

НАО «Започно-Казахстанский медицинский университет»

имени Марата Оспанова

**АННОТАЦИЯ НА ДИССЕРТАЦИОННУЮ РАБОТУ
НА СОИСКАНИЕ СТЕПЕНИ ДОКТОРА ФИЛОСОФИИ (PhD)**

**«Эпидемиологические особенности рака желудка, во взаимосвязи с
показателями клеточных биомаркеров и репарационной активности
двухнитевых разрывов ДНК»**

Специальность: 6D110100 –«Медицина»

ТУЛЯЕВА АНАР БАЛКАШЕВНА

Научный руководитель:

к.м.н, Изтлеуов Е.М.

Научный консультант:

д.м.н., профессор, Бекмухамбетов Е.Ж.

Зарубежный консультант:

д.м.н., профессор, Ираклий Кохреидзе

Тбилисский Государственный Медицинский Университет.

г.Тбилисси. Республика Грузия

Республика Казахстан

Актобе, 2023

АННОТАЦИЯ

Туляевой Анар Балкашовны на тему: «Эпидемиологические особенности рака желудка, во взаимосвязи с показателями клеточных биомаркеров и репарационной активности двухнитевых разрывов ДНК» предоставленной на соискание степени доктора философии (PhD), по специальности 6D110100 –«Медицина».

Научный руководитель: к.м.н., Изтлеуов Е.М.

Научный консультант: д.м.н., профессор Бекмухамбетов Е.Ж.

Зарубежный консультант: д.м.н., профессор Кохреидзе И.

Актуальность:

Рак желудка - один из важных проблем общественного здравоохранения, занимает четвертое место в ряду причин смертности от онкологических заболеваний во всем мире и относится к наиболее распространенной локализации [<https://gco.iarc.fr>]. В развивающихся странах рак желудка встречается в более 70% случаев, а в странах Восточной Азии примерно 50%. В последние десятилетия отмечается, что уровень заболеваемости в Восточной Азии заметно возрос, например, в Монголии, Японии, Корее, тогда как в Северной Америке и Северной Европе, в некоторых регионах Африки показатели заболеваемости оказались значительно ниже [Bray F. et al.,2018]. В Казахстане рак желудка занимает третье место среди диагностируемой онкологической патологии, с инцидентом 15,8/100000 случаев среди обоих полов, и третье место по смертности, с показателем 11,4/100000 случаев смерти от рака желудка [<https://gco.iarc.fr/>].

Имея многофакторную этиологию, с географическими особенностями и гетерогенной структурой, несмотря на последние достижения улучшения вариантов лечения, РЖ остается одним из наиболее трудно излечимых видов рака. Медиана общей выживаемости (ОВ) составляет 10-12 месяцев, а 5-летняя общая выживаемость составляет примерно 5-20% [Thrift A.P.et al.,2020].

Таким образом, существует огромная потребность в поисках практической и прогнатических факторов для идентификации терапевтических мишеней, с увеличением ответа на лечения и продления общей выживаемости. Среди них, область применение биомаркеров обладает высоким потенциалом в помощи прогнозирования, улучшенного мониторинга и оптимального выбора правильного варианта лечения у больных с раком желудка [Abbas M.et al.,2017].

Маркер Ki67 является хорошо известным маркером пролиферации в эволюции клеточной пролиферации. Он широко исследовался как потенциальный прогностический маркер пролиферации в ретроспективных исследованиях злокачественных заболеваний [YangC.et al.,2018]. Клинически было доказано во многих исследованиях, что Ki67 коррелирует с метастазированием и клинической стадией опухолей. Так же было выявлено, что экспрессия Ki67 значительно выше в злокачественных тканях с плохо

дифференцированными опухолевыми клетками, по сравнению с нормальной тканью. В соответствии со своей прогностической ролью экспрессия Ki67 может идентифицировать субпопуляции пациентов, которые с большей вероятностью ответят на определенную терапию лечения [Li L.T.et.al.,2015].

Апоптоз является одним из основных механизмов, проявляющихся в ответ на гибель клеток, и индукция апоптоза в опухолевых клетках означает потенциальную мишень для терапии рака. Уклонение от апоптоза является одним из основных признаков рака, что свою очередь не только повышает устойчивость к противоопухолевой терапии, но и способствует развитию прогрессирования рака. Одним из основных механизмов, лежащих в основе устойчивости к противоопухолевым препаратам, является измененная экспрессия белков семейства Bcl-2. Семейство белков Bcl-2 в значительной степени идентифицировано в нормальных клетках и играет решающую роль в гибели и выживании клеток. Его антиапоптотическая роль и сверхэкспрессия в раковых клетках на сегодняшний день широко изучается [Suvarna V.et al.,2019].

В настоящее время широкое распространение получил «персонализированный подход». В эпоху молекулярной медицины Классификация Лоурен, опубликованная полвека назад, является одним из актуальных морфологических классификаций. Макро и микроскопические различия рака желудка согласно классификацией Лоурен, с эпидемиологической и эпигенетической разновидностью вызывает огромный интерес в исследовании для подбора наиболее эффективной терапии при конкретной опухоли, основываясь на генетическом анализе и уровне экспрессии «особых» белков [Gullo I.et al.,2018].

