

В.Д. Марковський, О.В. Харченко

## Комплексна патоморфологічна диференційна діагностика передпухлинних процесів і раку шлунка

Харківський національний медичний університет,

Полтавський національний педагогічний університет ім. В.Г. Короленка

**Ключові слова:** дисплазія, фенотип, амплікони, ДНК, полімеразна ланцюгова реакція.

Уперше проведено комплексне дослідження, присвячене вивченню фенотипів диспластичних змін слизової оболонки шлунка гістологічними методами та відповідних їм геномів за допомогою молекулярно-біологічного методу ISSR-PCR. Показано базисне значення передракових станів, хронічного атрофічного гастриту та інфекції *Helicobacter pylori* в процесі формування передракових змін у вигляді дисплазій шлункового епітелію та осередків кишкової метаблазії. Вивчено прояви мітотичного режиму в різних регіонах слизової оболонки шлунка хворих на хронічну виразку дванадцятипалої кишки, шлунка та виразково-інфільтративного раку шлунка. Встановлено закономірності й особливості частоти і розповсюдження передпухлинних процесів у різних регіонах шлунка у хворих на виразкову хворобу дванадцятипалої кишки і шлунка. Розроблено диференційно-діагностичні критерії, що відрізняють їх від раку шлунка. На матеріалі післяопераційних шлунків і повторних гастробіопсій за п'ятирічний період обґрунтовано положення про неоднорідність дисплазій епітелію слизової оболонки шлунка другого та третього ступеня, критерії виявлення раннього раку шлунка за допомогою гістологічного методу в комплексі з методом ISSR-PCR. Застосування методу ISSR-PCR з метою виявлення пухлинних клітин у периферичній крові хворих на рак категорії  $M_0$  виявило наявність останніх у 27,8%, що вказує на ризик раннього метастазування у даної категорії хворих.

### Комплексная патоморфологическая дифференциальная диагностика предопухлевых процессов и рака желудка

В.Д. Марковский, А.В. Харченко

Впервые проведено комплексное исследование, посвященное изучению фенотипов диспластических изменений слизистой оболочки желудка гистологическими методами и соответствующих им геномов при помощи молекулярно-биологического метода ISSR-PCR. Показано базисное значение предраковых состояний, хронического атрофического гастрита и инфекции *Helicobacter pylori* в процессе формирования предраковых изменений в виде дисплазий желудочного эпителия и очагов кишечной метаблазии. Изучены проявления митотического режима в разных регионах слизистой оболочки желудка больных с хронической язвой двенадцатиперстной кишки, желудка и язвенно-инфильтративного рака желудка. Установлены закономерности и особенности частоты и распространенности предопухлевых процессов в разных регионах желудка у больных с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки и желудка. Разработаны дифференциально-диагностические критерии, которые отличают их от рака желудка. На материале послеоперационных желудков и повторных гастробиопсий за пятилетний период обосновано положение о неоднородности дисплазий эпителия слизистой оболочки желудка второй и третьей степени и найдены критерии обнаружения раннего рака желудка с помощью гистологического метода в комплексе с методом ISSR-PCR. Применение метода ISSR-PCR с целью обнаружения опухолевых клеток в периферической крови больных раком категории  $M_0$  обнаружило присутствие последних в 27,8%, что свидетельствует о риске раннего метастазирования у данной категории больных.

**Ключевые слова:** дисплазия, фенотип, ампликоны, ДНК, полимеразная цепная реакция.**Патология.** – 2012. – №3 (26). – С. 15–18

### Complex pathologic differential diagnosis of precancerous processes and gastric cancer

V.D. Markovskiy, A.V. Kharchenko

For the first time, a special comprehensive study of the phenotypes of dysplasia of gastric mucosa by histological techniques and their respective genomes using molecular-biological method of ISSR-PCR was performed. Main effect of precancerous lesions, chronic atrophic gastritis and *Helicobacter pylori* infection in the formation of precancerous changes in the form of gastric epithelium dysplasia and in the form of intestinal metaplasia foci was shown. We study manifestations of the mitotic regime in various zones of gastric mucosa in patients with chronic duodenal ulcer, gastric ulcer, and ulcero-infiltrative gastric cancer. The regularities and characteristics of the frequency and prevalence of precancerous processes in different zones of stomach in patients with duodenal ulcer and stomach ulcer were determined. Diagnostic criteria for differentiating them from stomach cancer were worked out. On the material of postoperative stomach gastrobiopsies repeated during five years, statement about heterogeneity of gastric mucosa epithelium dysplasia of the second and third degree was grounded, and criteria for the detection of early gastric cancer using histological methods in combination with the method of ISSR-PCR were found. The use of ISSR-PCR method for detecting tumor cells in peripheral blood of patients with category  $M_0$  cancer revealed their presence in 27,8% cases, which indicates risk of early metastasis in these patients.

