

# АССОЦИАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ОСНОВНЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ РАЗВИТИЯ РАКА ЖЕЛУДКА С ЕГО МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ

Ф.М. Кипкеева<sup>1</sup>, Т.А. Музаффарова<sup>1</sup>, М.П. Никулин<sup>2</sup>, П.В. Апанович<sup>1</sup>, С.Н. Неред<sup>2</sup>, М.Н. Нариманов<sup>2</sup>,  
О.А. Малихова<sup>2</sup>, Т.А. Богуш<sup>2</sup>, И.С. Стилиди<sup>2</sup>, А.В. Карпукхин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; Россия, 115478 Москва, ул. Москворечье, 1;

<sup>2</sup>ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

**Контакты:** Фатима Магомедовна Кипкеева [For\\_k@mail.ru](mailto:For_k@mail.ru)

**Цель исследования** — выявление генов, экспрессия которых ассоциирована с метастазированием опухоли рака желудка (РЖ). **Материалы и методы.** Использовали метод количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени на парных образцах опухоль — норма.

**Результаты.** Показана ассоциация с метастазированием экспрессии генов VEGF R1, FGFR2 и NRP-1. Значение отношения шансов (ОШ) оказалось наибольшим для гена FGFR2: ОШ 175,00; 95 % доверительный интервал (ДИ) 8,972–3413,271; для гена VEGFR1 — ОШ 4,622; 95 % ДИ 1,240–17,227, для NRP1 — ОШ 2,667; 95 % ДИ 0,597–11,915. При оценке совместно повышенной экспрессии генов VEGFR1 и NRP1 — ОШ 5,778; 95 % ДИ 1,393–23,909;  $p = 0,0147$ . Частота повышенной экспрессии FGFR2 составила 5 % при диссеминированном РЖ, в то время как при локализованном РЖ она достигает 53 %.

**Заключение.** Разрабатываемый таргетный препарат против FGFR2, скорее всего, при диссеминированном РЖ будет иметь ограниченную 5–10 % частоту эффективного действия. Его применение на ранних стадиях РЖ может способствовать предотвращению перехода опухоли в метастатическую стадию. Возможное взаимодействие VEGFR1 и NRP1 будет приводить к небольшому вкладу в метастазирование РЖ по сравнению с влиянием экспрессии только VEGFR1.

**Ключевые слова:** рак желудка, метастазирование, экспрессия генов

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-106-110

## ASSOCIATION OF GASTRIC CANCER MAIN SIGNALING PATHWAY GENE EXPRESSION WITH METASTASIS

F.M. Kipkeeva<sup>1</sup>, T.A. Muzaffarova<sup>1</sup>, M.P. Nikulin<sup>2</sup>, P.V. Apanovich<sup>1</sup>, S.N. Nered<sup>2</sup>, M.N. Narimanov<sup>2</sup>,  
O.A. Malikhova<sup>2</sup>, T.A. Bogush<sup>2</sup>, I.S. Stilidi<sup>2</sup>, A.V. Karpukhin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorechie St., Moscow 115478, Russia;

<sup>2</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe shosse, Moscow 115478, Russia

**Objective of the study.** Identification of genes, the expression of which is associated with the metastasis of gastric cancer tumor.

**Materials and methods.** Quantitative real-time PCR on paired tumor — normal samples.

**Results.** An association with the metastasis of the VEGFR1, FGFR2 and NRP-1 gene expression is shown. The odds ratio (OR) was the highest for the FGFR2 gene: OR 175.00; 95 % CI 8.972–3413.271; for the VEGFR1 gene, OR 4.622, 95 % CI 1.240–17.227, for NRP1 — OR 2.667; 95 % CI 0.597–11.915. When assessing the jointly elevated expression of VEGFR1 and NRP1 genes, OR 5,778; 95 % CI 1.393–23.909;  $p = 0.0147$ . The frequency of increased expression of FGFR2 was 5 % in case of metastasis, while in the case of localized GC it reached 53 %.

