

На правах рукописи

Бирюков Андрей Евгеньевич

**КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
ОСОБЕННОСТИ ДИСПЛАЗИИ И РАННЕГО РАКА ЖЕЛУДКА**

14.03.02 –патологическая анатомия

Автореферат

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Москва – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Михалёва Людмила Михайловна

Официальные оппоненты:

Андреева Юлия Юрьевна
доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
дополнительного профессионального образования "Российская медицинская
академия непрерывного профессионального образования" Министерства
здравоохранения Российской Федерации

Бабиченко Игорь Иванович
доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической
анатомии Медицинского института Федерального государственного автономного
образовательного учреждения высшего образования «Российский университет
дружбы народов»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования "Российский национальный исследовательский медицинский
университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской
Федерации

Защита диссертации состоится «__» _____ 2018 года в ____ на заседании
диссертационного совета (Д 001.004.01) Федерального государственного
бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт
морфологии человека» по адресу: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д.3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного
бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт
морфологии человека» и на сайте <http://www.morfolhum.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук

Михайлова Лилия Петровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Рак желудка (РЖ) является одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований. При этом самая высокая выживаемость при РЖ зарегистрирована в Японии, что связано с массовым скринингом населения, в ходе которого активно выявляются случаи дисплазии и раннего рака желудка (РРЖ), их доля в общей структуре больных РЖ самая высокая и составляет более 50% всех случаев, тогда как в других странах – не более 15–20 % (Давыдов М.И. и соавт., 2008; Zheng H. et al., 2007). Своевременное выявление РРЖ позволяет значительно снизить смертность больных вследствие низких значений лимфо- и гематогенного метастазирования (Isozaki H. et al., 1997; Lee J.H. et al., 2010; Abe S. et al., 2015; Lim H. et al., 2017) и рецидивов рака, а также позволяет использовать органосохраняющие эндоскопические методы лечения (Han J.P. et al., 2016).

Понятие «ранний рак желудка» было введено впервые в 1962 г. в Японии. РРЖ включает в себя карциному желудка, ограниченную слизистой оболочкой и/или подслизистым слоем, независимо от наличия или отсутствия метастазов в регионарных лимфатических узлах (Поддубный Б.К. и соавт, 2009; Murakami T. et al., 1962; Yoshimori M, 1989; Nogueira C. et al., 2002; Saragoni L. et al., 2013). Для прогнозирования клинического течения РЖ широко используются клинкоморфологические критерии злокачественности процесса. К указанным критериям относят размер опухоли, глубину ее инвазии, макроскопический и гистологический тип опухоли. Однако следует отметить, что течение заболевания в пределах одного гистологического типа также существенно варьирует у разных индивидуумов, что требует поиска информативных маркеров, позволяющих прогнозировать клиническое течение заболевания (Zheng H. et al., 2007).

В настоящее время широкое распространение получило иммуногистохимическое исследование (ИГХ) наличия и выраженности экспрессии ассоциированных с опухолевыми клетками белков, которые определяют

опухолевый фенотип и, в той или иной мере, ответственны за «поведение» опухолей, и, следовательно, являются потенциальными онкомаркерами.

Степень разработанности темы исследования. Клинико-морфологические изменения при дисплазии и РРЖ охарактеризованы в небольшом числе работ, причем данные работы посвящены преимущественно клиническим аспектам опухолевых поражений желудка. Известно, что заболеваемость РЖ в России увеличивается с возрастом, пик приходится на диапазон 60-85 лет, соотношение мужчин к женщинам колеблется в пределах 1,3:1; средний возраст пациентов с впервые выявленным РЖ составляет около 67 лет, причем у мужчин - 65 лет, у женщин – 69 лет (Каприн А.Д. и соавт., 2014; Шаназаров Н.А., 2014; Каприн А.Д. и соавт., 2015; Min Jung Jo et al., 2015; Peng Wang et al., 2015). Однако, данные литературы о возрастно-половых особенностях заболеваемости РРЖ в России отсутствуют.

Важную роль при исследовании РРЖ играет правильная оценка его макроскопического типа, что может служить косвенным критерием глубины инвазии опухоли и риска лимфогенного метастазирования (Lambert R., 2003; Abe S. et al., 2011; Ohara Y. et al., 2016). В литературе имеются сведения о макроскопических типах РРЖ, однако отсутствуют данные о макроскопическом типе дисплазии желудка слабой и тяжелой степени, а также не изучены особенности макроскопического типа дисплазии и РРЖ в сравнительном аспекте.

Недостаточная изученность морфологии дисплазии желудка тяжелой степени (ТДЖ) и РРЖ кишечного типа затрудняет, а порой делает невозможной оценку и интерпретацию выявляемых при них изменений, особенно при изучении гастробиоптатов (Lambert R., 2003). В связи с этим, ряд исследователей предлагают для ТДЖ применять ту же лечебную тактику, что и для РРЖ в стадии pT1a (то есть, по сути, относят ТДЖ к раку *in situ*) (Lambert R., 2003; Ryu D.G. et al., 2017).

В исследованиях по морфологическим и иммунофенотипическим особенностям опухолевых поражений желудка основная оценка дается РЖ в целом, без учета его стадии (Min Jong Lee B.S. et al., 2003; Bita Geramizadeh et al.,

2012; D. Lasar et al.; Hannah H. et al., 2017); отсутствуют исследования, в которых в сравнительном аспекте сопоставлены морфологические и иммунофенотипические особенности дисплазии и раннего рака желудка.

Таким образом, клиничко-морфологические особенности дисплазии и раннего рака желудка изучены недостаточно, что требует проведение исследования в данной области.

Цель исследования - оценка клиничко-морфологических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических особенностей дисплазии и раннего рака желудка.

Задачи исследования:

1. Выявить клиничко-морфологические особенности дисплазии желудка (low- и high-grade dysplasia);
2. Охарактеризовать клиничко-морфологические особенности раннего рака желудка кишечного типа;
3. Установить молекулярно-генетические особенности и HER2-статус раннего рака желудка кишечного типа;
4. Определить и сравнить иммунофенотип эпителия при хроническом атрофическом гастрите и опухолевых клеток при дисплазии желудка тяжелой степени (high-grade dysplasia) и раннем раке желудка кишечного типа;
5. Разработать алгоритм патологоанатомического исследования биопсийного и операционного материала с эпителиальными новообразованиями слизистой оболочки желудка.