**Key words:** dysplasia, phenotypes, amplicones, DNA, PCR.**Pathologia.** 2012; №3 (26): 15–18

Передумовами розвитку раку шлунка з хронічної виразки прийнято вважати зміну типу хронічного гастриту, що супроводжуються дисрегенераторними процесами з виникненням дисплазій епітелію. Дисплазія – термін, що використовується для визначення передпухлинних процесів. Зазвичай патологоанатом при їх дослідженні не має чітких морфологічних ознак для діагностики.

Гістологічний метод є хорошим методом морфологічної діагностики злоякісних пухлин, але у вирішенні диференційно-діагностичної проблеми між дисплазією і раком шлунка його роздільної здатності недостатньо.

Відомо, що злоякісна трансформація має певні перебудови в геномі клітин, що, в свою чергу, може бути виявлено при аналізі геномної ДНК. Останніми роками на основі методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР, PCR) розроблено цілий ряд методик аналізу ДНК, однією з яких є ISSR-PCR [3,6].

Умовою успішної розробки диференційно-діагностичної проблеми є застосування молекулярно-біологічного методу ISSR-PCR в комплексі з морфологічними дослідженнями слизової оболонки шлунка, що в науковій літературі, на наш погляд, висвітлено недостатньо.

#### Мета роботи

Розробити патоморфологічні диференційно-діагностичні критерії передпухлинних процесів і раку шлунка шляхом застосування генотипування.

#### Матеріали і методи дослідження

Результати дослідження 150 спостережень операційного матеріалу шлунків, що резеційовані з приводу виразкових форм раку – 50, хронічної виразки шлунка – 50, хронічної виразки дванадцятипалої кишки – 50. Оперативно видалені шлунки досліджено з метою порівняння морфологічних особливостей стану гастральної системи та диспластичних змін епітелію слизової оболонки шлунка (СОШ) при виразкових формах раку, виразковій хворобі шлунка і дванадцятипалої кишки.

Гастробіопсії отримано від 116 пацієнтів, які страждали на хронічну виразку шлунка (ХВШ) – 57, на хронічну виразку дванадцятипалої кишки (ХВДПК) – 59. У хворих з ХВШ, ХВДПК для вивчення динаміки частоти виявлення дисплазій досліджували повторні гастробіопсії через 3, 6 місяців, 1 рік, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5 років. Гастробіоптати СОШ для дослідження брали з країв виразки (пухлини), центру виразки (пухлини), поля виникнення пухлини, з пілоричного відділу, малої кривизни та тіла шлунка.

З парафінових блоків з різних топографоанатомічних відділів слизової оболонки шлунка отримали зрізи, які фарбували гематоксилін-еозином, пікрофуксином за Ван-Гізеном, за загальноприйнятими схемами та вміщували в полістерол. Вплив інфекції *Helicobacter pylori* на стан слизової оболонки шлунка вивчали на напівтонких

зрізах, виготовлених з епоксидних блоків (ЕПОН – 812). У якості барвника використовували 0,1% розчин толуїдинового синього на фосфатному буфері з рН 7,4.

Фіксатор – 10% розчин нейтрального формаліну або 4% холодний розчин глутаральдегіду.

При дослідженні повторних гастробіопсій паралельно з гістологічним методом (маркер фенотипу), за допомогою якого вивчали динаміку дисплазій СОШ, вивчали зміни ДНК (як маркер генотипу) СОШ в динаміці за допомогою полімеразної ланцюгової реакції [7,9].

У СОШ виявляли характер диспластичних змін покривно-ямкового епітелію та на ділянках з кишковою метаплазією [8,5].

