

© Вернигородский С.В., 2013

УДК 616-003.972-071:616.342-002:616.33-002.44-022

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ В ДИАГНОСТИКЕ И ПРОГНОЗЕ КИШЕЧНОЙ МЕТАПЛАЗИИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА

С.В. Вернигородский

Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова, г. Винница

На основе патоморфологического анализа гастробиопсий изучена экспрессия молекулярно-биологических маркеров при кишечной метаплазии (КМ) слизистой оболочки желудка (СОЖ). Показано, что наибольшую прогностическую и диагностическую ценность имеют: транскрипционный фактор кишечной дифференциации (CDX2), цитокератин 7 (СК7), муцин (MUC 5 AC) и маркер пролиферативной активности – Ki-67. Предложен алгоритм патоморфологической диагностики КМ СОЖ с использованием данных иммуногистохимических маркеров.

Ключевые слова: молекулярно-биологические маркеры, кишечная метаплазия слизистой оболочки желудка.

В структуре злокачественных новообразований рак желудка (РЖ) занимает одно из ведущих мест, уступая лишь раку лёгкого. Удельный вес этой патологии в структуре онкологических заболеваний составляет 12,3% (у мужчин рак желудка занимает 2 место – 14,2%, 3 место у женщин – 10,4%). Наиболее часто РЖ выявляется у лиц, в возрасте 45-59 лет, хотя основной пик заболеваемости приходится на возрастную группу 70-74 года. Мужчины болеют почти в два раза чаще, чем женщины, причём эта разница увеличивается с возрастом [5]. Несмотря на некоторое снижение уровня заболеваемости раком желудка во всех странах мира, своевременная диагностика и лечение опухолей желудка остается сложной и актуальной проблемой современной онкологии. Решение ее невозможно без определения основных факторов риска данного заболевания, выявления предраковых состояний и изменений СОЖ. Прогнозирование течения диспластических и метапластических процессов в СОЖ и формирование групп риска по РЖ позволит улучшить качество диагностики и снизить количество больных.

Предраковые изменения издавна привлекают особое внимание исследователей, однако возможность морфологической диагностики предрака дискутируется до настоящего времени, это объясняется тем, что понятие предрака является прогностическим, а постановка подобного диагноза конкретному больному может повлечь за собой лечебные мероприятия, оправданность которых должна быть полностью аргументирована. Как известно, только при раннем выявлении злокачественного новообразования или при своевременном лечении предопухолевых заболеваний можно предупредить опухолевую прогрессию. Вот почему столь важную роль должно сыграть рациональное формирование групп онкологического риска.

В настоящее время к основным предраковым состояниям относят хронический атрофический гастрит (ХАГ) и инфекцию *Helicobacter pylori* (H. pylori), а к основным предраковым морфологическим изменениям – кишечную метаплазию и дисплазию эпителия СОЖ [1, 7]. Центральное место в проблеме предраковых состояний желудка занимает ХАГ.

При целенаправленном эндоскопическом скрининге населения ранний РЖ

обнаруживается в среднем на 10 лет раньше, чем местно распространенные опухоли. Рутинные методы обследования больных РЖ и предраковыми состояниями практически не позволяют распознать патологический процесс на ранних стадиях [2, 3]. Это делает актуальным поиск чувствительных и специфичных методов диагностики, базирующихся на выявлении вовлеченных в формирование и прогрессию РЖ и предраковых состояний молекулярно-биологических маркеров.

Целью нашей работы явилось изучение закономерностей экспрессии молекулярно-биологических маркеров в клетках СОЖ при кишечной метаплазии для обоснования их диагностической и прогностической ценности.

