

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова
Медицинский научно-образовательный центр

На правах рукописи

ДАНИЛОВА НАТАЛЬЯ ВЛАДИМИРОВНА

**РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНОЙ КЛАССИФИКАЦИИ
РАКА ЖЕЛУДКА**

3.3.2 – патологическая анатомия

3.1.6 – онкология, лучевая терапия

на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научные консультанты:

Мальков Павел Георгиевич – доктор медицинских наук, доцент (3.3.2)

Андреева Юлия Юрьевна – доктор медицинских наук (3.1.6)

Москва – 2023 г.

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», Медицинский научно-образовательный центр

Научные руководители:

доктор медицинских наук, доцент
доктор медицинских наук

*Мальков Павел Георгиевич
Андреева Юлия Юрьевна*

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, доцент,
профессор кафедры патологической
анатомии ФГБОУ ВО «Омский
государственный медицинский
университет» Минздрава России

Мозговой Сергей Игоревич

доктор медицинских наук, профессор, член-
корреспондент РАН, директор НИИМЧ им.
академика А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ
имени академика Б.В. Петровского»

Михалева Людмила Михайловна

доктор медицинских наук, заместитель
главного врача по лабораторной медицине
Медицинского института им. Березина
Сергея

Раскин Григорий Александрович

доктор медицинских наук, заместитель
генерального директора по хирургии ФГБУ
«НМИЦ радиологии» МЗ РФ, руководитель
отдела торакоабдоминальной онкохирургии
МНИОИ им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ
«НМИЦ радиологии» Минздрава России

Рябов Андрей Борисович

Защита диссертации состоится **28 июня 2023 г. в 14:00** часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.006 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (адрес: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (адрес: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6; сайт: <http://dissovet.rudn.ru>).

Автореферат разослан _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ПДС 0300.006
кандидат медицинских наук

Горячев Вячеслав Александрович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Рак желудка продолжает оставаться ведущей причиной заболеваемости и смертности от онкологических заболеваний в мире. По оценкам авторов, в мире диагностируется около 950 000 новых случаев рака желудка в год и 720 000 случаев смерти от рака желудка, что делает его пятым по распространенности и третьим по уровню смертности среди всех онкологических заболеваний (Torre, L.A., et al. 2015). Большинство пациентов с раком желудка на момент постановки диагноза имеют продвинутые стадии заболевания с общей пятилетней выживаемостью 20-40% (Di Pinto, F., et al. 2020). Рак желудка плохо отвечает на химиотерапию, только у 20-30% пациентов в опухоли регистрируется значимый патоморфологический регресс (Tan, I.B., et al. 2011). Таргетная терапия, применяемая для лечения рака желудка, ограничена тремя препаратами: трастузумаб для пациентов с HER2-позитивным раком желудка (Bang, Y.J., et al. 2010), рамуцирумаб (анти-VEGFR2) в качестве второй линии терапии (Wilke, H., et al. 2014) и пембролизумаб (анти-PD-1) для лечения пациентов чьи опухоли экспрессируют PD-L1 в качестве третьей линии терапии (Yu, Y. 2018).

Для определения прогноза рака желудка используется множество различных маркеров, в частности маркеры микросателлитной нестабильности (MSH2, MSH6, MLH1, PMS2), маркеры желудочной/кишечной дифференцировки (MUC2, CDX2, MUC5AC, CD10), молекулы адгезии (E-кадгерин, β -катенин, Клаудин-1, Клаудин-3, Клаудин-4, CD44), маркеры вируса Эпштейна-барр (LMP-1, малые вирусные РНК, EBV), регулятор апоптоза p53, ингибитор контрольных точек иммунитета PD-L1, маркеры иммунного микроокружения (CD4, CD8, CD68, CD1a), однако данные по их экспрессии и прогностической значимости в литературе крайне противоречивы, что требует дальнейшего подробного изучения. Более того, в исследовательских работах, используется ограниченный набор прогностических маркеров, а исследования, охватывающие весь спектр возможных маркеров в литературе единичны.

Классификация рака желудка основывается, в первую очередь, на гистологических критериях (Nayakawa, Y., et al. 2016; Данилова, Н.В., и соавт. 2020) и предполагает прогнозирование степени агрессивности опухоли в зависимости от конкретного варианта морфологического строения и степени дифференцировки опухоли, однако, поскольку большинство опухолей желудка представлены аденокарциномами, ее прогностическое значение невелико. Классификация по системе TNM с выделением клинично-патологических стадий также направлена на оценку прогноза заболевания. Хотя стадия по TNM учитывается при определении показаний и выборе объема оперативного вмешательства, ни одна из классификаций не подразумевает дифференциального подхода к консервативному лечению конкретного пациента (Setia, N., et al. 2016).

Степень разработанности темы. В последние десятилетия в онкологической практике широко применяется персонализированный подход к

лечению опухолей с применением таргетных препаратов, направленных на различные звенья канцерогенеза. Одним из перспективных направлений разработки персонализированных подходов к терапии рака желудка является изучение его геномики и молекулярного фенотипа. Начиная с 2013 года отдельные группы исследователей пытаются создать молекулярно-генетические классификации рака желудка, самыми крупными из которых являются TCGA (2014) и ACRG (Cristescu, R., et al. 2015). Однако несмотря на то, что использование новых генетических методов и многочисленные попытки разработать молекулярные классификации рака желудка на их основе имеют большую перспективу, чем гистологическая классификация, остается неясным возможно ли использование новых молекулярных классификаций для коренных изменений в тактике лечения пациентов и улучшения выживаемости данной группы больных.

Для того чтобы адаптировать молекулярно-генетические классификации к рутинной практике несколькими группами были предложены их иммунофенотипические аналоги, не требующие сложных и дорогостоящих методов исследования (Gonzalez, R.S., et al. 2016; Setia, N., et al. 2016; Birkman, E.M., et al. 2018; Díaz Del Arco, C., et al. 2018; Di Pinto, F., et al. 2020). Анализ попыток классификации рака желудка иммуногистохимическим методом показывает, что большинство из них выполнены методом ТМА (tissue microarray, метод тканевых микрочипов). Имеется лишь два исследования, где использовался полноценный операционный материал от больных – R. S. Gonzalez с соавт (Gonzalez, R.S., et al. 2016) и F. Di Pinto с соавт (Di Pinto, F., et al. 2020), но эти исследования выполнены на крайне малой выборке пациентов (58 и 60 случаев соответственно), что не позволяет получить надежных и воспроизводимых результатов.

Таким образом, в области разработки молекулярной классификации рака желудка в последние годы был достигнут значительный прогресс, однако крупные и подробные исследования проведены лишь генетическими методами, а аналогичные исследования с использованием иммуногистохимических методов в литературе отсутствуют. Имеющиеся немногочисленные иммуногистохимические классификации обладают значительным количеством недостатков (небольшие выборки, использование метода ТМА, небольшая панель маркеров) и не отвечают современным запросам на создание молекулярной классификации рака желудка, а также не дают ответа на вопрос какие из имеющихся иммуногистохимических маркеров являются наиболее прогностически значимыми для рака желудка. В отечественной литературе подобные исследования отсутствуют.

Целью настоящего исследования явилось изучение комплекса морфологических и молекулярно-биологических характеристик, определяющих прогноз рака желудка, и разработка новой молекулярной классификации рака желудка

Для реализации цели работы решались следующие **задачи**:

1. Исследовать экспрессию маркеров микросателлитной нестабильности при раке желудка (MSH2, MSH6, MLH1, PMS2), ее прогностические характеристики и связь с клинико-морфологическими параметрами рака желудка.

2. Исследовать экспрессию маркеров желудочной и кишечной дифференцировки при раке желудка (MUC2, CDX2, MUC5AC, CD10), ее прогностические характеристики и связь с клинико-морфологическими параметрами рака желудка.

3. Исследовать экспрессию молекул адгезии при раке желудка (β -катенин, Е-кадгерин, клаудин-1, клаудин-3, клаудин-4, CD44), ее прогностические характеристики и связь с клинико-морфологическими параметрами рака желудка.

4. Исследовать экспрессию онкопротеина HER2 и белка-супрессора опухолевого роста p53 при раке желудка, ее прогностические характеристики и связь с клинико-морфологическими параметрами рака желудка.

5. Исследовать роль вируса Эпштейна-Барр в канцерогенезе рака желудка посредством изучения экспрессии маркера LMP-1 и малых вирусных РНК (EBER), их связи с клинико-морфологическими и прогностическими характеристиками опухоли.

6. Исследовать экспрессию маркеров иммунного микроокружения при раке желудка (CD4, CD8, CD68, CD1a) и экспрессию ингибитора контрольных точек иммунитета PDL1, их прогностические характеристики и связь с клинико-морфологическими параметрами рака желудка.

7. Выявить благоприятные прогностически значимые иммуногистохимические и молекулярно-биологические факторы для рака желудка

8. Предложить пошаговый алгоритм иммуногистохимического тестирования рака желудка для определения его молекулярных характеристик.

9. Разработать молекулярную классификацию рака желудка на основании данных об экспрессии и прогностической значимости указанных маркеров.

Научная новизна. Впервые проведен анализ экспрессии полного спектра прогностических маркеров рака желудка на крупной выборке пациентов (310 случаев) с использованием полноразмерного операционного материала от больных. Проведенное комплексное морфологическое исследование с применением иммуногистохимии и гибридизации *in situ* позволило разработать и обосновать новую молекулярную классификацию рака желудка и выделить 5 молекулярных подтипов рака желудка: MRR-негативный, EBER-позитивный, Е-кадгерин-аберрантный, CDX2-позитивный и CDX2-негативный.

Впервые на крупной выборке пациентов (более 300) при исследовании операционного материала рака желудка посредством иммуногистохимического метода выделен MMR-негативный молекулярный подтип рака желудка, характеризующийся лучшей выживаемостью и по клинико-морфологическим

характеристикам совпадающий с MSI-подтипами, выделяемыми другими авторами. Показано, что MUC2 значимо чаще экспрессируется в муцинозных опухолях желудка, а MUC5AC напротив – в дискогезивных раках.

Впервые выявлена связь между положительной экспрессией CD10 и язвенным макроскопическим типом по классификации R. Vogmann, а также впервые показано, что CDX2-позитивные опухоли имеют значимо меньший размер и реже являются субтотальными по распространенности. Нами доказано, что отдельно взятые маркеры желудочной и кишечной дифференцировки связаны с некоторыми клинико-мофрологическими параметрами, чаще всего с гистологическим типом опухоли, однако значимой предиктивной и прогностической нагрузки данные маркеры не несут и могут быть лишь вспомогательными элементами в комплексной оценке характеристик опухоли.

Впервые выявлено, что группа с aberrантной экспрессией E-кадгерина характеризуется преобладанием женщин ($p=0,035$), большим процентом опухолей с субтотальной/тотальной локализацией ($p=0,005$), большим количеством инфильтративно-язвенных и диффузно-инфильтративных форм рака ($p=0,023$), большей долей крупных опухолей (более 8 см) ($p=0,001$), преобладанием дискогезивного гистологического типа ($p=0,000$), более низкими степенями дифференцировки тубулярных, папиллярных и смешанных карцином ($p=0,000$), значимо большим количеством случаев с выявленными перстневидными клетками в опухолях ($p=0,000$), значимо большим количеством случаев с наличием эмболов в лимфатических сосудах ($p=0,001$). Также в группе с aberrантной экспрессией E-кадгерина отмечена большая частота отдаленного метастазирования ($p=0,024$), большая частота продвинутых клинических стадий (III и IV стадия, $p=0,009$).

Впервые показано, что CLAU1-позитивные опухоли значимо чаще локализуются в дистальной части желудка, и значимо реже характеризуются субтотальным/тотальным поражением желудка, в них значимо реже встречаются перстневидные клетки.

Впервые установлено, что для CLAU3-позитивных опухолей более характерны экзофитный и чашеподобный типы роста, а для CLAU3-негативных – диффузно-инфильтративный и инфильтративно-язвенный типы ($p=0,041$), в группе CLAU3-позитивных опухолей значимо преобладают высокодифференцированные новообразования ($p=0,001$), а в группе CLAU3-негативных – низкодифференцированные опухоли ($p=0,001$). Впервые показано, что в группе с aberrантной экспрессией p53 преобладают тубулярный, папиллярный и смешанный гистологические типы ($p=0,000$), значимо более высокие степени дифференцировки ($p=0,011$) и значимо меньшее количество случаев с выявленными перстневидными клетками в опухолях ($p=0,000$).

Впервые выявлено, что группа EBER-позитивных аденокарцином характеризуется меньшим количеством диффузно-инфильтративных форм рака, значимым преобладанием тубулярного гистологического типа ($p=0,040$), значимо более низкими степенями дифференцировки ($p=0,008$), значимо

меньшим количеством случаев с выявленными перстневидными клетками в опухолях ($p=0,001$) и значимым преобладанием промежуточного подтипа по P. Lauren ($p=0,000$).

Впервые показано, что PD-L1-позитивными значимо чаще являются новообразования, относящиеся к 1 и 2 макроскопическим типам по классификации R. Bormann (SP142 – $p=0,000$, SP263 – $p=0,001$), а также опухоли тубулярного гистологического типа (SP142 – $p=0,000$, SP263 – $p=0,000$), значимо преобладают случаи с отсутствием перстневидных клеток (SP142 – $p=0,000$, SP263 – $p=0,000$) и промежуточный подтип по классификации P. Lauren (SP142 – $p=0,000$, SP263 – $p=0,000$).

Впервые показано, что положительная экспрессия PD-L1(SP142) является значимым независимым благоприятным прогностическим фактором и сопряжена со снижением шансов летального исхода в 4,35 раза.

Впервые предложен пошаговый алгоритм иммуногистохимического тестирования образцов рака желудка для разработки наиболее персонифицированного подхода к лечению пациентов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в работе данные впервые позволят ввести в практику новый подход к классификации рака желудка на основе уровня экспрессии маркеров, выявленных иммуногистохимическим методом в конкретной опухоли. Кроме того, впервые исследовано прогностическое значение экспрессии иммуногистохимических маркеров на крупной выборке операционного материала от пациентов с раком желудка. По результатам проведенного исследования даны рекомендации о более предпочтительных методах лечебного воздействия на тот или иной подтип опухолей.

Полученные результаты способствуют улучшению морфологической диагностики рака желудка и позволяют внедрить в практику новые подходы для персонифицированного лечения пациентов.

Методология и методы диссертационного исследования. На выборке из 310 пациентов исследован широкий комплекс характеристик рака желудка, включая экспрессию 21 иммуногистохимического маркера (MSH2, MSH6, MLH1, PMS2, MUC2, CDX2, MUC5AC, CD10, β -катенин, E-кадгерин, клаудин-1, клаудин-3, клаудин-4, CD44, HER2, p53, LMP-1, CD4, CD8, CD68, CD1a), а также малых вирусных РНК вируса Эпштейна-Барр (EBER) и их связи с клинико-морфологическими и прогностическими характеристиками опухоли.

Внедрение результатов исследования. Результаты исследования внедрены в научную и диагностическую работу отдела клинической патологии МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова, в учебный процесс курса патологической анатомии кафедры физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВПО МГУ имени М.В. Ломоносова, а также в диагностическую работу патолого-анатомического отделения ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России.