**Conclusion.** The target drug against FGFR2, which is being developed, is likely to have a limited 5–10 % frequency of effective action in metastatic GC. Its use in the early stages of GC can help prevent the transition of the tumor to the metastatic stage. The possible interaction of VEGFR1 and NRP1 will result in a small contribution to the metastasis of GC as compared to the effect of VEGFR1-only expression.

**Key words:** gastric cancer, metastasis, gene expression

### Введение

Рак желудка (РЖ) относится к наиболее распространенным типам онкологических заболеваний, занимает 4-е место в мире по частоте случаев и характеризуется плохой выживаемостью [1].

Одной из причин высокой смертности больных РЖ является частый переход болезни в метастатическую стадию. В связи с этим весьма актуальным является выявление генов, ассоциированных с метастазированием опухоли. Знание таких генов и особенностей

их функционирования при переходе к диссеминированному состоянию позволит персонифицировать терапию и, следовательно, повысить ее эффективность. При этом могут открываться перспективы терапии не только метастатического РЖ, но и более ранних его стадий для предотвращения образования метастазов. Кроме того, такие гены могут быть источником биомаркеров, сигнализирующих о повышенном риске метастазирования опухоли.

В терапии разных типов рака в настоящее время активно используются таргетные препараты, воздействующие на конкретные гены-мишени. При РЖ используют таргетные препараты трастузумаб — моноклональное антитело против HER2 — и рамцирумаб, ингибирующий тирозинкиназный рецептор VEGFR2. Кроме того, разрабатываются средства терапии, направленные на другие гены-мишени, относящиеся к основным путям развития РЖ — PI3K-AKT-mTOR и RAS-RAF-MEK. В качестве мишеней при этом чаще всего рассматриваются ростовые факторы и их рецепторы. К таковым относятся эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста фибробластов (FGF), трансформирующий фактор роста (TGF- $\beta$ ), нейропипин1 (NRP1) [2, 3]. Последний из указанных способен связываться с разными лигандами (TGF- $\beta$ , FGF) и рецепторами VEGF (VEGFR1 и VEGFR2), модулируя их активность [4].

**Цель исследования** — выявление генов, экспрессия которых ассоциирована с метастазированием опухоли при диссеминированном раке желудка (ДРЖ) и РЖ на более ранних стадиях.

#### Материалы и методы

От каждого больного, включенного в исследование, были взяты парные образцы нормальной и опухолевой тканей желудка. Забор материала проводился при биопсии (во время фиброгастроскопии) или во время операции пациентов, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Были исследованы парные образцы (опухоль — норма) ткани желудка 30 больных ДРЖ в возрасте 29–87 лет и 25 больных с РЖ без отдаленных метастазов (I–III стадии) в возрасте 39–80 лет. Все образцы охарактеризованы гистологически. Основное их число представлено аденокарциномой.

Методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) в парных образцах опухоль — норма изучали уровни экспрессии мРНК генов *VEGF*, *VEGFR1*, *VEGFR2*, *NRP1*, *bFGF*, *FGFR2*, *TGF- $\beta$* , *HER2/neu*.

Из каждой пары образцов выделяли суммарную фракцию РНК. Для выделения РНК использовали набор RNeasy Mini Kit (QIAGEN, США). Обратную транскрипцию проводили, используя набор ImProm-II™

Reverse Transcriptase (Promega, США). ПЦР-РВ осуществляли на приборе Step One Plus фирмы Applied Biosystems (США). Каждое измерение проводили трехкратно. ПЦР-РВ проводили с использованием наборов TaqMan® Gene Expression Assays в соответствии с инструкцией изготовителя.

Использованные наборы:

HER 2 — TagMan Gene Expression Assay Hs 01001580\_m1.

VEGFA — TagMan Gene Expression Assay Hs 00900055\_m1.

NRP1 — TagMan Gene Expression Assay Hs00826128\_m1.

bFGF / FGF2 — TagMan Gene Expression Assay Hs00266645\_m1.

TGF  $\beta$  — TagMan Gene Expression Assay Hs00998133\_m1.