Одно из перспективных направлений в обеспечении повышения эффективности хирургических методов лечения онкологических больных — разработка методов повышения чувствительности опухолевых клеток к проводимой химиотерапии, которые базируются на использовании дефектов в системе репарации для достижения наиболее результативного противоопухолевого эффекта.

Различные эндогенные и экзогенные агенты, повреждающие ДНК приводят к одноцепочным и двухцепочным разрывам ДНК, включая несоответствия репарации. При не исправности межцепочных и внутрицепочных связей двух нитевых разрывов ДНК, приводит к геномной нестабильности и мутации [Hanahan D.et al.,2011]. Которая является один из признаков для раковых клеток.Чтобы предотвратить этот процесс в клеточной системе запускается ряд комплексных механизмов, называемой реакцией на повреждения ДНК (DDR). При происхождении двухцепочных разрывов ДНК катализируется серин 139, который приводит к фосфорилированию H2AX с связанными белками, накапливается на месте разрывов двух нитевых ДНК [Palla V.V.et.al.,2017].

Также gH2AX играет критическую структурную роль, способствуя современному и эффективному сохранению факторов ремоделирования на месте восстановления. Тем самым помогая удерживать разорванные концы

вместе, предоставляя время для репарации, сводя к минимуму риска неправильной репарации [Okabe A. et al., 2019].

Репарация двухцепочечного разрыва ДНК (DSB) играет решающую роль в поддержании целостности генома [Gillyard T. et al., 2021]. Когда механизмы репарации ДНК нарушаются или дерегулируются, это может увеличить скорость мутагенеза и геномной нестабильности и, таким образом, способствовать прогрессированию рака [Li L. Y. et al., 2021]. Анализ динамики уровня фосфорилированного гистона γ H2AX является одним из современных методов исследования систем репарации ДНК в клетке.

Учитывая особенности генетических преобразований при раке желудка и отражении их на отдаленных последствиях после проведенных оперативных вмешательств и химиотерапии, мы фокусировались на комплексном клиничко-морфологическом изучении течения рака желудка.

Цель исследования - изучить корреляционные взаимосвязи одно- и пятилетней выживаемости при различных типах рака желудка с содержанием клеточных биомаркеров, активностью репарации двухнитевых разрывов ДНК.

Задачи исследования:

1. Провести анализ тренда заболеваемости раком желудка по Актюбинской области на период 2009-2018 гг. (10 лет) и пятилетней выживаемости 2014-2018 гг. (5 лет).
2. Исследовать биомаркеры Ki67, Her2 и BCL2 при различных типах рака желудка (по Lauren), и установить связь с данными пятилетней выживаемости.
3. Изучить взаимосвязь между разрывами и репарацией нитей ДНК (γ H2AX, 53BP1) в лимфоцитах, с клеточными биомаркерами и одногодичной выживаемостью у пациентах раком желудка.

Научная новизна:

1. Впервые установлены региональные особенности заболеваемости раком желудка по Актюбинской области.
2. Установлены корреляционные связи между маркерами пролиферации, регулятором апоптоза, классификацией Lauren с одногодичной и пятилетней выживаемостью при раке желудка.
3. Установлена взаимосвязь между двухнитевыми разрывами и репарации нитей ДНК с содержанием клеточных биомаркеров и одногодичной выживаемостью у больных раком желудка.

Практическая значимость:

1. Применение классификации рака желудка по Lauren, в клинической практике позволит более точно прогнозировать течение и исходы заболевания, так как установлена корреляционная взаимосвязь между гистотипами и выживаемостью.
2. Полученные данные раскрывают механизмы канцерогенеза рака желудка, свидетельствуют о взаимосвязи маркеров пролиферации и апоптоза с выживаемостью. Таким образом, определение биомаркеров позволит персонализировано определить тактику ведения больного в плане объема диагностики и лечения, что отразится на исходах болезни.

3. Результаты исследования двухнитевых разрывов и репарации ДНК при комбинированном лечении рака желудка (операция+химиотерапия) доказали наличие связи репарации с биомаркерами. Тем самым данное исследование позволит применять биоинформационный инструмент для определения мониторинга эффективности лечения.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В Актюбинской области тренд заболеваемости составил - aAPC 3,2%, с потенциалом дальнейшего роста ($p<0,001$). В ретроспективном исследовании, пятилетняя выживаемость составила 28,4%. При общей медиане выживаемости 8,0 месяцев, у молодых лиц отмечалась худшая медиана выживаемости - 5,0 месяцев, $p=0,008$. Выявлено достоверное различие пятилетней выживаемости среди подтипов классификация Lauren. Интерстициальный тип - 30,7%, Диффузный тип - 25,9%, Смешанный тип - 19,5%, $p=0,047$.

2. В поперечном исследовании: Диффузный тип составил 61% и выявлен при запущенных формах РЖ, тогда как интерстициальный тип составил 39%, при общей низкой 5-летней выживаемости, составившей 21%. Это в свою очередь подчёркивает эпидемиологические и эпигенетические различия в классификации Lauren. Высокий индекс Ki67 $>50\%$ связан с низкой дифференцировкой опухоли ($p=0,005$), Her2+ с лимфогенным метастазированием ($p=0,027$). Биомаркер BCL2 не взаимосвязан с клинико-патологической характеристикой РЖ. При BCL2+ выявлена высокая 1-годовая выживаемость (61%), в отличие BCL2- которая составила 30%. Наилучшая 5-летняя выживаемость среди всех биомаркеров отмечается при BCL2 положительных пациентов - 25,4% ($p<0,0001$).