Для оцінки вираження порушень мітозу використовували визначення мітотичного режиму (МР) [2].

Індивідуальне ДНК-типування (генотипування) зразків СОШ проводили шляхом ампліфікації ДНК в ПЛР (PCR) з використанням ISSR – праймеру S2, який мав структуру: (AGC)<sub>6</sub>G [1,4,7].

Отримані результати статистично обробили з використанням критерію (t) Стьюдента. Різницю між порівнюваними величинами вважали значущою, якщо допустима помилка (p) була менша за 0,05.

#### Результати та їх обговорення

Гістологічний аналіз гастральної системи при ХВШ, ХВДПК, ВІРШ, а також поля виникнення пухлини та СОШ навколо виразки підтверджує належність вираженого хронічного атрофічного (ВАГ) та атрофічно-гіперпластичного гастриту (ВАГГ), а також інфекції *Helicobacter pylori* (НР) до стабільного фонового стану. При захворюванні на ХВШ та ХВДПК НР знайдено в 92% і 90% відповідно, але в СОШ хворих на ВІРШ бактерії виявлено лише в 70% спостережень.

Кишкову метаплазію найчастіше виявляють при ВІРШ – 88%, потім при ХВШ – 80%, найменший показник при ХВДПК – 75%. У СОШ малої кривизни показник частоти КМ достовірно більший при ХВШ (64,7±8,3%) та ВІРШ (64,7±8,3%) в порівнянні з ХВДПК (37,7±9,0%) p<0,01. У СОШ тіла показник частоти КМ більший при ВІРШ (29,4±7,9) від такого при ХВШ (23,5±7,4%) і достовірно більший відповідного при ХВДПК (9,0±4,6%), p<0,01.

Розповсюдження КМ на ділянках малої кривизни достовірно більше при ВІРШ (14,1±3,8%) порівняно з ХВШ (8,6±2,0%) p<0,01, а на останній достовірно більше ніж при ХВДПК (4,7±1,3%), p<0,05.

Для всіх розглянутих груп характерно, що Д виявляється в усіх відділах шлунка. Привертає увагу, що в тілі шлунка хворих на ВІРШ частота Д-I (90,9±3,7) достовірно вище порівняно з ХВДПК (50,0±9,3) і ХВШ (55,9±8,5), p<0,001. Д-II в цьому регіоні також домінує при ВІРШ (87,9±4,2%) порівняно з ХВДПК (23,3±7,8%) і ХВШ (38,2±8,5%), p<0,001. Д-III при ВІРШ має достовірно найбільшу частоту (54,5±6,5%) порівняно з ХВДПК (3,3±3,3%), p<0,001. У групі ХВШ в СОШ тіла Д-III зовсім не спостережено.

**Порівняльна характеристика показників мітотичного режиму:  
МІ, кількості мітозів в метафазі, кількості патологічних мітозів**

Відділ шлунка	ВІРШ			ХВШ			ХВДПК		
	МІ	Кількість мітозів у метафазі	Кількість патологічних мітозів	МІ	Кількість мітозів у метафазі	Кількість патологічних мітозів	МІ	Кількість мітозів у метафазі	Кількість патологічних мітозів
НП(НВ)*	33,1±11,8	56,9±5,8	37,3±3,5	22,3±1,7	37,3±7,8	10,6±1,3	-	-	-
*П	27,5±5,8	51,5±3,3	35,1±2,7	20,0±2,8	46,9±2,8	15,6±1,9	16,5±4,2	37,8±7,8	10,6±1,3
*МК	25,5±3,9	51,9±2,9	25,3±3,3	19,8±2,3	44,9±2,8	13,7±1,9	16,0±2,4	38,8±3,7	9,0±1,4
*Т	15,1±1,3	44,9±2,8	5,1±1,1	14,8±1,2	20,6±8,3	4,0±1,1	7,5±1,2	20,0±3,1	4,0±1,1

Примітки: \*НП – навколо пухлини; НВ – навколо виразки; П – пілоричний відділ; МК – мала кривизна; Т – тіло.