Объект и предмет исследования - дисплазия и ранний рак желудка, их клиничко-морфологические, иммуногистохимические и молекулярно-генетические особенности.

Теоретической и методологической базой диссертации являются научные работы и методические разработки отечественных и зарубежных авторов в области дисплазии и раннего рака желудка.

Информационной базой исследования являются научные статьи в

рецензируемых журналах, монографии, материалы конференций соответствующей научной тематики.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 14.03.02 – патологическая анатомия.

Научная новизна исследования. На основе анализа результатов проведенного комплексного исследования впервые выявлены клинкоморфологические особенности и установлена высокая значимость иммуногистохимических маркеров (цитокератины (СК) 7, 8/18, муцины (Muc) -1, -2, -5АС и p53), объективизирующих патологоанатомическую диагностику дисплазии и раннего рака желудка.

Впервые установлено, что 60% опухолевых поражений желудка (дисплазии и раннего рака), относятся к 0-IIa и 0-IIb макроскопическим типам, а 13% - к сочетанному макроскопическому типу; при этом средний возраст у пациентов с дисплазией желудка слабой степени 64,3лет, тяжелой степени – 63,8лет, с РРЖ - 67,2лет.

Впервые показано, что частота инфицированности *Helicobacter pylori* при раннем раке желудка составляет 33,5%. Чувствительность различных методов определения *Helicobacter pylori* (бактериоскопический, иммуногистохимический и молекулярно-генетический) варьирует, причем ни в одном из используемых методов она не достигает 100%. Впервые установлена частота встречаемости мутации гена KRAS (5%) в РРЖ.

Впервые установлено, что ТДЖ и РРЖ кишечного типа обладают во многом схожим иммунофенотипом, однако если для СК7, Muc-1 и p53 характерно нарастание количества экспрессирующих клеток в ряду «дисплазия желудка тяжелой степени – РРЖ кишечного типа», то для Muc-2 - снижение количества Muc2-позитивных опухолевых клеток в том же ряду.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в работе теоретические данные о количественном и качественном определении экспрессии ассоциированных с опухолевыми клетками белков, которые определяют

опухолевый фенотип и являются потенциальными онкомаркерами, расширяют научные представления о морфогенезе дисплазии и раннего рака желудка и могут быть использованы в качестве базовых при планировании и проведении исследований по вопросам малигнизации эпителиальных опухолей желудка.

Впервые для установления стадии заболевания (pTis, pT1a и pT1b) и определения тактики лечения разработан алгоритм патологоанатомического исследования биопсийного и операционного материала с опухолевыми поражениями желудка, включая РРЖ.

Впервые представлен подход к макроскопическому изучению и забору материала для патологоанатомического исследования после эндоскопической диссекции подслизистой основы или резекции слизистой оболочки желудка (СОЖ) с наличием дисплазии слабой и тяжелой степени, РРЖ.

Разработанная иммуногистохимическая панель маркеров, включающая CK7, CK8/18, Muc-1, Muc-2, Muc-5AC и p53, дает новые возможности для дифференциальной диагностики ТДЖ и РРЖ кишечного типа, позволяет объективно оценить степень распространения опухоли и интактность краев резекции (горизонтального и вертикального), наличие раковых эмболов в просвете кровеносных и лимфатических сосудов.

С целью повышения диагностических возможностей выявления инфицированности опухолевых поражений желудка *Helicobacter pylori* (Hp) помимо использования окраски по Романовскому-Гимзе (Р-Г) целесообразно в каждом случае использовать ИГХ с антителами (АТ) к *Helicobacter pylori*.

Разработанный комплексный подход к оценке опухолевых поражений желудка позволяет оптимизировать диагностику и лечебную тактику РРЖ с расширением практики эндоскопических «щадящих» методов лечения и проводить в обязательном порядке оценку эффективности проведения эндоскопического хирургического лечения.

Методология и методы исследования. В работе были изучены 135 образцов ткани желудка, из которых 114 – эпителиальные новообразования

желудка и 21 – хронический атрофический гастрит (ХАГ). На основе патоморфологического исследования были выделены четыре группы наблюдения: ХАГ, дисплазия желудка слабой степени (СДЖ), ТДЖ и РРЖ. Методологическая работа построена на принципах системного анализа комплекса данных. Для решения поставленных задач был использован комплекс современных методов исследования: клинико-морфологический, морфометрический, иммуногистохимический и молекулярно-генетический методы с последующей статистической обработкой количественных данных. Полученные в ходе исследования цифровые данные были собраны в электронной таблице Microsoft Excel XP (Microsoft Corp., США).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Для дисплазии желудка тяжелой степени и раннего рака желудка кишечного типа характерны иммунофенотипические различия при иммуногистохимическом исследовании с антителами к CK7, Muc-1, p53 (характерно нарастание количества экспрессирующих клеток в ряду «дисплазия желудка тяжелой степени – РРЖ кишечного типа»), к Muc-2 (снижение количества Muc2-позитивных опухолевых клеток в том же ряду).

2. Прилежащие к РРЖ кишечного типа участки слизистой оболочки желудка характеризуются наличием дисплазии тяжелой степени (в 97% случаев), хронического атрофического гастрита (в 94% случаев) и толстокишечной метаплазии (в 77% случаев). *Helicobacter pylori* в раннем раке желудка не определяется в 2/3 случаев, а в оставшихся 1/3 случаев выявлена слабая обсемененность.

3. Алгоритм патологоанатомического исследования эпителиальных новообразований желудка, в том числе ранний рак желудка, включает: тотальное исследование удаленного новообразования с оценкой краев резекции и глубины инвазии; использование окраски гематоксилином и эозином, комбинированной ШИК-реакции в сочетании с альциановым синим; выполнение иммуногистохимического исследования с антителами к p53, Muc-1, Muc-2, Muc-

5AC, CK8/18, CK7, HER2, Desmin, CD34, D2-40 и Helicobacter pylori с последующим комплексным анализом эффективности проведенной эндоскопической операции.