При индексе Ki67 $<50\%/BCL2+$ риск быстрого наступления неблагоприятного исхода ниже на 50% по сравнению с Ki67 $>50\%/BCL2-$ ($p=0,0002$).

3. В пилотном исследовании: после гастрэктомии с лимфодиссекцией в объеме Д2, при сравнении количественных показателей параметров двухнитевых разрывов ДНК в лимфоцитах ($\gamma H2AX$), отмечается положительная обратно пропорциональная связь с количеством разрывов и иммунореактивностью BCL2, $r=-0,504$ ($p=0,003$). Тогда как 53BP1 (репарация) в параметре «количество репарации на клетку» положительно коррелирует с BCL2, $r=0,280$ ($p=0,029$). После комбинированного лечения отмечается увеличение репарационной активности двух нитевых разрывов ДНК (53BP1) с BCL2+ пациентов, $r=0,263$ ($p=0,04$). Самая высокая одногодичная выживаемость среди всех биомаркеров при BCL2+ 51,5% ($p=0,019$).

Апробация работы:

Основные положения диссертационной работы представлены и обсуждены на следующих мероприятиях:

- VI международной научной конференции молодых ученых и студентов, инициированной Фондом Первого Президента Казахстана – Елбасы и Южно-

Казахстанской медицинской академией, «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (7-8 декабря 2018 года, г.Шымкент, Казахстан).

- VIII Ежегодной Международной Научно-Практической Конференции «Актуальные вопросы медицины» и «Спутниковый форум по общественному здоровью и политике здравоохранения» (10-12 апреля 2019, г.Баку, Азербайджан).

-III Международной научно-образовательной конференции «Интернационализация непрерывного медицинского образования. Взгляд в будущее» (25-26 апреля 2019 года, г.Актобе, Казахстан).

- The Second International Scientific-Practical Virtual Conference-Modern Medicine: Problems, Prognoses and Solutions.(18-20 декабря 2020года, г.Алма-Ата, Казахстан)

- XVII International Symposium on Morphological Sciences - ISMS 2021 (27-30 мая 2021года, г.Алма-Ата, Казахстан).

Публикации по теме диссертации: По теме диссертации опубликовано 8 работ. В том числе 3 работы в материалах международных научно-практических конференций, 1 статья в международном журнале, 3 статьи в научных изданиях, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере образования и науки МОН РК. (Астана медицина журналы, Наука и здравоохранение, Вестник КазНМУ). Публикации на международных конференциях – 4 (из них 2 в журнале, индексируемом в информационной базе Scopus, 1 в журнале индексируемом в информационной базе Web of Science).

Внедрение результатов исследования:

Материалы диссертации используются в учебном процессе на кафедре онкологии НАО Западно Казахстанский Медицинский Университет имени Марата Оспанова. (Приложение А)

Методическая рекомендация «Основные диагностические ценности использования классификации рака желудка по Lauren». Ученый совет от 31.01.23 №5(802), ISBN9786017650629, (Актобе,2023)

Личный вклад автора:

Автор принимала участие во всех этапах исследования: от постановки цели исследования, задач, разработки дизайна, протокола. Получение информированного согласия, активное участие в исследовании. Автором проведён литературный поиск, составление базы данных, статистическая обработка с последующей интерпретацией.

Объем и структура диссертации: Диссертационная работа изложена на 152 страницах и состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов исследования, результатов исследования соответственно поставленным задачам. Диссертация содержит 21 таблицы, 27 рисунков, 2 схемы, 23 графика. Список использованной литературы включает 339 источников, из которых 2 на казахском, 8 на русском, 329 на иностранных языках.

Дизайн исследования:

Ретроспективное, поперечное и пилотное исследования.

Исследование проводилось на базе Медицинского Центра НАО «Западно Казахстанский Медицинский Университет имени Марата Оспанова» города Актобе в период с 2017 по 2021 гг. Все пациенты являются жителями Актыбинской области. В исследование включены пациенты осмотренные, обсуждённые мультидисциплинарной группой согласно протоколу диагностики и лечения рака желудка МЗ РК от 2017 года № 56, всем пациентам было назначено оперативное лечение. В исследование включено в общем 1617 пациента:

1. Ретроспективное исследование: 1454 впервые выявленные пациенты с РЖ, обеих полов.

2. Поперечное исследование: 159 пациентов мужчин и женщин в возрасте от 18 до 78 лет с диагностированным раком желудка перенёвшие и подготавливаемые на оперативное вмешательство.

3. Пилотное исследование: 30 условно здоровые пациенты и 30 пациентов старше 18 лет, обеих полов с диагностированным раком желудка получившие комбинированное лечение.

Исследование проводилось на 3 этапа. До операции, после операции, после 1 курса химиотерапии.

3.1.1 Этическое одобрение: Исследование одобрено Биоэтической комиссии НАО ЗКМУ имени Марата Оспанова Протокол №24 от 03.10.2017, утвержден протокол исследования и этические документы: форма информированного согласия пациента (Приложение Б). Работа с использованием данных электронного регистра онкологических больных проводилось с соблюдением правил биотических норм. Исследование у пациентов проводилось после добровольного информированного согласия, с соблюдением всех принципов Хельсинской декларации. Дизайн и Протокол исследования были одобрены на заседании локальной биоэтической экспертной комиссии при ЗКМУ имени Марата Оспанова (Протокол №24 от 03.10.17).