FGFR2 — TagMan Gene Expression Assay Hs01552918\_m1.

VEGFR1 / FLT1 — TagMan Gene Expression Assay Hs01052961\_m1.

VEGFR2 / KDR — TagMan Gene Expression Assay Hs00911700\_m1.

GAPDH — TagMan Gene Expression Assay Hs02786624\_g1.

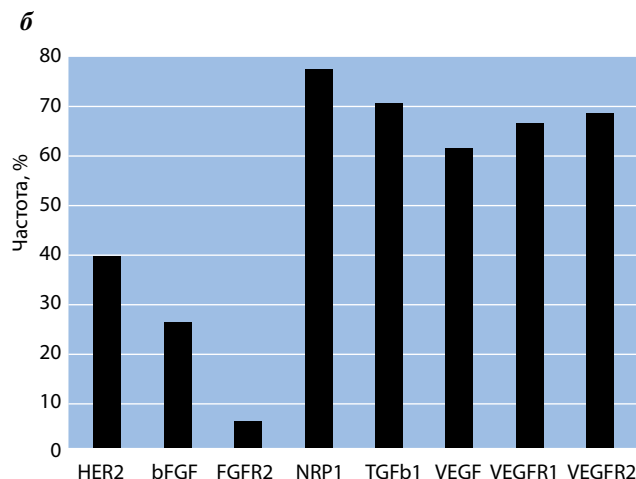
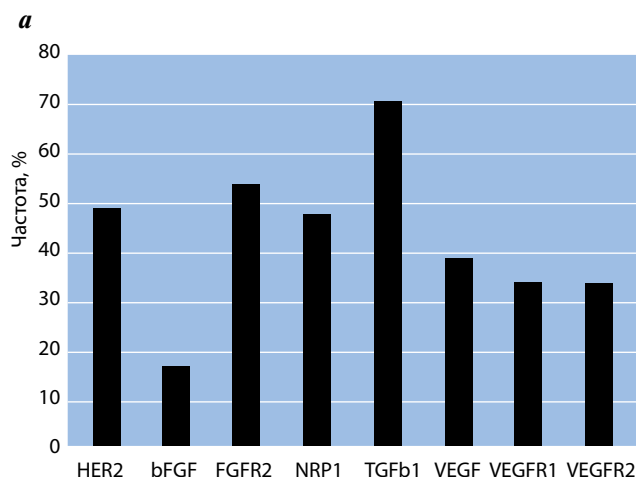
Для анализа полученных результатов использовали встроенную программу Applied Biosystems Step One Plus. В качестве контрольного использовали ген *GAPDH*. В результате обработки измерений получены значения уровней экспрессии генов в опухолевой ткани относительно нормальной. Пороговый уровень экспрессии гена в опухоли определяли с помощью ROC-анализа. Для гена *VEGFR1* он составил  $>0,5$ , для генов *FGFR2* и *NRP1*: 0 и  $>0,97$  соответственно.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета стандартных программ Statistica 10 и программы MedCalc. Были применены методы — точный критерий Фишера и ROC-анализ. Уровень значимости для выявленных различий принимали при  $p < 0,05$ .

#### Результаты и обсуждение

Были исследованы особенности экспрессии ряда генов — в образцах РЖ на ранних этапах развития (до диссеминированного состояния) и ДРЖ. На рисунке представлены результаты определения уровней экспрессии на ранних стадиях развития РЖ относительно нормальной ткани того же органа и при диссеминированном состоянии.

Частота повышенной относительно нормы экспрессии исследованных генов при ДРЖ в ряде случаев имеет тенденцию к повышению (гены *VEGFR1*, *VEGFR2* и *NRP1*) или снижению (ген *FGFR2*) по отношению к более ранним стадиям развития РЖ (см. рисунок).