Степень достоверности и апробация работы. Результаты исследования получены при изучении достаточного объема материала - 135 образцов ткани желудка. Для решения поставленных задач автором использован комплекс современных методов исследования: клинико-морфологический, морфометрический, иммуногистохимический и молекулярно-генетический методы с последующей статистическим анализом цифровых данных в сопоставлении с актуальными литературными данными.

Основные положения исследования представлены на 27, 28, 29 и 30 Европейских конгрессах по патологической анатомии (2015г., 2016г., 2017г., 2018г.); VII Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы эндоскопии 2016» (Санкт-Петербург, 2016); научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2016); научной конференции «достижения и инновации в современной морфологии» (Минск, 2016); международной конференции «World Congress GI of Endoscopy» (Индия, 2017); V съезде Российского общества патологоанатомов (Челябинск, 2017).

Личное участие автора заключалось в сборе, вырезке, гистологической и иммуногистохимической оценке материала исследования, анализе и интерпретации полученных данных, формулировке научных положения и выводов, подготовке и публикации статей по результатам исследования, выступлении на научных конференциях.

Публикации. Опубликовано 14 научных работ по теме диссертации, в том числе 4 – в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук. 9 публикаций – в материалах конференций и съездов, 1 – в научном рецензируемом

журнале, не входящем в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук.

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационного исследования внедрены в практическую работу ГБУЗ «Городская клиническая больница №31 Департамента здравоохранения города Москвы».

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 141 странице машинописного текста, включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение и выводы, практические рекомендации, список сокращений, 45 рисунков, 27 таблиц, список литературы содержит 181 библиографических источника, из них российских - 17, зарубежных - 164.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования послужили фрагменты опухолевой ткани желудка, удаленные у пациентов, проходивших лечение в ГБУЗ «Городская клиническая больница №31 Департамента здравоохранения города Москвы» в период с 2013 по 2017 годы. Всего на исследование было отобрано 135 случаев от 100 пациентов в возрасте от 32 до 85 лет, из них 114 – опухолевые поражения желудка (за исключением образований, относящихся к пищеводно-желудочному переходу) и 21 случай с диагностированным ХАГ (таблица 1).

Таблица 1

Количество исследованных случаев со слабой и тяжелой дисплазией желудка и ранним раком желудка по группам

Хронический атрофический гастрит	Дисплазия желудка слабой степени	Дисплазия желудка тяжелой степени	Ранний рак желудка	
			Кишечный тип	Диффузный тип
21	22	57	31	4

Из 135 случаев – 77 удалены методами эндоскопическое резекции слизистой оболочки/диссекции подслизистой основы (ЭРСО/ЭДПО) (все случаи РРЖ и ХАГ, 21 случай ТДЖ); 58 случаев – биопсированные фрагменты.

Все фрагменты опухоли сразу после удаления были помещены в 10% забуференный раствор формалина, после фиксации в течение 24 часов выполнялась проводка по стандартной методике и заливка в парафин. Эпителиальные новообразования вырезали шагом в 2 мм и их брали в исследование целиком.

Гистологические срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а также проводили комбинированную ШИК-реакцию в сочетании с альциановым синим (для выявления нейтральных муцинов и высоко сульфатированных муцинов).

В группах с ХАГ (в 21 случае), ТДЖ (в 21 случае) и РРЖ кишечного типа (в 21 случае) дополнительно было проведено ИГХ, а в этой же группе с РРЖ кишечного типа - также ПЦР в режиме реального времени и окраска по Р-Г.

ИГХ проведено с готовыми первичными моноклональными АТ фирмы Leica Bond к СК 7 (клон RN7), 8/18 (клон 5D3), Мис -1 (клон Ма695), -2 (клон Сср58) и -5АС (клон CLH2), p53 (клон DO-7). Реакции проводили с помощью автоматического иммуногистостейнера «Leica Bond-MAX».

Интерпретацию ИГХ с указанными АТ проводили по двум критериям: критерий №1 - количество опухолевых клеток, экспрессирующих АТ; критерий №2 – интенсивность экспрессии АТ [Соколов В.В. и соавт., 2012].

Оценку экспрессии АТ по критерию №1 проводили путем подсчета количества окрашенных опухолевых клеток на 100 клеток в 10 полях зрения (увеличение 400) и выражали полученные результаты в процентах. Интенсивность экспрессии оценивали полуколичественным способом по балльной шкале от 0 до 3: 0 – отсутствие реакции; 1– слабая реакция (светло-коричневое окрашивание); 2 – умеренная реакция (коричневое окрашивание); 3 – сильная реакция (темно-коричневое окрашивание). Препараты изучали при помощи светового микроскопа

«Leica DMLB» со стандартным набором оптики. Микрофотографирование производили на микроскопе биологическом универсальном Leica DMLB с цветной цифровой камерой DFC420 при помощи стандартного программного средства Leica Application Suite v. 3.7.0.

Для оценки Нр использовали 3 метода – гистохимический (гистологические срезы окрашивали по Романовскому-Гимзе, ИГХ с кроличьими поликлональными АТ фирмы Cell Marque к Нр и ПЦР с использованием набора АмплиСенс Нр. Для оценки целостности мышечной пластинки слизистой оболочки (МП СО) проведено ИГХ с первичными моноклональными АТ фирмы Leica Bond к десмину (клон DE-R-11), а для определения наличия или отсутствия раковых эмболов в просвете кровеносных сосудов - с первичными моноклональными АТ фирмы Leica Bond к CD34 (клон QVEnd/10) и фирмы Cell Marque к Podoplanin (D2-40). С целью подтверждения эпителиального генеза клеточных кластеров в просвете сосудов нами использовалось ИГХ с АТ к CK8/18.

Кроме того, методом ПЦР в режиме реального времени с набором KRAS/BRAF Mutation Analysis Kit (фирма EntroGen) и Real-time-PCR-HER2/new (фирма БиоЛинк) проведена оценка мутаций генов KRAS и BRAF, а также амплификации гена Her2.