Розповсюдження Д у тілі шлунка при всіх ступенях її вираження низьке. Але при ВІРШ розповсюдження Д-І в СОШ тіла достовірно вище (21,5±2,2%) ніж у хворих на ХВДПК (2,9±0,9%) і ХВШ (3,1±0,6),  $p < 0,001$ . У пілоричному відділі розповсюдження Д-І було найбільшим при ВІРШ (32,0±1,1%), далі при ХВДПК (25,2±1,6%) і ХВШ (12,2±1,1%). Д-ІІ і Д-ІІІ також превалювали при ВІРШ. Аналогічні співвідношення цього показника і на малій кривизні. Найбільшим показник розповсюдження Д-І зареєстровано навколо пухлини (34,9±2,2%), що достовірно вищий порівняно з таким навколо виразки шлунка (13,3±1,4%),  $p < 0,001$ . Аналогічно більшими при ВІРШ є показники розповсюдження Д-ІІ і Д-ІІІ навколо пухлини.

Характерним для всіх дослідних груп є те, що в тілі шлунка показники МР нижчі ніж у пілоричному відділі і на малій кривизні. Привертає увагу факт, що в тілі шлунка при ВІРШ достовірно вища кількість мітозів у метафазі 44,9±2,8% порівняно з показниками при ХВДПК (20,0±3,1%) і ХВШ (20,6±8,3%),  $p < 0,001$  (табл. 1).

Загалом при ВІРШ показники МР вищі від таких при ХВШ і ХВДПК.

Порівняння ДНК-профілів відповідно до фенотипічних ознак дало можливість виділити ПЛР-типи (ISSR-PCR) (рис. 1).

Фенотипу Д-ІІ при ХВДПК відповідали два варіанти ДНК-профілів наявністю ампліконів розміром у межах 500 п.н. (№1, рис. 1) та без них. Ці профілі мали значну подібність на рівні 36,4% з ДНК-профілями СОШ типу Д-ІІІ. Це свідчить, що ДНК-профілі Д-ІІ лабільні і мають перехідні форми щодо ПЛР типу Д-ІІІ.

При ХВДПК Д-ІІІ виявлено ДНК-профілі тільки одного варіанту (№2, рис. 1), тоді як при ХВШ знайдені профілі двох варіантів: перший (№3, рис. 1) і другий – №4 (рис. 1.)

ДНК-профілі СОШ Д-ІІ містили два варіанти з наявністю ампліконів розміром 320 п.н. та 520 п.н. Останні мали значну подібність на рівні 63,6% з першим варіантом ДНК-профілів СОШ типу Д-ІІІ. Цей факт підтверджує, що ДНК-профілі Д-ІІ змінюються і мають перехідні форми щодо ПЛР типу Д-ІІІ.

У ДНК-профілях СОШ Д-ІІІ переважали амплікони розміром від 520 п.н. до 620 п.н. і мали значну генетичну відмінність від інших груп спостереження.