Положения, выносимые на защиту:

1. Впервые на выборке из 310 случаев полноразмерного операционного материала рака желудка проведена комплексная оценка широкого спектра иммуногистохимических факторов, участвующих в канцерогенезе и их сравнение с различными клинико-морфологическими и прогностическими характеристиками опухоли.

2. Выявлены факторы, влияющие на клиническое течение рака желудка. Установлено, что отсутствие маркеров микросателлитной нестабильности в опухоли характерно пожилых пациентов и значимо улучшает прогноз заболевания. Не выявлено значимого влияния MUC-статуса опухоли на стадию заболевания и выживаемость пациентов. Показана связь аберрантной экспрессии E-кадгерина с наличием большого количества метастазов в лимфатические узлы, высокой частотой отдаленного метастазирования и продвинутыми клиническими стадиями. Выявлены новые факты, характеризующие EBV-ассоциированные опухоли желудка.

3. Разработан оригинальный алгоритм пошагового иммуногистохимического тестирования рака желудка для выявления молекулярных подтипов. С помощью иммуногистохимического метода разработана новая молекулярная классификация рака желудка и выделено 5 молекулярных подтипов рака: MMR-негативный, EBER-позитивный, E-кадгерин аберрантный, CDX2-позитивный и CDX2-негативный подтипы, среди которых CDX2-позитивный и CDX2-негативный подтипы выделены впервые. Целесообразность выделения подтипа, связанного с аберрантной экспрессией p53 не подтверждена.

Степень достоверности и апробация результатов исследования. Результаты работы получены на обширной выборке из 310 пациентов, в каждом случае использован полноразмерный операционный материал. В работе использовано множество статистических методов (U-критерий Манна-Уитни, критерий χ -квадрат, точный критерий Фишера, критерий Краскела-Уоллиса) в зависимости от распределения и вида переменных. Уровень значимости (p) в целом не превышал 0.050 во всех вышеописанных сравнениях. Для множественных сравнений в трех группах исследования использовалась поправка Бонферони, уровень значимости p принимался равным $0.050/3=0.017$.

Материалы исследования доложены на научно-практических конференциях: 29th European Congress of Pathology (Amsterdam, 2017), 30th European Congress of Pathology (Bilbao, 2018), 31th European Congress of Pathology (Nice, 2019), XLIII-XLIV международной научно-практической конференции «Экспериментальные теоретические исследования в современной науке» (Новосибирск, 2019), 4th National Congress on Regenerative Medicine (Москва, 2019), 33th European Congress of Pathology (август 2021), VII Всероссийской Конференции по молекулярной онкологии (Москва, 2022).

Публикации. По теме диссертации с 2017 по 2022 гг. опубликовано 28 работ, в том числе – 19 в журналах, рекомендованных ВАК, и входящих в базы данных Web of Science и Scopus.

Объем и структура диссертации. Объем рукописи составляет 490 страниц, состоит из введения, описания материалов и методов исследования, 9 разделов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов и практических рекомендаций. Библиографический аппарат работы представлен 300 источниками литературы, в том числе 274 на иностранных языках. Работа иллюстрирована 180 рисунками и 133 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

В исследовании использованы образцы операционного материала от 310 пациентов с верифицированным диагнозом рака желудка, не получавших в предоперационном периоде химио- или лучевую терапию. Критериями исключения были: карцинома *in situ*, недостаточное количество материала в парафиновых блоках, верифицированный нейроэндокринный рак, лимфома желудка или гастроинтестинальная стромальная опухоль желудка. Возраст пациентов варьировал от 22 до 85 лет (медиана – 63 года). Медиана наблюдения за пациентами составила 83 мес.

Каждый образец окрашивали иммуногистохимическим методом. Характеристики антител приведены в таблице 1.

Постановку иммуногистохимических реакций осуществляли с помощью системы детекции UltraVision Quanto (Thermo Fisher Scientific, USA) согласно протоколу производителя в иммуностейнере Autostainer 480S (Thermo Fisher Scientific, USA). Депарафинирование, регидратацию и демаскировку антигенов выполняли при помощи буферов Thermo Dewax and HIER Bufer L (pH 6,0), Thermo Dewax and HIER Bufer M (pH 8,0) и Thermo Dewax and HIER Bufer H (pH 9,0) при температуре 95-98°C в течение 20 минут в модуле предобработки (PT-Module, Thermo Fisher Scientific, USA). Выбор буфера производился индивидуально для конкретного антитела в соответствии с инструкцией производителя. Только для маркера LMP-1 производителем рекомендован буфер с pH 9,0 для депарафинирования и демаскировки антигенов, однако при его использовании наблюдалось выраженное фоновое окрашивание, вследствие чего был выбран буфер с pH 6,0. Время инкубации антител составляло 20-30 минут в соответствии с инструкцией производителя.

Постановку реакций с маркером HER2/neu осуществляли с помощью набора HercepTest (Dako/Agilent Technologies, США) по инструкции производителя. Для определения экспрессии PD-L1 использовали антитела производства Roche Ventana, USA клоны SP142 и SP263 и систему детекции OptiView DAB IHC Detection Kit. Постановка реакций с PD-L1 осуществлялась с помощью прибора

Ventana BenchMark Ultra (Roche Ventana, USA) по стандартному протоколу не позднее чем через 24 часа после изготовления парафиновых срезов.

Таблица 1. Характеристики использованных антител

Наименование маркера	Клон	Производитель	Разведение
1	2	3	4
MSH2	FE-11	Dako/Agilent Technologies, США	1:50
MSH6	EP49	Dako/Agilent Technologies, США	RTU
MLH1	ES05	Dako/Agilent Technologies, США	1:50
PMS2	EP51	Dako/Agilent Technologies, США	1:40
MUC2	CCP58	Dako/Agilent Technologies, США	RTU
CDX2	DAK-CDX2	Dako/Agilent Technologies, США	RTU
MUC5AC	CLH2	Dako/Agilent Technologies, США	RTU
CD10	56C6	Dako/Agilent Technologies, США	RTU
Е-кадгерин	NCH-38	Dako/Agilent Technologies, США	1:100
β-катенин	В-Catenin-1	Dako/Agilent Technologies, США	1:200
Claudin 1	Поликлональные кроличьи ab15098	Abcam, Великобритания	1:200
Claudin 3	Поликлональные кроличьи ab15102	Abcam, Великобритания	1:100
Claudin 4	Поликлональные кроличьи	Thermo Fisher Scientific, США	RTU
CD44	DF1485	Dako/Agilent Technologies, США	1:25
P53	DO-7	Dako/Agilent Technologies, США	RTU
PD-L1	SP142	Roche Ventana, USA	RTU
PD-L1	SP263	Roche Ventana, USA	RTU
HER2/neu	HercepTest	Dako/Agilent Technologies, США	RTU
CD4	4B12	Dako/Agilent Technologies, США	1:40
CD8	C8/144B	Dako/Agilent Technologies, США	1:100
CD68	PG-M1	Dako/Agilent Technologies, США	RTU
CD1a	010	Dako/Agilent Technologies, США	1:50
LMP-1	CS.1-4	Dako/Agilent Technologies, США	1:100

Результаты реакций оценивали с помощью светового микроскопа DM2500 (Leica Microsystems, Germany) двумя независимыми исследователями. Сканер микропрепаратов SCN400 и микроскоп DM4000B/DFC495 (Leica Microsystems, Germany) использовались для получения микрофотографий.

Критерием для позитивного PD-L1 статуса опухоли выбрано полное или частичное мембранное окрашивание не менее 1 опухолевой и иммунной клетки на 100 клеток, расположенных в толще опухоли или не далее 1 мм от границы опухоли. В подсчет включали как опухолевые, так и иммунные клетки (использовался показатель CPS, Combined Positive/positivity Score (Ma, J., et al. 2018)). Допускалось наличие гранулярного или зернистого окрашивания по ходу

мембраны клетки. Долю окрашенных клеток подсчитывали отдельно для каждого из полей зрения и выводили среднее значение для всего препарата. Для удобства сравнения результаты отображали в баллах: 0 – полное отсутствие реакции, 1 – CPS 1 или менее, 2 – CPS >1<10, 3 – CPS >10, 4 – CPS >50. В качестве контроля использованы ткани миндалина и плаценты.

Оценка реакции с маркерами микросателлитной нестабильности проводилась в соответствии с ранее опубликованными методиками (Setia, N., et al. 2016; Birkman, E.M., et al. 2018). Опухоли относили к MMR-негативным (дефицитным), если отсутствовала ядерная экспрессия хотя бы одного из маркеров (MLH1, MSH2, MSH6 и PMS2), при наличии положительной реакции в окружающих нормальных эпителиальных и гладкомышечных клетках, а также лимфоцитах. При положительной экспрессии маркеров опухоли считались MMR-позитивными, то есть не имеющими дефектов в генах системы репарации ДНК. При отсутствии экспрессии одновременно в опухолевых клетках и окружающих нормальных клетках случаи исключались из анализа.

Экспрессия муцинов проводилась в соответствии с ранее опубликованными методиками (Geramizadeh, B., et al. 2012; Kim, D.H., et al. 2013; Park, K.K., et al. 2015; Kerckhoffs, K.G.P., et al. 2020). CDX2 оценивали по методике K. Roessler и соавт (Roessler, K., et al. 2005).

Оценка экспрессии клаудинов осуществлялась двумя независимыми исследователями по методике Hwang T.L. et al. [4] (с изменениями). Экспрессию E-кадгерина, β -катенина, p53 оценивали по методике, предложенной N.Setia (Setia, N., et al. 2016). Экспрессию CD44 оценивали как долю положительно окрашенных клеток от общего числа клеток опухоли. HER2-статус определяли с помощью общепринятой системы оценки (Завалишина, Л.Э., и соавт. 2014).

Оценка экспрессии маркеров иммунного микроокружения (CD4, CD8, CD68, CD1a) проводили путем количественного подсчета клеток внутриопухолевого инфильтрата в трех полях зрения препарата с вычислением среднего.

Гибридизация *in situ* проводилась с использованием праймеров к малым вирусным РНК вируса Эпштейна-Барр (INFORM EBER, Roche Ventana, USA) и системы визуализации ISH iVIEW Blue Detection Kit (Roche Ventana, USA). Постановка реакций гибридизации *in situ* осуществлялась с помощью прибора Ventana BenchMark Ultra (Roche Ventana, USA). Результаты реакций оценивали в соответствии с общепринятыми стандартами (Gulley, M.L., et al. 2002; Weiss, L.M., et al. 2013). Реакция считалась положительной, если сигнал EBER был локализован в ядре опухолевых клеток, но при этом отсутствовало цитоплазматическое окрашивание, (Gulley, M.L., et al. 2002). При каждой постановке реакций использовался положительный контроль в виде тканевого образца EBV-ассоциированной назофарингеальной карциномы.

Полученные результаты были сопоставлены с основными клинико-морфологическими характеристиками рака желудка.

Статистические методы

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы PASW Statistics 22. Описательные статистики представлялись в виде среднего и стандартного отклонения, медианы и 25-го и 75-го процентилей, минимального и максимального значений для количественных переменных, а также частот встречаемости и долей в выборке для качественных переменных.

Для графического представления данных использовались диаграммы-боксплоты с обозначенными на них медианой, 25-м и 75-м перцентилями и 1,5-м межквартильным размахом, а также «выбросами», выходящими за пределы полуторного (°) и тройного (*) межквартильных размахов. Для качественных данных использовались кластеризованные столбчатые диаграммы, на которых отображалось процентное распределение показателя в группах исследования.

Проверка распределения на нормальность проводилась с использованием теста Шапиро-Уилкса. При малом объеме выборки ($N < 30$) проверка распределения на нормальность не проводилась, и для анализа использовались непараметрические методы. Для сравнения количественных данных в двух несвязанных между собой выборках применялся Т-критерий Стьюдента для параметров, распределённых нормально, и U-критерий Манна-Уитни для параметров, распределение которых отличалось от нормального, а также для параметров, относящихся к порядковой шкале. Для сравнения номинальных переменных в двух несвязанных совокупностях использовался критерий χ^2 -квадрат, а при наличии ограничений – точный критерий Фишера. Для множественных сравнений количественных данных применялся критерий Краскела-Уоллиса. Если после проведения множественного сравнения выявлялись достоверные различия, впоследствии проводились попарные групповые сравнения с использованием U-критерия Манна-Уитни. Для множественных сравнений качественных данных использовался критерий χ^2 -квадрат. В последствии необходимые попарные сравнения проводились с использованием критериев χ^2 -квадрат или Фишера. Корреляционный анализ проводился с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Анализ выживаемости производился с использованием метода Каплана-Мейера. Характеристики выживаемости представлялись в виде среднего времени выживаемости и стандартной ошибки среднего, 95% ДИ для среднего времени выживаемости, а также медианы выживаемости. Сравнение выживаемости производилось с использованием лог-рангового критерия. Для графического представления данных построены диаграммы дожития. Для оценки предикторов выживаемости использовалась многофакторная регрессионная модель Кокса с алгоритмом пошагового включения Вальда.

Уровень значимости (p) в целом не превышал 0.050 во всех вышеописанных сравнениях. Для множественных сравнений в трех группах исследования использовалась поправка Бонферони, уровень значимости p принимался равным $0.050/3=0.017$.

Результаты исследования Маркеры микросателлитной нестабильности

При изучении экспрессии маркеров была обнаружена только ядерная реакция (рис. 1а, б). Нормальным считалось окрашивание ядер клеток независимо от его интенсивности. Следует отметить, что положительная ядерная реакция наблюдалась в ядрах лимфоцитов, клеток стромы или нормальной слизистой оболочки в качестве внутреннего контроля.

Позитивный MMR-статус (положительная иммуногистохимическая реакция со всеми четырьмя маркерами) выявлен в 285 случаях из 310 (91,9 %), негативный MMR-статус (отсутствие реакции с одним или несколькими маркерами MMR) выявлен в 25 наблюдениях (8,1%).

Среди 25 MMR-негативных опухолей только в трех наблюдениях (12%) наблюдалось отсутствие экспрессии пары MSH2/MSH6, в остальных случаях отсутствовала экспрессия пары MLH-1/PMS2 (88%). Таким образом, опираться только на пару MLH-1/PMS2 при оценке микросателлитной нестабильности рака желудка нецелесообразно, поскольку возникает вероятность пропуска части пациентов с микросателлитной нестабильностью. Исходя из данных литературы известно, что MMR-негативные опухоли достоверно чаще наблюдаются в старшей возрастной группе, более характерны для женщин, развиваются преимущественно в дистальных отделах желудка, чаще имеют кишечный тип строения, реже метастазируют в регионарные лимфоузлы и, как следствие, характеризуются более ранними стадиями по TNM. Согласно анализу наших данных частота выявления MMR-негативных опухолей составляет 8,1% от всех пациентов с раком желудка (Данилова, Н.В., и соавт. 2022). Среди MMR-негативных опухолей значимо чаще выявляются пациенты старших возрастных групп (средний возраст 69 лет, медиана – 70 лет) (рис. 1в), преобладает дистальная локализация опухолей, 2 тип по классификации R. Vormann, тубулярный гистологический тип, кишечный подтип по классификации P. Lauren (рис. 1г). Также выявлено, что среди пациентов с MMR-негативными опухолями преобладают женщины (60%) (рис. 1д), однако данное различие не подтверждено статистически ($p=0,104$). Других значимых различий между MMR-негативными и MMR-позитивными опухолями по клинико-морфологическим параметрам выявлено не было. Таким образом, по большинству клинико-морфологических характеристик выделенный нами MMR-негативный подтип рака желудка соответствует данным литературы. Однако в отличие от других авторов, мы не обнаружили подтверждений более редкого метастазирования в регионарные лимфатические узлы, а также различий в клинических стадиях.