Материалы и методы

В течение 6 лет обследовано 336 пациентов, которые были направлены в эндоскопические отделения и кабинеты для уточнения клинического диагноза. Мужчин среди них было 192 (57%), женщин – 144 (43%). За основную группу принято 68 больных с ХАГ и наличием КМ из-за подавляющей ассоциации последней с ХАГ. В группу сравнения вошли 30 человек, больных ХАГ без КМ. Средний возраст пациентов, которые были обследованы в динамике, составил $52,96 \pm 1,13$, средняя продолжительность заболевания на момент диагностики КМ – $2,6 \pm 0,63$ лет. В процессе фиброэзофагогастродуоденоскопии и хромоэндоскопии с 0,5% водным раствором метиленового синего выполняли множественные биопсии (по два биоптата из тела и антрального отдела желудка и один – из области угла желудка) с учетом требований модифицированной Сиднейской системы диагностики хронического гастрита и из прокрашенных участков СОЖ с последующим гистологическим изучением биоптатов. Биопсийный материал фиксировали в 10% нейтральном формалине и после общепринятой обработки изготавливали парафиновые блоки, а из них – срезы 5-7 мкм толщиной. Для определения метапластических изменений СОЖ использовали следующие методики: гистологические

(окраска гематоксилином и эозином), гистохимические (окраска железистым диамином по Спайсеру, орсеином в сочетании с альциановым синим, альдегид фуксином по Гомори, альциановым синим при pH 1,0 и 2,5 в сочетании с ШИК-реакцией). Определение персистенции H. pylori в СОЖ проводилось с использованием быстрого уреазного теста, цитологического метода по Папенгейму, гистологического – окраской по Романовскому-Гимзе и толудиновым синим. Иммуногистохимические исследования выполняли на парафиновых срезах с использованием стрептавидин-биотинового метода ("DAKO", Дания, LSAB2 Systems, HRP). Демаскировки антигена проводили в цитратном буфере с pH 6,0. В качестве первичных антител применяли мышинные и кроличьи моноклональные антитела. Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера течение 15-60 сек. Пролиферативную активность клеток оценивали с помощью мышинных моноклональных антител к ядерному антигену Ki-67 ("DAKO", клон MIB-1, Дания) по методу T. Scholzen, 2000 [8]. В препаратах при 400-кратном увеличении микроскопа определяли индекс пролиферации (ядерная метка Ki-67) и индекс апоптоза (перинуклеарная или цитоплазматическая метка CPP32 – caspase-3) в 5 случайно выбранных полях зрения (≥ 500 клеток) как долю в процентах положительно окрашенных ядер эпителиоцитов СОЖ в трех компартментах (I – поверхностный и ямочный эпителий; II – перешеечная зона, III – основа желез, средняя и нижняя треть желез базальных отделов). Аналогичным образом определяли индекс метки p53 – маркера повреждения ДНК, bcl-2 – супрессора апоптоза и CDX2 – транскрипционного фактора кишечной дифференциации. Для оценки экспрессии муцинов (MUC1, MUC2, MUC 5AC), цитокератинов (CK7, CK20) и карциноэмбрионального антигена (CEA) в СОЖ в аналогичных участках использовалась полуколичественная шкала оценки интенсивности окраски: 0 (отсутствует) – отсутствие положительной реакции в клетках, 1 (слабая) – до 30% клеток, которые отреагировали позитивно, 2 (уме-

ренная) – 31-60%, 3 (сильная) – 60% и более окрашенных клеток [6].

Результаты и их обсуждение

Среди иммуногистохимических маркеров, которые были использованы нами, наиболее эффективными в динамике оказались CDX2, CK7, CK20, MUC 5AC, MUC2, HER2, Ki 67, p53, CEA.

MUC1 и bcl-2 не показали существенных изменений на протяжении 6 лет ($p < 0,05$). Нами отмечено преобладание CDX2-положительных пациентов при полной КМ (ПКМ) и неполной КМ (НКМ) во время первичного обследования (рис. 1) и достоверное ($p < 0,05$) уменьшение экспрессии CDX2 при повторных обследованиях.

