterogeneity and clinical outcomes / R.E. Sexton, M.N.A. Hallak, M.H. Uddin [et al.] // *Technol Cancer Res Treat*. – 2020. – № 19. – P. 1533033820935477.
235. Shao, L. Risk of gastric cancer among patients with gastric intestinal metaplasia / L. Shao, P. Li, J. Ye [et al.] // *Int J Cancer*. – 2018. – № 143 (7). – P. 1671—1677.
236. Shen, L. *Helicobacter pylori* Induces a Novel NF- κ B/LIN28A/let-7a/hTERT Axis to Promote Gastric Carcinogenesis / L. Shen, J. Zeng, L. Ma [et al.] // *Mol Cancer Res*. – 2021. – № 19 (1). – P. 74—85.
237. Shiao, Y. P53 alteration in gastric precancerous lesions / Y. Shiao, M. Rugge, P. Correa [et al.] // *Am J Pathol*. – 1994. – № 144 (3). – P. 511–517.
238. Siewert, J.R. Kardiakarzinom: Versuch einer therapeutisch relevanten Klassifikation / J.R. Siewert, A.H. Hölscher, K. Becker [et al.] // *Chirurg*. – 1987. – № 58. – P. 25–34.

239. Snietura, M. Potential role of human papilloma virus in the pathogenesis of gastric cancer / M. Snietura, D. Waniczek, W. Piglowski [et al.] // *World J Gastroenterol.* – 2014. – № 20 (21). – P. 6632—6637.
240. Song, L. Expressions of Ras Homolog Gene Family, Member A (RhoA) and Cyclooxygenase-2 (COX-2) Proteins in Early Gastric Cancer and Their Role in the Development of Gastric Cancer / L. Song, Y. Guo, B. Xu // *Med Sci Monit.* – 2017. – № 23. – P. 2979—2984.
241. Subramaniam, M.M. Molecular pathology of RUNX3 in human carcinogenesis / M.M. Subramaniam, J.Y. Chan, K.G. Yeoh [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 2009. – № 1796 (2). – P. 315—331.
242. Tahara, T. Molecular subtyping of gastric cancer combining genetic and epigenetic anomalies provides distinct clinicopathological features and prognostic impacts / T. Tahara, S. Tahara, N. Horiguchi [et al.] // *Hum Mutat.* – 2019. – № 40 (3). – P. 347—354.
243. Takahashi, Y. Significance of platelet derived endothelial cell growth factor in the angiogenesis of human gastric cancer / Y. Takahashi, C.D. Bucana, Y. Akagi [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 1998. – № 4 (2). – P. 429—434.
244. Tamura, G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and prognosis of gastric cancer / G. Tamura // *World J Gastroenterol.* – 2006. – № 12 (12). – P. 192—198.
245. Tavakoli, A. Association between Epstein-Barr virus infection and gastric cancer: a systematic review and meta-analysis / A. Tavakoli, S.H. Monavari, F. Solaymani Mohammadi [et al.] // *BMC Cancer.* – 2020. – № 20 (1). – P. 493.
246. Testino, G. Gastric preneoplastic changes [article in Italian] / G. Testino // *Recenti Prog Med.* – 2004. – № 95 (5). – P. 239—244.
247. Todaro, G.J. N.A.S. symposium: new evidence as the basis for increased efforts in cancer research / G.J. Todaro, R.J. Huebner // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1972. – № 69 (4). – P. 1009—1015.
248. Torabizadeh, Z. Evaluation of E-cadherin Expression in Gastric Cancer and Its Correlation with Clinicopathologic Parameters / Z. Torabizadeh, A. Nosrati, S.N.S. Saravi [et al.] // *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* – 2017. – № 11 (2). – P. 158—163.

1.

249. Treese, C. Hereditary Diffuse Gastric Cancer—Update Based on the Current Consort Recommendations / C. Treese, B. Siegmund, S. Daum // *Curr Oncol.* – 2022. – № 29 (4). – P. 2454–2460.

250. Tsugane, S. Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence / S. Tsugane, S. Sasazuki // *Gastr Cancer.* – 2007. – № 10 (2). – P. 75–83.