Общая пятилетняя выживаемость больных в группе MMR-негативных опухолей составила 76% (медиана 91 мес.), что значимо ($p=0,013$) превышает таковую в группе MMR-позитивных опухолей (36%, медиана 35 мес.).

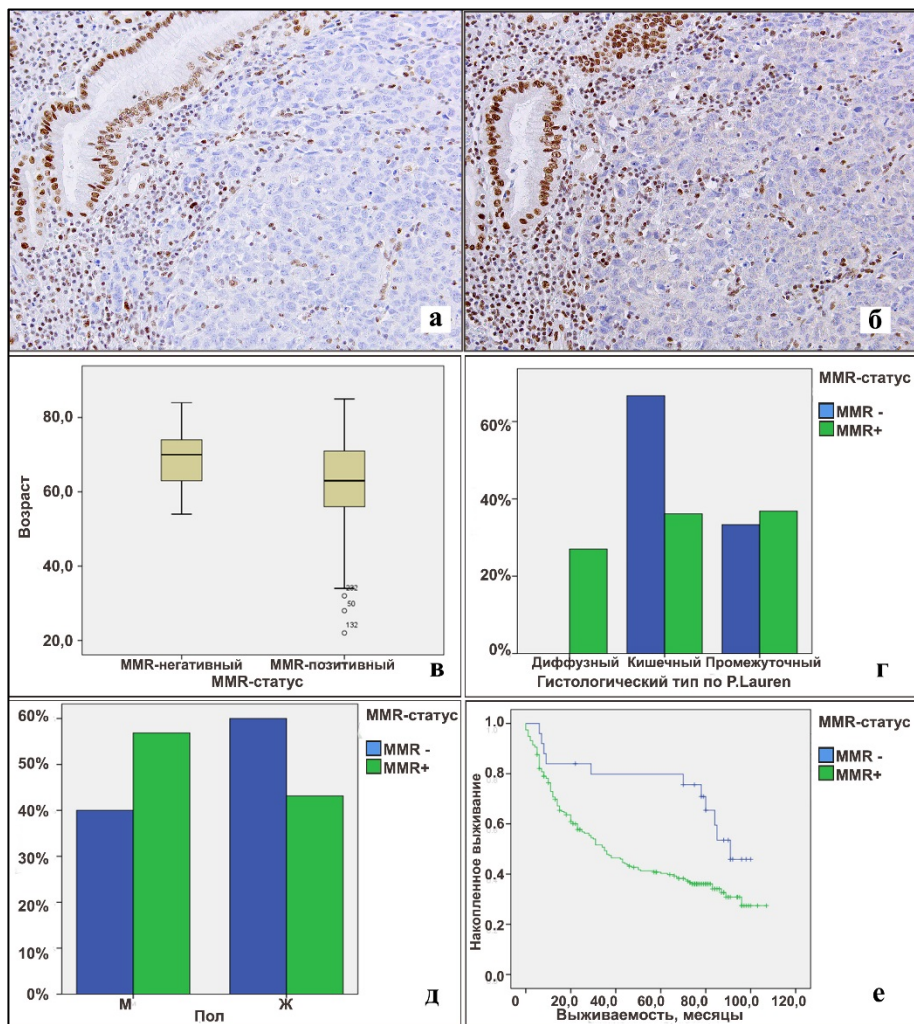


Рисунок 1. Характеристики MMR-негативных и MMR-положительных опухолей: а – отсутствие экспрессии MLH-1 в ткани опухоли, иммуногистохимическая реакция с антителами к MLH-1, об. x20; б – отсутствие экспрессии PMS2 в ткани опухоли, иммуногистохимическая реакция с антителами к PMS2, об. x20; в – диаграмма размаха распределения по возрасту; г – структурная диаграмма распределения по гистологическому типу Р. Lauren; д – структурная диаграмма распределения по полу; е – анализ выживаемости пациентов.

Таким образом, MMR-негативные опухоли в нашей выборке имеют благоприятный прогноз (рис. 1е), что также соответствует данным литературы.

Полученные нами данные о клинико-морфологических характеристиках и выживаемости пациентов с данным подтипом соответствуют характеристикам MSI-подтипа, публикуемым в большинстве исследований, в том числе и генетических (Polom, K., et al. 2018; Di Pinto, F., et al. 2020).

Маркеры желудочной и кишечной дифференцировки

Частота встречаемости экспрессии MUC2 составила 32,3%, что соответствует данным литературы (Pinto-de-Sousa, J., et al. 2002; Xiao, L.J., et al. 2012; Kim, D.H., et al. 2013). Согласно нашим результатам MUC2-позитивные опухоли значимо чаще относятся к муцинозному гистологическому типу ($p=0,000$), в них реже встречаются перстневидные клетки ($p=0,003$), что согласуется с данными литературы (Gürbüz, Y., et al. 2002; Pinto-de-Sousa, J., et al. 2002; Zhang, H.K., et al. 2004; İlhan, Ö., et al. 2010). Общая пятилетняя выживаемость больных в группе MUC2-позитивных опухолей была ниже, чем в группе MUC2-негативных опухолей и составила 32,5% (медиана 35 мес.), что может отчасти характеризовать MUC2 как негативный прогностический признак ($p=0,206$).

Частота выявления MUC5AC-позитивных опухолей составляет 56,8% от всех пациентов с раком желудка, что соответствует данным литературы (Pinto-de-Sousa, J., et al. 2002; Xiao, L.J., et al. 2012; Kim, D.H., et al. 2013). В нашем исследовании MUC5AC-позитивные опухоли чаще характеризуются дистальной и субтотальной локализацией ($p=0,023$), чаще относятся к дискогезивному гистологическому типу ($p=0,000$) и диффузному подтипу по классификации P. Lauren ($p=0,007$), что соответствует данным J. Pinto-de-Sousa (2002). Также мы обнаружили более частое наличие перстневидных клеток в MUC5AC-позитивных опухолях ($p=0,000$). Не подтверждена связь положительной экспрессии MUC5AC с глубиной инвазии опухоли и наличием метастазов в лимфатические узлы, о чем упоминали некоторые авторы (Xiao, L.J., et al. 2012, Zhang, C.T., et al. 2015). Общая пятилетняя выживаемость больных в группе MUC5AC-позитивных опухолей была несколько ниже, чем в группе MUC5AC-негативных опухолей и составила 38,1% против 40,2% ($p=0,374$).

Частота выявления CD10-позитивных опухолей составляет 29%. CD10-позитивные опухоли чаще относятся к инфильтративно-язвенному макроскопическому подтипу по R. Vormann ($p=0,006$). Общая пятилетняя выживаемость больных в группе CD10-позитивных опухолей была ниже, чем в другой группе, и составила 36,1%, медиана составила 38 мес. ($p=0,776$).

Частота выявления CDX2-позитивных опухолей составляет 70,3% от всех пациентов с раком желудка, что не совпадает с данными литературы (описанная частота – 30%) (Masood, M.A., et al. 2016). Возможно, причиной таких различий является структура выборки или разные подходы к определению критериев

положительной экспрессии. Большинство авторов сообщают о более выраженной экспрессии CDX2 в раках кишечного типа по сравнению с диффузными (Bai, Y.Q., et al. 2002; Seno, H., et al. 2002), однако мы не обнаружили значимых различий по гистологическому типу. Также в литературе описана обратная связь экспрессии CDX2 с глубиной инвазии рака желудка и наличием метастазов в лимфатические узлы (Bai, Y.Q., et al. 2002; Seno, H., et al. 2002), что подтверждено в нашем исследовании, где для CDX2-позитивных опухолей была характерна меньшая глубина инвазии по сравнению с CDX2-негативными новообразованиями ($p=0,007$), а также более низкие клинические стадии опухолевого процесса ($p=0,010$).

Нами впервые описано, что CDX2-позитивные опухоли имеют значимо меньший размер ($p=0,001$), и значимо реже являются субтотальными по распространенности ($p=0,018$). Значимых различий по другим клинкоморфологическим параметрам между CDX2-негативными и CDX2-позитивными опухолями выявлено не было. Общая пятилетняя выживаемость больных в группе CDX2-позитивных опухолей была выше, чем в группе CDX2-негативных опухолей и составила 42,6%, медиана составила 43 мес. ($p=0,085$).

Таким образом, нами показано, что MUC2 значимо чаще экспрессируется в муцинозных опухолях желудка, а MUC5AC напротив – в дискогезивных раках. Впервые выявлена связь между положительной экспрессией CD10 и язвенным макроскопическим типом по классификации R. Vormann, а также впервые показано, что CDX2-позитивные опухоли имеют значимо меньший размер и реже являются субтотальными по распространенности. Отдельно взятые маркеры желудочной и кишечной дифференцировки связаны с некоторыми клинкоморфологическими параметрами, чаще всего с гистологическим типом опухоли, однако значимой предиктивной и прогностической нагрузки не несут.

По результатам группировки маркеров желудочной и кишечной дифференцировки по MUC-статусу и анализа клинкоморфологических характеристик выявлено, что по преобладанию субтотальных/тотальных опухолей группы MUC-null и MUC-mix значимо отличаются от группы MUC-I ($p=0,022$ и $p=0,007$ соответственно), где таких опухолей меньше (Данилова, Н.В., и соавт. 2023). В группе со статусом MUC-null чаще встречаются опухоли тубулярного гистологического типа и значимо реже – смешанные карциномы по сравнению с группами со статусом MUC-G ($p=0,026$) и MUC-mix ($p=0,006$), а также в группе со статусом MUC-null меньше случаев с наличием перстневидных клеток в опухоли ($p=0,000$). При изучении дискогезивного гистологического типа для статуса MUC-G не подтверждены данные литературы о меньших размерах опухолей, более низкой частоте лимфогенного метастазирования и сосудистой инвазии, но выявлена значимо более частая проксимальная локализация опухолей со статусом MUC-I ($p=0,003$).

При анализе общей выборки наибольшая общая выживаемость выявлена в группе со статусом MUC-G (48,7%), а наименьшая – в группе со статусом MUC-mix (26,1%), при этом статистически значимых различий по выживаемости

обнаружено не было ($p=0,172$). Различия в выживаемости обнаружены только при отдельном рассмотрении группы дискоезивных карцином, где значимо лучшая выживаемость зафиксирована для группы со статусом MUC-null, а значимо худшая – для группы со статусом MUC-mix ($p=0,022$).

В общей выборке пациентов выделенные группы значимо не различались по возрасту, полу, макроскопической форме опухолей, сосудистой инвазии, подтипу по классификации P. Lauren. Отмечены попарные различия в локализации опухолей и принадлежности к отдельным гистологическим типам. Значимые различия по выживаемости обнаружены только для дискоезивных карцином со статусами MUC-null и MUC-mix. Разделение карцином желудка в зависимости от MUC-статуса может иметь лишь ограниченную предиктивную и прогностическую ценность в отдельных гистологических формах рака.

Молекулы адгезии

E-кадгерин (эпителиальный кадгерин, кадгерин-1) относится к "классическим" кадгеринам и получил префикс "E" (epithelial) поскольку обнаруживается в эпителиальных клетках (van Roy, F., et al. 2008). E-кадгерин кодируется геном CDH1.

Частота встречаемости aberrантной экспрессии E-кадгерина в нашем исследовании составила 19,4%, что соответствует данным литературы (Chan, A.O. 2006; Di Pinto, F., et al. 2020). Группа с aberrантной экспрессией E-кадгерина характеризуется значимым преобладанием диффузного подтипа по P. Lauren ($p=0,000$) (рис. 2а) и большим количеством случаев с массивным поражением регионарных лимфатических узлов (N3a – N3b, $p=0,002$), что соответствует данным литературы (Di Pinto, F., et al. 2020).

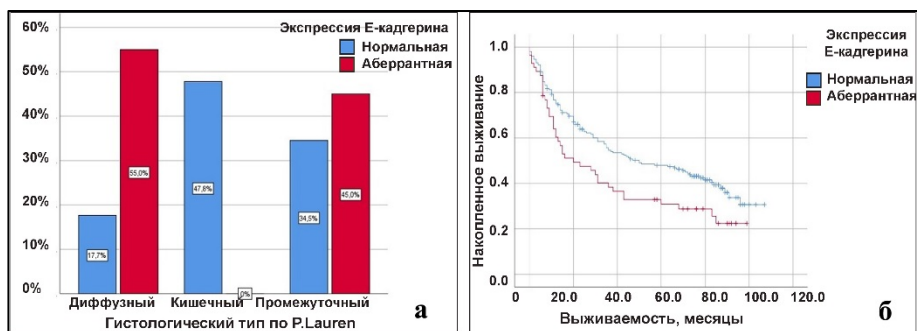


Рисунок 2. Сравнение групп с нормальной и aberrантной экспрессией E-кадгерина: а – структурная диаграмма распределения по гистологическому типу P. Lauren; б – анализ выживаемости пациентов с раком желудка в группах с нормальной и aberrантной экспрессией E-кадгерина.

При этом в группе с aberrантной экспрессией не выявлено значимых различий по возрасту пациентов, хотя средний возраст был несколько меньше, чем в общей выборке (61 год против 63 лет), что противоречит данным литературы, где указано, что пациенты с aberrантной экспрессией E-кадгерина значимо моложе (TCGA, 2014; Katona, V.W., et al. 2017). Впервые выявлено, что группа с aberrантной экспрессией E-кадгерина характеризуется преобладанием женщин ($p=0,035$), большим процентом опухолей с субтотальной/тотальной локализацией ($p=0,005$), большим количеством инфильтративно-язвенных и диффузно-инфильтративных форм рака ($p=0,023$), большей долей крупных опухолей (более 8 см) ($p=0,001$), преобладанием дискогезивного гистологического типа ($p=0,000$), более низкими степенями дифференцировки тубулярных, папиллярных и смешанных карцином ($p=0,000$), большим количеством случаев с наличием эмболов в лимфатических сосудах ($p=0,001$). В группе с aberrантной экспрессией E-кадгерина отмечена большая частота отдаленного метастазирования ($p=0,024$) и продвинутых клинических стадий (III и IV стадия, $p=0,009$).

Общая пятилетняя выживаемость больных в группе с aberrантной экспрессией составила 26,8%, медиана – 20 мес., что значимо ниже ($p=0,019$), чем в группе с нормальной экспрессией E-кадгерина, где общая пятилетняя выживаемость больных составила 42,4%, медиана – 50 мес. Таким образом, aberrантная экспрессия E-кадгерина является неблагоприятным прогностическим признаком у пациентов с раком желудка (рис. 2б).

В опухолевых эмболах при раке желудка наблюдалась экспрессия E-кадгерина различной интенсивности (рис. 3а, б, в, г), однако чаще отмечено увеличение экспрессии E-кадгерина по сравнению с первичной опухолью (рис. 3д), даже в случаях с aberrантной экспрессией белка в опухоли (0 и 0,33).