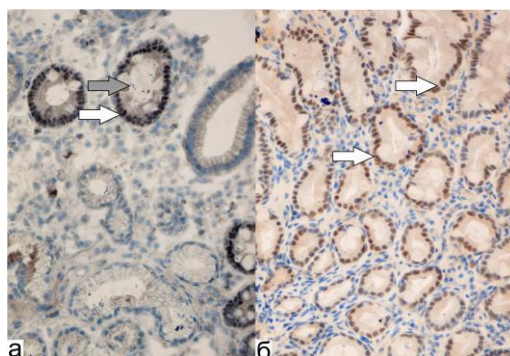


Рис. 1. Сильная экспрессия CDX2 в ядрах абсорбтивных эпителиоцитов, бокаловидных клеток и желудочного эпителия. Хронический атрофический гастрит с полной кишечной метаплазией. Иммуногистохимическая окраска CDX2, а x 400, б x 200

Экспрессия цитокератина 7 усиливалась со временем преимущественно в случаях с НКМ и при изменении гистологического фенотипа с полной на неполную КМ, экспрессия CK20 также усиливалась, однако преобладала у больных с ПКМ и при появлении тонкокишечного фенотипа у больных с НКМ. Весьма информативной в динамике оказалась экспрессия MUC 5 AC, так в течение

6 лет у пациентов с диспластическими изменениями, формирующимися микроаденомами его маркировка уменьшалась от выраженной (+++) к слабой (+). После эрадикации *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) наблюдалось незначительное повышение экспрессии MUC 5AC (рис. 2), но выявленные изменения были не достоверными ($p > 0,05$).

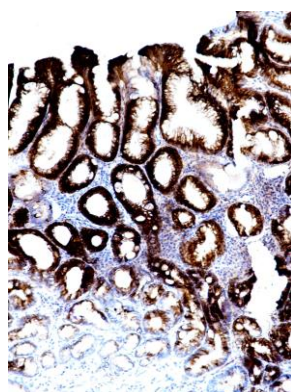


Рис. 2. Выраженная экспрессия MUC 5AC в желудочных эпителиоцитах и призматическом эпителии в участках полной и неполной кишечной метаплазии после эрадикации *H. pylori*. Иммуногистохимическая окраска MUC 5AC x 200

Маркировка MUC2 со временем усиливалась и не зависела от инфицирования *H. pylori*. Экспрессия трансмембранного рецептора тирозинкиназы HER2 была характерной для НКМ и усиливалась на протяжении всего периода наблюдения. Положительная экспрессия p53 проявлялась преимущественно у больных с НКМ и дисплазией тяжелой степени. Карциноэмбриональный антиген встречался только в щеточной каемке больных с ПКМ и определялся в цитоплазме призматических клеток при прогрессировании НКМ. В динамике отмечали появление как ПКМ, так и НКМ, а у 53% больных присутствовали оба типа КМ в СОЖ. При динамическом наблюдении в случаях ПКМ гистологический тип не менялся у 41% больных в течение 6 лет, как у *H. pylori* положительных (+) пациентов так и в *H. pylori* отрицательных (-). Дисплазия легкой степени в участках, прилегающих к ПКМ развивалась в 6% случаев. В 59% *H. pylori* (+) больных наряду с полным типом КМ был обнаружен неполный. У больных с НКМ отмечали прогрессирование диспластических изменений с возникновением дисплазии тяжелой степени в 30%, аденом в 15% в течение двух лет. У 3 больных с НКМ и 1 у одного с ПКМ был обнаружен РЖ при повторном обследовании через 5 месяцев в течение 1 года с момента первичной диагностики КМ. Однако им была выполнена повторная биопсия после диагностики КМ в течение 3, и 5 месяцев взято 6 гастробиоптатов для гистологического исследования. Это означает, что нужно проводить тщательную эндоскопическую и гистологическую оценку вскоре после постановки первоначального диагноза, и в случае эндоскопически видимых поражений, необходимо проводить резекцию либо при помощи эндоскопии (эндоскопическая резекция слизистой), либо хирургически. Наряду с неполным и полным типом КМ у 53% больных присутствовали оба типа КМ в СОЖ.