251. Tsukuma, H. Natural history of early gastric cancer: a non concurrent, long-term, follow up study / H. Tsukuma, A. Oshima, H. Narahara, T. Morii // *Gut.* – 2000. – № 47 (5). – P. 618–621.

252. Tyczyńska, M. Treatment Strategies of Gastric Cancer—Molecular Targets for Anti-angiogenic Therapy: a State-of-the-art Review / M. Tyczyńska, P. Kędzierawski, K. Karakuła [et al.] // *J Gastrointest Cancer.* – 2021. – № 52 (2). – P. 476–488.

253. Uppal, D.S., Genetics/genomics/proteomics of gastric adenocarcinoma / D.S. Uppal, S.M. Powel // *Gastroenterol Clin North Am.* – 2013. – № 42 (2). – P. 241–260.

254. Valent, P. Proposed Terminology and Classification of Pre-Malignant Neoplastic Conditions: A Consensus Proposal / P. Valent, C. Akin, M. Arock [et al.] // *EBioMedicine.* – 2017. – № 26. – P. 17–24.

255. van de Haar, J. Identifying Epistasis in Cancer Genomes: A Delicate Affair / J. van de Haar, S. Canisius, M.K. Yu [et al.] // *Cell.* – 2019. – № 177 (6). – P. 1375–1383.

256. Vannella, K.M. Mechanisms of Organ Injury and Repair by Macrophages / K.M. Vannella, T.A. Wynn // *Annu Rev Physiol.* – 2017. – № 79. – P. 593–617.

257. Vašíčková, K. TUSC3: functional duality of a cancer gene / K. Vašíčková, P. Horak, P. Vaňhara // *Cell Mol Life Sci.* – 2018. – № 75 (5). – P. 849–857.

258. Wagner, A.D. Chemotherapy for advanced gastric cancer / A.D. Wagner, N.L. Syn, M. Moehler [et al.] // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2017. – № 8 (8). – CD004064.

259. Wang, H. Associations Between Gastric Cancer Risk and Virus Infection Other Than Epstein-Barr Virus: A Systematic Review and Meta-analysis Based on Epidemiological Studies / H. Wang, X.L. Chen, K. Liu [et al.] // *Clin Transl Gastroenterol.* – 2020. – № 11 (7). – P. e00201.

260. Wang, H. A functional polymorphism within the distal promoter of *RUNX3* confers risk of colorectal cancer / H. Wang, J. Wang, D. Li [et al.] // *Int J Biol Markers*. – 2022. – № 37 (1). – P. 40—46.
261. Wei, X. BRCA1-associated protein induced proliferation and migration of gastric cancer cells through MAPK pathway / X. Wei, X. Liu, H. Liu [et al.] // *Surg Oncol*. – 2020. – № 35. – P. 191—199.
262. Wen, J. Promoter methylation of tumor-related genes as a potential biomarker using blood samples for gastric cancer detection / J. Wen, T. Zheng, K. Hu [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – № 8 (44). – P. 77783—77793.
263. Wheatley, S.P. Survivin at a glance / S.P. Wheatley, D.C. Altieri // *J Cell Sci*. – 2019. – № 132 (7). – jcs223826.
264. Wild, C.P. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention / C.P. Wild, E. Weiderpass, B.W. Stewart (eds). // Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. – 2020. Available from: <http://publications.iarc.fr/586>.
265. Xu, Y. p53 Codon 72 polymorphism predicts the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer / Y. Xu, L. Yao, T. Ouyang [et al.] // *Clin Cancer Res*. – 2005. – № 11 (20). – P. 7328—7333.
266. Yamada, A. Dual Role of Fas/FasL-Mediated Signal in Peripheral Immune Tolerance / A. Yamada, R. Arakaki, M. Saito [et al.] // *Front Immunol*. – 2017. – № 8. – P. 403.
267. Yang, B. Advances in optical assays for detecting telomerase activity / B. Yang, L. Shi, J. Lei [et al.] // *Luminescence*. – 2019. – № 34 (2). – P. 136—152.
268. Yasui, M. Cancer stem cells in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma / M. Yasui, A. Kunita, S. Numakura [et al.] // *Cancer Sci*. – 2020. – № 111 (7). – P. 2598—2607.
269. Yatagai, N. TP53 inactivation and expression of methylation-associated proteins in gastric adenocarcinoma with enteroblastic differentiation / N. Yatagai, T. Saito, Y. Akazawa [et al.] // *Virchows Archiv*. – 2019. – № 474 (3). – P. 315—324.