Диссертационная работа выполнялась в рамках внутривузовской научно-технической программы «Анализ эпидемиологической ситуации и мониторинг лечения онкологических заболеваний методом репарации двухнитевых разрывов ДНК в лимфоцитах на примере рака желудка и молочной железы» № гос. регистрации 12/4-1-17/163 от 30.01.2018.

Дизайн исследования 1 задачи: Ретроспективное когортное исследование

Сплошная выборка. Ретроспективное исследование динамики заболеваемости РЖ по Актыбинской области проведено на основании анализа электронного регистра онкологических больных за 2009-2018 гг. В исследовании динамики заболеваемости включено 1454 впервые выявленных случая РЖ среди обоих полов. В исследование анализа выживаемости включено 762 медицинских карт пациентов, получивших лечение по поводу рака желудка.

Составлена Excell база данных, включающая: паспортные данные пациента, группирование пациентов по виду лечения, по срокам от начала заболевания,

установки диагноза и даты смерти, по гистологическому типу опухоли. Исследование проводилось согласно критериями включения и исключения.

Статистический анализ: Численность населения по Актюбинской области для проведения статистических расчетов была взята из базы Комитета по статистике Министерства национальной экономики РК: «Численность населения Республики Казахстан по областям, городам и районам на 01.01.2009-01.01.2018». Расчёты проводились в программе Statistica.10 (Dell Technologies, Round Rock, Texas, США), а также в программе SPSS.v.25. Для всех тестов двусторонняя ошибка типа I $p=0,05$ при 95% доверительном интервале (ДИ) считалась статистически значимой. Грубый (rough) показатель заболеваемости РЖ (на 100 000 человек) вычислен общепринятыми статистическими методами.

Тренды заболеваемости определены методом наименьших квадратов. Среднегодовой темп прироста (Тпр), процентные изменения оценивались методом линейного регрессионного анализа, включая прогностический индекс на 2019-2020 годы. Изменения в показателях заболеваемости были представлены в качестве сводного показателя тенденции за фиксированный период времени и выражены в виде средних ежегодных изменений в процентах (Annual Percent Change). Показатели пятилетней выживаемости оценивались с помощью общепринятых Анализ Каплана-Мейера с определением различий между группами с помощью лонгрангового критерия с 95% доверительными интервалами.

Дизайн исследования 2 задачи: Поперечное исследование

Случайная выборка. В исследование включено 159 пациентов в возрасте от 18 до 78 лет. Проживающие в Актюбинской области с впервые диагностированным раком желудка. Всем пациентам в период с 01.01.2018 по 01.06.2021 в МЦ ЗКМУ имени Марата Оспанова проведено оперативное лечение. Исследование проводилось согласно критериями включения и исключения.

Статистический анализ:

Репрезентативная выборка составила 151 человек + 30%. Онлайн калькулятор <http://www.raosoft.com/>. По учётным документам 07/у формы (гистологически верифицированные впервые выявленные) за 2018 год выявлено 164 пациентов с диагнозом РЖ в Актюбинской области. То есть 11% из всей впервые выявленной онкологической патологии за 2018 г.

Непрерывные переменные были представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение; медиана (межквартильный диапазон) и категориальные переменные в виде количества (в процентах), с расчётом 95% доверительный интервала. Клинико-патологические факторы в разных подгруппах по комбинированной экспрессии VCL2, Ki-67% Her2 сравнивали с использованием непараметрический критерия χ^2 (Пирсон X) или анализ дисперсионного теста в зависимости от типа данных.

Согласно данным Шарашова Е. и соавторов анализ выживаемости определяется двумя методами: использование таблиц дожития (Life tables), метод Каплана–Мейера (Kaplan–Meier analysis). Были построены кривые

выживаемости Каплана–Мейера, стратифицированные по экспрессии маркеров, и с помощью лонгрангового критерия были изучены прогностические различия между группами. Лонгранговый(Longrank) критерий способен определять межгрупповые различия одиночно, по сравнению критерий Бреслоу(Breslow) который определяет ранее межгрупповые различия и критерий Тарон Уаре(TaronWare) который определяют поздние межгрупповые различия.

Мы использовали Унивариантный (Univariableanalysis) и Мультивариантный анализы (Multivariableanalysis) регрессии пропорциональных рисков Кокса [Bradburn MJ et all., 2003]. Данные анализировались с использованием статистического программного обеспечения R (v. 4.1.0, Вена, Австрия). (<https://www.r-project.org/>). Результаты были статистически значимым при значении $p < 0,05$.

Дизайн исследования третьей задачи: Пилотное исследование.

Удобная выборка. В исследование включено 30 пациентов в возрасте от 20 лет до 76 лет, с впервые диагностированным раком желудка любой степени выраженности (N30), осмотренные и обсуждённые на мультидисциплинарной группе, имеющие показания к лечению согласно протоколу диагностики и лечения онкологических больных РК от 01.03.2019г.№56. Исследование проводилось в период с 09.2020 года по 08.2021 года в МЦ ЗКМУ имени Марата Оспанова. Исследование проводилось согласно критериями включения и исключения.