У 30 больных ХАГ без КМ отмечали появление дисплазии у 3% больных, формирования аденом и возникновения рака не наблюдали.

В нашем исследовании распространение КМ коррелировало с возрастом больных и инфицированием *H. pylori*. Так, КМ наблюдалась преимущественно у пациентов старше 45 лет (средний возраст – $57,23 \pm 1,59$ лет). Мы не обнаружили определенной зависимости между степенью активности ХАГ и распространенностью КМ. По нашим данным распространение КМ останавливалось у больных, которым была проведена эрадикация *H. pylori*, и прогрессировала у больных без таковой. При этом у последних на протяжении 6 лет площадь КМ увеличилась на 25% и перешла из субтотального в тотальный тип у 18% пациентов. Регрессивных изменений КМ после эрадикации инфекции мы не регистрировали.

Сопоставление результатов эндоскопической диагностики при общепринятой гастроскопии и хромогастроскопии с метиленовым синим доказало достоверно ($p < 0,05$) большую эффективность хромогастроскопии. Информативность метода очень высока, о чем свидетельствует совпадение результатов хромоэндоскопии с данными патогистологического исследования биоптатов в 98% случаев, против 75,5% при общепринятой эндоскопии. Использование магнификационной (НМЕ) и узкоспектральной (NBI) эндоскопии по сравнению с хромогастроскопией позволяет определить макроскопические дифференциально-диагностические критерии КМ: для ПКМ характерна ворсинчатая структура поверхности СОЖ, для НКМ – преимущественно сетчатая. Степень распространенности КМ имеет решающее значение для прогноза диспластических и неопластических изменений СОЖ. При ее объеме, который превышает 20% поверхности СОЖ, создаются условия для развития дисплазии и аденокарциномы желудка.

Таким образом, динамическое наблюдение за больными ХАГ с КМ позволяет выявить диспластические изменения эпителия и появление неопластических изменений на ранних этапах. В соответствии с нашими данными, наряду с прогрессированием диспластических изменений у

больных с неполной КМ, именно распространение КМ из антрального отдела на тело и кардиальный отдел является прогностически неблагоприятным в плане дальнейшей опухолевой трансформации.

Полученные результаты позволили предложить следующий алгоритм патоморфологической диагностики кишечной метapлазии СОЖ с использованием иммуногистохимических маркеров (рис. 3, 4):

1. Определение транскрипционного фактора кишечной дифференциации CDX2.