Частоты повышенных относительно нормы уровней экспрессии генов на ранних стадиях (до диссеминированного состояния) развития РЖ (а) и при ДРЖ (б)

Для этих генов (*FGFR2*, *VEGFR1*, *VEGFR2* и *NRP1*) найдены статистически значимые различия в частотах повышенной экспрессии ( $p = 0,0001–0,04$ , точный критерий Фишера). Частота повышенной экспрессии генов *VEGFR1*, *VEGFR2* при ДРЖ возросла примерно в 2 раза. Эти гены были выбраны для более детального изучения различий в экспрессии при ДРЖ и местно-распространенном РЖ.

Был применен ROC-анализ. Результаты определения связи уровней экспрессии изучаемых генов с диссеминацией опухоли РЖ приведены в таблице.

Результаты определения связи уровней экспрессии генов с метастазированием опухоли РЖ

Ген	Отдаленные метастазы, значения $p$ при ДРЖ и РЖ без отдаленных метастазов (I–III стадии)	
	ROC-анализ	Точный критерий Фишера
<i>VEGFR1</i>	0,0001	0,0009
<i>FGFR2</i>	0,0029	0,0074
<i>NRP1</i>	0,0159	0,0168
<i>VEGFR2</i>	0,405	—

Экспрессия 3 генов — *VEGFR1*, *FGFR2* и *NRP1* — связана с метастазированием опухоли РЖ (см. таблицу). Такая связь остается значимой и при применении поправки FDR на множественность сравнений. Экспрессия гена *VEGFR2* не ассоциирована с ДРЖ.

Дополнительно ассоциация 3 указанных генов с ДРЖ была проверена с помощью точного критерия Фишера с использованием пороговых значений экспрессии, определенных при ROC-анализе.

Полученные данные свидетельствуют о схожести результатов, полученных двумя статистическими методами.

Значение отношения шансов (ОШ) оказалось наибольшим для гена *FGFR2*: ОШ 175,00; 95 % доверительный интервал (ДИ) 8,972–3413,271, что говорит о максимальном среди 3 изученных генов различии между ДРЖ и РЖ на более ранних стадиях. Для гена *VEGFR1* ОШ 4,622; 95 % ДИ 1,240–17,227. Наихудший среди 3 генов результат получен для гена *NRP1*: ОШ 2,667; 95 % ДИ 0,597–11,915. Значение нижней границы 95 % ДИ <1 для значения ОШ ставит под сомнение пригодность использования экспрессии этого гена в качестве маркера метастазирования.

Ген *FGFR2* (2-й рецептор фактора роста фибробластов) связан с пролиферацией опухолевых клеток и неблагоприятным прогнозом развития РЖ [5]. Пациенты с повышенной экспрессией *FGFR2* в аденокарциноме желудка имеют более низкую выживаемость. Этот ген рассматривается в качестве таргетной мишени. На модели ксенотрансплантата РЖ с амплификацией *FGFR2* ингибирование этого рецептора дает существенный эффект [6]. Препараты, разработанные против *FGFR2*, в настоящее время проходят клинические испытания (NCT02318329).

В нашей работе частота повышенной экспрессии *FGFR2* составила 5 % при ДРЖ, в то время как при локализованном РЖ она достигает 53 %. Такое значение практически совпадает с определенной иммуногистохимическим методом частотой повышенной экспрессии *FGFR2* при РЖ — 51 % [7]. При этом полученная нами частота повышенной экспрессии *FGFR2* при ДРЖ близка к частоте его амплификации среди больных ДРЖ, в том числе подвергавшихся системной терапии [8].

Как следует из полученных результатов, разрабатываемый таргетный препарат против *FGFR2*, скорее всего, при ДРЖ будет иметь ограниченную 5–10 % частоту эффективного действия. В то же время при локализованном РЖ такой препарат может быть

эффективным примерно в половине случаев. С учетом связи повышенной экспрессии *FGFR2* с прогрессией опухоли [7] и найденной нами связи с метастазированием его применение на ранних стадиях РЖ может способствовать предотвращению перехода опухоли в метастатическую стадию.