270. Yin, A. A Review of Mathematical Models for Tumor Dynamics and Treatment Resistance Evolution of Solid Tumors / A. Yin, D.J.A.R. Moes, J.G.C. van Hasselt [et al.] // *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* – 2019. – № 8 (10). – P. 720—737.
271. Ying, X. Value of combined detection of routine blood, biochemical indexes and tumor markers for screening of patients with gastric cancer / X. Ying, J. Zheng, Z. Wang [et al.] // *Biomedical Research.* – 2017. – № 28 (21). – P. 9589—9592.
272. Yoo, H.J. Role of COX2 as a Biomarker for Estimating Survival of Patients With Clinical Stage I Gastric Cancer / H.J. Yoo, T.J. Kim, D.J. Kim, W. Kim // *Anticancer Res.* – 2020. – № 40 (1). – P. 341—347.
273. Yue, H. The significance of OLGA and OLGIM staging systems in the risk assessment of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis / H. Yue, L. Shan, L. Bin // *Gastric Cancer.* – 2018. – № 21 (4). – P. 579–587.
274. Yueh, T.C. The Contribution of *MMP-7* Genotypes to Colorectal Cancer Susceptibility in Taiwan / T.C. Yueh, C.N. Wu, Y.W. Hung [et al.] // *Cancer Genomics Proteomics.* – 2018. – № 15 (3). – P. 207—212.
275. Zawacka-Pankau, J.E. The Role of p53 Family in Cancer / J.E. Zawacka-Pankau // *Cancers (Basel).* – 2022. – № 14 (3). – P. 823.
276. Zeng, L. Construction of the POT1 promoter report gene vector, and the effect and underlying mechanism of the POT1 promoter in regulating telomerase and telomere length / L. Zeng, Y. Wang, F. Wang [et al.] // *Oncol Lett.* – 2017. – № 14 (6). – P. 7232—7240.
277. Zhang, J. Polymorphisms in human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene, gene-gene and gene-smoking interaction with susceptibility to gastric cancer in Chinese Han population / J. Zhang, H. Ju, J.R. Gao [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – № 8 (12). – P. 20235—20243.
278. Zhang, T. Hypoxia and Metabolism in Metastasis / T. Zhang, C. Suo, C. Zheng, H. Zhang // *Adv Exp Med Biol.* – 2019. – № 1136. – P. 87–95.
279. Zhao, C. Promoter methylation of tumorrelated genes in gastric carcinogenesis / C. Zhao, X. Bu // *Histol Histopathol.* – 2012. – № 27 (10). – P. 1271–1282.

280. Zhao, J. *Helicobacter pylori* modulates cyclooxygenase-2 and 15-hydroxy prostaglandin dehydrogenase in gastric cancer / J. Zhao, S. Wen, X. Wang, Z. Zhang // *Oncol Lett.* – 2017. – № 14 (5). – P. 5519—5525.
281. Zhao, Y. Long-Term Clinical Efficacy and Perioperative Safety of Endoscopic Submucosal Dissection versus Endoscopic Mucosal Resection for Early Gastric Cancer: An Updated Meta-Analysis / Y. Zhao, C. Wang // *Biomed Res Int.* – 2018. – 3152346.
282. Zhou, X. Association of APC gene promoter methylation and the risk of gastric cancer: A meta-analysis and bioinformatics study / X. Zhou, D. Jiao, M. Dou [et al.] // *Medicine (Baltimore)*. – 2020. – № 99 (16). – P. e19828.
283. Zhou, Z. Expression of Wnt3, β -catenin and MMP-7 in gastric cancer and precancerous lesions and their correlations with *Helicobacter pylori* infection / Z. Zhou, G. Ye, J. Peng [et al.] // *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* – 2021. – № 46 (6). – P. 575—582.
284. Zou, Z. The plasma levels of 12 cytokines and growth factors in patients with gastric cancer / Z. Zou, L. Zhao, S. Su [et al.] // *Medicine (Baltimore)*. – 2018. – № 97 (19). – P. e0413.