Вероятно, в этих случаях снижение или отсутствие E-кадгерина в опухоли было обусловлено эпигенетическими механизмами (например, метилированием промотора гена CDH1). Это свидетельствует о том, что экспрессия маркера в опухоли не является константой и может быть отрегулирована самими опухолевыми клетками при необходимости.

Опухоли с aberrантной экспрессией β -катенина характеризовались преобладанием инфильтративно-язвенных и диффузно-инфильтративных форм ($p=0,043$) с субтотальным (или тотальным) поражением желудка ($p=0,000$), соответственно чаще имели более крупные размеры ($p=0,001$). Средний возраст в группе с aberrантной экспрессией на 3 года ниже, чем средний возраст в группе с нормальной экспрессией ($p=0,011$). Среди гистологических типов закономерно преобладал дискогезивный ($p=0,000$), а в случаях тубулярных и смешанных опухолей – новообразования с низкой степенью дифференцировки ($p=0,000$). В группе с aberrантной экспрессией чаще выявляются перстневидные клетки ($p=0,000$) и эмболы в лимфатических сосудах ($p=0,022$). В данной группе также чаще встречаются опухоли с большой распространенностью ($p=0,009$), большое количество метастазов в лимфатические узлы ($p=0,002$), наличие отдаленных метастазов ($p=0,041$),

более продвинутой клинической стадией – $p=0,000$). Опухоли с aberrантной экспрессией β -катенина чаще относились к диффузному подтипу по классификации P. Lauren ($p=0,000$). В целом характеристики группы с aberrантной экспрессией β -катенина совпадают с таковыми в группе с aberrантной экспрессией E-кадгерина, за исключением различий по полу, возрасту и глубине инвазии опухоли (Т).

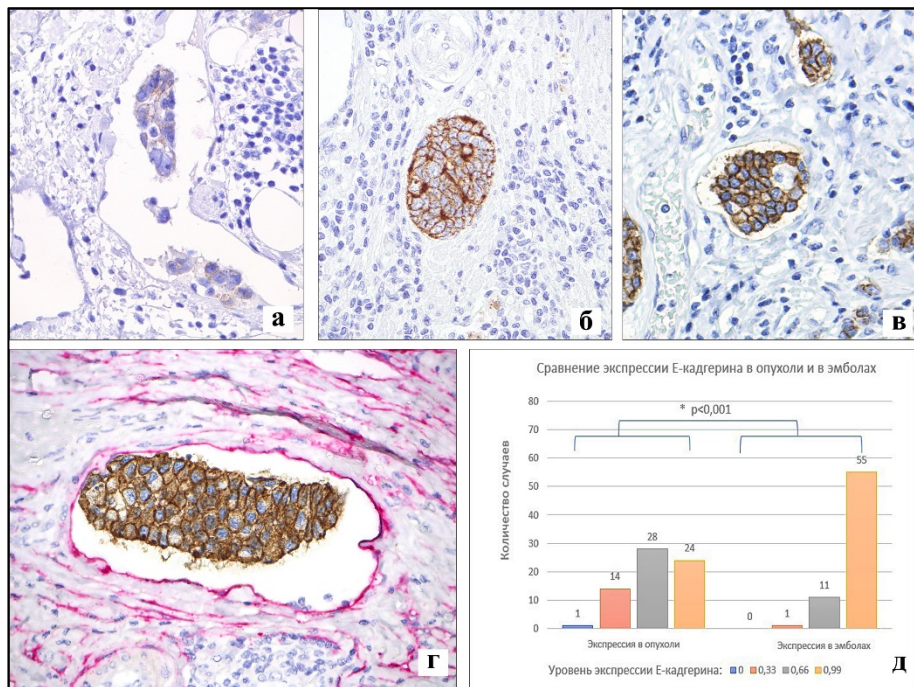


Рисунок 3. Экспрессия E-кадгерина различной интенсивности в опухолевых эмболах при раке желудка: а – слабая цитоплазматическая экспрессия E-кадгерина в клетках опухолевого эмбола; б – умеренная цитоплазматическая и мембранная экспрессия E-кадгерина в клетках опухолевого эмбола; в – выраженная мембранная экспрессия E-кадгерина в клетках опухолевого эмбола; г – выраженная мембранная экспрессия E-кадгерина в клетках опухолевого эмбола, положительная экспрессия подопланина в эндотелии лимфатического сосуда; д – распределение уровня экспрессии E-кадгерина в ткани первичной опухоли и эмболах. а, б, в – иммуногистохимическое окрашивание с антителами к E-кадгерину, об. $\times 40$; г – двойное иммуногистохимическое окрашивание с антителами к E-кадгерину (коричневый цвет) и подопланину (красный цвет).

Общая пятилетняя выживаемость больных в группе с aberrантной экспрессией β -катенина составила 22,6%, медиана – 14 мес., что было значимо ниже, чем в группе с нормальной экспрессией β -катенина ($p=0,001$).

Частота встречаемости экспрессии CD44 в нашем исследовании составила 53,9%, что соответствует данным литературы (Liu, Y.J., et al. 2005; Wakamatsu, Y., et al. 2012; Cao, L., et al. 2014), связи с клинико-морфологическими параметрами и выживаемостью обнаружено не было.

Впервые показано, что CLAU1-позитивные опухоли значимо чаще локализуются в дистальной части желудка, и значимо реже характеризуются субтотальным/тотальным поражением желудка, в них значимо реже встречаются перстневидные клетки. Также подтверждены данные литературы о меньшей частоте диффузного подтипа по P. Lauren и меньшей выживаемости пациентов в группе CLAU1-позитивных опухолей.

Опухоли с повышенной экспрессией клаудина-3 (CLAU3-позитивные) встречаются в 71,6% случаев рака желудка. Впервые выявлено, что для CLAU3-позитивных опухолей более характерны экзофитный и чашеподобный типы роста, а для CLAU3-негативных – диффузно-инфильтративный и инфильтративно-язвенный типы ($p=0,041$), в группе CLAU3-позитивных опухолей значимо преобладают высокодифференцированные новообразования ($p=0,001$). Других значимых различий между CLAU3-негативными и CLAU3-позитивными опухолями по клинико-морфологическим параметрам и выживаемости выявлено не было. Клаудин-4 по нашим данным не является значимым прогностическим или предиктивным маркером рака желудка.

Белок-регулятор апоптоза p53 и онкопротени HER2

Нормальная экспрессия p53 выявлена в 157 наблюдениях (50,6%), aberrантная экспрессия – в 153 наблюдениях (49,4%). Группа с aberrантной экспрессией p53 характеризуется меньшим количеством диффузно-инфильтративных форм рака, меньшей частотой IV клинической стадии и преобладанием кишечного и промежуточного подтипа по P. Lauren ($p=0,000$).

В группе с aberrантной экспрессией p53 выявлена большая доля наблюдений с проксимальной локализацией, что роднит ее с хромосомно-нестабильным подтипом (CIN) TCGA, который характеризуется более частой локализацией в области пищеводно-желудочного перехода/кардии, однако, как и в случае с TCGA, данные различия статистически не значимы. В аналогичном CIN подтипе группы исследователей ACRG (MSS/TP53–) выявляется амплификация гена ERBB2, что предполагает связь aberrантной экспрессии p53 и положительного HER2-статуса, что было подтверждено в нашем исследовании ($p=0,000$). Таким образом, группу с aberrантной экспрессией p53 можно считать иммуногистохимическим аналогом подтипа CIN TCGA и подтипа MSS/TP53– ACRG.

Полученные нами результаты о связи aberrантной экспрессии p53 с клиничко-мофрولوجическими параметрами частично совпадают с данными литературы: как и N.Setia и соавт. мы показали значимое преобладание кишечного и промежуточного подтипа по P. Lauren (p=0,000) в группе с aberrантной экспрессией. Однако, в отличие от N.Setia и соавт. мы дополнительно выявили преобладание тубулярного, папиллярного и смешанного гистологических типов (p=0,000), более высокие степени дифференцировки (p=0,011) и меньшее количество случаев с перстневидными клетками в опухолях (p=0,000); связи с более частым лимфогенным метастазированием не обнаружено (p=0,627).

По данным литературы aberrантная экспрессия p53 в раке желудка является отрицательным прогностическим фактором для общей выживаемости пациентов (Данилова, Н.В., и соавт. 2017, Yildirim, M., et al. 2015). В нашем исследовании общая пятилетняя выживаемость больных в группе с aberrантной экспрессией 35,6% (медиана 36 мес.) ниже, чем в группе с нормальной экспрессией (42,5%, медиана 51 мес., p=0,392).

Маркеры вируса Эпштейна-Барр (LMP-1, EBV)

Частота выявления LMP-1-позитивных опухолей составляет 4,5% от всех пациентов с раком желудка (Данилова, Н.В., и соавт. 2019). LMP-1-позитивные опухоли характеризуются значимо меньшими размерами (p=0,027), среди них значимо чаще встречаются высокодифференцированные (G1) новообразования (p=0,035). Общая пятилетняя выживаемость больных в группе LMP-1-позитивных опухолей была ниже, чем в группе LMP-1-негативных опухолей и составила 33,3%, медиана 23 мес., однако статистически значимых различий по выживаемости обнаружено не было (p=0,668). Выявленные различия по размерам опухоли и степени дифференцировки не совпадают с клиничко-морфولوجическими характеристиками EBV-ассоциированного рака желудка, представленными в литературе, и не имеют клинического значения. Экспрессия белка LMP-1 в раке желудка не коррелирует с экспрессией малых вирусных РНК ($r = -0,069$, p=0,229), таким образом, использование маркера LMP-1 для верификации EBV-ассоциированного рака желудка нежелательна.

Опухоли с положительной экспрессией EBV встречаются в нашей выборке в 9% случаев (рис. 4а), что совпадает с данными литературы (Shinozaki, A., et al. 2009; Ushiku, T., et al. 2010; Fukayama, M., et al. 2011). Согласно литературным данным EBV-позитивные опухоли чаще встречаются в проксимальных отделах желудка и чаще у мужчин (Shinozaki, A., et al. 2009; Shinozaki, A., et al. 2010; Fukayama, M., et al. 2011), что полностью подтверждено в нашем исследовании: в отличие от группы с отсутствием экспрессии EBV группа с положительной экспрессией EBV характеризуется значимым преобладанием пациентов мужского пола (p=0,003) (рис. 4б) и более частой проксимальной локализацией (p=0,026) (рис. 4в). В литературе сообщается о более частой локализации EBV-позитивных аденокарцином в культе желудка после

гастрэктомии, однако в нашем исследовании единственный случай с локализацией в культе желудка был EBER-негативным. Впервые выявлено, что группа EBER-положительных аденокарцином характеризуется меньшим количеством диффузно-инфильтративных форм рака, преобладанием тубулярного гистологического типа ($p=0,040$), более низкими степенями дифференцировки ($p=0,008$) и преобладанием промежуточного подтипа по P. Lauren ($p=0,000$).

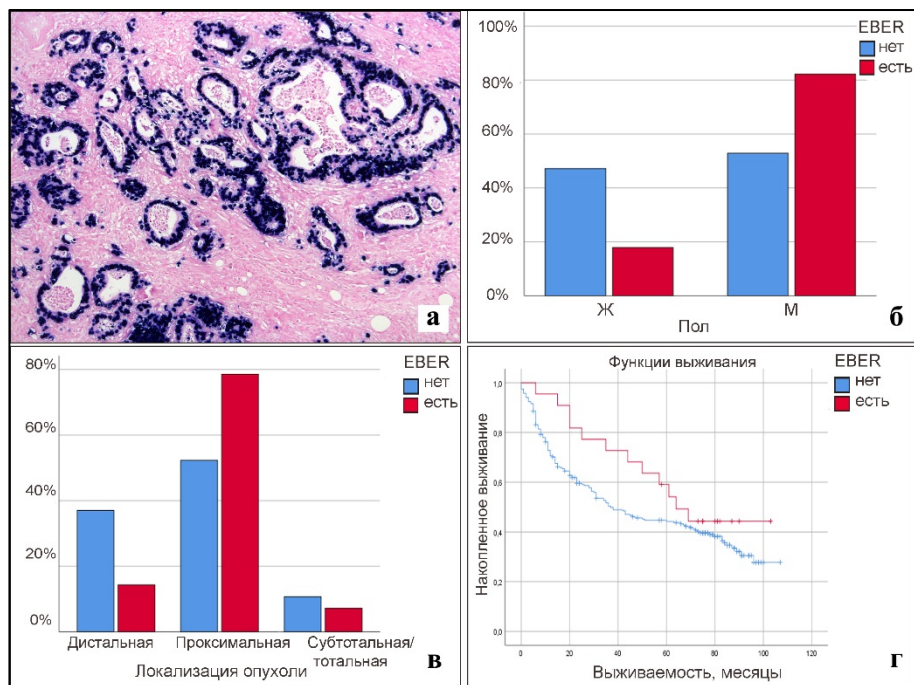


Рисунок 4. Экспрессия EBER в аденокарциномах желудка: а – экспрессия EBER в опухоли, выявление EBER методом гибридизации *in situ*, об. x10; б – структурная диаграмма распределения по полу; г – структурная диаграмма распределения локализации опухолей; г – анализ выживаемости пациентов с раком желудка в группах EBER-негативных и EBER-положительных опухолей

В литературе авторы утверждают, что для EBER-положительных карцином характерен хороший прогноз (Shinozaki, A., et al. 2009; Shinozaki, A., et al. 2010; Fukayama, M., et al. 2011) и высокая выживаемость пациентов. В нашем исследовании общая пятилетняя выживаемость больных в группе с положительной экспрессией EBER составила 45,5% (медиана 64 мес.) и была выше, чем в группе с отсутствием экспрессии (38,4%, медиана 37 мес.) ($p=0,205$)

(Данилова, Н.В., и соавт. 2022) (рис. 4г). Таким образом, данные пациенты демонстрируют более длительную выживаемость, что совпадает с данными литературы.

Маркеры иммунного микроокружения (CD4, CD8, CD68, CD1a) и ингибитор контрольных точек иммунитета PD-L1

В опухолях с низкой степенью дифференцировки (G3, ВОЗ 2010) наблюдается значимо более выраженная инфильтрация CD4+ ($p=0,006$), CD8+ ($p=0,048$), CD68+ ($p=0,013$) и CD1a+ клетками ($p=0,006$). При этом в опухолях high grade по классификации ВОЗ 2019 отмечено только значимое повышение числа CD4+ ($p=0,012$), CD68+ ($p=0,002$) и CD1a+ клетками ($p=0,003$). Опухоли с низкой степенью дифференцировки, как правило, имеют более высокую мутационную нагрузку, что вызывает продукцию большего количества неоантигенов для стимуляции иммунной системы (Данилова, Н.В., и соавт. 2021; Данилова, Н.В., и соавт. 2021). Впервые показано, что у пациентов мужского пола в опухолях содержится более высокое количество CD4+ клеток (66 ± 48 , $p=0,008$), CD8+ клеток (145 ± 219 , $p=0,011$), CD1a+ клеток (14 ± 13 , $p=0,038$). Опухоли с промежуточным подтипом по классификации P. Lauren характеризовались большей плотностью CD4+ и CD1a+ клеток в инфильтрате, по сравнению с опухолями диффузного ($p=0,039$, $p=0,001$) и кишечного подтипов ($p=0,044$, $p=0,011$). Также в этих опухолях выявлено большее количество CD8+ клеток (по сравнению с опухолями диффузного подтипа, $p=0,041$) и CD68+ клеток (по сравнению с опухолями кишечного подтипа, $p=0,008$). Значимых различий по выживаемости не обнаружено.