Метод исследования:

В пилотном исследовании первым этапом участвовало №30 условно здоровые и №30 пациенты с морфологически подтвержденным диагнозом рак желудка. У всех пациентов после получения информированного согласия, произведён забор периферической крови в вакутейнер с ЭДТА2.

Вторым этапом пациентам с РЖ(N30) в динамике лечения проводилось исследования двухнитевых разрывов и репарационной активности ДНК в лимфоцитах (γ H2AX,53BP1) на аппарате AKLIDES.

В контрольной группе условно здоровых пациентов забор крови произведено однократно. В основной группе исследование проводилось на 3 этапа.1 точка за день до операции. 2 точка после операции на 9 сутки (учитывая ранее после операционные осложнения)[209].3 точка на 7 сутки после 1 курса адьювантной химиотерапии.

Основная методика на данном этапе: исследование оценки репарации двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах крови, непрямым иммунофлюоресцентным анализом при помощи системы γ H2AX, 53BP1 foci на аппарате AKLIDES® (Germany/Medipan). Иммуногистохимическое исследования ткани желудка проведено только в исследуемой группе. Вырезка, подготовка тканей и протоколы окраски, микроскопирование соблюдены такие же как в проспективном исследовании.

Статистическая обработка: результатов проведена в программе Statistica.10 (Dell Technologies, Round Rock, Техас, США), а также в программе SPSS.v.25. Количественные показатели представлены в виде M

(СО), где M – среднее значение, 95% ДИ, СО – стандартное отклонение. Для показателей, характеризующих качественные признаки, указаны абсолютное число и относительная величина в процентах (%). Для проверки двух не связанных групп мы использовали критерий Мани Уитни. (Контрольная группа условно здоровых №30, основная группа пациенты в первые выявленные с верифицированным диагнозом РЖ №30). Для определения чувствительности и специфичности теста мы использовали ROC анализ.

Для проверки нормальности распределения исследуемых количественных показателей в группах использовали критерий согласия Колмогорова-Смирнова. Если распределение исследуемых числовых показателей отличался от нормального, то значимость различий для связанных выборок проверялась при помощи непараметрическим аналогом дисперсионного анализа повторных измерений-ранговый Дисперсионного анализа Фридмана. С применением коэффициента конкордации Кендала.

Статистическая мощность при выборке №30 составила 80% при уровне доверительной вероятности 95%, коэффициент корреляции 0,5 [Гржибовский А.М., 2020]. Для определения существования связей между качественным ранговым параметром биомаркера BCL2 и количественными параметрами γ H2AX, 53BP1 мы вычисляли коэффициент корреляции Tau Кендалла.

Для определения существования связей между качественными параметрами биомаркеров Her2, Ki67% и количественными параметрами γ H2AX, 53BP1 foci для малой выборки внутри 30 пациентов с РЖ, мы вычисляли непараметрический критерий Wald-Wolfowitz. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Были построены кривые выживаемости Каплана–Мейера, стратифицированные по экспрессии маркеров, и с помощью логарифмического критерия были изучены прогностические различия между группами. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Для выявления влияния на выживаемость в параметрах разрывов и репарации ДНК мы использовали многофакторный смешанный анализ пропорциональных рисков Кокса (Proportional hazard mixed Cox model) [Husain H, et al., 208]. Данные анализировались с использованием статистического программного обеспечения R (v.4.1.0., Вена, Австрия). (<https://www.r-project.org/>). Medcalc.

Результаты исследования:

Ретроспективное когортное исследование:

Общая заболеваемость РЖ увеличилась с 19,2 до 29,3 и составила в среднем 25,8 (R^2 0.65) при аАРС 3,2% и с потенциалом дальнейшего роста (30,4 к 2020 году, $p < 0.001$). Преобладали некардиальная локализация (17,8, $p < 0.001$, аАРС 6,4%) и кишечный тип опухоли (17,0, $p < 0.001$, аАРС 7,35%). Наблюдаемая общая пятилетняя выживаемость составила 28,4% [95% ДИ 24,5; 32,3] при медиане выживаемости 8,0 месяцев [95% ДИ 6,6; 9,4]. Группы в возрасте 40-49 лет и 70+ имели самые низкие показатели (24,4% и 22,1% соответственно, лонгранговый критерий $p = 0,008$), но самые молодые люди (18-39 лет) показали худшую медиану выживаемости - 5,0 месяцев после постановки диагноза при выживаемости 29,4%. Своевременное обращение за медицинской помощью и получения соответствующее лечение для пациентов

с раком желудка несомненно имеет значения в общей пятилетней выживаемости (50% против 7% лонгранговый критерий $p < 0.001$). По морфологическому типу согласно результатам классификации Лоурен, которое свою очередь эпидемиологический и эпигенетический различен под типами по влияла на общую пятилетнюю выживаемость (30,7% против 25,9% и 19,5% лонгранговый критерий $p < 0.047$).