Ген *VEGFR1* является одним из ключевых факторов, регулирующих ангиогенез. Значение уровня его экспрессии для развития метастазов было продемонстрировано для некоторых типов рака. Так, повышенный уровень экспрессии гена *VEGFR1* приводит к увеличению риска метастазирования рака шейки матки [9] и увеличению степени злокачественности клеток меланомы [10]. Повышенная экспрессия найдена при метастатической меланоме [11]. Активация *VEGFR1* способна влиять на вероятность метастазирования при колоректальном раке [12].

Однако при РЖ значение уровня экспрессии гена *VEGFR1* в опухоли для ее метастазирования ранее не было определено. Как найдено в нашей работе, экспрессия *VEGFR1* с высокой значимостью (см. таблицу) ассоциирована с метастазированием РЖ. Возможно, такая связь обусловлена особенностями структуры белка этого гена, приводящими к запуску процессов миграции клеток [13].

*NRP1* — трансмембранный гликопротеин, принимающий участие в VEGF-опосредованном ангиогенезе. Он выступает в качестве многофункционального корцептора, связываясь и модулируя активность различных лигандов и рецепторов, включая *VEGFR1*. Как корцептор, *NRP1* способен принимать участие в метастазировании клеток рака [14].

В соответствии с полученными нами результатами экспрессия *NRP1* ассоциирована с метастазированием РЖ, хотя и с пограничным уровнем значимости. Учитывая возможное взаимодействие *VEGFR1* с *NRP1*, потенциально способное усилить действие *VEGFR1*, была проведена оценка ассоциации с метастазированием случаев совместно повышенной экспрессии генов *VEGFR1* и *NRP1*. При таком подходе — ОШ 5,778; 95 % ДИ 1,393–23,909,  $p = 0,0147$ , т. е. ОШ по отношению к таковому для экспрессии гена *VEGFR1* возрастает примерно на 24 %. Увеличивается и нижняя граница ДИ. Если исходить из предположения взаимодействия *VEGFR1* и *NRP1*, полученные результаты свидетельствуют о небольшом вкладе такого взаимодействия в развитие метастазирования РЖ по сравнению с влиянием экспрессии только *VEGFR1*.

### Заключение

Таким образом, показана ассоциация с метастазированием экспрессии генов *VEGFR1*, *FGFR2* и *NRP1*. Частота повышенной экспрессии *FGFR2* составила 5 % при ДРЖ, в то время как при локализованном РЖ она достигает 53 %. Как следует из полученных результатов, разрабатываемый таргетный препарат против *FGFR2*, скорее всего, при ДРЖ будет иметь ограниченную 5–10 % частоту эффективного действия. Его применение на ранних стадиях РЖ может способствовать предотвращению перехода опухоли в метастатическую стадию. Возможное взаимодействие *VEGFR1* и *NRP1*, в соответствии с полученными результатами, будет приводить к небольшому вкладу в метастазирование РЖ по сравнению с влиянием экспрессии только *VEGFR1*.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Sitarz R., Skierucha M., Mielko J. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Manag Res* 2018;10:239–48. PMID: 29445300. DOI: 10.2147/CMAR.S149619.
2. Smyth E.C., Cunningham D. Targeted therapy for gastric cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2012;13(3):377–89. DOI: 10.1007/s11864-012-0192-6.
3. Prud'homme G. J. and Glinka Y. Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget* 2012;3(9):921–39.
4. Li L., Jiang X., Zhang Q. et al. Neuropilin-1 is associated with clinicopathology of gastric cancer and contributes to cell proliferation and migration as multifunctional co-receptors. *J Experimental & Clinical Cancer Research* 2016;35:16. PMID: 26795388. DOI: 10.1186/s13046-016-0291-5.
5. Su X., Zhan P., Gavine P.R. et al. *FGFR2* amplification has prognostic significance in gastric cancer: results from a large international multicentre study. *Br J Cancer* 2014;110(4):967–75. PMID: 24457912. DOI: 10.1038/bjc.2013.802.
6. Liang Xie, Xinying Su, Lin Zhang et al. *FGFR2* Gene Amplification in Gastric Cancer Predicts Sensitivity to the Selective *FGFR* Inhibitor AZD4547 2572. *Clin Cancer Res* 2013;19:2572–83. PMID: 23493349. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3898.
7. Murase H., Inokuchi M., Takagi Y. et al. Prognostic significance of the co-overexpression of fibroblast growth factor receptors 1, 2 and 4 in gastric cancer. *Mol Clin Oncol* 2014;2(4):509–17. PMID: 24940486. DOI: 10.3892/mco.2014.293.
8. Shoji H., Yamada Y., Okita N. et al. Amplification of *FGFR2* Gene in Patients with Advanced Gastric Cancer Receiving Chemotherapy: Prevalence and Prognostic Significance. *Anticancer Res* 2015;35(9):5055–61. PMID: 26254407.
9. Dang Y.-Z., Zhang Y., Li J.-P. et al. High *VEGFR1/2* expression levels are predictors of poor survival in patients with cervical cancer. *Medicine (Baltimore)* 2017;96(1):e5772. PMID: 28072723. DOI: 10.1097/MD.0000000000005772.
10. Тырси́на Е.Г., Никулицкий С.И., Иншаков А.Н., Рябая О.О. *VEGF-R1* как потенциальная молекулярная мишень противоопухолевой терапии.