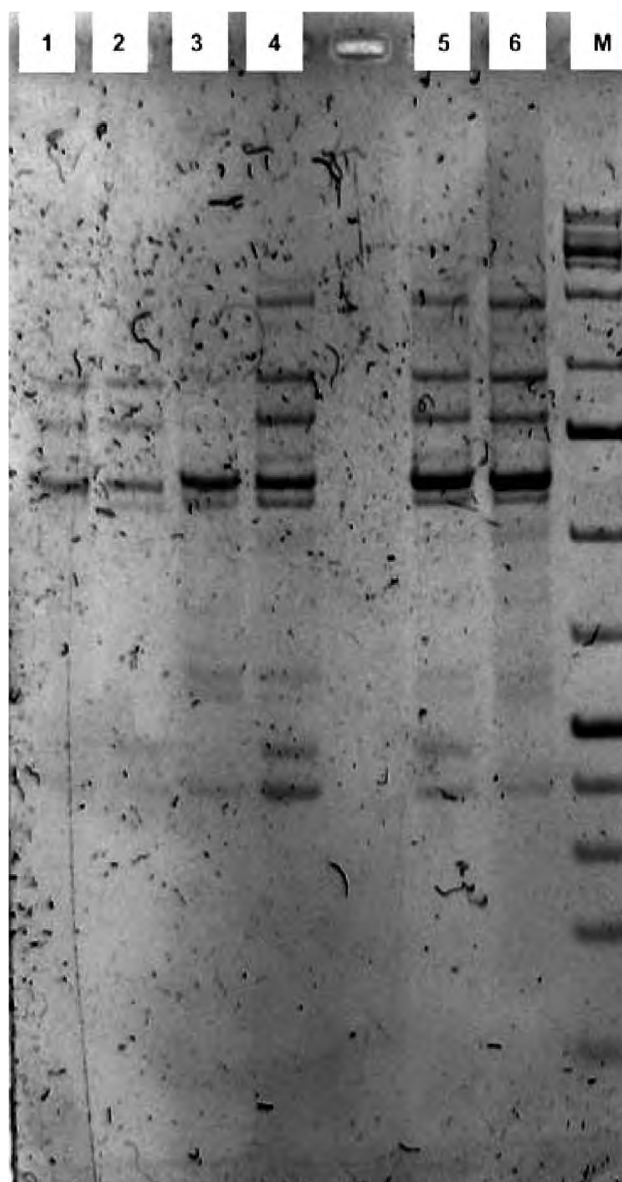


Рис. 1. Електрофореграми продуктів ампліфікату зразків ДНК СОШ пацієнтів з ХВДПК, ХВШ та ВІРШ: 1 – ДНК-профіль СОШ Д-ІІ другий варіант пацієнтів з ХВДПК; 2 – ДНК-профіль СОШ Д-ІІІ пацієнтів з ХВДПК; 3 – ДНК-профіль Д-ІІІ перший варіант пацієнтів з ХВШ; 4 – ДНК-профіль СОШ Д-ІІІ другий варіант пацієнтів з ХВШ; 5, 6 – ДНК-профіль СОШ пацієнтів з ВІРШ; М – маркер молекулярної маси.

При дослідженні повторних гастробіопсій виявлено динаміку змін фенотипів Д епітелію. Регресія Д-I спостерігається в  $92,8 \pm 2,0\%$  випадків, Д-II –  $87,6 \pm 3,8\%$ , Д-III – В  $60,0 \pm 10,0\%$ . Зворотній розвиток Д відбувається переважно протягом першого півріччя, потім вони набувають переважно стабільного характеру.

У 2 пацієнтів з ХВШ через 4,5 і 5 років від початку спостереження виявився рак шлунка. Ці хворі неодноразово проходили ендоскопічне дослідження з взяттям численних біопсій. Тобто наймовірніше, що на початок дослідження пухлина в них відсутня. Після резекції шлунка в обох випадках виявлено внутрішньослизовий рак шлунка. При первинному обстеженні в гастробіопсіях в обох спостереженнях виявлено Д-III, яку постійно спостерігали протягом всього періоду дослідження, але за методом ISSR-PCR виявлені високомолекулярні амплікони розміром 620 та 520 п. н. та низький ступінь подібності геномів відносно інших представників групи –  $37,6\%$ , що можна вважати ознаками виникнення новоутворення.

Порівняння ДНК-профілів СОШ різних груп показало, що отримані результати дослідження корелювали з такими при гістологічному дослідженні гастробіоптатів. Тому після 2 років спостереження кількість хворих різко зменшилась, тобто за ПЛР-типами залишилися лише ті хворі, які відповідали фенотипам СОШ Д-II та Д-III.

У 18 хворих, у яких діагностовано ранній рак шлунка з відсутністю метастазів у лімфатичні вузли, в периферичній крові за методом ISSR-PCR виявлено дисеміновані пухлинні клітини в 5 випадках. Тобто в периферичній крові хворих на ВІРШ, у яких традиційними методами діагностують  $M_0$  за допомогою методу ISSR-PCR пухлинні клітини виявлено в  $27,8\%$  випадків.

#### Висновки

У СОШ при виразковій хворобі і ВІРШ постійно виявляють *Helicobacter pylori*-асоційовані хронічні гастрити: ВАГ або ВАГТ, що складають стабільний фон, вираження якого превалює при раку.

КМ епітелію виявлена в усіх регіонах СОШ в умовах численних проявів дисрегенераторних процесів, але її частота і розповсюдження превалюють при ВІРШ і ХВШ порівняно з ХВДПК.

Частота і розповсюдження Д епітелію, переважно виражених, в усіх топографоанатомічних регіонах шлунка при виразково-інфільтративному раку достовірно вищі, ніж при виразковій хворобі.