Статистическая обработка данных. Перед началом работы методом Колмогорова-Смирнова был проведен анализ цифровых данных на нормальность распределения. Для статистической обработки данных использовали методы непараметрической статистики. Выборки описывали через медиану и межквартильные размахи (25% и 75%). Сравнение групп проводили методом дисперсионного анализа Kruskal-Wallis «multiple comparisons of mean ranks for all groups». Частотный анализ проводился с использованием метода хи-квадрат и оценкой стандартизованного смещения. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета статистических программ SPSS 16.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клинические особенности дисплазии и раннего рака желудка.

Всего мужчин с СДЖ, ТДЖ, РРЖ диффузного типа и РРЖ кишечного исследовано 53 (средний возраст 65,1 лет), женщин 61 (средний возраст 64,5 лет) - статистически значимых различий по полу и возрасту нет. При сопоставлении по возрасту отдельно по группам с СДЖ, ТДЖ и РРЖ кишечного типа установлено, что средний возраст в группе со СДЖ 64,3г., с ТДЖ – 63,8г., с РРЖ кишечного типа 67,2г. - статистически значимые различия по возрасту в группах с СДЖ, ТДЖ и РРЖ кишечного типа отсутствовали. В России заболеваемость РЖ у мужчин и женщин находится в соотношении 1,3:1 (Каприн А.Д. и соавт., 2014; Каприн А.Д. и соавт., 2015). Однако данная статистика учитывает заболеваемость РЖ на всех стадиях.

Исходя из общепринятой схемы развития РРЖ кишечного типа через каскад изменений от ХАГ до дисплазии и рака, можно предположить, что от группы с СДЖ к группе с ТДЖ и группе РРЖ кишечного типа средний возраст пациентов должен возрастать. Однако, в нашем исследовании мы обнаружили, что группа с СДЖ «старше» группы с ТДЖ на 0,5лет. Вероятно, это связано с бессимптомным течением СДЖ либо клиническая картина соответствует хроническому гастриту, что в свою очередь приводит к несвоевременному обследованию и проведению ЭГДС и, следовательно, обнаружение СДЖ происходит в определенной степени случайно. Кроме того, СДЖ в значительном количестве случаев подвержена регрессу (и вероятно, сюда же следует отнести «реактивную» атипию).

Разница между средним возрастом в группе с ТДЖ и РРЖ кишечного типа составила 3,4г. Данный возрастной интервал соотносится с литературными данными, показывающими, что между моментом установления дисплазии желудка II – III степени тяжести до развития РЖ проходит в среднем от 1 до 30 месяцев (Янкин А.В., 2010; Saraga E-P et al., 1987; Ruge M et al., 1991; Di Gregorio C et al., 1993; Farinati F et al., 1993; Pathology and Genetics of Tumors of the Digestive System, 1993).

Важную роль при исследовании РРЖ играет правильная оценка его макроскопического типа, что может служить косвенным критерием глубины инвазии опухоли и риска лимфогенного метастазирования (Lambert R., 2003; Abe S. et al., 2011; Ohara Y. et al., 2016). Так, по данным литературы при РРЖ 0-Ia типа инвазия в подслизистую основу стенки желудка отмечается в 57% случаев, при 0-IIa и 0-IIb – в 29% и 20% соответственно, при 0-IIc, 0-IIc+IIa и 0-IIa+IIc – в 37%, 47% и 65% соответственно.

Нами был изучен макроскопический тип эпителиальных новообразований желудка в соответствии с Парижской классификацией. При сопоставлении групп с СДЖ, ТДЖ и РРЖ кишечного и диффузного типа по макроскопическому типу установлено, что преобладают образования желудка 0-IIa и 0-IIb типов (более половины от всех случаев – 60%). Всего 1,5% образования желудка 0-Is типа, 0-III тип образований ни одного случая. Следует отметить, что 13% всех случаев представлены сочетанием различных типов образований желудка. Для СДЖ наиболее характерный тип 0-IIa (41%) и 0-Ip (32%), для ТДЖ - 0-IIa и 0-IIb, для РРЖ кишечного типа – также 0-IIa и 0-IIb, для РРЖ диффузного типа - 0-IIa. Сходство результатов в группах с ТДЖ и РРЖ кишечного типа (преимущественно поверхностные типы поражения слизистой оболочки желудка (СОЖ)) хорошо согласуется между собой, учитывая патогенетическую связь между двумя этими состояниями. Группа СДЖ, помимо поверхностного типа поражения слизистой оболочки желудка, характеризуется достаточно частым наличием выступающего типа поражения. На наш взгляд это, также как и «нестыковки» по возрастным критериям, свидетельствует о гетерогенности данного типа поражения желудка.

Подходы и критерии для проведения ЭРСО/ЭДПО постоянно совершенствуются и претерпевают изменения. Так, размер РРЖ при pT1a стадии перестает играть ключевую роль и позволяет радикально иссекать опухоль любого размера (Park Y.M. et al., 2011). Наибольший риск регионарного метастазирования имеют злокачественные опухоли при pT1b стадии и размере более 3,0см в диаметре (Hannah H. et al., 2017). Важную роль в оценке прогностических факторов имеет и гистологическое строение опухоли. Особое

место занимает РРЖ смешанного типа строения в виду ухудшения прогноза заболевания (Hwang C.S. et al., 2016; Lee J.H. et al., 2016; Pyo J.H. et al., 2016; Kim Y.H. et al., 2017; Pyo J.H. et al., 2017). Помимо гистологического строения РРЖ важную прогностическую роль имеет степень дифференцировки опухоли. Так, при наличии в РРЖ участков высокой и низкой степени злокачественности характеризуются значительно большим риском лимфогенного метастазирования, чем в РРЖ одной степени дифференцировки (Pyo J.H. et al., 2016).