При корреляционном анализе обнаружены сильные положительные взаимосвязи высокой плотности всех клеток инфильтрата между собой, а также с положительным EBER-статусом.

Частота выявления частота выявления PD-L1(SP142)-позитивных опухолей составляет 18,5% (рис. 5а), а PD-L1(SP263)-позитивных опухолей составляет 29,4% (рис. 5б). В литературе имеются данные о том, что экспрессия PD-L1 не зависит от пола и возраста, стадии заболевания, локализации первичной опухоли, степени ее дифференцировки и глубины инвазии (Zhang, M., et al. 2016). В нашем исследовании эти данные подтверждены частично: показано, что среди PD-L1-позитивных опухолей (SP142, SP263) значимо чаще выявляются опухоли с низкой степенью дифференцировки (SP142 – $p=0,017$, SP263 – $p=0,031$) или High grade по классификации 2019 года (SP142 – $p=0,027$). Впервые выявлено, что PD-L1-позитивными значимо чаще являются новообразования 1 и 2 типа R. Vormann (SP142 – $p=0,000$, SP263 – $p=0,001$), а также тубулярные карциномы (SP142 – $p=0,000$, SP263 – $p=0,000$), преобладают случаи с отсутствием перстневидных клеток (SP142 – $p=0,000$, SP263 – $p=0,000$) и промежуточный подтип по P. Lauren (SP142 – $p=0,000$, SP263 – $p=0,000$). Связи с размерами опухолей и наличием отдаленных метастазов,

описанных в исследовании Zhang, M., et al. 2016, не обнаружено. Выявлена сильная положительная взаимосвязь экспрессии маркеров SP142 и SP263 между собой ($r = 0,704$, $p=0,000$), а также с экспрессией EBER (SP142 $r= 0,411$, $p=0,000$; SP263 $r= 0,496$, $p=0,000$), что совпадает с данными (Böger, C., et al. 2016).

Общая пятилетняя выживаемость больных в группе PD-L1(SP142)-позитивных опухолей составила 47,8% (медиана 87 мес.) и была выше ($p=0,027$), чем в группе PD-L1(SP142)-негативных опухолей (19,4%, медиана 20 мес.) (рис. 5в). Общая пятилетняя выживаемость больных в группе PD-L1 (SP263)-позитивных опухолей была меньше, чем у другого маркера – 34,8% (медиана 31 мес.), однако все равно значимо превышала ($p=0,036$) аналогичную в группе PD-L1(SP263)-негативных опухолей (18,9%, медиана 15 мес.) (рис. 5г). Таким образом, экспрессия обоих маркеров PD-L1 характеризуется благоприятным прогнозом у пациентов, а лучшими характеристиками выживаемости обладает маркер PD-L1(SP142).

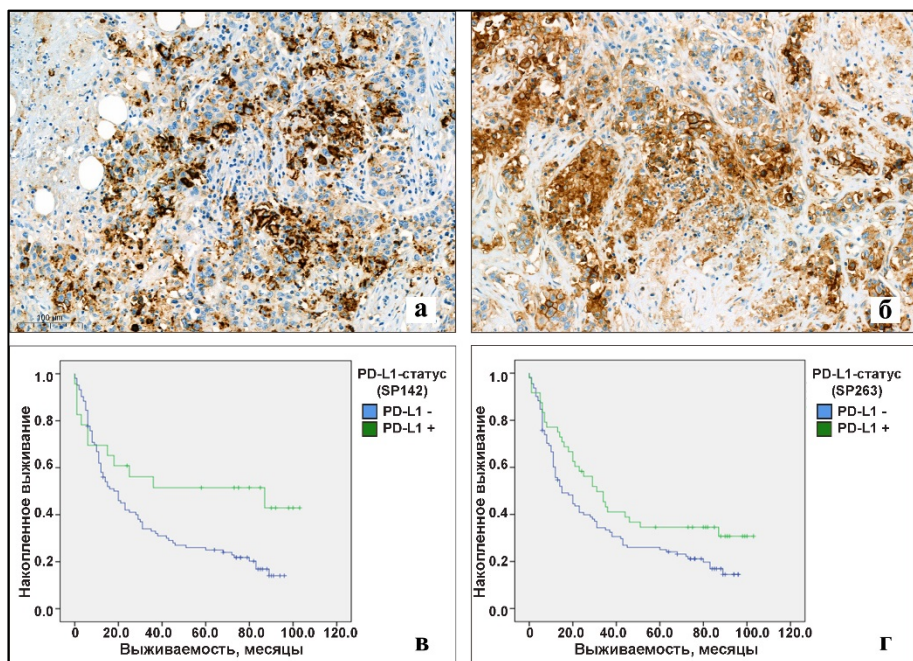


Рисунок 5. Экспрессия PD-L1 в карциномах желудка и анализ выживаемости пациентов: а – экспрессия PD-L1 SP142 в аденокарциноме желудка (CPS> 50, 4 балла); б – экспрессия PD-L1 SP263 в аденокарциноме желудка (CPS> 50, 4 балла); в – анализ выживаемости пациентов, PD-L1 (SP142); г – анализ выживаемости пациентов, PD-L1 (SP263).

Положительный PD-L1-статус (SP263, SP142) значимо чаще выявляется в EBV-ассоциированных карциномах желудка (Данилова, Н.В., и соавт. 2022). Установлено, что пациенты с положительным PD-L1-статусом (вне зависимости от исследованного маркера) в EBV-ассоциированных карциномах желудка отличаются более молодым возрастом, принадлежностью к мужскому полу (SP142 $p<0,009$, SP263 $p<0,007$), проксимальной локализацией опухолей. Хотя данные различия (кроме различия по полу) статистически не значимы, они согласуются с результатами, полученными С. Böger и соавт. (Böger, C., et al. 2016). Большая часть из этих опухолей относится к низкодифференцированным тубулярным карциномам (SP263 $p=0,005$, SP142 $p=0,021$), и промежуточному подтипу по P. Lauren (SP142 $p=0,007$, SP263 $p<0,004$). Данные характеристики не зависят от клона антител: положительный PD-L1-статус SP142 и SP263 выявляется у одних и тех же пациентов за небольшим исключением.

Сравнение прогностических характеристик различных маркеров

Для выявления значимых факторов прогноза рака желудка использован статистический анализ по Каплану-Майеру и регрессионная модель пропорциональных рисков Кокса.

На рис. 6 показано, что мужской пол сопряжен с увеличением шансов летального исхода в 2,02 раза ($p<0,001$), увеличение возраста на 1 год сопровождалось увеличением шансов летального исхода в 1,02 раза ($p=0,02$), увеличение показателя N – в 1,61 раз ($p<0,001$); увеличение показателя M – в 2,52 раза ($p<0,001$). Другие показатели не достигли статистической значимости, $p>0,05$. Негативный MMR-негативный статус сопряжен с уменьшением шансов летального исхода в 2 раза ($p=0,05$). Наличие положительной экспрессии PD-L1 (SP142) сопряжено со снижением шансов летального исхода в 4,35 раз ($p=0,005$).

По результатам анализа выживаемости (табл. 2) к благоприятным прогностическим факторам рака желудка следует относить MMR-негативный статус опухоли ($p=0,013$), положительную экспрессию CDX2, CLAU3, CLAU4, EBER, PD-L1(SP263) ($p=0,036$). Неблагоприятные прогностические факторы: положительная экспрессия MUC2, MUC5AC, CD10, CLAU1, LMP1, aberrантная экспрессия E-кадгерина ($p=0,019$), β -катенина ($p=0,001$) и p53. Значимыми независимыми благоприятными прогностическими факторами являются PD-L1(SP142), положительная экспрессия которого сопряжена со снижением шансов летального исхода в 4,35 раз ($p=0,005$) и негативный MMR-статус опухоли, который сопряжен с уменьшением шансов летального исхода в 2 раза ($p=0,05$).

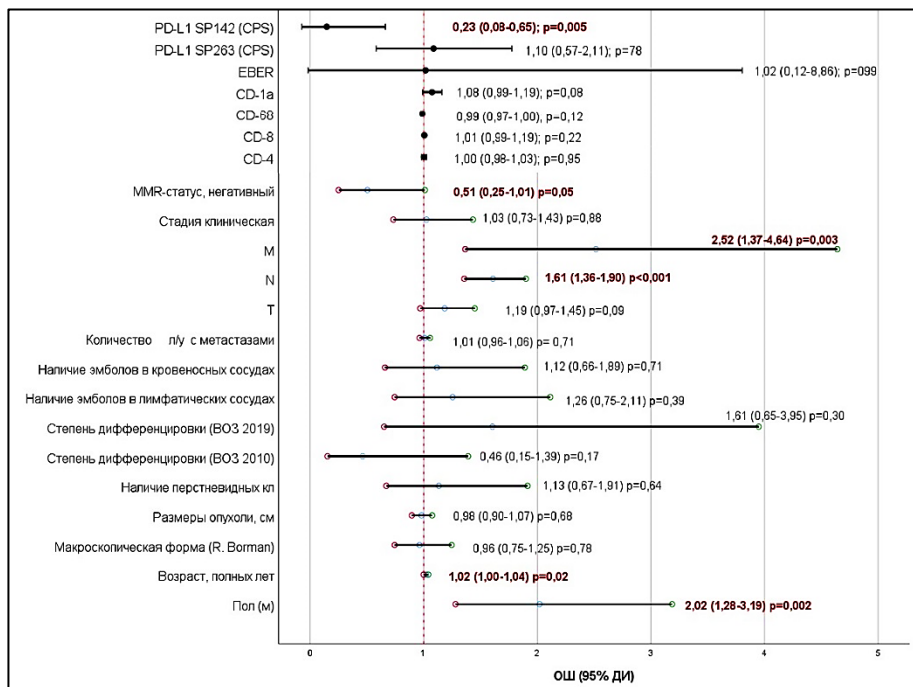


Рисунок 6. График отношения шансов для негативного MMR-статуса опухоли, EBER, маркеров иммунного микроокружения и PD-L1, составленный с помощью регрессионной модели пропорциональных рисков Кокса.

Таблица 2. Иммуногистохимические и молекулярно-биологические факторы прогноза рака желудка

Благоприятные прогностические факторы		Неблагоприятные прогностические факторы	
Фактор	LogRank (Mantel-Cox)	Фактор	LogRank (Mantel-Cox)
MMR-	p=0,013	MUC2+	p=0,206
CDX2+	p=0,085	MUC5AC+	p=0,374
CLAU3+	p=0,930	CD10+	p=0,776
CLAU4+	p=0,400	E-кадгерин aberrантный	p=0,019
EBER+	p=0,205	β-катенин aberrантный	p=0,001
PD-L1(SP142)	p=0,027	CLAU1+	p=0,754
PD-L1(SP263)	p=0,036	P53 aberrантный	p=0,392
		LMP-1 +	p=0,668

Алгоритм иммуногистохимического тестирования рака желудка для определения молекулярного подтипа опухоли

В результате многоступенчатого статистического анализа нами сформулирован пошаговый алгоритм для определения принадлежности опухоли к молекулярному подтипу (рис. 7). Предлагаемый алгоритм обоснован статистически, обеспечивает наиболее точное разделение опухолей на молекулярные подтипы в соответствии с клинико-морфологическими и прогностическими характеристиками. В ходе разработки алгоритма проанализировано 17 вариантов разбивки на молекулярные подтипы, статистически показана необоснованность выделения следующих подтипов: EBER/PD-L1, E-кадгерин/ β -катенин-абберантный, PD-L1-позитивный, поскольку выделение этих подтипов не отражает различий в выживаемости.

Исходя из анализа кривых выживаемости и других статистических данных наиболее предпочтительным является вариант классификации, который предусматривает выделение на первом этапе MMR-негативного подтипа (25 случаев, 8,1%), на втором этапе EBER-позитивного подтипа (28 случаев, 9%), далее – E-кадгерин-абберантного подтипа (53 случая, 17,1%) и, наконец, разделения оставшихся случаев на две группы: CDX2+ и CDX2–.

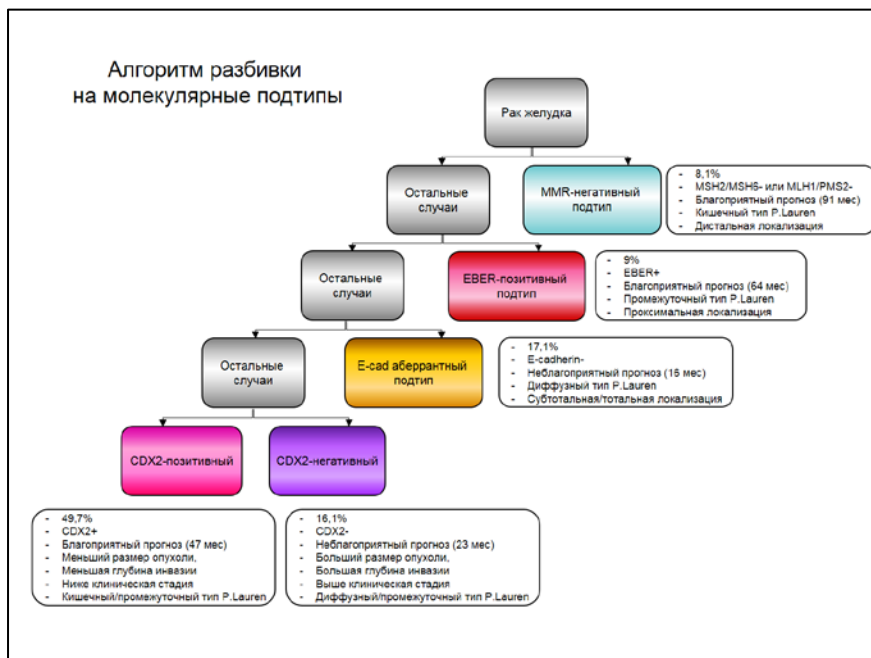


Рисунок 7. Алгоритм разбивки случаев с раком желудка на молекулярные подтипы с использованием иммуногистохимического метода

Молекулярная классификация рака желудка

В данной работе не только выделено 5 отдельных молекулярных подтипов рака желудка, но и впервые, по сравнению со всеми имеющимися в литературе данными, наиболее полно охарактеризованы с точки зрения клинико-морфологических и иммуногистохимических характеристик. Два из пяти подтипов выделены и охарактеризованы впервые. Выделенный нами MMR-негативный подтип имеет больше сходств с MSI-подтипом ACRG, чем TCGA. В отличие от TCGA, мы обнаружили связь с выживаемостью пациентов (табл. 3, рис. 8)

Таблица 3. Парные сравнения выживаемости пациентов с различными молекулярными подтипами рака желудка.