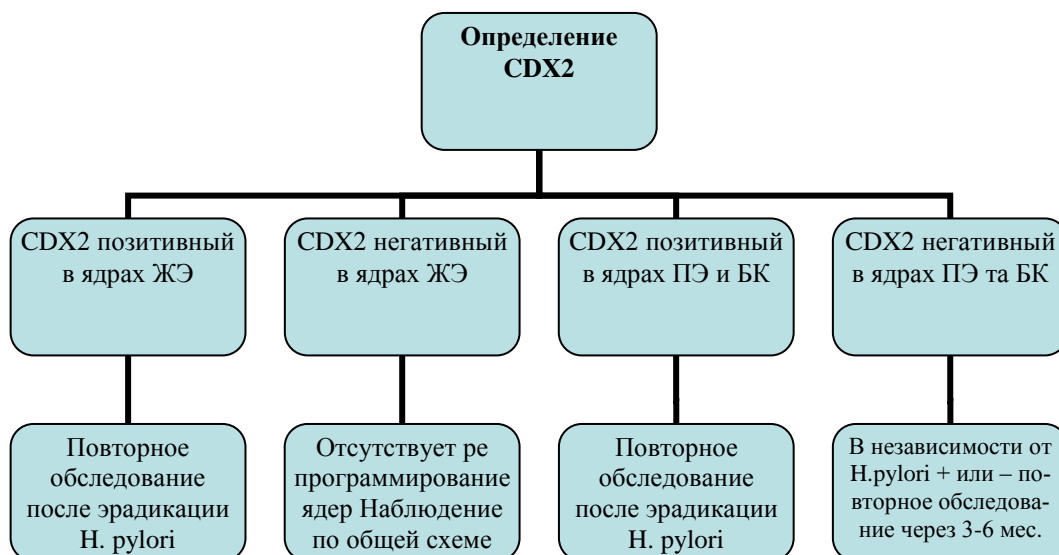


Рис. 3. Алгоритм определения транскрипционного фактора кишечной дифференциации у больных ХАГ с КМ. ЖЭ – желудочный эпителий. ПЭ – призматические эпителиоциты. БК – бокаловидные клетки

2. Определение дополнительных прогностических молекулярно-биологических маркеров в очагах КМ (CK7, MUC5AC, Ki-67).

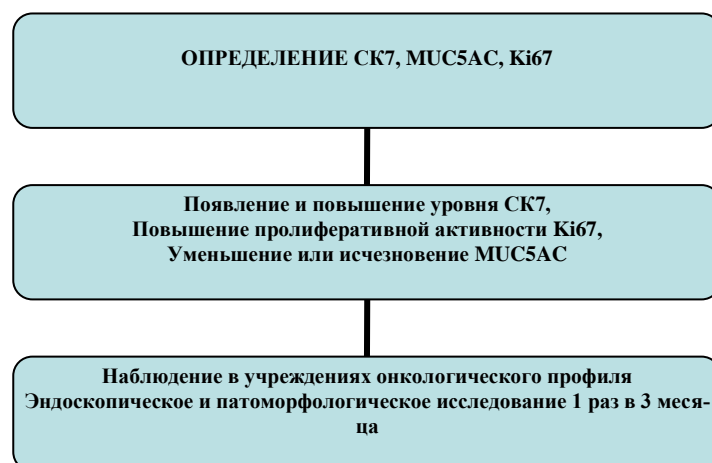


Рис. 4. Дополнительные прогностические маркеры прогрессии КМ

Выводы

Анализ литературы и наших исследований позволил выделить группы лиц с ХАГ и КМ, наиболее опасные в плане развития РЖ, и определить программу их наблюдения с целью более глубокого и всестороннего клинико-инструментального исследования:

1. Больные хроническим атрофическим гастритом с явлениями кишечной метаплазии СОЖ. Для наблюдения может быть использована общая схема при полной (тонкокишечной) слабой (занимает до 5% поверхности желудка) и умеренной (до 20%) метаплазии.

2. Общая схема наблюдения: чередование хромоэндоскопического исследования с морфологическим изучением многочисленных биоптатов любых очаговых изменений СОЖ с кратностью 1 раз в 2 года у лиц в возрасте 35-49 лет и ежегодно у лиц старше 50 лет. Ежегодное не менее 1 раза в год эндоскопическое наблюдение с гистологическим и цитологическим исследованием нескольких биоптатов при прогрессировании процесса – переходе от умеренной до тяжелой полной метаплазии (более 20%) или выявлении очагов неполной метаплазии.

3. Больные с хроническим атрофическим гастритом и явлениями дисплазии СОЖ. Для наблюдения может быть использована общая схема при слабой дисплазии. Прогрессирование процесса (появление признаков умеренной дисплазии) требует перехода к схеме с ежегодным (1 раз в год) гистологическим исследованием нескольких биоптатов. Дальнейшее ухудшение степени дисплазии (тяжелая) не исключает онкотрансформации, поэтому решается вопрос о дальнейшем наблюдении (эндоскопическое исследование 1 раз в 3 месяца, не менее 2 раз в год). Легкую и умеренную дисплазию рассматривают как "регенераторную атипию", а не предрак. Ухудшение степени дисплазии свидетельствует о прогрессировании малигнизации, что повышает вероятность возникновения рака. Схема зависит от результатов гистологического исследования [4].