Важнейшим параметром при патологоанатомическом исследовании РРЖ имеет оценка сосудистой (венозной и лимфатической) инвазии. В соответствии с классификацией Японского общества рака желудка выделяют 4 степени инвазии РРЖ в сосуды, причем отдельно оцениваются лимфатические (ly) и венозные сосуды (v) (Ohara Y. et al., 2016). С целью унификации и практического подхода при ЭРСО/ЭДПО, в 2017 году была разработана балльная шкала оценки риска лимфогенного метастазирования РРЖ «eCura» [Hatta W et al., 2017], которая предлагает 3 степени риска.

Дисплазия желудка слабой степени

Проведенное исследование в группе с СДЖ показало примерно равное распределение случаев по полу: 10 случаев у мужчин и 12 - у женщин. При анализе случаев со СДЖ по полу и возрасту выявлено, что и у мужчин и у женщин имеется 2 пика заболеваемости: первый приходится на период 60-64 лет, второй – на период 75-79 лет (по 18% от всех случаев со СДЖ). При изучении случаев с СДЖ в соответствии с Парижской эндоскопической классификацией установлено, что в целом преобладали случаи, относящиеся к 0-IIa (41%) и 0-Is (32%), причем у женщин 0-IIa - 55% и 0-Is - 27%, а у мужчин преобладали случаи с 0-Is (36%), затем в равных долях 0-IIa и 0-IIb (по 27%). В 94% случаев СДЖ сочетается с хроническим воспалением и в 69% случаев – толстокишечной метаплазией.

Дисплазия желудка тяжелой степени

Проведенное исследование в группе с ТДЖ показало примерно равное распределение по полу: 25 мужчин (45%) и 30 женщин (55%). У мужчин доля ТДЖ имеет максимальные значения в возрастной группе 60-69 лет (52% от всех случаев

ТДЖ), а у женщин пиковые значения ТДЖ более пролонгированные и начинаются на 10 лет раньше мужчин – с 50 до 69 лет. После 70 лет у мужчин и у женщин наблюдается сходная динамика удельного веса ТДЖ. При изучении случаев с ТДЖ в соответствии с Парижской эндоскопической классификацией установлено, что преобладали случаи, относящиеся к 0-IIa и 0-IIb (по 32%), причем аналогичные результаты были получены при анализе макроскопического типа ТДЖ в зависимости от пола. В 68% случаев ТДЖ сочетается с толстокишечной метаплазией и в 95% случаев - с хроническим воспалением.

Недостаточная изученность морфологии ТДЖ и РРЖ кишечного типа затрудняет, а порой делает невозможной оценку и интерпретацию выявляемых при них изменений, особенно при изучении гастробиоптатов (Lambert R., 2003). В связи с этим, ряд исследователей предлагают для ТДЖ применять ту же лечебную тактику, что и для РРЖ в стадии pT1a (то есть, по сути, относят ТДЖ к раку in situ) (Lambert R., 2003; Ryu D.G. et al., 2017).

Ранний рак желудка

Проведенное исследование показало, что у 31 пациента (89%) с РРЖ имел место рак кишечного типа и лишь у 4 пациентов (11%) – рак диффузного типа. Распределение случаев по полу: 16 мужчин (46%) и 19 женщин (54%). При этом в группе пациентов с РРЖ кишечного типа мужчин было 14 (45%), а женщин 17 (55%).

Пик заболеваемости РРЖ кишечного типа приходится на возрастной период 60-69 лет (55% от всех случаев заболеваемости РРЖ кишечного типа), затем отмечается спад и второй пик в возрастной группе 75-79 лет (23% от всех случаев заболеваемости РРЖ кишечного типа). При этом у мужчин доля РРЖ кишечного типа имеет максимальные значения в возрастной группе 60-69 лет (72% от всех случаев РРЖ кишечного типа у мужчин) со вторым пиком в возрастной группе 75-79 лет (23% от всех случаев РРЖ кишечного типа у мужчин), а у женщин пиковые значения РРЖ кишечного типа более пролонгированные и начинаются на 10 лет раньше мужчин – с 50 до 69 лет (59% от всех случаев РРЖ кишечного типа у

женщин), также как и у мужчин с наличием второго пика в возрастной группе 75-79 лет (21% от всех случаев РРЖ кишечного типа у женщин). При анализе случаев с РРЖ кишечного типа в соответствии с Парижской эндоскопической классификацией установлено, что преобладали случаи, относящиеся к 0-IIa и 0-IIb (29% и 26% соответственно), 0-Is отсутствовали. При разбивке макроскопического типа ТДЖ по полу выяснено, что у мужчин преобладали 0-IIb и 0-IIa (36% и 29% соответственно), а у женщин - 0-IIa и 0-Is (по 29%).

В РРЖ кишечного типа для исключения сосудистой инвазии были проведено ИГХ с АТ к CD34 (для верификации кровеносных сосудов) и к D2-40 (для верификации лимфатических сосудов). С целью подтверждения эпителиального генеза опухолевых клеток в просвете сосудов нами использовалось ИГХ с АТ к СК8/18. В 30 случаях (97%) в СОЖ рядом с РРЖ кишечного типа определялись очаги ТДЖ. Кроме того, в СОЖ рядом с РРЖ кишечного типа были диагностированы зоны толстокишечной метаплазии в 77% случаев и ХАГ в 94% случаев. В 27 случаях (87%) с РРЖ кишечного типа распространение опухоли в подслизистую основу желудка не было обнаружено (стадия pT1a), при этом у 10 из них (37%) диагностированы участки с инвазией рака в МП СО без прорастания в подслизистую основу. В 4 случаях (13%) была выявлена инвазия опухоли в подслизистую основу, при этом разрушение МП СО четко визуализировалось с помощью АТ к десмину – стадия pT1b. Наряду с этим, в 1 случае из четырех (25%) с РРЖ кишечного типа со стадией pT1b были выявлены раковые эмболы в просвете кровеносных и лимфатических сосудов подслизистой основы и еще в 1 случае (25%) – метастазы в регионарных лимфатических узлах.

