

На правах рукописи

Вандышева Росица Андреевна
**ЗУБЧАТЫЕ ПОРАЖЕНИЯ ТОЛСТОЙ КИШКИ. КЛИНИКО-
МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА**

3.3.2 – патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении
«Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор

Михалёва Людмила Михайловна

Оппоненты:

доктор медицинских наук

Андреева Юлия Юрьевна

профессор кафедры патологической анатомии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

доктор медицинских наук

Мальков Павел Георгиевич

профессор кафедры физиологии и общей патологии, руководитель курса патологической анатомии факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, заведующий отделом клинической патологии Медицинского научно-образовательного центра Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» (ФГАОУ ВО РУДН) Медицинский институт, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

Защита состоится «___» _____ 2021 года в 12.00 часов на заседании диссертационного совета (24.1.177.01) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» по адресу: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д.3

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

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Доктор биологических наук

Косырева Анна Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

В соответствии с новой классификацией опухолевых новообразований органов пищеварения Всемирной организации здравоохранения от 2019 года зубчатые аденомы толстой кишки получили название «зубчатые поражения» толстой кишки (ЗП) – группа новообразований, являющихся предшественниками колоректального рака (КРР). Общий гистологический признак всех ЗП – зубчатый (или пилообразный) профиль поверхностного эпителия и крипт. Различают следующие типы ЗП: гиперпластические полипы (ГП); гиперпластические полипы микровезикулярного типа (МВГП); гиперпластические полипы богатые бокаловидными клетками (ББГП); сидячие зубчатые поражения (СЗП); сидячие зубчатые поражения с дисплазией; традиционные зубчатые аденомы (ТЗА) (**Digestive System Tumours WHO Classification of Tumours, 5th Edition, 2019**). Особое место среди ГП занимает МВГП, обладающий способностью трансформироваться в СЗП, которые наряду с ТЗА являются предшественниками зубчатых аденокарцином (ЗА) толстой кишки (**Sekine S. et al., 2020; Liu C. et al., 2018**). ЗА составляют от 10% до 30% всех КРР (**Alburquerque-González B. et al., 2020**).

КРР – это одно из самых часто встречающихся злокачественных новообразований во всем мире (3-е место). В России КРР находится на 5-ом месте у мужчин и на 4-ом месте у женщин (**Петрова Г.В. и др., 2019; Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В., 2017**). Большая часть КРР, трансформировавшихся из ЗП по зубчатому пути канцерогенеза, располагаются в правой половине толстой кишки, что вызывает большие трудности для обнаружения и выявляются только на поздних стадиях (**Anderson J.C. et al., 2020**). На сегодняшний день сохраняются сложности при патоморфологическом исследовании типов ЗП толстой кишки, так их часто диагностируют как гиперпластические полипы или просто полипы (**Jaravaza D.R. et al., 2020**). Для лечащего врача крайне важно знать молекулярно-генетические характеристики, влияющие на выбор способа дальнейшего лечения и прогноза заболевания. Поэтому актуальным вопросом в практике врача-патологоанатома является способ дифференциальной диагностики типов ЗП и их иммуногистохимический фенотип.

Известно, что гомеостаз в кишечном эпителии зависит от строго регулируемого баланса между пролиферирующими, дифференцирующимися и апоптотическими клетками. При патоморфологическом исследовании гистологических срезов ЗП, выявляются изменения в зонах пролиферации, однако четко оценить степень выраженности и различия в морфологических типах возможно только с помощью иммуногистохимического маркера Ki67 (**Олейникова Н.А. и др., 2018**). Желудочная дифференцировка зубчатых новообразований была описана в 1999 году на основании иммуногистохимической реакции с «human gastric mucin». На наш взгляд в настоящее время недостаточно широко изучена реакция не только с антителами к муцинам желудочного типа MUC5AC и MUC6, но и толстокишечного типа MUC2 в ЗП различных типов (**Михалева Л.М. и др., 2019**). Имеются единичные литературные данные о значимой разнице между типами ЗП в локализации в экспрессии маркера CK20 (**Михалева Л.М. и др., 2017**). Особенности фенотипа ЗП при наличии мутаций в генах *KRAS*, *BRAF* и *NRAS*, и микросателлитной нестабильности лишь отрывочно представлены в литературе (**Кузнецова О.А. и др., 2021; Mikhaleva L.M. et al., 2021; Bettington M. et al., 2019**). Несмотря на имеющиеся данные до сих пор не изучен фенотип ЗП и не сформулировано единого структурированного подхода к дифференциальной диагностике типов ЗП с использованием иммуногистохимических (ИГХ) и молекулярно-генетических методов.

Предполагается, что применение ИГХ и молекулярно-генетических маркеров даст возможность комплексно представить иммунофенотип, гистогенез ЗП и значение мутаций

генов *KRAS*, *BRAF* и *NRAS* для прогноза заболевания, и их способность к злокачественной трансформации.

Комплексный подход в изучении ЗП толстой кишки позволит представить объективные дифференциально-диагностические критерии всех типов ЗП и уточнить путь зубчатого канцерогенеза, что, несомненно, имеет важное значение как для фундаментальной, так и для практической медицины. Кроме того, необходимо провести сравнительную характеристику типов ЗП в зависимости от экспрессии маркеров MUC2, MUC5AC, MUC6, Ki67, CK20, наличия/отсутствия мутации генов *KRAS*, *BRAF* и *NRAS*, а также микросателлитной нестабильности, что найдет свое отражение в разработке алгоритма дифференциальной диагностики ЗП.

Степень разработанности темы исследования

На сегодняшний день не описаны четкие критерии для дифференциальной диагностики типов зубчатых поражений толстой кишки. При сформированных морфологических критериях не всегда удается четко определить тип зубчатого поражения в практической деятельности врача-патологоанатома. Это связано, в первую очередь, с тем, что зубчатые поражения имеют крайне малые размеры, из-за чего не всегда возможно сориентировать их правильно при заливке в парафиновые блоки. С клинико-морфологической точки зрения данные образования за счет небольших размеров часто остаются недооцененными, и нередко их упускают при колоноскопии, либо трактуют как гиперпластические полипы, которые по существующим рекомендациям, не требуют обязательного удаления. Однако имеются исследования, в которых микровезикулярные гиперпластические полипы вызывают наибольшую настороженность, так как они являются промежуточным этапом в развитии сидячих зубчатых поражений и традиционных зубчатых аденом. Важным моментом в канцерогенезе по зубчатому пути является этап трансформации сидячих зубчатых поражений и традиционных зубчатых аденом в стадию с наличием низкой (low-grade) или высокой (high-grade) степени диспластических изменений.

Несмотря на рост числа публикаций, в которых рассматриваются морфологические критерии зубчатых поражений, включая обновленную классификацию Всемирной организации здравоохранения от 2019 года, вопрос о дополнительных способах диагностики остается открытым. Отсутствуют исследования, посвященные определению диагностической панели для выявления различий типов зубчатых поражений толстой кишки. Известно, что зубчатый путь характеризуется желудочной дифференцировкой с характерным появлением экспрессии маркеров MUC5AC, и реже MUC6. Колоректальные раки с мутацией гена *BRAF* имеют повышенную экспрессию MUC2. Экспрессия CK20, выявляемая только в верхней части крипты и поверхностном эпителии нормальной слизистой оболочки толстой кишки, а также маркера пролиферативной активности Ki67 изменяются в зависимости от типа зубчатого поражения. ИГХ метод исследования с маркерами MUC2, MUC5AC, MUC6, Ki67, CK20 позволит уточнить пути развития зубчатых поражений, а также выявить актуальные критерии для их дифференциальной диагностики.