Log Rank (Mantel-Cox)	MMR-негативный подтип	EBER подтип	Е-кадгерин-аберрантный подтип	CDX2-положительный подтип	CDX2-негативный подтип
	Значимость	Значимость	Значимость	Значимость	Значимость
MMR –		,213	,000	,072	,001
EBER +	,213		,006	,433	,021
Е-кадгерин	,000	,006		,003	,661
CDX2 +	,072	,433	,003		,029
CDX2 –	,001	,021	,661	,029	

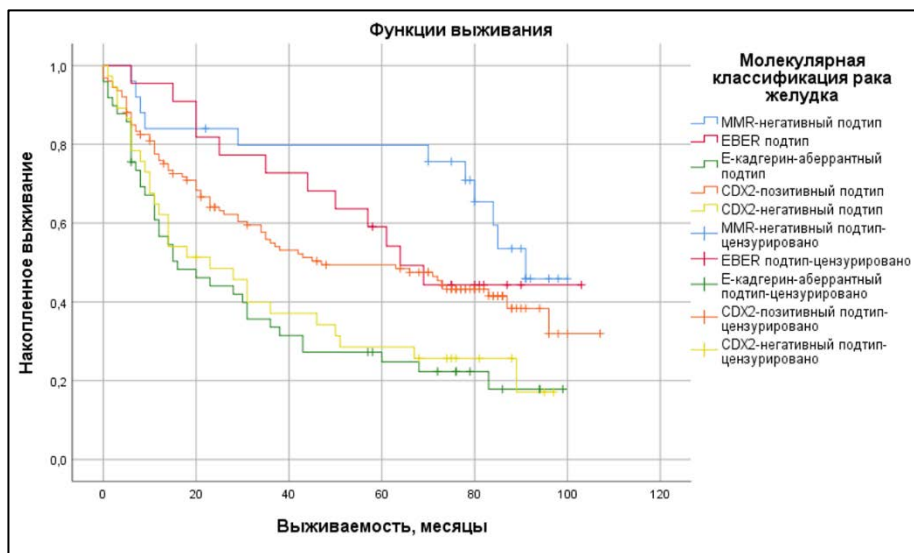


Рисунок 8. Анализ выживаемости пациентов с различными молекулярными подтипами рака желудка.

Молекулярные подтипы рака желудка:

1. MMR-негативный подтип (рис. 9) встречается в 8,1% случаев рака желудка, чаще включает пациентов старших возрастных групп (медиана 70 лет), с преобладанием женского пола; к нему относятся тубулярные аденокарциномы кишечного типа по P. Lauren, без перстневидных клеток, расположенные в желудке дистально и имеющие блюдцеобразную/чашеподобную макроскопическую форму. Для MMR-негативного подтипа характерна положительная экспрессия MUC2 ($p=0,017$), CD44 ($p=0,01$) и PD-L1 ($p<0,05$), а также повышенная плотность инфильтрации CD8+ клетками по сравнению с CDX2-позитивным ($p=0,005$) и CD1a+ клетками по сравнению с E-кадгерин-абerrантным подтипом ($p=0,038$). MMR-негативный подтип характеризуется благоприятным прогнозом (медиана 91 мес.).

2. EBER-позитивный подтип (рис. 10) встречается в 9% случаев рака желудка, включает пациентов мужского пола; к нему относятся тубулярные аденокарциномы с низкой степенью дифференцировки, без перстневидных клеток, промежуточного подтипа по P. Lauren, расположенные в желудке проксимально. Для EBER-позитивного подтипа характерна нормальная экспрессия p53 ($p=0,014$), отсутствие повышенной экспрессии CLAU-3 ($p<0,05$) и MUC-null фенотип ($p<0,05$), а также положительная экспрессия PD-L1 ($p<0,05$) и повышенная плотность инфильтрации CD4+, CD8+, CD68+ и CD1a+ клетками по сравнению со всеми остальными подтипами ($p=0,000$). EBER-позитивный подтип характеризуется благоприятным прогнозом (медиана 64 мес.).

3. E-кадгерин-абerrантный подтип (рис. 11) встречается в 17,1% случаев рака желудка, чаще включает пациентов женского пола; к нему относятся дискогезивные карциномы и тубулярные аденокарциномы с низкой степенью дифференцировки, с субтотальной/тотальной локализацией, инфильтративно-язвенным и диффузно-инфильтративным ростом рака, более крупными размерами опухолей (более 8 см), диффузного подтипа по P. Lauren. Для E-кадгерин-абerrантного подтипа характерна абerrантная экспрессия β -катенина ($p=0,000$). E-кадгерин-абerrантный подтип характеризуется крайне неблагоприятным прогнозом (медиана 16 мес.).

4. CDX2-позитивный подтип (рис. 12) встречается в 49,7% случаев рака желудка; к нему относятся опухоли кишечного и промежуточного типа по P. Lauren, расположенные в желудке проксимально и имеющие значимо меньшие размеры. В состав этого подтипа чаще входят папиллярные и муцинозные раки желудка с меньшей глубиной инвазии, без поражения лимфатических узлов и с более низкой клинической стадией. Для CDX2-позитивного подтипа характерна положительная экспрессия MUC2 ($p<0,050$), CD10 ($p=0,019$) и MUC-I фенотип ($p=0,030$). CDX2-позитивный подтип характеризуется относительно благоприятным прогнозом (медиана 47 мес.).

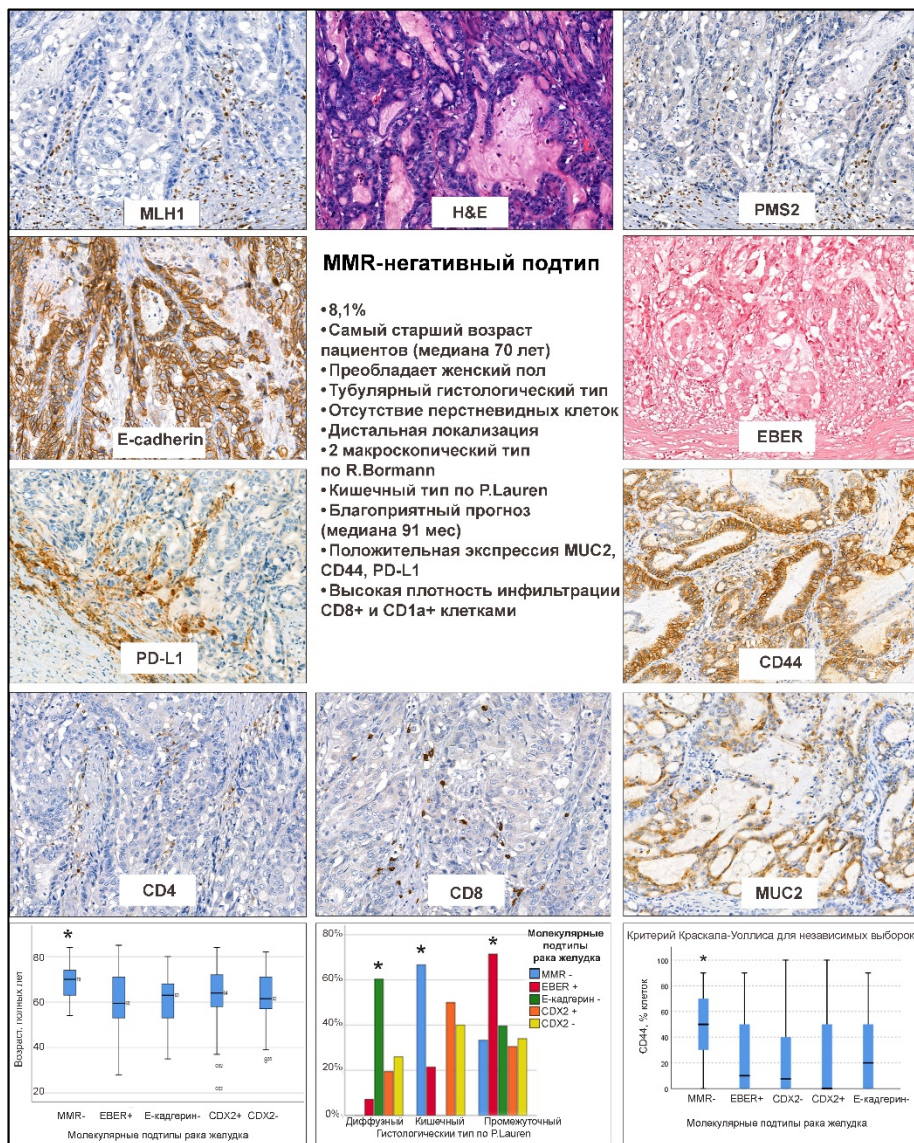


Рисунок 9. Основные характеристики MMR-негативного молекулярного подтипа рака желудка.

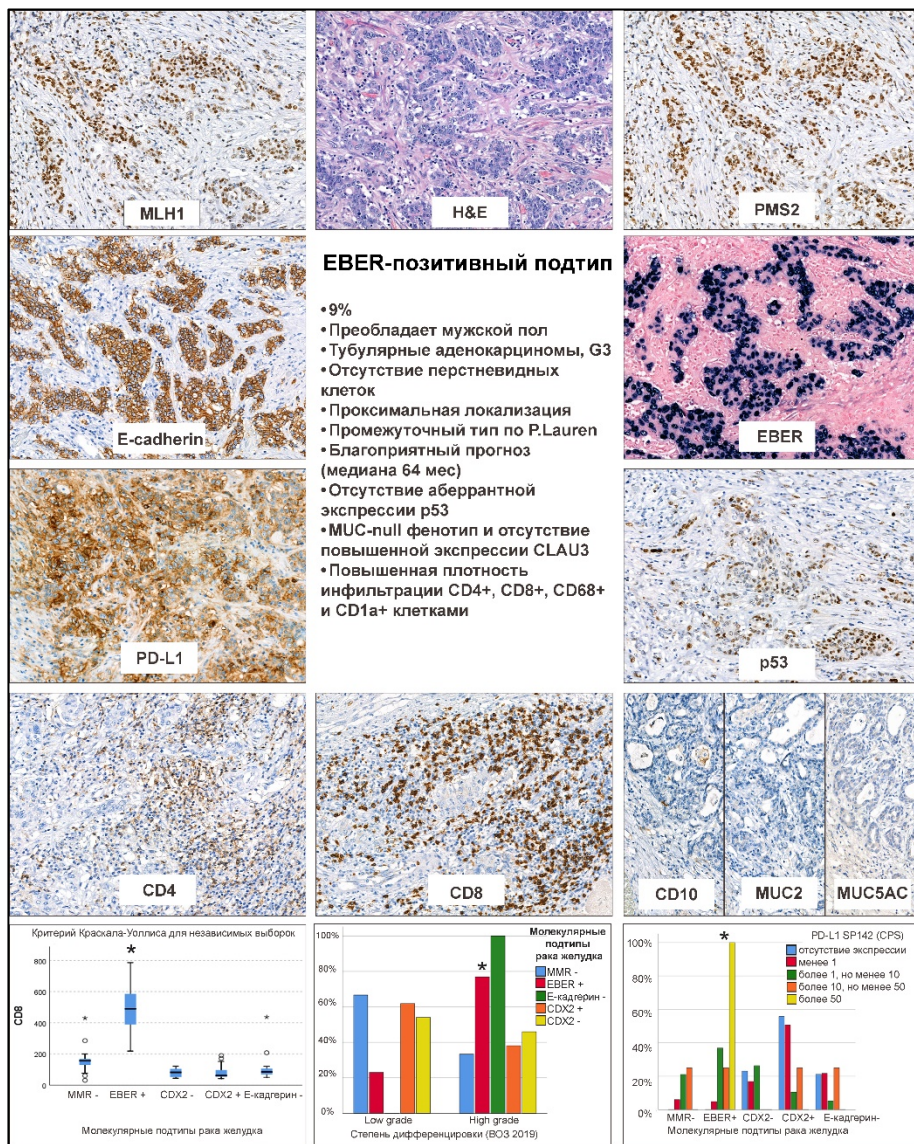


Рисунок 10. Основные характеристики EBER-позитивного молекулярного подтипа рака желудка.

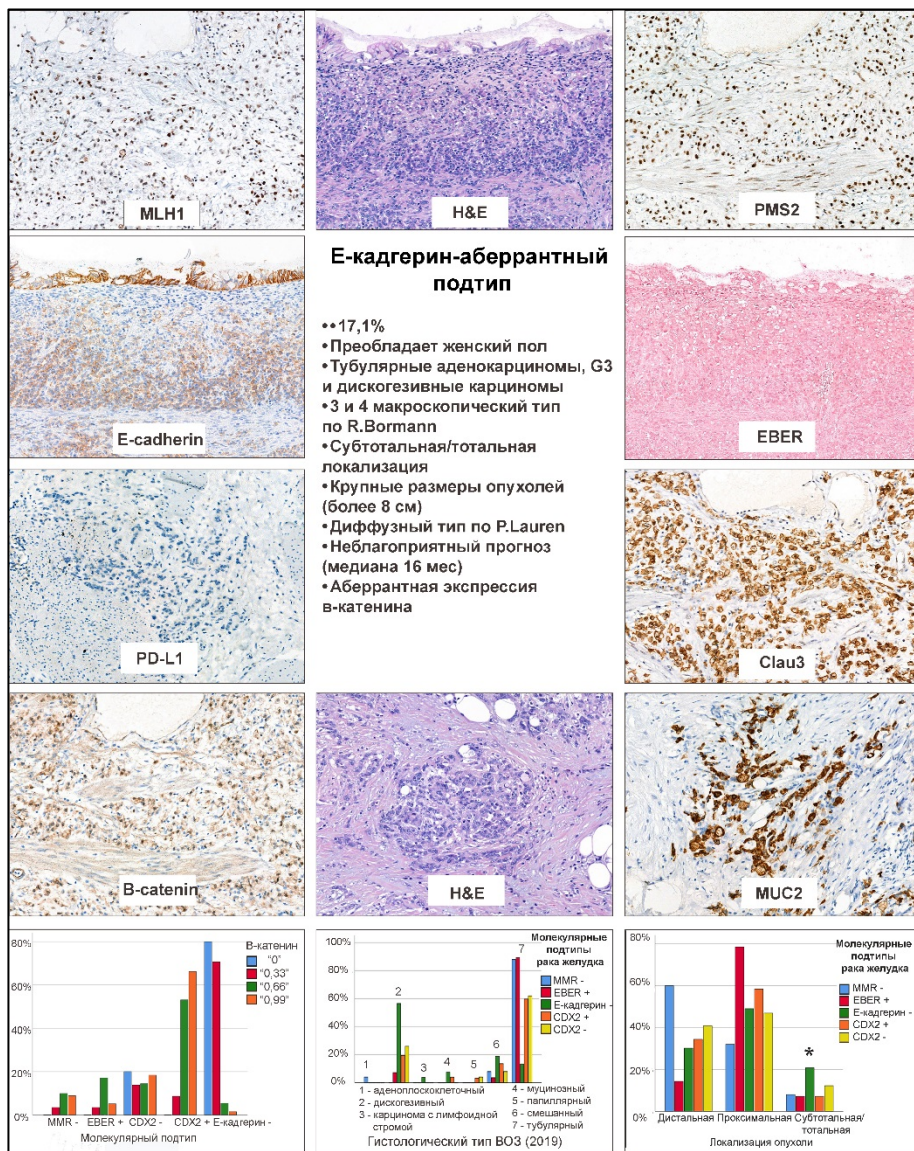


Рисунок 11. Основные характеристики Е-кадгерин-аберрантного молекулярного подтипа рака желудка.