По данным литературы (Давыдов М.И. и соавт., 2008), частота выявления *Hp* у больных с дисплазией различной степени и с кишечной метаплазией находится на уровне 88-96%, при этом возрастая от СДЖ к ТДЖ; к тому же наличие кишечной метаплазии у пациентов с ХАГ также увеличивает частоту выявления *Hp*. Эти данные противоречат результатам, полученными нами. Для оценки

инфицированности РРЖ кишечного типа *Hp* нами были использованы 3 метода: окраска по Р-Г, ИГХ и ПЦР в режиме реального времени. При этом *Hp* были обнаружены только в 1/3 случаев (33,5%), из них выраженная обсемененность *Hp* была только в 14% случаев, в оставшихся случаях 86% - слабая (таблица 2). На наш взгляд, наличие *Hp*-инфекции только в 1/3 случаев РРЖ кишечного типа достаточно закономерно в виду того, что изменения морфологии СОЖ (толстокишечная метаплазия, РРЖ кишечного типа) изменяют ее физико-химические свойства, что приводит к изменению микроусловий для жизнедеятельности *Hp*. Данный вопрос нуждается в дополнительном исследовании.

BRAF мутации не были обнаружены ни в одном случае, KRAS мутации – только в одном случае (таблица 2).

HER2 амплификация была диагностирована в 6 случаях (29%), причем в 2 случаях из них (10% от всех исследованных случаев с РРЖ) результат интерпретируется как +/- (сомнительный) (таблица 2).

Таблица 2

Результаты исследование РРЖ кишечного типа на *Helicobacter pylori*, мутации KRAS, BRAF и Her2 амплификации

<i>Helicobacter pylori</i>				Мутации KRAS	Мутации BRAF	Her2 амплификация	
Отрицательный результат	14 (66,5%)			20 (95%)	21 (100%)	15 (71%)	
Положительный результат	7 (33,5%)			1 (5%) KRAS с.38G>A	0 (0%)	6 (29%)	
	ПЦР + Р- Г + ИГХ	только ПЦР	ПЦР + Р-Г / Р-Г + ИГХ			+	+/-
	1 (14%)	2 (29%)	4 (57%)			4 (19%)	2 (10%)

Анализ иммуногистохимических особенностей тяжелой дисплазии и раннего рака желудка

Иммуногистохимическое исследование с АТ к СК8/18

Наше исследование показало, что статистически значимых различий в количестве клеток, экспрессирующих СК8/18 между ХАГ, ТДЖ и РРЖ кишечного типа нет ($p > 0,05$) – для всех них характерно высокое значение экспрессии АТ, медиана > 96 (94,5 и 98) при небольшом стандартном отклонении (менее 3). При анализе экспрессии СК8/18 по интенсивности экспрессии АТ во всех случаях наблюдалась сильная экспрессия АТ.

Иммуногистохимическое исследование с АТ к СК7

Нами показано, что имеются статистически значимые различия в количестве клеток, экспрессирующих СК7 между ХАГ, ТДЖ и РРЖ кишечного типа. Так, если в ХАГ медиана СК7-положительных клеток равнялась 3,0 (2,0 и 4,0), то при ТДЖ это значение выросло более чем в 3,5 раза - до 11,0 (4,0 и 24,0), а при РРЖ кишечного типа – до 18,0 (10,5 и 48,0) - более чем в 6 раз по сравнению с ХАГ и более чем в 1,6 раза по сравнению с ТДЖ. При анализе интенсивности экспрессии СК7 во всех случаях наблюдалась либо слабая, либо умеренная реакция. Сильной экспрессии СК7 не наблюдалось ни в ХАГ, ни при ТДЖ, ни при РРЖ кишечного типа. При этом вывлены статистически значимые различия ($p < 0,05$) по критерию хи-квадрат – в ХАГ слабая реакция наблюдается статистически значимо чаще, чем при ТДЖ и РРЖ кишечного типа. Статистически значимых различий между ТДЖ и РРЖ кишечного типа по интенсивности экспрессии не выявлено.

Иммуногистохимическое исследование с АТ к Мис-1

Нами показано, что имеются статистически значимые различия в количестве клеток, экспрессирующих Мис1 между ХАГ, ТДЖ и РРЖ кишечного типа. Так, если в ХАГ медиана Мис1-положительных клеток равнялась 3,0 (1,0 и 4,0), то при ТДЖ это значение выросло в 2 раза - до 6,0 (3,0 и 8,0), а при РРЖ кишечного типа - до 8,0 (6,0 и 9,0) - в 2,6 раза больше по сравнению с ХАГ и в 1,3 раза больше по сравнению с ТДЖ. При анализе интенсивности экспрессии Мис-1 во всех случаях

значительно превалировала слабая реакция АТ. Сильной экспрессии Мис-1 не наблюдалось ни в ХАГ, ни при ТДЖ, ни при РРЖ кишечного типа. В 14% случаев в ХАГ было полное отсутствие экспрессии Мис-1. Статистически значимых различий между ТДЖ и РРЖ кишечного типа по критерию 2 не выявлено.

Иммуногистохимическое исследование с АТ к Мис-2

Нами показано, что имеются статистически значимые различия в количестве клеток, экспрессирующих Мис-2 между ХАГ, ТДЖ и РРЖ кишечного типа. Так, если в ХАГ медиана Мис2-положительных клеток составила 0,0 (0,0 и 0,0) (в 19 случаях из 21 экспрессия АТ отсутствовала), то при ТДЖ это значение было 20,0 (14,0 и 38,5). При РРЖ кишечного типа медиана экспрессирующих Мис-2 клеток равнялось 10,0 (6,5 и 15,0) - вдвое меньше, чем при ТДЖ. При анализе интенсивности экспрессии Мис-2 в ХАГ реакция АТ была слабая (из трёх положительных случаев из двадцати одного исследованного). Для ТДЖ более характерна умеренная экспрессия (62% случаев) и в равной степени (по 19%) слабая и сильная. Для РРЖ кишечного типа более характерна слабая (48%) и умеренная (43%) экспрессия Мис-2.