С патогенетической точки зрения для зубчатых поражений наиболее характерными изменениями считаются появления мутации гена *BRAF*, реже *KRAS* и микросателлитной нестабильности. Стоит отметить, что каждый из типов зубчатого поражения имеет свой особенный молекулярный путь при однотипности гистологических черт. Возможно, что эти различия обусловлены этапами эмбриональной закладки толстой кишки и, соответственно, зависят от того, в каком отделе толстой кишки развиваются новообразования. Полученные к настоящему времени данные, не позволяют полноценно описать различия каждого из типов зубчатого поражения с точки зрения патогенеза, и представить наиболее значимые для

практического применения в патологической анатомии способы дифференциальной диагностики.

Цель исследования

Определение клинико-морфологических особенностей и молекулярно-генетических характеристик зубчатых поражений толстой кишки и их роли в канцерогенезе.

Задачи исследования

1. Провести клинико-морфологическую диагностику зубчатых поражений толстой кишки.
2. Определить иммуногистохимический фенотип зубчатых поражений толстой кишки с маркерами MUC2, MUC5AC, MUC6, Ki67 и CK20.
3. Определить частоту мутации генов *KRAS*, *BRAF* и *NRAS* в общей структуре зубчатых поражений толстой кишки и в их типах.
4. Выявить микросателлитную нестабильность с помощью иммуногистохимического метода с маркерами MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6 в зубчатых поражениях толстой кишки.

Научная новизна

Впервые на большом клиническом материале представлена клинико-морфологическая и эндоскопическая характеристика зубчатых поражений толстой кишки и их гистологических типов.

Впервые проведено исследование зубчатых поражений толстой кишки с сопоставлением полученных клинико-морфологических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических данных для определения фенотипа зубчатых поражений.

Впервые разработан алгоритм клинико-морфологической дифференциальной диагностики зубчатых поражений с применением иммуногистохимических маркеров, а также с учетом наличия/отсутствия мутаций генов *KRAS*, *BRAF* и *NRAS*.

На основании результатов молекулярно-генетического исследования уточнены основные звенья патогенеза зубчатых поражений и их роли в канцерогенезе.

Теоретическая и практическая значимость

Проведенное комплексное клинико-патоморфологическое исследование позволило полноценно охарактеризовать каждый тип зубчатых поражений толстой кишки в зависимости от клинических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических характеристик.

Полученные результаты способствуют уточнению механизмов канцерогенеза колоректального рака по зубчатому пути. Представлено, что микровезикулярный гиперпластический полип является промежуточным этапом как для дальнейшего развития сидячих зубчатых поражений, так и традиционных зубчатых аденом, что основано на изучении частоты мутации генов *BRAF* и *KRAS*.

Проведенное клинико-морфологическое исследование на большом клиническом материале определило значимость пола, размера и локализации для каждого типа зубчатых поражений толстой кишки.

Представленный иммунофенотип всех типов зубчатых поражений толстой кишки в сочетании с мутациями генов *BRAF* и *KRAS* позволит обосновано эндоскопистам, хирургам и онкологам проводить персонализированные диагностические и лечебные мероприятия.

Методология и методы исследования

Моделирование дизайна исследования было проведено при участии диссертанта и в полном соответствии с поставленными целями и задачами. Методология диссертационного исследования основана на комплексном клинико-морфологическом подходе в изучении зубчатых поражений толстой кишки, а именно: клинико-морфологическом, иммуногистохимическом и молекулярно-генетическом исследовании трех гистологических типов зубчатых поражений толстой кишки и сопоставлении полученных результатов. Первоначальное выполнение патоморфологического исследования позволило распределить на

три гистологических типа зубчатые поражения толстой кишки, собраны клинико-анамнестические и эндоскопические данные, проведены иммуногистохимическое и молекулярно-генетическое исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. Зубчатые поражения толстой кишки диагностируются у пациентов старше 55 лет и в 1,5 раза чаще поражают женщин ($p < 0,05$). В правых отделах толстой кишки развиваются преимущественно сидячие зубчатые поражения со средним размером 8,2 мм, в левых – традиционные зубчатые аденомы и гиперпластические полипы со средними размерами 16,3 мм и 6,2 мм соответственно ($p < 0,05$), макроскопически зубчатые поражения имеют характерный 0-IIa тип по Парижской эндоскопической классификации.
2. Зубчатые поражения толстой кишки имеют иммунофенотипические признаки как толстокишечной дифференцировки (выраженная экспрессия более 50% всех клеток маркеров MUC2 и CK20), так и желудочной дифференцировки (появление экспрессии MUC5AC и MUC6, очаговое Шифф-позитивное окрашивание). Экспрессия MUC6 характерна только для сидячих зубчатых поражений толстой кишки.
3. Зубчатый путь канцерогенеза характеризуется преимущественным наличием мутации гена *BRAF* (37,7%), реже - гена *KRAS* (17,4%), и микросателлитной нестабильности высокой степени. Путь малигнизации сидячих зубчатых поражений связан с наличием мутации гена *BRAF* (53,8%) и микросателлитной нестабильности высокой степени (34,8%), традиционных зубчатых аденом - с мутацией гена *KRAS* (47,1%) и микросателлитной нестабильности высокой степени (40%). Выявленные мутации генов *KRAS* (15,4%), *BRAF* (38,5%) и микросателлитная нестабильность (60%) в гиперпластических полипах толстой кишки подтверждает их роль в зубчатом канцерогенезе.

Степень достоверности и апробация работы

Проведенное исследование было выполнено на достаточном объеме материала для каждой исследованной группы, задачи исследования логично изложены, достоверность результатов подтверждается выбором методов и результатами статистического исследования, а также сравнительной оценкой полученных данных с литературными.

Основные положения диссертационного исследования были доложены и обсуждались на 28th European Congress of Pathology (Cologne, 25-29 сентября 2016 г.), V Съезде Российского общества Патологоанатомов (Челябинск, 1-4 июня 2017 г.), 29th European Congress of Pathology (Amsterdam, 2-6 сентября 2017 г.), IV Российско-Японском научно-образовательном семинаре по программе ТТТ с прямой видеотрансляцией “Сложные и нерешенные вопросы диагностики и лечения заболеваний пищевода, желудка и толстой кишки” (Москва, 29-30 января 2018 г.), Международной научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 1-2 ноября 2018 г.), I Крымском форуме «Онкология, патоморфология и патофизиология: от теории к практике» (Крым, 7-8 октября 2020 г.), Международной научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 12-13 ноября 2020 г.).

Личный вклад автора

Автор диссертации самостоятельно осуществил сбор литературных данных, проанализировал и обобщил их, участвовал в отборе материала, анализе и получении анамнестических и клинических данных, проведении морфометрии ИГХ реакций, статистической обработке, обобщении и обсуждении полученных результатов, подготовке публикаций.

Публикации по теме работы

Результаты исследования изложены в 11 работах, 4 из которых опубликованы в журналах RSCI WoS (1), Scopus (3), входящих в перечень рецензируемых научных изданий

ВАК, где должны быть размещены основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук. Получен 1 патент на изобретение.

Внедрение результатов в практику

Результаты исследования внедрены в работу патологоанатомического отделения ГБУЗ «Городская клиническая больница №31 Департамента здравоохранения города Москвы».

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 174 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, практических рекомендаций, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 51 рисунками и 10 таблицами. Список литературы включает 217 источников, из них 27 отечественных и 190 зарубежных.