Доклады академии наук  
2018;478(2):236–39.

DOI: 10.7868/S086956521802024X.

[Tyrsina E.G., Nikulickij S.I.,  
Inshakov A.N., Ryabaya O.O.  
VEGFR1 as a potential molecular target  
of anticancer therapy. Doklady akademii  
nauk = Reports of the Academy  
of Sciences 2018;478(2):236–39.  
(In Russ.)].

11. Mehnert J.M., McCarthy M. M.,  
Aziz S.A. et al. VEGF, VEGFR1, and  
VEGFR2 expression in melanoma.

Journal of Clinical Oncology  
2007;25 (18, suppl):8520. DOI: 10.1200/  
jco.2007.25.18\_suppl.8520.

12. Jayasinghe C., Simiantonaki N.,  
Kirkpatrick C.J. Cell type- and tumor  
zone-specific expression of pVEGFR-1  
and its ligands influence colon cancer  
metastasis. BMC Cancer 2015;15:104.  
PMID: 25880726.  
DOI: 10.1186/s12885-015-1130-3.
13. Weddell J.C., Chen S., Imoukhuede P.I.  
VEGFR1 promotes cell migration and  
proliferation through PLC $\gamma$  and PI3K

pathways. NPJ Systems Biology and  
Applications 2018;4:1.

PMID: 29263797.

DOI: 10.1038/s41540-017-0037-9.

14. Tse B.W. C., Volpert M., Ratther E. et al.  
Neuropilin-1 is upregulated  
in the adaptive response of prostate  
tumors to androgen-targeted therapies  
and is prognostic of metastatic  
progression and patient mortality.  
Oncogene 2017;36(24):3417–27.  
PMID: 28092670.  
DOI: 10.1038/onc.2016.482.

#### ORCID авторов/ORCID of authors

Ф.М. Кипкеева/F.M. Kipkeeva <https://orcid.org/0000-0003-4778-9726>

Т.А. Музаффарова/T.A. Muzaffarova <https://orcid.org/0000-0002-2345-2056>

М.П. Никулин/M.P. Nikulin <https://orcid.org/0000-0002-9608-4696>

П.В. Апанович/P.V. Apanovich <https://orcid.org/0000-0001-6576-5512>

Т.А. Богущ/T.A. Bogush <https://orcid.org/0000-0002-7673-4284>

С.Н. Неред/S.N. Nered <https://orcid.org/0000-0002-5403-2396>

М.Н. Нариманов/M.N. Narimanov <https://orcid.org/0000-0003-1806-8401>

И.С. Стилиди/I.S. Stilidi <https://orcid.org/0000-0002-5229-8203>

А.В. Карпукхин/A.V. Karpukhin <https://orcid.org/0000-0002-7001-9116>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.