Таким образом, группы риска необходимо формировать по морфологическим критериям, общим для всех предраковых состояний желудка. Нахождение неполной метаплазии, тяжелой дисплазии эпителия на фоне атрофического гастрита, является, по данным многих авторов, абсолютным показанием к динамическому наблюдению за больными, включению их в группы высокого риска развития РЖ. Необходимо более тесное сотрудничество врачей патогистологических лабораторий с клиницистами, что будет способствовать улучшению диагностики и дальнейшей тактики ведения больных с предраковыми состояниями и изменениями СОЖ.

Использование иммуногистохимических маркеров наряду с хорошо известными и широко применяемыми гистохимическими прогностическими факторами, позволит более точно проводить диагностику кишечной метаплазии СОЖ, прогнозировать течение заболевания и своевременно осуществлять коррекцию лечения.

Литература

1. Бабак О.Я. Хронический атрофический гастрит – точка отсчёта начала канцерогенеза / О.Я. Бабак, Ю.В. Протас // Сучасна гастроентерологія. – 2005. – № 5(25). – С. 9-14.
2. Поддубный Б.К. Современное состояние эндоскопической диагностики и лечения ранних форм рака пищевода и желудка / Б.К. Поддубный, Ю.П. Кувшинов, О.Н. Ефимов // Современная онкология. – 2000. – № 2. – С. 68-72.
3. Заридзе Д.Г. Эпидемиология и этиология злокачественных заболеваний / Д.Г. Заридзе // Канцерогенез. – М.: Научный мир, 2000. – С. 26-30.
4. Формирование групп риска по раку желудка / Л.Е. Денисов [и др.] // Кремлевская медицина. Клинич. вестн. – 1999. – № 1. – С. 13-17.
5. Шаназаров Н.А. Рак желудка: учебное пособие / под ред. проф. А.В. Важенина. – Челябинск, 2001. – 29 с.
6. Indefinite for non-invasive neoplasia lesions in gastric intestinal metaplasia:

- the immunophenotype / M. Cassaro [et al.] // J. Clin. Pathol. – 2007. – Vol. 60. – P. 615-621.
7. Hamilton Stanley R. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System / Stanley R. Hamilton, Lauri A. Aaltonen. – Lyon: IARC Press, 2000. – 314 p.
8. The Ki-67 protein interacts with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure / T. Scholzen [et al.] // J. Pathol. – 2002. – Vol. 196. – P. 135-144.

MOLECULAR AND BIOLOGICAL MARKERS IN THE DIAGNOSIS AND PROGNOSIS OF THE GASTRIC MUCOSA INTESTINAL METAPLASIA

S.V. Vernygorodskyi

The expression of molecular and biological markers in the intestinal metaplasia (IM) of the gastric mucosa on the basis of pathomorphological analysis was studied. It is shown that the follow useful prognostic and diagnostic value have been used: differentiation of intestinal transcription factor (CDX2), cytokeratin 7 (CK7), mucin (MUC 5 AC) and a marker of proliferative activity – Ki-67. The algorithm for pathomorphological diagnosis of gastric mucosa IM with using of immunohistochemical markers was suggested.

Key words: *molecular and biological markers, intestinal metaplasia of the gastric mucosa.*

Вернигородский С.В. – к.м.н., доцент кафедры патологической анатомии с курсами судебной медицины и права Винницкого национального медицинского университета им. Н.И. Пирогова.

21018, Украина, г. Винница, ул. Пирогова, д. 56.

Тел.: 380 (432)50-03-60.

E-mail: vernsot@rambler.ru.