Поперечное исследование: Согласно нашему поперечному исследованию (159 пациентов) средний возраст составил 59 лет [95%ДИ: 57.43:60.29] (ранг: 29-80 лет). Заболеваемость у мужчин в 2 раза чаще чем у женщин. 98 пациентов (61%) имели местно распространённый РЖ. Соотношение местно распространённого РЖ и распространённого РЖ составила (0,79; 70/89). Большинство пациентов при участии в исследовании имели III стадию (68,55%) с низкой дифференцированной опухолью - 66%. По классификации Лоурен диффузные и смешанные РЖ выявлено 2 раза больше, чем кишечный тип РЖ (61% против 38,36%). Одна треть пациентов имели самую высокую активность биомаркера пролиферации Ki 67%: индекс 76-100% (38,36%), а самая низкая пролиферативная активность составила - 6,92%. Her2 позитивные опухоли составили 15% из всех 159 пациентов с РЖ. Биомаркер апоптоза BCL2 в 52% был отрицательный, а в 48% - положительный.

Клинико патологическая характеристика маркера Ki67%:

Позитивная экспрессия Ki67% было выявлено у всех 159 пациентов с РЖ. Согласно данным индекс пролиферация Ki 67% не имеет статистическую связь с возрастом, полом, pTNM, классификацией, биомаркерами BCL-2 и Her2. Однако, отмечается сильная статистическая связь с низко дифференцированными опухолями - 29% ($p = 0,005$).

Клинико патологическая характеристика маркера BCL-2:

Позитивная экспрессия BCL-2 была выявлена в 49% (77/159) из тканей опухолей желудка и в 82 случая отрицательной экспрессии иммуногистохимического окрашивания. Не было выявлено статистический значимой зависимости в клинико патологической характеристике РЖ.

Клинико патологическая характеристика маркера Her2:

Позитивная экспрессия Her2 было выявлено у 14% (159/25) пациентов с РЖ. Согласно данным Her2 отмечается статистическая связь между лимфогенным поражением лимфоузлов, $p = 0,027$.

Одногодичная и пятилетняя выживаемость у пациентов с РЖ:

Общая одногодичная выживаемость составила 48% [95%ДИ: 0.45-0.52], пятилетняя выживаемость составила 18% [95%ДИ: 7.38-14.65]. Медиана выживаемости составляет 11 месяцев.

Выживаемость в зависимости от количества маркера BCL-2:

В основной группе у пациентов с низкой иммунореактивностью BCL-2, общая 1-годичная выживаемость больных составила 30% [95%ДИ: 21.03-43.30], 5-летняя выживаемость - 12,49% [95%ДИ: 14.60-25.67] медиана выживаемости 12 [95%ДИ: 8.69-15.30] месяцев. Во второй группе пациентов с высокой иммунореактивностью BCL-2 общая 1-годичная выживаемость составила 61% [95%ДИ: 50.0-74.5], 5-летняя выживаемость - 25,40% [95%ДИ:

20.61-22.31] медиана выживаемости 23 [95%ДИ: 7.95-39.04] месяцев. Отмечается высокая выживаемость у пациентов с повышенной иммунореактивностью VCL-2 по сравнению низкой иммунореактивностью VCL-2, со сильной статистической связью ($p < 0,0001$)

Выживаемость в зависимости от соотношении количество маркеров Ki67%/VCL-2: У пациентов первой группе с $Ki67 > 50\%$ / VCL2отр, общая 1-годичная выживаемость больных составила 37% [95%ДИ: 26-54], 5-летняя выживаемость – 11,75% [95%ДИ: 8,9-14,6] медиана выживаемости 9 [95%ДИ: 6,23-11,77] месяцев. У пациентов с $Ki67 < 50\%$ / VCL2 полож. общая 1-годичная выживаемость составила 71% [95%ДИ: 54-92], 5-летняя выживаемость - 31,32% [95%ДИ: 23,41-39,23] медиана выживаемости 33 [95%ДИ: 18,68-47,32] месяцев. У пациентов с $Ki67 > 50\%$ / VCL2 полож. общая 1-годичная выживаемость составила 55% [95%ДИ: 41-73], 5-летняя выживаемость – 20,8% [95%ДИ: 15,53-26,06] медиана выживаемости 15 [95%ДИ: 1,6-28,4] месяцев. У пациентов $Ki67\% < 50\%$ / VCL2 отрицательным показателем общая 1-годичная выживаемость составила 51% [95%ДИ: 33-76], 5-летняя выживаемость – 11,76% [95%ДИ: 4,81-18,71] медиана выживаемости составила 7 [95%ДИ: 3,63-10,36] месяцев. $p < 0,0001$

Унивариантный и мультивариантный анализ пропорциональных рисков Сох:

В группе $Ki67\% < 50\%$ / VCL2 положительный: на 74% ниже риск быстрого наступления неблагоприятного исхода, по сравнению с группой $Ki67\% > 50\%$ / VCL2 отрицательный, с сильной статистической связью [ОШ 0,26 95%ДИ: 0,13-0,53 $p = 0,0002$]. При мультивариантном анализе, также на 66% ниже риск быстрого наступления неблагоприятного исхода, однако статистической связи не имеется [ОШ 0,35 95%ДИ: 0,01-8,20 $p = 0,514$].

В группе $Ki67\% > 50\%$ / VCL2 положительный: на 48% ниже риск быстрого наступления неблагоприятного исхода, по сравнению с группой $Ki67\% > 50\%$ / VCL2 отрицательный, с сильной статистической связью [ОШ 0,52 95%ДИ: 0,31-0,85 $p = 0,00985$]. При мультивариантном анализе также на 66% ниже риск быстрого наступления неблагоприятного исхода, с сильной статистической связью [ОШ 0,29 95%ДИ: 0,10-0,80 $p = 0,017$].