Диссертация соответствует паспорту специальности: 3.3.2 - патологическая анатомия.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В работе было исследовано 481 наблюдение зубчатых поражений толстой кишки, полученное во время колоноскопии с биопсией или после полипэктомии от 353 пациентов в возрасте от 29 до 87 лет (средний возраст составил 59,1 год), проходивших лечение в ГБУЗ «ГКБ №31 ДЗМ» с 2014 по 2020 гг. Весь материал был разделен на группы в соответствии с гистологическим типом согласно классификации зубчатых поражений ВОЗ от 2019 года (таблица 1).

Таблица 1 – Число наблюдений ЗП и распределение по гистологическому типу

	Зубчатые поражения	Сидячие зубчатые поражения	Гиперпластические полипы	Традиционные зубчатые аденомы
Число пациентов	353	124	193	36
Число образований	481	201	238	42

Материал доставлялся в патологоанатомическое отделение ГБУЗ «ГКБ №31 ДЗМ» в 10% забуференном растворе формалина с направительным диагнозом «полип толстой кишки» или «зубчатая аденома/полип». Далее проводилась вырезка образцов. Полиповидные образования разрезались таким образом, чтобы была представлена вся слизистая оболочка и участок с прилегающей нормальной слизистой оболочкой. После чего формировались парафиновые блоки. С помощью ротационных микротомов Sacuga были изготовлены гистологические срезы толщиной 3-4 мкм. Полученные срезы после депарафинации были окрашены гематоксилином и эозином, а также реактивом Шиффа в сочетании с альциановым синим по стандартной методике. В каждом наблюдении был проведен анализ клинических данных пациентов с учетом анамнеза заболеваний толстой кишки и оценки эндоскопических протоколов.

Вторым этапом явилось определение иммунофенотипа каждой группы ЗП. Для этого было отобрано для ИГХ исследования 69 наблюдений ЗП толстой кишки: СЗП — 26, ГП — 26, ТЗА — 17. Иммуногистохимическая панель включала антитела к CK20 (Leica, UK), Ki67 (30-9, Ventana, USA), MUC2 (клон MRQ-18, CELL MARQUE, USA), MUC5AC (клон MRQ-19, CELL MARQUE, USA) и MUC6 (клон MRQ – 20, CELL MARQUE, USA). Для ИГХ были изготовлены срезы толщиной 3-4 мкм, которые помещали на высокоадгезивные стекла и высушивали в термостате при температуре 70С в течение 2 часов. Для детекции применяли «Bond Polymer Refine Detection (DS9800)», в качестве хромогена – диаминобензидин. Реакции проводили с помощью автоматического иммуногистостейнера Leica Bond-maX (Germany) и Ventana Veuch Mark Ultra (USA).

Интерпретацию ИГХ исследования с указанными антителами проводили по двум критериям: а) количественным – путем подсчета количества окрашенных опухолевых клеток на 100 клеток в 10 полях зрения (увеличение 400), выражали полученные результаты в процентах с формированием 3 групп: 0 – отсутствие окрашенных клеток, 1 – до 50% окрашенных клеток (очаговая), 2 – более 50% окрашенных клеток; б) полуколичественным - интенсивность экспрессии антител в опухолевых клетках оценивали по балльной шкале от 0 до 3 (рисунок 1): 0 – отсутствие реакции; 1 – слабая реакция (светло-коричневое окрашивание); 2 – умеренная реакция (коричневое окрашивание); 3 – сильная реакция (темно-коричневое окрашивание).

Препараты изучались при помощи светового микроскопа «ZIESS Axiostar plus» со стандартным набором оптики. Микрофотографирование производилось на микроскопе биологическом универсальном Leica DMLB с цветной цифровой камерой DFC420 при помощи стандартного программного средства Leica Application Suite v. 3.7.0. и путем сканирования микропрепаратов на цифровом сканере Leica Aperio AT2 с последующим отбором изображений в программе Aperio ImageScope 12.4.3.

Первый этап молекулярно-генетического исследования

Для выявления мутаций генов *KRAS*, *BRAF* и *NRAS* использованы парафиновые блоки с исследованным материалом (таблица 2), из которых производились параллельные срезы с шагом 3-4 мкм с последующим выделением геномной ДНК (набором для выделения ДНК “DNA Sample Preparation Kit, Cobas®” Roche, USA). Для определения мутаций генов *KRAS* и *BRAF* использовался метод ПЦР в режиме реального времени набором реагентов “*KRAS/BRAF* Mutation Analysis Kit” (EntroGen, USA); аналитическая панель включала мутации 2,3,4 экзона гена *KRAS* и мутацию гена *BRAF p.V600E*. Определение мутаций гена *NRAS* проводилось также методом ПЦР в режиме реального времени с помощью набора реагентов «Гест-*NRAS*-ткань» фирмы ТестГен (Россия).

Таблица 2 – Количество наблюдений, исследованных на наличие мутаций генов *BRAF*, *KRAS* и *NRAS*

Тип зубчатых аденом	Число образований/ число пациентов
Все типы ЗП	71/71
СЗП	26/26
ГП	26/26
ТЗА	17/17
СЗП червеобразного отростка	2/2

Панель выявляемых мутаций включает: ген *KRAS* (12,13,61,117,146 кодоны): ген *KRAS* (12,13,61,117,146 кодоны): G12A (с.35G>C); G12D(с.35G>A); G12R (с.34G>C); G12C (с.34G>T); G12S (с.34G>A); G12V (с.35G>T); G13D (с.38G>A); Q61H (с.183A>C; с.183A>T); Q61H (с.182A>T); Q61R (с.182A>G); K117N (с.351A>C; с.351A>T); K117R(с.350A>G); K117E (с.349A>G); A146T (с.436G>A); A146P (с.436G>C); A146V (с.437C>T); ген *BRAF*: V600E (с.1799T>A), 12, 13 и 61-го кодонов гена *NRAS*, сопровождающиеся аминокислотными заменами: Gly12Asp, Gly12Cys, Gly12Ser, Gly13Asp, Gly13Arg, Gln61Lys, Gln61Leu, Gln61Arg. Лимит детекции мутаций – 5% на фоне ДНК дикого типа.

Второй этап молекулярно-генетического исследования

Для обнаружения микросателлитной нестабильности (МСН) был использован метод ИГХ диагностики с антителами к MLH1 (G168-728), PMS2 (MRQ-28), MSH2 (G219-1129) и MSH6 (44) с обязательным контролем. Появление МСН расценивалось при отсутствии экспрессии в эпителиальных клетках в 3-х и более смежных криптах, по рекомендациям Pai

R.K. et al. (2019), в парах MLH1 и PMS2 или MSH6 и MSH2, или всех четырех маркеров. Дополнительно оценивался маркер MLH1 в случаях ЗП с наличием и без дисплазии.

Нами были отобраны 28 наблюдений ЗП (16 – СЗП толстой кишки и 2 – СЗП червеобразного отростка, 5 – ТЗА толстой кишки, 5 – ГП толстой кишки) для исследования МСН с помощью ИГХ диагностики с панелью антител к MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6 с обязательным контролем, которые на первом этапе генетического исследования были оценены на наличие мутаций генов *KRAS*, *BRAF* и *NRAS*. При отсутствии экспрессии маркеров MLH1 и PMS2 или всех четырех маркеров более чем в 3-х смежных криптах расценивалось как МСН высокой степени (МСН-В). При отсутствии экспрессии маркеров MSH2 и MSH6 более чем в 3-х смежных криптах расценивалось как МСН низкой степени (МСН-Н).