Иммуногистохимическое исследование с АТ к Мис5АС

Наше исследование показало, что статистически значимых различий в количестве клеток, экспрессирующих Мис5АС между ХАГ, ТДЖ и РРЖ кишечного типа нет ($p > 0,05$), однако медиана снижается более чем в 4 раза в ряду от ХАГ к РРЖ: для ХАГ 30,0 (21,0 и 42,5), для ТДЖ – 24,0 (8,5 и 43,0), для РРЖ кишечного типа – 7,0 (5,0 и 45,5). При анализе интенсивности экспрессии Мис5АС во всех случаях наблюдалась реакция АТ различной степени. При этом статистически значимых различий по интенсивности экспрессии АТ между ХАГ, ТДЖ и РРЖ кишечного типа выявлено не было ($p > 0,05$).

Иммуногистохимическое исследование с АТ к p53

Нами показано, что имеются статистически значимые различия в количестве клеток, экспрессирующих p53 между ХАГ, ТДЖ и РРЖ кишечного типа. Так, если в ХАГ медиана p53-положительных клеток составила 0,0 (0,0 и 0,0), то при ТДЖ

это значение было 12,0 (4,5 и 22,5), а при РРЖ кишечного типа - до 52,0 (17,5 и 69,0) - более чем в 4 раза больше по сравнению с ТДЖ. При анализе интенсивности экспрессии p53 в ХАГ наблюдалась только слабая экспрессия (из тех случаев, где имела место экспрессия АТ вообще). При ТДЖ сильной реакции мы не обнаружили, преобладала слабая экспрессия над умеренной в соотношении 2:1. При РРЖ кишечного типа превалировала умеренная экспрессия p53.

Таким образом, современные представления о РРЖ претерпевают значительные изменения и рядом исследователей предлагается рассматривать РРЖ с точки зрения критериев эндоскопических возможностей его радикального удаления (Endoscopic Classification Review Group, 2005; Japanese classification of gastric carcinoma, 2011; Barreto S.G. et al., 2016; Imamura T. Et al., 2016; Kim Y.H. et al., 2016; Japanese Gastric Cancer Association, 2017; Lee I.S. et al., 2017). Выполненное нами исследование РРЖ кишечного типа позволяет применить полученные результаты для комплексной патологоанатомической оценки эпителиальных новообразований желудка с целью определения тактики лечения пациента.

ВЫВОДЫ

1. Для возрастной структуры пациентов с дисплазией желудка слабой и тяжелой степени, раннего рака желудка кишечного типа характерно 2 пика: первый пик для дисплазии слабой степени приходится на возрастной период 60-64 года, для дисплазии тяжелой степени и раннего рака желудка кишечного типа – на возрастной период 60-69 лет; второй пик заболеваемости во всех группах 75-79 лет.

2. Наиболее частыми макроскопическими типами для дисплазии желудка слабой степени являются 0-IIa и 0-Is, а для дисплазии желудка тяжелой степени и раннего рака желудка кишечного типа - 0-IIa и 0-IIb.

3. Ранний рак желудка кишечного типа характеризуется наличием в прилежащих отделах слизистой оболочки желудка участков дисплазии тяжелой степени (в 97% случаев), хронического атрофического гастрита (в 94% случаев) и

толстокишечной метаплазии (в 77% случаев). Для раннего рака желудка кишечного типа характерны низкие значения обсемененности *Helicobacter pylori*, который выявляется только в 33,5%.

4. В раннем раке желудка мутации гена BRAF отсутствовали; мутации гена KRAS выявлены в 5%; HER2-амплификация была выявлена в 29%.

5. Ранний рак желудка кишечного типа и дисплазия желудка тяжелой степени характеризуются во многом сходным иммунофенотипом, однако имеются статистически значимые отличия по характеру экспрессии ряда антител: для CK7, Muc-1 и p53 характерно нарастание количества экспрессирующих клеток в ряду «хронический атрофический гастрит – дисплазия желудка тяжелой степени – ранний рак желудка кишечного типа»; для CK8/18 и Muc-5AC статистически значимых отличий в экспрессии нет; а для Muc-2 характерно резкое увеличение количества экспрессирующих клеток в ряду «хронический атрофический гастрит – дисплазия желудка тяжелой степени» и затем снижение вдвое в ряду «дисплазия желудка тяжелой степени – ранний рак желудка кишечного типа».

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Разработан алгоритм патологоанатомического исследования биопсийного и операционного материала с эпителиальными новообразованиями желудка, включая РРЖ, отражающий значимые параметры, необходимые для стадирования заболевания (pTis, pT1a, pT1b), анализа эффективности выполненной ЭРСО/ЭДПО и определения тактики лечения (рисунок 1):

При этом под эффективно выполненной ЭРСО/ЭДПО понимают метод лечения РРЖ при минимальных рисках лимфогенного метастазирования и рецидива, сравнимых с операционным риском традиционных хирургических вмешательств.