5. CDX2-негативный подтип (рис. 13) встречается в 16,1% случаев рака желудка; к нему относятся опухоли диффузного и промежуточного типа по P. Lauren, расположенные в желудке преимущественно дистально и имеющие значимо более крупные размеры. В состав этого подтипа чаще входят папиллярные карциномы желудка, а также карциномы с большой глубиной инвазии и с более высокой клинической стадией. Для CDX2-негативного подтипа характерна положительная экспрессия MUC5AC ($p=0,02$) и MUC-G фенотип ($p=0,045$). CDX2-негативный подтип характеризуется неблагоприятным прогнозом (медиана 23 мес.).

Выделенные подтипы имеют перспективное значение для применения таргетной терапии рака желудка. Высокая экспрессия PD-L1 в MMR-негативном и EBER-положительном подтипах создает предпосылки для использования блокаторов контрольных точек иммунитета в лечении пациентов, в частности атезолизумаба и дурвалумаба. По данным ACRG опухоли MSI-подтипа характеризовались большим количеством мутаций, причем в 44% образцов из этой группы выявлены мутации ARID1A, а в 42% – мутации фосфоинозитид-3 киназы и гомолога тензина (PTEN), являющихся мишенями для рапамицина (mTOR-сигнальный путь). Таким образом, рапамицин также может быть перспективным маркером для терапии пациентов с MMR-негативным подтипом.

В E-кадгерин аберрантном подтипе выявлена повышенная экспрессия клаудина-3. Известно, что клаудин-3 и клаудин-4 являются рецепторами энтеротоксина *Clostridium perfringens* (CPE), который вызывает разрушение эпителиальных клеток (Hewitt, K.J., et al. 2006). Таким образом, представляется возможным использование CPE для таргетной терапии аденокарцином желудка, характеризующихся повышенной экспрессией клаудинов 3 и 4, в частности опухолей E-кадгерин аберрантного подтипа (Satake, S., et al. 2008; Kamata, I., et al. 2009; Jung, H., et al. 2011; Kwon, M.J. 2013; Todd, M.C., et al. 2015).

В MMR-негативном подтипе обнаружена высокая экспрессия CD44, являющегося как маркером опухолевых стволовых клеток, так и рецептором гиалуроновой кислоты. Векторы с использованием гиалуроновой кислоты, находящиеся в данный момент в разработке, могут быть использованы для таргетной терапии опухолей, экспрессирующих CD44 (Mattheolabakis, G., et al. 2015), что является дополнительным возможным терапевтическим подходом к лечению MMR-негативных опухолей.

В клетках аденокарциномы желудка и в участках кишечной метаплазии обнаружена положительная корреляция клаудинов 3 и 4 с экспрессией CDX2, контролирующего дифференцировку кишечного эпителия (Lee, S.K., et al. 2005; Sathiyu Pandi, N., et al. 2013). Увеличение экспрессии CDX2, так же как и клаудинов 3 и 4, наиболее характерно для рака желудка кишечного типа. В эксперименте *in vitro* в CDX2-негативные клетки рака желудка производился перенос рекомбинантного CDX2-экспрессирующего вектора, после чего

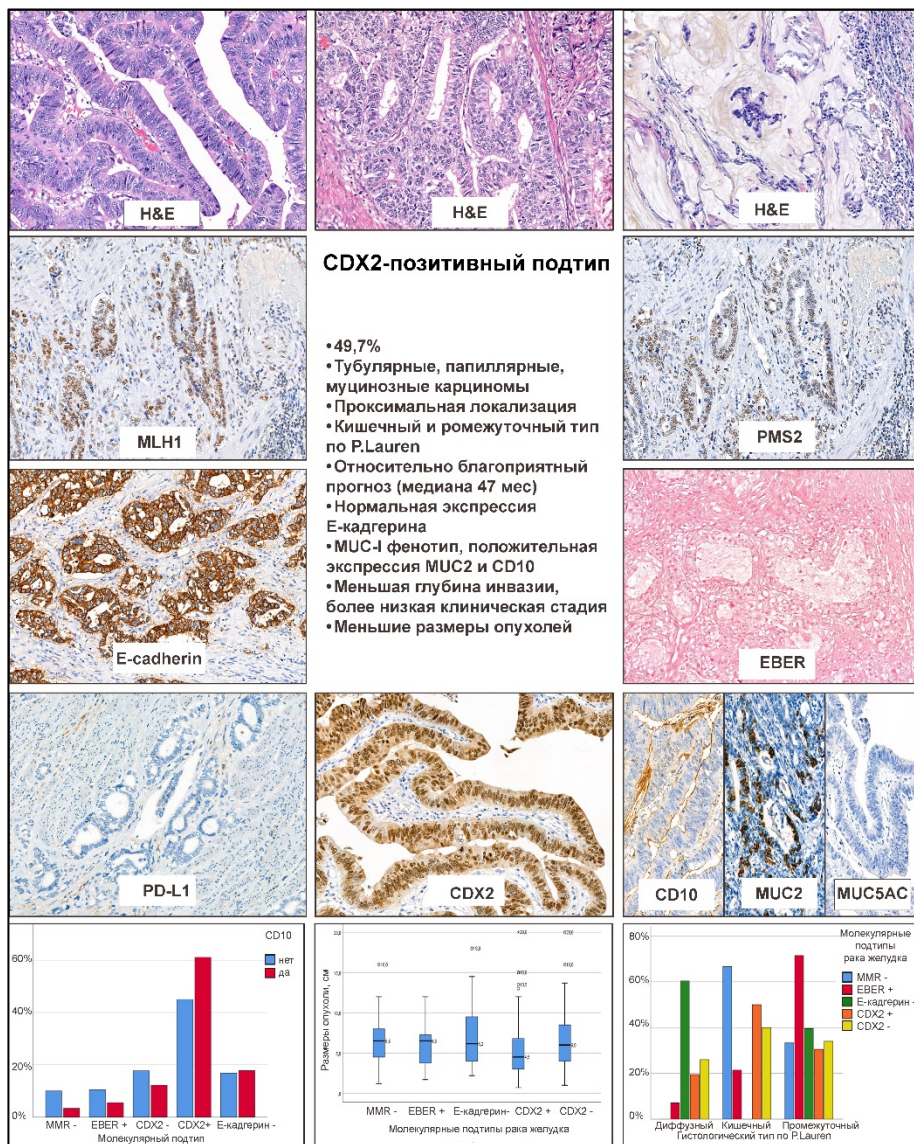


Рисунок 12. Основные характеристики CDX2-позитивного молекулярного подтипа рака желудка.

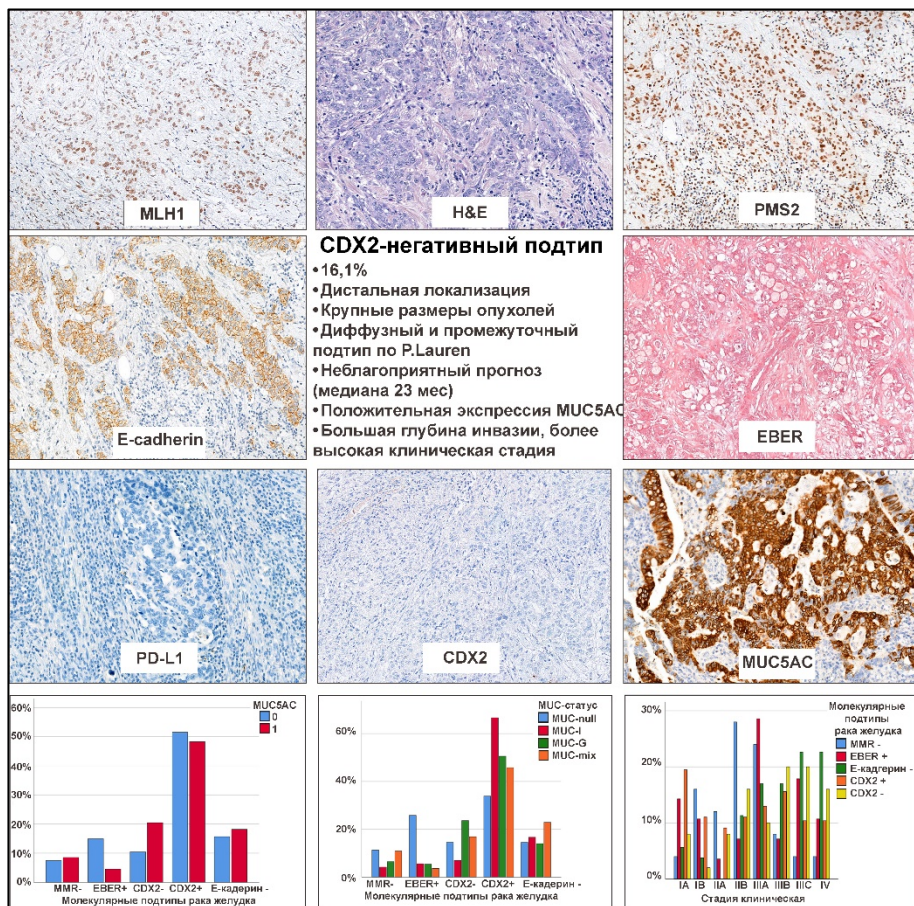


Рисунок 13. Основные характеристики CDX2-негативного молекулярного подтипа рака желудка.

уровень экспрессии клаудинов 3 и 4 повышался, а экспрессия других клаудинов (Jung, H., et al. 2011; Huang, J., et al. 2015; Coati, I., et al. 2019) не менялась. Можно предположить, что CDX2 играет роль в регуляции экспрессии клаудинов 3 и 4 (Sathiyapandi, N., et al. 2013) и возможно использование CPE для терапии не только E-кадгерин-аберрантного, но и CDX2+ подтипов.

В CDX2-позитивном и CDX2-негативном подтипах в части случаев определяется экспрессия HER2/neu. Однако, ввиду того, что CDX2-позитивный и CDX2-негативный подтипы выделены в данной работе впервые, необходимо дальнейшее подробное изучение молекулярного профиля этих подтипов для поиска наиболее подходящих терапевтических мишеней.

ВЫВОДЫ

1. Маркеры микросателлитной нестабильности (MSH2, MSH6, MLH1, PMS2) не экспрессируются в 8,1% случаев. Среди MMR-негативных опухолей значимо чаще выявляются пациенты старших возрастных групп (медиана – 70 лет), преобладает дистальная локализация опухолей, 2-й макроскопический тип по классификации R. Vormann, тубулярный гистологический тип, кишечный подтип по P. Lauren. Общая пятилетняя выживаемость пациентов с MMR-негативными опухолями составляет 76%.

2. Маркеры желудочной и кишечной дифференцировки связаны с отдельными клинико-морфологическими характеристиками рака желудка: MUC2-позитивные опухоли чаще относятся к муцинозному гистологическому типу ($p=0,000$); MUC5AC-позитивные опухоли чаще характеризуются дистальной и субтотальной локализацией ($p=0,023$), относятся к дискогезивному гистологическому типу ($p=0,000$) и диффузному подтипу по P. Lauren ($p=0,007$); CDX2-позитивные опухоли имеют меньший размер ($p=0,001$), и реже являются субтотальными по распространенности ($p=0,018$), для них характерна меньшая глубина инвазии, более низкие клинические стадии ($p=0,010$). Разделение карцином желудка в зависимости от MUC-статуса может иметь лишь ограниченную прогностическую ценность в отдельных гистологических формах рака.

3. Среди молекул адгезии наиболее значимой является aberrантная экспрессия E-кадгерина. Опухоли с aberrантной экспрессией E-кадгерина относятся к диффузному подтипу по P. Lauren, с массивным поражением регионарных лимфатических узлов (N3a – N3b). Впервые выявлено, что эта группа характеризуется большей долей опухолей с субтотальной/тотальной локализацией, большим количеством диффузно-инfiltrативных форм рака, преобладанием дискогезивного гистологического типа, низкими степенями дифференцировки тубулярных, папиллярных и смешанных карцином, наличием эмболов в лимфатических сосудах ($p=0,001$), частым отдаленным метастазированием и продвинутыми клиническими стадиями. Общая пятилетняя выживаемость больных в группе с aberrантной экспрессией составила 26,8%. Повышенная экспрессия клаудина-1 характерна для опухолей кишечного типа с дистальной локализацией. Повышенная экспрессия клаудина-3 характерна для новообразований 1-2 по R. Vormann с высокой степенью дифференцировки. Клаудин-4 и CD44 значимо не связаны с клинико-морфологическими и прогностическими характеристиками рака желудка.

4. Aberrантная экспрессия p53 характерна для опухолей с проксимальной локализацией, с более высокими степенями дифференцировки ($p=0,011$) и преобладанием кишечного и промежуточного подтипа по P. Lauren ($p=0,000$). Положительный HER2-статус коррелирует с aberrантной экспрессией p53 ($p=0,000$). Общая пятилетняя выживаемость больных в группе с aberrантной экспрессией p53 составила 35,6%.

5. Положительная экспрессия EBER встречается в 9% случаев, характеризуется благоприятным прогнозом, преобладанием проксимальной локализации ($p=0,026$), пациентов мужского пола ($p=0,003$), тубулярного гистологического типа с более низкими степенями дифференцировки ($p=0,008$) и промежуточного подтипа по P. Lauren ($p=0,000$). LMP-1 не коррелирует с какими-либо клинико-морфологическими характеристиками рака желудка.

6. Опухоли с низкой степенью дифференцировки и промежуточного подтипа по P.Lauren характеризуются высокой плотностью инфильтрации CD4+, CD8+, CD68+ и CD1a+ клетками, которая значимо коррелирует с EBER-положительными опухолями. Частота выявления PD-L1(SP142)-положительных опухолей составляет 18,5%, PD-L1(SP263)-положительных опухолей – 29,4%. Среди PD-L1-положительных опухолей значимо чаще выявляются опухоли с низкой степенью дифференцировки, новообразования тубулярного гистологического типа и промежуточного подтипа по классификации P. Lauren. Пациенты с PD-L1(SP142)-положительными опухолями характеризуются более благоприятным прогнозом. Положительный PD-L1-статус (SP263, SP142) значимо чаще выявляется в EBV-ассоциированных карциномах желудка.

7. Благоприятными прогностическими факторами рака желудка являются: MMR-негативный статус опухоли ($p=0,013$), положительную экспрессию CDX2, CLAU3, CLAU4, EBER, PD-L1 ($p=0,036$). Неблагоприятные прогностические факторы: положительная экспрессия MUC2, MUC5AC, CD10, CLAU1, LMP1, aberrантная экспрессия E-кадгерина ($p=0,019$), β -катенина ($p=0,001$) и p53. Экспрессия маркеров иммунного микроокружения оказывает минимальное влияние на выживаемость. Значимыми независимыми благоприятными прогностическими факторами являются PD-L1(SP142), положительная экспрессия которого сопряжена со снижением шансов летального исхода в 4,35 раз ($p=0,005$) и негативный MMR-статус опухоли, который сопряжен с уменьшением шансов летального исхода в 2 раза ($p=0,05$).