Анализ медицинской документации

Обязательным этапом явилось изучение истории болезни с оценкой пола, возраста пациентов и анализом анамнестических данных о заболеваниях толстой кишки. Учитывались протоколы колоноскопии с определением типа эндоскопического вмешательства, локализации и количества образований, их размера и типа согласно Парижской эндоскопической классификации новообразований желудочно-кишечного тракта.

Статистическое исследование

Статистический анализ выполняли в программах MS Excel, Statistica 10.0. и IBM SPSS Statistics v25 (IBM corp., USA). Нормальность распределения количественных переменных проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. В качестве параметров описательной статистики для нормально распределенных количественных переменных рассчитывали средние арифметические значения и стандартные отклонения ($M \pm SD$), для переменных с распределением, отличным от нормального - медианы и квантили (Me (LQ; UQ)). Сравнение количественных переменных в двух группах проводили с помощью критерия Манна-Уитни, в трёх группах и более - с помощью критерия Крускала-Уоллиса с апостериорными сравнениями критерием Данна. Для качественных переменных рассчитывали абсолютные и относительные частоты - n (%). Анализ таблиц сопряженности качественных переменных проводили с помощью критериев Хи-квадрат и точного критерия Фишера. При множественных попарных сравнениях применяли поправку Бонферрони. Анализ корреляций проводили с помощью критерия ранговой корреляции Спирмена. При проверке статистических гипотез уровень значимости был установлен равным 0,05 (нулевые гипотезы отвергали при $p < 0,05$). Перед началом работы методом Колмогорова-Смирнова был проведен анализ цифровых данных на нормальность распределения.

Результаты исследования и их обсуждение

Совокупность полученных результатов комплексного исследования ЗП толстой кишки позволяет описать полноценную картину заболевания с учетом половозрастных особенностей, локализации, макроскопического и микроскопического портрета данного заболевания.

Так, по нашим результатам средний возраст пациентов с ЗП толстой кишки составил 59,1 год, однако достоверно отличался в зависимости от типа (таблица 3), но не менялся у мужчин и женщин. В тоже время ЗП в 1,5 раза чаще диагностируются у женщин, чем у мужчин.

Таблица 3 – Возрастные особенности зубчатых поражений

Тип	Число наблюдений	Число пациентов	Среднее значение (лет)	Стандартное отклонение	Стандартная ошибка среднего	LQ/ UQ	Min/ Max
ГП	238	193	58,8 лет	13,88	0,88	51/70	26/86
СЗП	201	124	56,8 лет	13,78	0,97	46/68	29/87
ТЗА	42	36	66,7 лет	11,9	0,77	60/75	31/83
Все ЗП	481	343	59,1 год	13,7	0,63	51/71	26/87

Нами было отмечено, что большинство наблюдений с ЗП у мужчин фиксировалось в возрасте от 20 до 49 лет со средним значением 46,5 лет ($\pm 13,4$). Для пациентов женского пола наиболее характерной оказалась возрастная группа от 60 до 69 лет со средним значением 64,7 года ($\pm 11,7$). Что интересно, четверть пациентов, страдающих ЗП, были моложе 50 лет. В данной возрастной группе преобладали СЗП толстой кишки, которые обладают наибольшим потенциалом злокачественной трансформации (рисунок 1). ТЗА диагностировались наиболее часто (76,19%) у людей старше 60 лет, и средний возраст составил 66,7 лет ($\pm 11,9$) (рисунок 1). Необходимо отметить, что у женщин ТЗА встречались преимущественно в возрастном периоде от 60 до 69 лет, в то время как у мужчин - от 70 до 79 лет. По данным литературы ЗП толстой кишки поражают наиболее часто пациентов в возрасте от 50 до 65 лет, при этом у мужчин средний возраст с данным заболеванием составляет 63,3 года, у женщин — 56,8 лет (Chen Z. et al., 2019; Hirai H.W. et al., 2019; Liu C. et al., 2018; Neary P.M. et al., 2018; Oliveira P.S.P. et al., 2018; Park S.J. et al., 2018; Zhao S. et al., 2019). Это свидетельствует о том, что необходимо проводить скрининг в более раннем возрасте и тщательно исследовать гистологический материал для дифференциальной диагностики между СЗП и ГП.

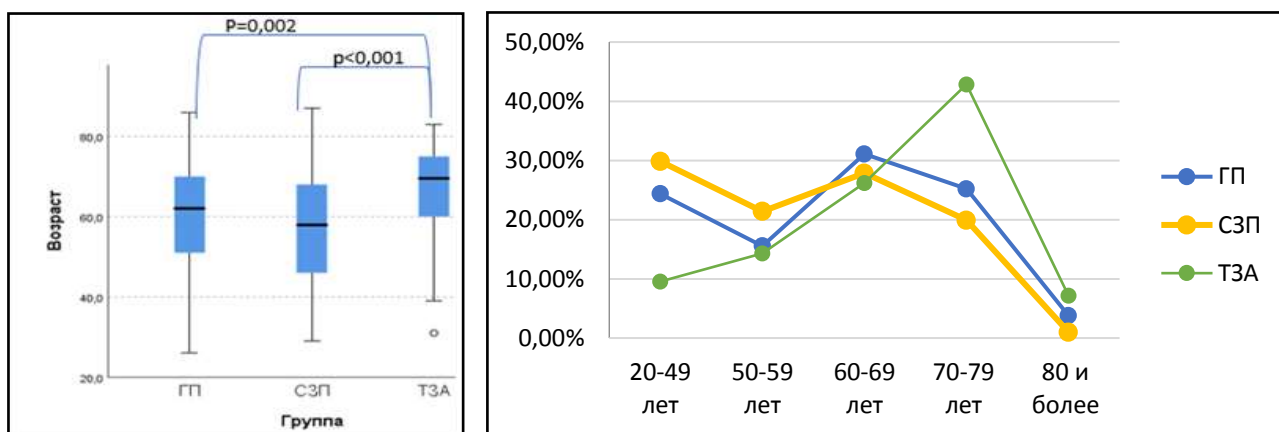


Рисунок 1 – Графики возрастных особенностей пациентов с зубчатыми поражениями

Нами было определено, что у 15,4% пациентов с ЗП были выявлены от 2-х и более поражений одновременно. Преимущественно это касалось СЗП, которые также обнаруживались в одной и той же локализации одновременно в 36,7% и многие из них были в количестве от 5 до 13 СЗП (таблица 4).

Таблица 4 – Число наблюдений пациентов с множественными зубчатыми поражениями толстой кишки

Число пациентов с множественными ЗП толстой кишки (n=59)					
ГП(n=24)		СЗП(n=30)		ТЗА (n=6)	
<5	≥5	<5	≥5	<5	≥5
22	2	24	6	6	0

По макроскопическим данным ЗП преимущественно имеют небольшие размеры до 10 мм и плоскую форму, которые крайне тяжело диагностируются (Агейкина Н.В. и др., 2020; Chavali L.B. et al., 2020; Gupta V. et al., 2020; Murakami T. et al., 2019). Согласно нашим исследованиям размер образований у 72,14% ЗП толстой кишки не достигал 10 мм в диаметре, при этом в 20,5% был менее 5 мм (рисунок 2). Большая часть исследователей приводят данные, свидетельствующие о том, что частота появления диспластических изменений и рака «in situ» в ЗП возрастает с увеличением размеров образования (Okamura T. et al., 2020; Rubio C.A. et al., 2020; Tao E.W. et al., 2020; O'Connell B. et al., 2017; Bettington M. et al., 2017).