В группе $Ki67\% < 50\%$ / VCL2 отрицательный: на 16% выше риск быстрого наступления неблагоприятного исхода, по сравнению с группой $Ki67\% > 50\%$ / VCL2 отрицательный [ОШ 1,16 95%ДИ: 0,67-2,02 $p = 0,581$]. При мультивариантном анализе, также на 2% выше риск быстрого наступления неблагоприятного исхода, однако статистической связи не имеется [ОШ 1,02 95%ДИ: 0,04-24,01 $p = 0,990$].

Пилотное исследование:

В исследование вошли 30 пациентов, получивших лечение по поводу РЖ с сентября 2018 по август 2021 года; средний возраст составил 62,13 года (от 20 лет до 76 лет). Для категоризации опухолей использовалась международная TNM классификация, гистологическая классификация рака желудка по Lauren. У большинства пациентов отмечалась наиболее агрессивная форма РЖ (Диффузный тип РЖ 53,33%). По pTNM

классификации Локальный РЖ составил 60% (IA, IB, IIA, IIB). Лимфогенное метастазирование отмечалась у 56,67% пациентов. Около 60% пациентом выполнена Стандартная гастроэктомия с лимфодиссекцией в объеме Д2. Некардиальный отдел РЖ превалировал по сравнению с кардиальным отделом РЖ (56,66% против 43,33%). При иммуногистохимическом исследовании, положительная иммунореактивность биомаркера VCL2 отмечалась у 63,33% пациентов. Также положительная иммунореактивность биомаркера HER 2 у 13,33%. Проллиферативная активность РЖ на 2/3 являлось очень агрессивной (Биомаркер Ki67% больше 50% составил у 19 человек).

Результаты корреляционные связи с биомаркером Ki67% со всеми параметрами двунитевых разрывов ДНК(γ H2AX):

Согласно данным, один из главных параметров, среднее значение всех очагов разрывов в клетке имеет статистические различия между двумя группами $p=0,04$, С последующим оперативным лечением, также отмечается статистические различия $p=0,001$. В ядрах повышенной интенсивности сечения выявлено статистически значимые различия с биомаркером Ki67% (между группой №1 с низким пролиферативной активности $>50\%$ и второй группой $<50\%$) $p=0,01$. и средним значением интенсивности свечения разрывов в условных единицах, после оперативного лечения ($p=0,023$). После оперативного лечения отмечается увеличение показателей в группе Ki67% >50 в среднем значение интенсивности свечения разрывов в условных единицах, $p=0,04$. Также выявлены различия в среднем количестве разрывов на клетку до операции, $p=0,04$. После оперативного вмешательства отмечается уменьшение в разрывах у пациентов с Ki67% $<50\%$, $p=0,001$.

Результаты корреляционные связи с биомаркером Ki67% со всеми параметрами двунитевых репарации ДНК (53BP1): не выявлено статистической связи.

Результаты корреляционные связи с биомаркером Her2 со всеми параметрами двунитевых разрывов ДНК (γ H2AX): Согласно данным в количестве посчитанных ядер разрыва 2-х нитевых ДНК выявлены различия после комбинированного лечения и корреляционной связи между группами Her2 положительных и Her2 отрицательных групп, $p=0,04$. Также отмечается различия в среднем значении всех низких очагов разрыва в условных единицах после комбинированного лечения между двумя группами $p=0,04$. В группе Her 2 положительных пациентов выявлено намного больше среднего значения низкой интенсивности всех очагов разрыва в кластере после комбинированного лечения $p=0,04$. Также опухолью поврежденных клетках в группе Her 2 положительных пациентов с рж имеется больше разрывов после комбинированного лечения по сравнению в группе Her2 отрицательных пациентов, $p=0,04$

Результаты корреляционные связи с биомаркером Her2 со всеми параметрами двунитевых репарации ДНК (53BP1): Между группой №1 положительным и №2 группой отрицательным иммунореактивностью, отмечается статистически значимые различия в среднем значении низкой

интенсивности всех очагов репарации двухнитевых разрывов ДНК в кластере, в условных единицах после комбинированного лечения, $p=0,013$.

Результаты корреляционные связи с биомаркером BCL2 со всеми параметрами двух нитевых разрывов ДНК (γ H2AX): Согласно данным, выявлена слабая связь с биомаркером BCL2 и средним значением интенсивности свечения разрывов в условных единицах, $p=0,02$. При сравнения количественных показателей параметров двухнитевых разрывов ДНК в лимфоцитах (γ H2AX), отмечается обратно пропорциональная связь $r=-0,5046$ с количеством разрывов и иммунореактивностью BCL2, $p=0,003$.