Показники МР епітелію СОШ при ВІРШ превалюють над такими при виразковій хворобі. Визначено певну залежність між показниками МР і частотою та розповсюдженням Д-III у топографоанатомічних відділах шлунка.

Динаміка дисплазій епітелію значною мірою залежить від ступеня їх вираження і терміну існування. Регресію Д-I спостерігають у  $92,8 \pm 2,0\%$  випадків, Д-II –  $87,6 \pm 3,8\%$ , Д-III – В  $60,0 \pm 10,0\%$ . Зворотній розвиток Д-I відзначено практично з однаковою частотою

в усі строки спостереження, Д-II та Д-III – переважно протягом першого півріччя, а потім вони набувають стабільного характеру. При ХВШ Д-III більш інертні, ніж при ХВДПК.

За п'ятирічний період спостереження у двох хворих на ХВШ з Д-III виявлено РШ. Розвитку РШ на фоні Д-I та Д-II не спостережено. У зв'язку з цим при виявленні в гастробіопсіях Д-III епітелію хворі повинні підлягати ретельному обстеженню для виключення пухлини. Д-III епітелію, що знайдені в гастробіопсіях при виразковій хворобі, можуть слугувати основою для формування вузьких груп хворих підвищеного ризику на РШ.

Результати генотипування епітелію СОШ хворих на ВІРШ виявили досить стабільні ДНК-профілі, де превалювали фрагменти з молекулярною масою розміром 520 та 620 п. н. (пар нуклеотидів) в усіх спостереженнях, що показало значну відмінність відносно таких при ХВШ і ХВДПК. У групі Д-III ампліфікаційні профілі ДНК СОШ пацієнтів, у яких за п'ятирічний період розвинувся рак, також показали наявність високомолекулярних ампліконів розміром 620 та 520 п. н., що можна вважати ознаками виникнення новоутворення.

Застосування методу ISSR-PCR дає можливість ранньої діагностики раку шлунка з матеріалу біопсій СОШ.

У периферичній крові хворих на рак шлунка категорії  $M_0$  за допомогою ISSR-PCR у  $27,8\%$  знайдено пухлинні клітини. Наявність їх у крові вказує на підвищену здатність клітин первинної пухлини до дисемінації та ризик раннього метастазування.

#### Список літератури

1. *Абрамов Д.Д.* Точность метода полимеразной цепной реакции «в реальном времени» / Абрамов Д.Д., Трофимов Д.Ю., Ребриков Д.В. // Прикл. биохимия и микробиология. – 2006. – №42. – С. 485–488.
2. *Алов И.А.* Определение митотического режима ткани в патогистологической диагностике предраковых процессов и рака: метод. указания) / Алов И.А., Аспиз М.Е., Казанцева И.А. – М., 1973. – 143 с.
3. *Канцерогенез* / Под ред. Д.Г.Заридзе. – М.: Медицина, 2004. – 576 с.
4. ПЦР «в реальном времени» / [Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семенов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д.]; под ред. Д.В. Ребрикова. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 215 с.
5. *Садчиков В.Д.* Дисплазия покровно-язочного эпителия слизистой оболочки желудка / Садчиков В.Д. // Врачебное дело. – 1986. – №10. – С. 65–68.
6. *Свердлов Е.Д.* Перспективы использования достижений геномики в медицине: начало эры полногеномной медицинской генетики / Свердлов Е.Д. // Журн. патол. физиол. эксперим. терапии. – 2001. – №1. – С. 3–22.
7. *Mullis K.B.* Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction / Mullis K.B. and Faloona F. // Meth. Enzymol. – 1987. – №155. – С. 335–350.
8. *Nagayo T.* Dysplasia of the gastric mucosa and its relation to the precancerous state / Nagayo T. // GANN. – 1981. – Vol. 72, №6. – P. 813–823.
9. *Tsanev R.* Molecular mechanisms of cancer cells survival / Tsanev R. // J.BUON. – 2005. – №10. – P. 309–318.

#### Відомості про авторів:

Марковський В.Д., д. мед. н., професор, зав. каф. патологічної анатомії ХНМУ.

Харченко О.В., к. мед. н., доцент, зав. каф. медико-біологічних дисциплін ПНПУ ім. В.Г. Короленка.

Надійшла в редакцію 25.09.2012 р.