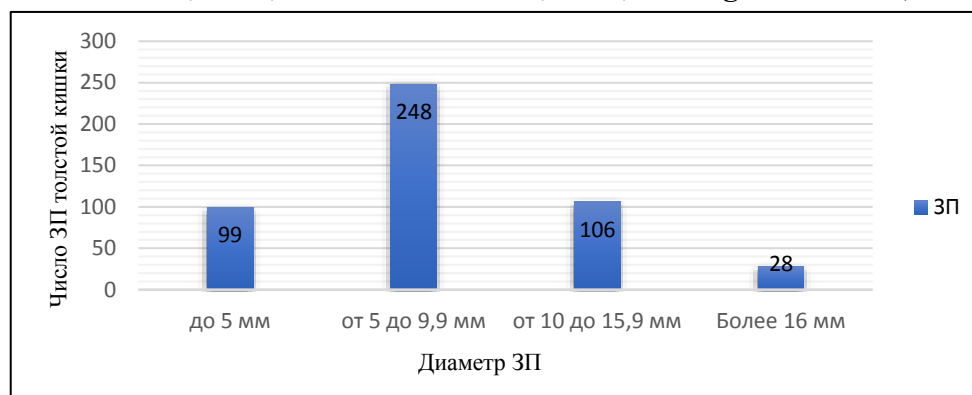


Рисунок 2 – Распределение числа наблюдений ЗП толстой кишки в зависимости от их размера.

Около половины наблюдений СЗП (48,76%) имели размеры от 5,0 до 10,0 мм, среднее значение составило 8,4 мм ($\pm 4,9$), что достоверно выше ($p < 0,001$), чем у ГП (6,2 мм ± 3). Это согласуется с результатами других исследований (Зобнина М.В. и др., 2018; Gupta V. et al., 2020; Mccarthy A.J. et al., 2019). ГП имеют небольшие размеры до 10 мм в диаметре со средним значением 6,2 мм ± 3 , однако большая часть (59,24%) были диаметром от 5,0 до 10 мм, что отличается от большинства данных (рисунок 3). Стоит также отметить, что в 14,71% наблюдений ГП их размер был более 10 мм. Часть зарубежных коллег (Villanacci V. et al., 2019; Pai R.K. et al., 2019) считают, что истинные ГП не могут быть таких размеров, поэтому рекомендуют ставить диагноз СЗП для более тщательного наблюдения за таким пациентом и обеспечения тотальной резекции данного участка. Согласно существующим рекомендациям ГП, размером больше 1,0 см, по одним данным, и более 5 мм – по другим, особенно расположенные проксимальнее селезеночного изгиба следует трактовать как СЗП (Villanacci V. et al., 2019). По нашему мнению, следует усилить внимание к диагностике и лечению ГП, расположенных проксимальнее селезеночного изгиба.

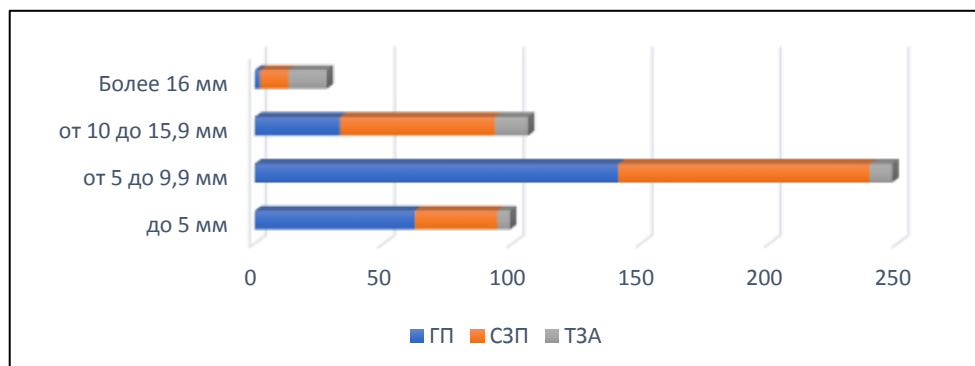


Рисунок 3 – Распределение числа наблюдений ЗП толстой кишки в зависимости от их размера и гистологического типа.

Результаты нашего исследования показали, что размеры образований с увеличением степени дисплазии возрастали у женщин и у мужчин, и средний размер СЗП с дисплазией оказался равен 10,2 и 10,7 мм соответственно. По данным других коллег до 87% СЗП и СЗП с дисплазией располагались в правой половине толстой кишки, но также встречались в левых отделах, прямой кишке и аппендиксе (Mccarthy A.J. et al., 2019). При этом многими авторами отмечается, что с увеличением размеров СЗП увеличивается риск развития диспластических изменений и средний размер СЗП с дисплазией составляет 12 мм, и около 40% от них оказались менее 10 мм (Bettington M. et al. 2017; Cenaj O. et al., 2018; Liu C. et al., 2017). По нашим данным в 47,6% ТЗА была выявлена дисплазия низкой степени и их средний размер составил 9,7 мм, в то время как ТЗА с дисплазией высокой степени (28,6%) имели средние размеры в 1,4 раза больше – 13,4 мм. ТЗА с признаками малигнизации по типу умеренно- и высокодифференцированной аденокарциномы, которые составили 11,2% от всех ТЗА, имели размеры более 33 мм. Полученные данные макроскопического исследования ТЗА согласуются с результатами отечественных и зарубежных коллег (Харлова О.А. и др., 2018; Sekine S. et al., 2020; Okamura T. et al., 2020).

По эндоскопическим характеристикам, согласно Парижской классификации, для большей части ЗП толстой кишки характерен «плоско-приподнятый» 0-IIa тип (рисунок 4).



Рисунок 4 – Фотографии эндоскопического исследования толстой кишки и патоморфологического исследования (окр. гематоксилином и эозином). А – гиперпластический полип толстой кишки 0-IIa тип по Парижской эндоскопической классификации. Б – сидячее зубчатое поражение толстой кишки 0-IIa тип по Парижской эндоскопической классификации. В – традиционная зубчатая аденома толстой кишки 0-Is тип по Парижской эндоскопической классификации.

ГП и ТЗА у пациентов женского (по 33,3% соответственно) и мужского пола (27,4% и 33,4% соответственно) диагностировались преимущественно в сигмовидной кишке. В то время как большинство СЗП и СЗП с дисплазией развиваются в правой половине толстой кишки с преобладанием в восходящей части как у пациентов мужского пола (31,8%), так и женского (44,4%). В общей структуре ЗП характерна правосторонняя локализация (рисунок 5 а, б).

Полученные результаты не противоречат исследованиям зарубежных коллег (Murakami T. et al., 2018; Liu T.Y. et al., 2018; Cassese G. et al., 2019; Zhou M.J. et al., 2019).