Результаты корреляционные связи с биомаркером BCL2 со всех параметров репарации двунитевых разрывов ДНК (53BP1):

Выявлена слабая корреляция со статистической значимостью между биомаркером BCL2 и средним количеством репарации на клетку после операции, $p=0,029$. После 1 курса химиотерапии отмечается слабая связь с статистической значимостью между биомаркером BCL2 и средним количестве репарации на клетку, $p=0,04$. Также, слабая корреляционная связь ($r=0,357$) с общим количеством репарации и иммунореактивностью BCL2, $p=0,05$. **Анализ выживаемости проводился в соответствии с методом Каплан-Майера.** Одногодичная выживаемость в исследуемой группе составила 51,5% [95CI% ДИ: 49,1-87,5]. В одногодичной выживаемости по Каплан-Майеру статистически достоверная разница была показана для биомаркера BCL2 ($p = 0,019$)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

РЖ занимает один из главных мест среди всех раков. Молчаливым, агрессивным течением, с дальнейшим ростом, проявляет низкой пятилетней выживаемостью. Биология рака очень сложна, на сегодняшний день РЖ является один из трудноизлечимых раков. Что свою очередь требует поиск биомаркеров для прогноза и выбора дальнейшего лечения. В своем исследовании мы использовали биомаркеры пролиферативной активности (Ki67%), маркер ангиогенеза (Her2) и антипролиферативный белок, регулятор апоптоза (BCL2). В молекулярном уровне, мы использовали маркеры γ H2AX, 53BP1 для понимания DNA Damage Responce связи с гетерогенной структуры РЖ и возможного поиска ответа низкой выживаемости. Таким образом, на основании полученных результатов проведенного нами исследования можно сделать следующие выводы:

1. Общая заболеваемость РЖ увеличилась с 19,2 до 29,3 и составила в среднем 25,8 ($R^2 0,65$) при аАРС 3,2% и с потенциалом дальнейшего роста (30,4 к 2020 году, $p<0.001$). Преобладали некардиальная локализация (17,8, $p<0.001$, аАРС 6,4%) и интерстициальный тип опухоли (17,0, $p<0.001$, аАРС 7,35%). Наблюдаемая общая пятилетняя выживаемость составила 28,4% [95% ДИ 24,5;32,3] при медиане выживаемости 8,0 месяцев [95% ДИ 6,6;9,4]. Группы в возрасте 40-49 лет и 70+ имели самые низкие показатели (24,4% и 22,1% соответственно, лонгранговый критерий $p=0,008$), но самые молодые люди (18-39 лет) показали худшую медиану выживаемости - 5,0 месяцев

после постановки диагноза при выживаемости 29,4%. По морфологическому типу согласно результатам классификации Лоурен, которое свою очередь эпидемиологически и эпигенетически различен под типами повлияла на общую пятилетнюю выживаемость (30,7% против 25,9% и 19,5%, лонгранговый критерий $p < 0,047$).

2. Местно распространенная форма было выявлено у диффузного типа (61%), тогда как интестинальный тип был выявлен с начальными стадиями РЖ ($p = 0,005$). Отмечается высокая пролиферативная активность Ki67, у 107 пациентов из 159 отмечается Ki67 $> 50\%$. Индекс Ki67 (50-75%) коррелирует с низко дифференцированной опухолью ($p = 0,005$). Маркер Her2 коррелирует с лимфогенным метастазированием ($p = 0,027$). Маркер VCL2 не коррелирует с клинико-патологическими характеристиками РЖ. При VCL2+ отмечается высокая 1-годичная и 5-летняя выживаемость ($p < 0,0001$), и риск быстрого наступления неблагоприятного исхода на 50% ниже, по сравнению с VCL2neg ($p = 0,04$). Индекс соотношения Ki67/VCL2 имеет различия в 1-годичной и 5-летней выживаемостью, $p < 0,0001$. Соотношение маркеров Ki67neg/ VCL2+ уменьшает риск быстрого наступления неблагоприятного исхода на 74%, по сравнению с группой Ki67+/Vcl2neg ($p = 0,0002$).

3. Отмечаются статистически значимые различия в параметрах двухнитевых разрывов и репарации ДНК, между условно здоровыми и пациентами с РЖ. По биомаркеру Ki67, между Ki67 $> 50\%$ и Ki67 $< 50\%$ в параметре (γ H2AX) «среднее значение всех очагов разрывов в клетке» отмечаются различия до операции ($p = 0,04$). Также различия, в увеличении γ H2AX после оперативного лечения при Ki67 $> 50\%$ пациентов с РЖ ($p = 0,001$). Между первой группой с низкой пролиферативной активностью $< 50\%$ и второй группой $> 50\%$ выявлены различия в параметре «средним значением интенсивности свечения разрывов в у.е.», после оперативного лечения, $p = 0,023$.

По биомаркеру Her2, были выявлены увеличения γ H2AX, в параметре «среднее значение всех низких очагов разрывов в у.е.» после комбинированного лечения, у Her2 положительных пациентов ($p = 0,04$). Но после комбинированного лечения отмечаются различия 53BP1, в увеличении параметра «среднее значение всех низких очагов репарации в у.е.» у Her2neg пациентов ($p = 0,01$).

По биомаркеру VCL2, после комбинированного лечения выявлена обратно пропорциональная связь γ H2AX в параметре «среднее значение интенсивности разрывов для всех очагов в у.е.» и иммунореактивностью VCL2+ ($r = -0,285$, $p = 0,03$). После оперативного лечения отмечается связь 53BP1 в параметре «среднее количество репарации на клетку» и иммунореактивностью VCL2 ($r = 0,280$, $p = 0,029$). Далее после комбинированного лечения в параметре «среднее количество репарации на клетку» выявлена связь ($r = 0,263$, $p = 0,04$). Среди всех биомаркеров наилучшая одногодичная выживаемость выявлена при VCL2+, которая составила 51,5% ($p = 0,0019$).