8. Разработанный оригинальный алгоритм пошагового иммуногистохимического тестирования рака желудка, включающий панель из следующих маркеров: MSH2, MSH6, MLH1, PMS1, EBER, E-cadherin, CDX2, позволяет выделить 5 молекулярных подтипов рака желудка. Алгоритм предусматривает выделение на первом этапе MMR-негативного подтипа (25 случаев, 8,1%), на втором этапе EBER-положительного подтипа (28 случаев, 9%), далее – E-кадгерин-абerrантного подтипа (53 случая, 17,1%), далее CDX2-положительного подтипа (49,7%) и CDX2-негативного подтипа (16,1%).

9. Разработанная новая молекулярная классификация рака желудка, включающая 5 молекулярных подтипов – MMR-негативный подтип (медиана выживаемости 91 мес.), EBER-положительный подтип (медиана 64 мес.), E-кадгерин-абerrантный подтип (медиана 16 мес.), CDX2-положительный подтип (медиана 47 мес.), CDX2-негативный (медиана 23 мес.). CDX2-положительный и CDX2-негативный подтипы выделены впервые. Целесообразность выделения подтипа, связанного с aberrантной экспрессией p53 и описанного другими авторами, не подтверждена.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для выявления MMR-негативного подтипа рекомендуется использовать все четыре маркера микросателлитной нестабильности (MSH2, MSH6, MLH1, PMS2), поскольку в 12% наблюдений нестабильность обусловлена именно отсутствием пары MSH2/MSH6. В первую очередь исследование на маркеры микросателлитной нестабильности надо проводить на опухолях кишечного типа по P. Lauren.

2. Среди маркеров желудочной и кишечной дифференцировки целесообразно применять CDX2, который может быть использован для выделения CDX2-позитивного и CDX2-негативного молекулярных подтипов. Разделение карцином желудка в зависимости от MUC-статуса может иметь лишь ограниченную предиктивную и прогностическую ценность в отдельных гистологических формах рака.

3. Рекомендую во всех карциномах желудка обязательно проводить исследование экспрессии E-кадгерина для выявления aberrантной экспрессии. Дополнительной прогностической и предиктивной ценностью обладают маркеры клаудин-3 и CD44.

4. Использование aberrантной экспрессии p53 для оценки не рекомендуется, так как этот маркер не обладает прогностической значимостью при раке желудка.

5. Исследование экспрессии EBER необходимо проводить в первую очередь для карцином промежуточного типа по P. Lauren. Использование маркера LMP-1 для определения EBV-статуса опухоли при раке желудка нецелесообразно.

6. Необходимо проводить исследование экспрессии PD-L1 всем пациентам с раком желудка, поскольку PD-L1(SP142) является значимым независимым положительным фактором прогноза. В первую очередь тестирование показано пациентам с MMR-негативным и EBER-позитивным подтипами.

7. В качестве благоприятных прогностических признаков для планирования терапии пациентов с раком желудка рекомендуется учитывать: MMR-негативный статус опухоли, положительную экспрессию CDX2, CLAU3, CLAU4, EBER, PD-L1.

8. Для выделения молекулярных подтипов рака желудка необходимо использовать предложенный алгоритм иммуногистохимического тестирования, включающий панель из следующих маркеров: MSH2, MSH6, MLH1, PMS2, EBER, E-cadherin, CDX2. Выделение 5 молекулярных подтипов рака желудка (MMR-негативного, EBER-позитивного, E-кадгерин aberrантного, CDX2-позитивного и CDX2-негативного) имеет важное практическое значение и может быть полезно для определения персонализированной тактики лечения пациентов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Mikhailov, I., Danilova, N., Malkov, P. The immune microenvironment of various histological types of EBV-associated gastric cancer // *Virchows Arch.* – 2018. – 473(Suppl. 1). – P. 168-168.
2. Mikhailov, I., Danilova, N., Oleynikova, N., Chayka, A., Khomyakov, V., Malkov, P. Identification of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs (EBER) in gastric adenocarcinomas // *Virchows Arch.* – 2021. – 479(Suppl. 1). – P. S17-S17.
3. Mikhailov, I., Danilova, N., Oleynikova, N., Malkov, P. CD4+ and CD8+ lymphocytes in the immune microenvironment of gastric cancer: evaluation in Tumour Tissue // *Virchows Arch.* – 2019. – 475(Suppl. 1). – P. S282-282.
4. Mikhailov, I., Danilova, N., Oleynikova, N., Malkov, P. Density of CD8+ infiltration in the peritumoral mucosa in gastric cancer is significantly associated with lymphovascular invasion // *Virchows Arch.* – 2021. – 479(Suppl. 1). – P. S20-S20.
5. Popov, P., Danilova, N., Oleynikova, N., Malkov, P., Yusupova, K., Agapov, M. Malignant transformation of gastric hyperplastic polyp: Case report // *Virchows Arch.* – 2017. – 471(9). – P. 321-321.
6. Данилова, Н.В. Экспрессия маркеров желудочной и кишечной дифференцировки в раке желудка: обзор литературы // *Технологии живых систем.* – 2023. – 20(1). – С. 16-26
7. Данилова, Н.В., Аникина, К.А., Олейникова, Н.А. Экспрессия клаудина-4 в клетках аденокарциномы желудка // *Технологии живых систем.* – 2020. – 17(3). – С. 46-52.
8. Данилова, Н.В., Аникина, К.А., Олейникова, Н.А., Вычужанин, Д.В., Мальков, П.Г. Экспрессия клаудина-3 в раке желудка // *Архив патологии.* – 2020. – 82(2). – С. 5-11.
9. Данилова, Н.В., Мальков, П.Г., Олейникова, Н.А., Михайлов, И.А. Аденокарцинома желудка, ассоциированная с вирусом Эпштейна-Барр // *Архив патологии.* – 2019. – 81(3). – С. 74-83.
10. Данилова, Н.В., Михайлов, И.А., Калинин, Д.В., Олейникова, Н.А., Чайка, А.В., Хомяков, В.М., Какоткин, В.В., Юдин, М.Ю., Вычужанин, Д.В., Андреева, Ю.Ю., Мальков, П.Г. Исследование ассоциации аденокарцином желудка с малыми вирусными РНК вируса Эпштейна-Барр // *Архив патологии.* – 2022. – 84(2). – С. 5-12.
11. Данилова, Н.В., Михайлов, И.А., Олейникова, Н.А., Мальков, П.Г. Экспрессия белка LMP-1 в раке желудка и железистом эпителии перитуморальной области // *Архив патологии.* – 2019. – 81(6). – С. 24-33.
12. Данилова, Н.В., Михайлов, И.А., Олейникова, Н.А., Мальков, П.Г. Аденокарцинома желудка: многообразие генетических нарушений в опухолевых клетках как теоретическая основа разработки таргетных препаратов // *Практическая онкология.* – 2019. – 20(2). – С. 144-154.

13. Данилова, Н.В., Михайлов, И.А., Олейникова, Н.А., Мальков, П.Г. Экспрессия е-кадгерина в опухолевых эмболах при раке желудка // Архив патологии. – 2021. – 83(3). – С. 11-19.
14. Данилова, Н.В., Михайлов, И.А., Олейникова, Н.А., Мальков, П.Г., Чайка, А.В., Хомяков, В.М., Какоткин, В.В., Юдин, М.Ю. Персистенция антигенов вируса Эпштейна-Барр при раке желудка – характеристика воспалительных клеточных реакций в опухоли // Архив патологии. – 2021. – 83(1). – С. 18-24.
15. Данилова, Н.В., Олейникова, Н.А., Мальков, П.Г. Классификация эпителиальных опухолей желудка ВОЗ 2019 г., 5-е издание // Архив патологии. – 2020. – 82(4). – С. 58-69.
16. Данилова, Н.В., Попов, П.В., Олейникова, Н.А., Мальков, П.Г., Харлова, О.А., Юсупова, Х.И., Агапов, М.А. Аденокарцинома в гигантском гиперпластическом полипе желудка // Архив патологии. – 2017. – 79(6). – С. 43-52.
17. Данилова, Н.В., Сотникова, Т.Н., Калинин, Д.В., Олейникова, Н.А., Чайка, А.В., Хомяков, В.М., Какоткин, В.В., Вычужанин, Д.В., Андреева, Ю.Ю., Мальков, П.Г. Экспрессия PD-L1 в EBV-ассоциированном раке желудка // Архив патологии. – 2022. – 84(4). – С.5-12.
18. Данилова, Н.В., Хомяков, В.М., Чайка, А.В., Михайлов, И.А., Олейникова, Н.А., Мальков, П.Г. Характеристики иммунного микроокружения нормальной слизистой оболочки перитуморальной области – дополнительный независимый прогностический фактор при раке желудка // Сибирский онкологический журнал. – 2021. – 20(1). – С.74-86.
19. Данилова, Н.В., Чайка, А.В., Хомяков, В.М., Олейникова, Н.А., Андреева, Ю.Ю., Мальков, П.Г. Микросателлитная нестабильность в раке желудка – предиктор благоприятного прогноза // Архив патологии. – 2022. – 84(6) . – С. 5-15.
20. Данилова, Н.В., Чайка, А.В., Хомяков, В.М., Олейникова, Н.А., Андреева, Ю.Ю., Мальков, П.Г., Сотникова, Т.Н. Экспрессия муцинов в раке желудка: связь МUC-статуса с клинико-морфологическими и прогностическими характеристиками опухоли // Архив патологии. – 2023. – 85(1). – С.16-28.
21. Данилова, Н.В., Чайка, А.В., Хомяков, В.М., Олейникова, Н.А., Какоткин, В.В., Вычужанин, Д.В., Андреева, Ю.Ю., Мальков, П.Г. Аберрантная экспрессия p53 в карциноме желудка и ее связь с HER2-статусом // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2023. – 12(1). – С. 46-58.
22. Завалишина, Л.Э., Андреева, Ю.Ю., Виноградов, И.Ю., Данилова, Н.В., Кузнецова, О.А., Франк, Г.А. Сравнительный анализ определения HER-2 – статуса рака желудка в биопсийном и операционном материале // Архив патологии. – 2014. – (6). – С. 22-28.
23. Франк, Г. А., Завалишина, Л. Э., Данилова, Н. В., Андреева Ю. Ю. Морфологическое исследование HER2-статуса рака молочной железы и желудка. Методические рекомендации и атлас (монография) // Медиасфера Москва, 2013. – 64 с.

24. Аникина К. А., Данилова Н. В., Бычкова Е. А. Аномальная ядерная экспрессия клаудина-3 при раке желудка // Сборник статей по материалам XLIII-XLIV международной научно-практической конференции Экспериментальные и теоретические исследования в современной науке №13-14(39). – Новосибирск: Изд. АНС СиБАК, 2019. – С. 14-19.
25. Михайлов, И.А., Данилова, Н.В., Олейникова, Н.А., Мальков, П.Г., Гайфуллин, Н.М. Регенераторный потенциал воспалительного ответа в перитуморальной области при раке желудка // Genes & Cells (Гены и клетки). – 2019. – Т. 14, № Приложение. – С. 154–155.
26. Сотникова Т.Н., Данилова, Н.В., Мальков, П.Г., Калинин Д.В., Полушкина Т.В. Оценка экспрессии pd-11 клонов sp142 и sp263 при раке желудка // Успехи молекулярной онкологии. – 2022. – Т. 9, № 4 приложение. – С. 23–24.
27. Данилова, Н.В., Сотникова Т.Н., Мальков, П.Г., Калинин Д.В., Полушкина Т.В. Оценка экспрессии pd-11 при ВЭБ-ассоциированном раке желудка / // Успехи молекулярной онкологии. – 2022. – Т. 9, № 4 приложение. – С. 13-14.
28. Данилова, Н.В., Михайлов, И.А., Хомяков, В.М., Чайка А.В., Полушкина Т.В., Сотникова Т.Н., Олейникова, Н.А., Мальков, П.Г. Автоматизированная оценка площади инфильтрации CD8+ клетками в карциноме желудка и участках нормальной слизистой оболочки как значимый прогностический фактор // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2023. – 175(4). – С.512-516.

РЕЗЮМЕ

Докторской диссертации Н.В. Даниловой «Разработка молекулярной классификации рака желудка»

В представленном диссертационном исследовании изучены иммуногистохимические и прогностические характеристики рака желудка. Объектом исследования являлись образцы операционного материала от 310 пациентов с раком желудка, не получавших в предоперационном периоде химио- или лучевую терапию. Каждый образец окрашивали иммуногистохимическим методом с антителами к маркерам микросателлитной нестабильности (MSH2, MSH6, MLH1, PMS2), маркерам желудочной/кишечной дифференцировки (MUC2, CDX2, MUC5AC, CD10), молекулам адгезии (Е-кадгерин, β -катенин, Клаудин-1, Клаудин-3, Клаудин-4, CD44), регулятору апоптоза p53, ингибитору контрольных точек иммунитета PD-L1, онкогену HER2, маркерам иммунного микроокружения (CD4, CD8, CD68, CD1a), маркеру вируса Эпштейна-Барр (LMP-1), а также проводили гибридизацию *in situ* с малыми вирусными РНК вируса Эпштейна-Барр (EBER). По результатам анализа выживаемости значимыми независимыми благоприятными прогностическими факторами являются PD-L1(SP142), положительная экспрессия которого сопряжена со снижением шансов летального исхода в 4,35 раз ($p=0,005$) и негативный MMR-статус опухоли, который сопряжен с уменьшением шансов летального исхода в 2 раза ($p=0,05$).

Все случаи рака желудка разделены на 5 молекулярных подтипов: MMR-негативный, EBER-позитивный, Е-кадгерин-аберрантный, CDX2-позитивный и CDX2-негативный. Два из пяти подтипов выделены и охарактеризованы впервые.

SUMMARY

of the doctorate thesis "Development of molecular classification of gastric cancer" by N.V. Danilova.

In the presented dissertation research, the immunohistochemical and prognostic characteristics of gastric cancer were studied. The object of the study were samples of surgical material from 310 patients with gastric cancer who did not receive chemotherapy or radiation therapy in the preoperative period. Each sample was immunohistochemically stained with antibodies to markers of microsatellite instability (MSH2, MSH6, MLH1, PMS2), markers of gastric/intestinal differentiation (MUC2, CDX2, MUC5AC, CD10), adhesion molecules (E-cadherin, β -catenin, Claudin-1, Claudin-3, Claudin-4, CD44), p53 apoptosis regulator, PD-L1 immunity checkpoint inhibitor, HER2 oncogene, immune microenvironment markers (CD4, CD8, CD68, CD1a), Epstein-Barr virus marker (LMP-1), as well as *in situ* hybridization with small viral RNA Epstein-Barr virus (EBER). According to the results significant independent favorable prognostic factors are PD-L1(SP142), which positive expression is associated with a 4.35-fold decrease in the chances of a lethal outcome ($p=0.005$) and a negative MMR status of the tumor, which is associated with a 2-fold decrease in the chances of a lethal outcome ($p=0.05$). All cases of gastric cancer are divided into 5 molecular subtypes: MMR-negative, EBER-positive, E-cadherin-aberrant, CDX2-positive and CDX2-negative. Two of the five subtypes have been identified and characterized for the first time.