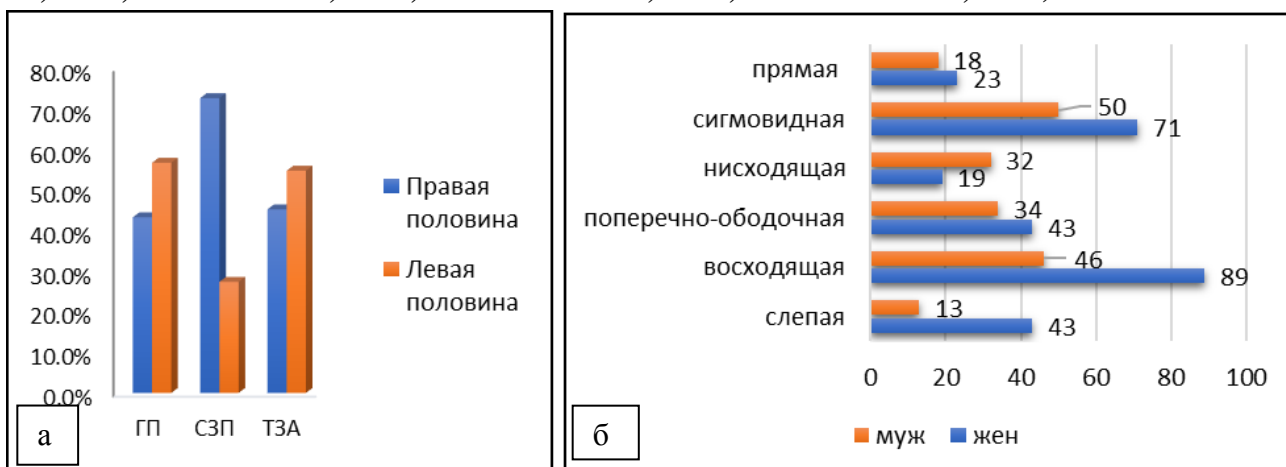


Рисунок 5 – распределение наблюдений зубчатых поражений по локализации в зависимости от типа (а) и пола (б).

По результатам нашего исследования было определено, что для всех ЗП характерна положительная реакция с MUC2, которая имела некоторые отличия в выраженности экспрессии в зависимости от типа и генетического нарушения (рисунок 6). Для ГП выраженная реакция была определена во всех наблюдениях и не отличалась в зависимости от присутствия мутаций генов *BRAF*, *KRAS* и без. В группе СЗП в 84,6% была выявлена выраженная экспрессия MUC2 вдоль всей длины крипты и в дилатированном основании. Стоит отметить, что СЗП с мутацией гена *BRAF* показывали более яркую реакцию (в 85,7%), чем в СЗП без мутации и без признаков дисплазии, что согласуется с имеющимися данными (Sugai T. Et al., 2018; Eizuka M. et al., 2018). Экспрессия MUC2 была отмечена во всех случаях ТЗА, здесь важно сказать, что при наличии дисплазии высокой степени и очагов малигнизации по типу умеренно- и высокодифференцированной аденокарциномы отмечалось интенсивное окрашивание более 50% клеток.

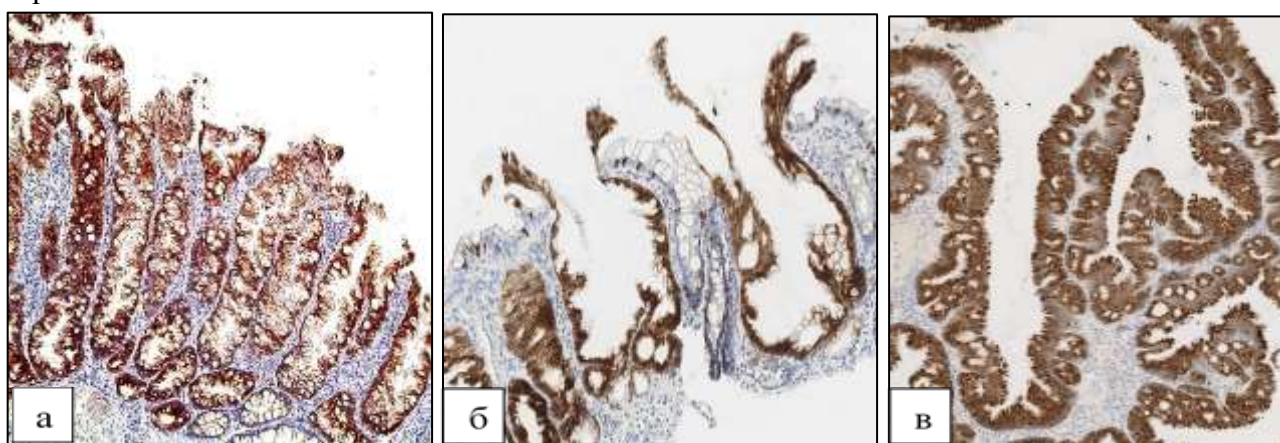


Рисунок 6 - Микрофотографии. ИГХ исследование с антителом к MUC2 в гиперпластическом полипе (а), сидячем зубчатом поражении (б) и традиционной зубчатой аденоме (в).

Исследование с антителами к MUC6 показали наибольшие отличия в типах ЗП (рисунок 7). Так, положительная экспрессия MUC6 выявлена в большинстве СЗП, особенно важно подчеркнуть, что в СЗП с признаками дисплазии высокой и низкой степени, а также при наличии мутации гена *BRAF* чаще присутствовала экспрессия данного маркера. В ГП в 7,7%

(в том числе с наличием мутации гена *BRAF*) была выявлена умеренная экспрессия MUC6 в базальных отделах крипты, что, по нашему мнению, может быть косвенным свидетельством того, что МВГП может быть предшественником СЗП. Поэтому ГП с экспрессией MUC6 следует трактовать как СЗП. В ТЗА как с мутацией гена *KRAS*, так гена *BRAF* экспрессия MUC6 оказалась отрицательной. Полученные нами данные не противоречат зарубежной научной литературе (Pai R.K. et al., 2019; Eizuka M. et al., 2018; Sugai T. Et al., 2018).

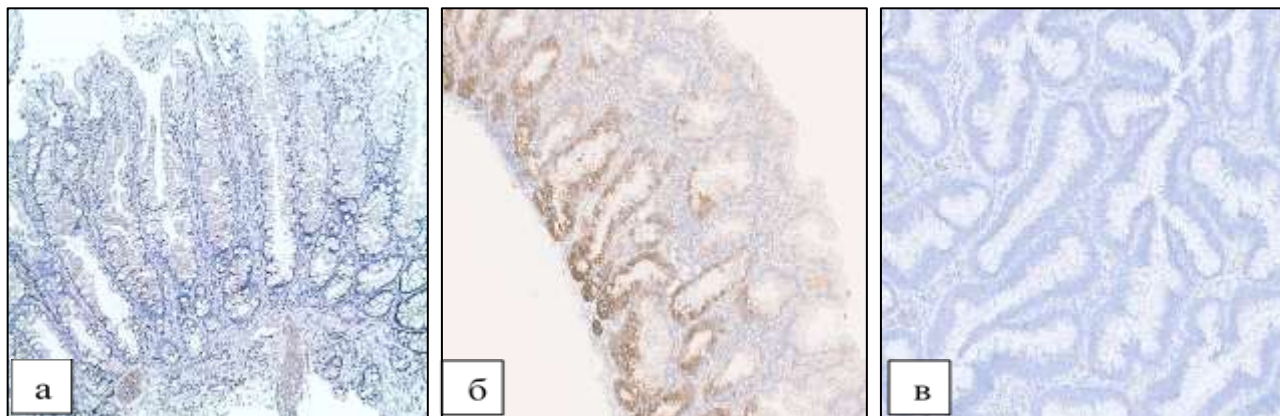


Рисунок 7 - Микрофотографии. ИГХ исследование с антителом к MUC6 в гиперпластическом полипе (а), сидячем зубчатом поражении (б) и традиционной зубчатой аденоме (в).