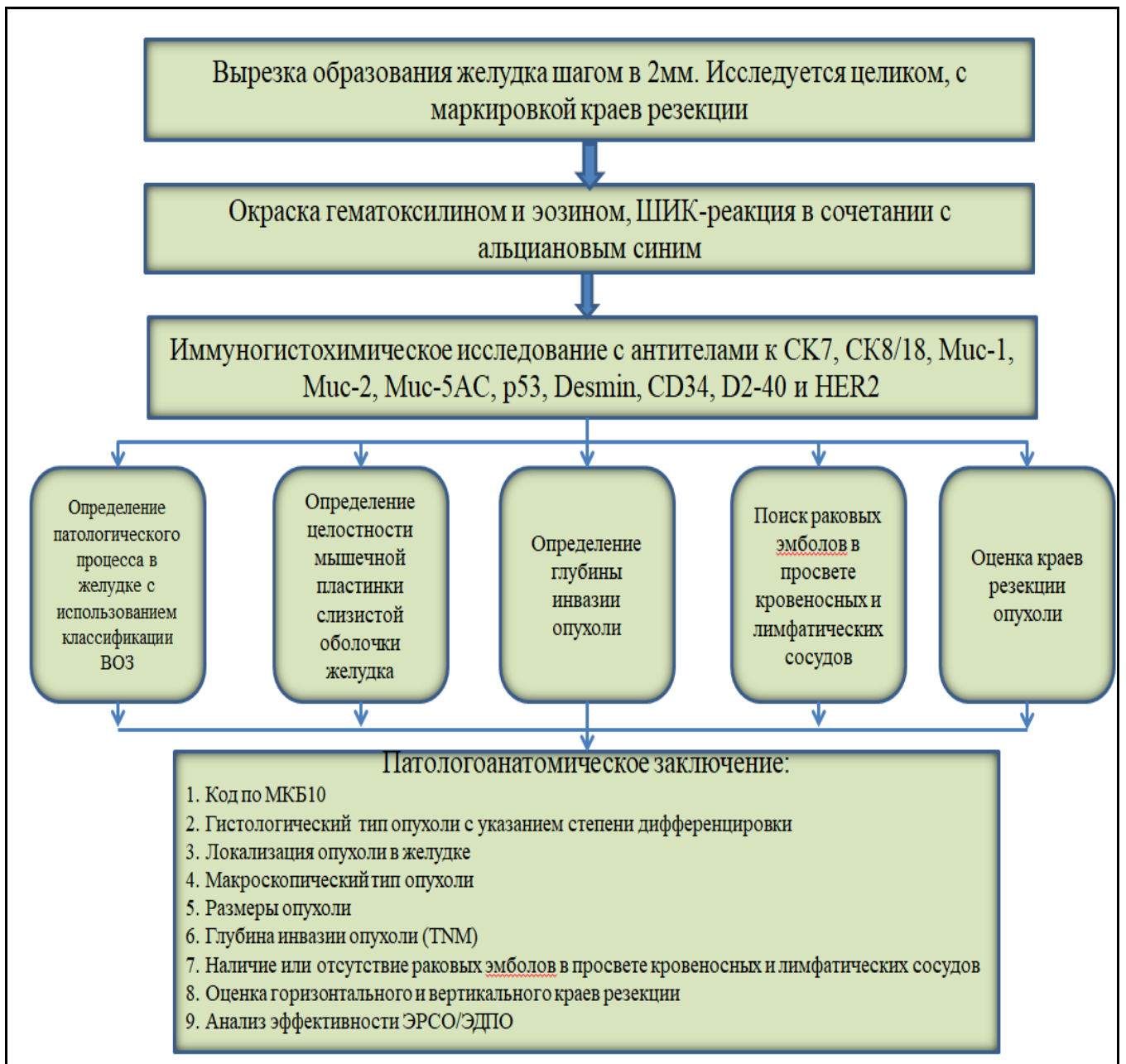


Рисунок 1. Алгоритм патологоанатомического исследования раннего рака желудка

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1. Михалева Л.М., Бирюков А.Е., Плахов Р.В. Современный клинимоρφологический подход к раннему раку желудка // Российский медикобиологический вестник имени академика И.П. Павлова. - 2014. - №4. - с.35-41**
- 2. Бирюков А.Е., Михалева Л.М., Шахпазян Н.К. Современные возможности патологической анатомии в диагностике раннего рака желудка // Уральский медицинский журнал. – 2017. - №04(148). – с.19-25**
- 3. Михалева Л.М., Бирюков А.Е. Морфологические и иммуногистохимические особенности тяжелой дисплазии и раннего рака желудка // Архив патологии. -2017. - №4(79). – с.22-28**
- 4. Михалева Л.М., Бирюков А.Е., Полянко Н.И. Предраковые поражения и ранний рак желудка: современные клинимоρφологические данные // Клиническая медицина. – 2017. - №10(95). – с.881-887**
5. Михалева Л.М., Бирюков А.Е., Плахов Р.В. Алгоритм клинимоρφологической диагностики раннего рака желудка // Клиническая и экспериментальная морфология. - 2015. - №1. - с.19-23
6. Mikhaleva L., Birukov A. Early cancer of the stomach // Modern approaches to morphological diagnosis. Virchows Archiv (2015) 467 (Suppl 1):S1-S279
7. Плахов Р.В., Михалева Л.М., Шаповальянц С.Г., Федоров Е.Д., Галкова З.В., Бунцева О.А., Бирюков А.Е. Роль патоморфологического исследования в оценке эффективности выполнения эндоскопической диссекции при раннем раке желудка. Клиническая демонстрация. Материалы VII Всероссийская научно-практическая конференция «Актуальные вопросы эндоскопии 2016». - Санкт-Петербург. - 2016. – с.116-120
8. Михалева Л.М., Бирюков А.Е., Комлева Р.А. Разработка алгоритма клинимоρφологической диагностики раннего рака желудка. Материалы научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». – Москва. - 2016. - с.28-29

9. Mikhaleva L., Birukov A., Shahpazyan N., Komleva R. Early cancer of the stomach: Clinical-morphological and genetic features. *Virchows Archiv* (2016) 469 (Suppl 1): S1-S346

10. Бирюков А.Е., Михалева Л.М. Ранний рак желудка. Алгоритм клинико-морфологической диагностики после эндоскопической резекции (диссекции) слизистой оболочки. Сборник трудов конференции «Достижения и инновации в современной морфологии». – Минск. -2016. - с.58-63

11. Михалева Л.М., Бирюков А.Е., Шахпазян Н.К. Ранний рак желудка: молекулярно-биологические и генетические аспекты. Материалы V съезда Российского общества патологоанатомов. – Челябинск. -2017. с.203-204

12. Birukov A.E., Mikhaleva L.M., Shahpazyan N.K. Early cancer of the stomach: features of detection of *Helicobacter pylori*. *Virchows Archiv* (2017) 471 (Suppl 1):S1-S352

13. Buntseva O., Fedorov E., Erendgenova K., Galkova Z., Plakhov R., Mayat E., Rauzina S., Zarubina T., Mikhaleva L., Biryukov A., Mizgulin V., Kadushnikov R. High definition and magnified narrow band imaging endoscopy for precise differentiation between gastric epithelial neoplasia and benign lesions. *Digestive Endoscopy* 2017; 29(Suppl 1):S29-261

14. Mikhaleva L.M., Birukov A.E., Shvyrev S.L. Features of the phenotype of severe dysplasia and early gastric cancer of the intestinal type. *Virchows Archiv* (2018) 473 (Suppl 1):S1-340