Еще одним важным маркером для дифференциальной диагностики ЗП и изучения молекулярно-генетических характеристик является маркер MUC5AC. Мы отметили, что в ЗП экспрессия желудочного маркера MUC5AC выявилась во всех типах (рисунок 8) (Михалева Л.М. и др., 2017; 2019). Разница между типами была в локализации экспрессии, интенсивности и количестве окрашенных клеток. Так, умеренно выраженная экспрессия с MUC5AC в ГП выявлялась менее чем в 50% и отличалась в ГП с наличием мутации генов *BRAF* и *KRAS*. В отличие от ГП, большинство СЗП, особенно с признаками дисплазии, характеризовались ярко выраженной реакцией с маркером MUC5AC, которая определялась более чем в 50% клеток. При сопоставлении с наличием генетических нарушений оказалось, что выраженная экспрессия наблюдалась с мутантными формами, а без мутации гена *BRAF* в СЗП интенсивность экспрессии оценивалась как умеренная. В ТЗА диагностировалась преимущественно умеренно выраженная реакция, которая затрагивала более 50% клеток и была характерна для наблюдений с признаками дисплазии и малигнизации, а также в ТЗА с мутацией гена *KRAS*. Наличие дисплазии как низкой, так и высокой степени сочеталось с усилением экспрессии MUC5AC для всех типов ЗП ($p=0,03$). Таким образом, экспрессия MUC5AC характерна для ЗП и связана с основными молекулярно-генетическими нарушениями – мутацией генов *BRAF* и *KRAS*, что согласуется с имеющимися сведениями других исследователей (De Palma F. et al., 2019; Pai R.K. et al., 2019; Sugai T. et al., 2018).

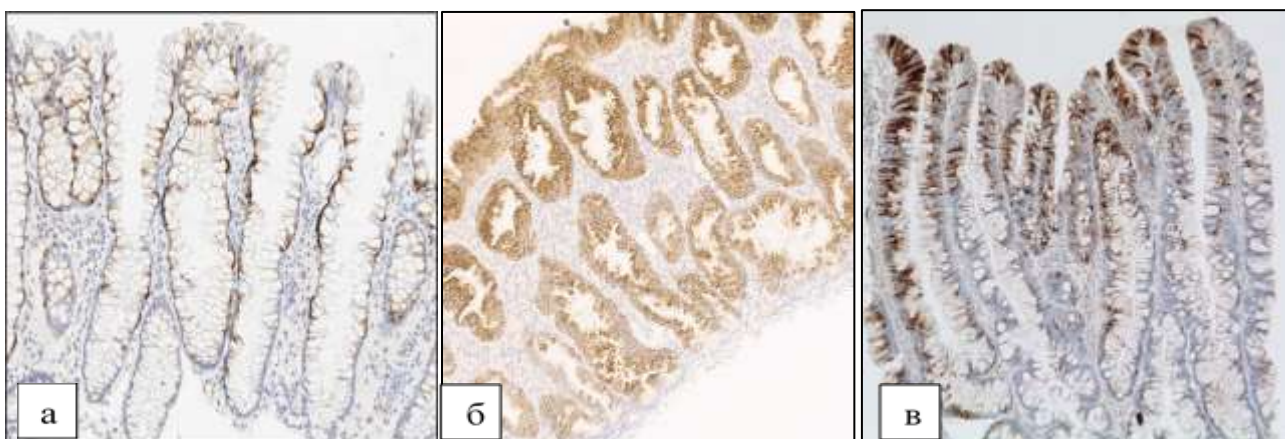


Рисунок 8 - Микрофотографии. ИГХ исследование с антителом к MUC5AC в гиперпластическом полипе (а), сидячем зубчатом поражении (б) и традиционной зубчатой аденоме (в).

Основным маркером энтероцитов является CK20, который в норме экспрессируется только в верхней части крипт. В случаях с ГП и СЗП отмечалось распределение экспрессии на нижнюю треть, исключая основание крипты (рисунок 9 а, б). В ТЗА наблюдалась в большинстве случаев выраженная экспрессия, которая диагностировалась вдоль всей длины и в эктопированных криптах (рисунок 9 в). Результаты исследования согласуются с литературными данными (**Hiromoto T. et al., 2018**). При сопоставлении данных экспрессии CK20 с наличием мутаций генов – отличий получено не было.

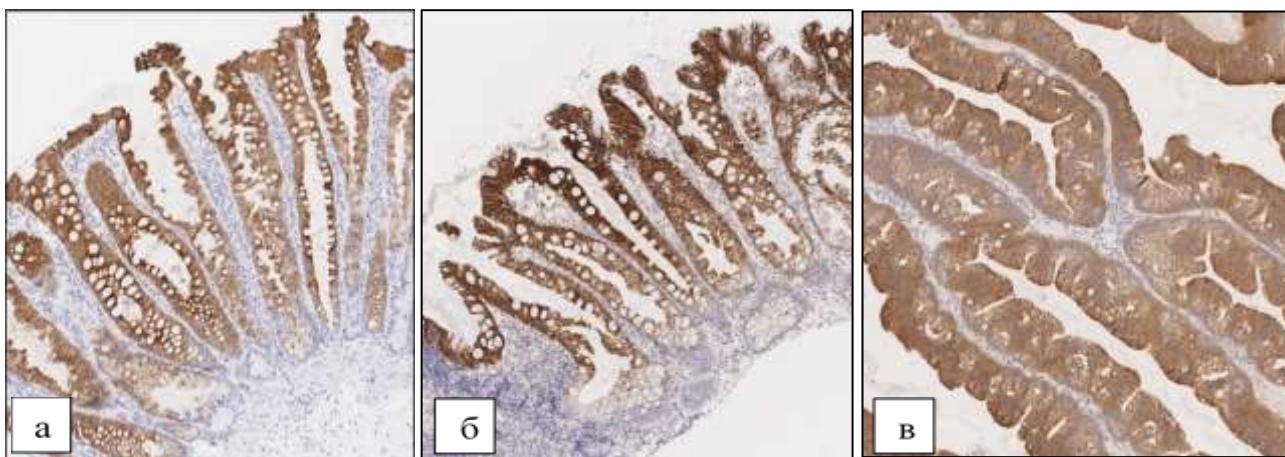


Рисунок 9 - Микрофотографии. ИГХ исследование с антителом к CK20 в гиперпластическом полипе (а), сидячем зубчатом поражении (б) и традиционной зубчатой аденоме (в).

Для выявления пролиферативных особенностей было проведено исследование с маркером Ki67 (рисунок 10). По полученным данным ГП характеризовались малой пролиферативной активностью со средним значением индекса 34,4%. Наиболее высокий индекс был выявлен у ТЗА со средним значением 76,3%. В СЗП индекс пролиферативной активности статистически значимо был выше, чем в ГП ($p=0,02$), но ниже, чем у ТЗА ($p=0,001$). Полученные показатели согласуются с данными многих исследователей (**Okamura T. et al., 2020; Digestive System Tumours WHO Classification of Tumours, 5th Edition, 2019; Олейникова Н.А. и др., 2018; Hashimoto T. et al., 2018**). В ТЗА экспрессия выявлялась неравномерно, также присутствовала в эктопированных криптах, что согласуется с результатами Bettington M. et al. (2018). В то же время в более ранних исследованиях Torlakovic

E. et al. (2008) показано, что экспрессия в эктопированных криптах для них не была характерна. Однако в СЗП мы выявили более высокие уровни индекса Ki67, особенно для наблюдений с дисплазией со значением 56,3%, а для СЗП без дисплазии составил 35,1%. Результаты проведенного нами исследования показали, что экспрессия Ki67 коррелировала с увеличением степени дисплазии в СЗП и ТЗА ($p < 0,05$) и усилением реакции с MUC5AC во всех типах ЗП ($p < 0,05$).



Рисунок 10 - Микрофотографии. ИГХ исследование с антителом к Ki67 в гиперпластическом полипе (а), сидячем зубчатом поражении (б) и традиционной зубчатой аденоме (в).

В результате ИГХ исследования нами было показано, что все ЗП характеризуются выраженной экспрессией CK20 и MUC2, что характерно для образований толстой кишки. Однако выявленная экспрессия маркеров желудочного типа MUC6 и MUC5AC характерна для ЗП, особенно с наличием мутаций генов *BRAF*, и реже *KRAS*.

При генетическом исследовании ГП были выявлены мутации гена *BRAF* в 38,5% случаев и гена *KRAS* в 15,4%, в 46,2% случаев – отсутствовали мутации генов. В МВГП обнаружены мутации обоих генов, в то время как в ББГП была выявлена мутация только гена *KRAS*.

В СЗП была определена мутация гена *BRAF* в 53,8% наблюдений, в 46,2% СЗП мутация генов *KRAS* и *NRAS* не обнаружена. СЗП с дисплазией в 64,3% наблюдений имели мутацию гена *BRAF*, при этом 41,7% СЗП без дисплазии также были с мутацией гена *BRAF*.

Результаты генетического исследования показали, что в 47,1% ТЗА имеется мутация гена *KRAS*, в 11,8% - мутации гена *BRAF*, а в 41,2% - мутация генов отсутствовала. Что оказалось характерно, мутация гена *BRAF* была обнаружена в наблюдениях ТЗА с наличием дисплазии высокой степени и фокусами малигнизации по типу умеренно- и высококодифференцированной аденокарциномы. Мутация гена *KRAS* выявлена в 50% наблюдений с дисплазией низкой степени, а также во всех оставшихся случаях с дисплазией высокой степени и с фокусами малигнизации.

Мутации гена *NRAS* не было выявлено ни в одном из исследуемых образцов от пациентов с ГП, СЗП и ТЗА.

Таким образом мутация преимущественно гена *BRAF* была определена в 37,7% ЗП толстой кишки, которая диагностировалась во всех типах, с преобладанием в ГП и СЗП (таблица 5). Эти результаты согласуются с данными большинства исследователей (Kim J.H. et al., 2020; Borowsky J. et al., 2018; Kim S.Y. et al., 2018; Zhao S. et al., 2019). В наблюдениях с ТЗА, напротив, мы чаще выявляли мутацию гена *KRAS* (41,7%) (таблица 3). Часть зарубежных коллег полагает, что ТЗА с мутацией гена *KRAS* развиваются *de novo*, в то время как ТЗА с мутацией гена *BRAF* – имеют предшественников в виде МВГП или СЗП (Bettington M. et al., 2018; Chavali L. et al., 2020; Hashimoto T. et al., 2018). Схожие результаты были получены

японскими коллегами Shigeki Sekine et al. (2020), которые продемонстрировали, что в ТЗА чаще встречается мутация гена *KRAS*, и выявили дополнительные изменения, такие как *PTPRK–RSPO3* и *RNF43*, которые приводят к активации WNT путей, в дополнение к мутации гена *KRAS*, что доказывает возможность перехода ГП в СЗП и ТЗА, и СЗП в ТЗА (Sekine S. et al., 2020).

Таблица 5 - Число наблюдений ЗП толстой кишки в зависимости от наличия мутаций генов.

Тип зубчатых поражений	Число наблюдений/ пациентов	<i>BRAF</i> + случаи	<i>KRAS</i> + случаи	<i>NRAS</i> + случаи	<i>BRAF</i> / <i>KRAS</i> - (без мутаций генов)
ГП	26/26	10 (38,4%)	4 (15,4%)	0 (0%)	12 (46,2%)
СЗП	26/26	14 (52,8%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (42,2%)
ТЗА	17/17	2 (11,8%)	8 (47,1%)	0 (0%)	7 (41,2%)

Мутация гена *KRAS* встречалась в ТЗА и ГП, локализованных преимущественно в левых отделах, однако при наличии мутации гена *BRAF* в этих же типах ЗП было характерно правостороннее расположение. В СЗП толстой кишки была определена только мутация гена *BRAF*, которая встречалась как в правосторонних, так и левосторонних новообразованиях. В наблюдениях СЗП в червеобразном отростке в одном из наблюдений была выявлена мутация гена *KRAS*, что отличает молекулярный путь этого типа в данной локализации и подтверждается большинством исследований (Adhya A.K. et al., 2018; Biswas S. et al., 2018; Figueroa-Rivera I.M. et al., 2018; Sato K. et al., 2018). Что касается влияния мутации гена *NRAS* на зубчатый путь, мы считаем его незначимым, так как не было выявлено ни одного ЗП с мутацией данного гена.

КРР с диагностированной мутацией гена *BRAF* в 25% случаев развиваются из СЗП и имеют худшие прогнозы (Moriichi K. et al., 2020). По данным исследователей Богомоловой И.А. с соавторами (2019), нарушения EGFR-сигнального пути в целом (*KRAS*, *NRAS* и *BRAF*) в предраковых поражениях и КРР, повышает риск развития рецидива рака и ухудшает прогноз заболевания.

В половине исследованных нами наблюдений ЗП толстой кишки и во всех гистологических типах были отмечены признаки МСН, что было обусловлено нарушением функции генов репарации неспаренных оснований – *MLH1*, *PMS2*, *MSH6* и *MSH2* (рисунок 11). Для большинства злокачественных опухолей для точного диагностирования МСН необходима потеря маркеров при ИГХ исследовании во всем опухолевом участке (Кузнецова О.А. и др., 2021; Завалишина Л.Э. и др., 2020; Андреева Ю.Ю. и др., 2019). Что касается КРР и предраковых поражений толстой кишки, часть исследователей (Luchini C. et al., 2019) предлагают на основании только *PMS2* и *MSH6* и их выпадении диагностировать МСН.

Так как ЗП относятся к доброкачественным образованиям, не описано четких критериев для постановки диагноза МСН, однако при выпадении только одного маркера *MLH1* считается достаточным (в том числе по рекомендациям ВОЗ (2019)), для диагностики МСН (Олейникова Н.А. и др., 2020; Dekker E. et al., 2020; Nagtegaal I.D. et al., 2020; Pai R.K. et al., 2019; Digestive System Tumours WHO Classification of Tumours, 5th Edition, 2019). Одним из ключевых моментов перехода из СЗП в СЗП с дисплазией, которое в дальнейшем имеет тенденцию к быстрой малигнизации в стадию ЗА является потеря экспрессии *MLH1*. Впервые это отметили и связали в предположение в 2006 году Goldstein N.S. et al. По последним публикациям, включая рекомендации ВОЗ, при появлении подозрений на

дисплазию в СЗП рекомендуется проводить ИГХ с MLH1, и при выявлении выпадения экспрессии данного маркера диагностировать СЗП с дисплазией высокой степени (high grade), даже при минимальных гистологических проявлениях дисплазии (Mikhaleva L.M. et al., 2021; Pai R.K. et al., 2019; Digestive System Tumours WHO Classification of Tumours, 5th Edition, 2019).

Нами показано, что появление МСН в ГП сочеталось в 66,7% наблюдений с мутацией гена *BRAF*. Половина наблюдений СЗП и ТЗА с МСН имели также мутацию гена *BRAF*. Стоит отметить, что в ТЗА МСН не была выявлена в наблюдениях с мутацией гена *KRAS*. Полученные результаты сопоставимы с данными литературы (Bettington M. et al., 2017). В то же время, при определении иммунофенотипа ЗП толстой кишки с наличием или отсутствием МСН значимых различий получено не было.

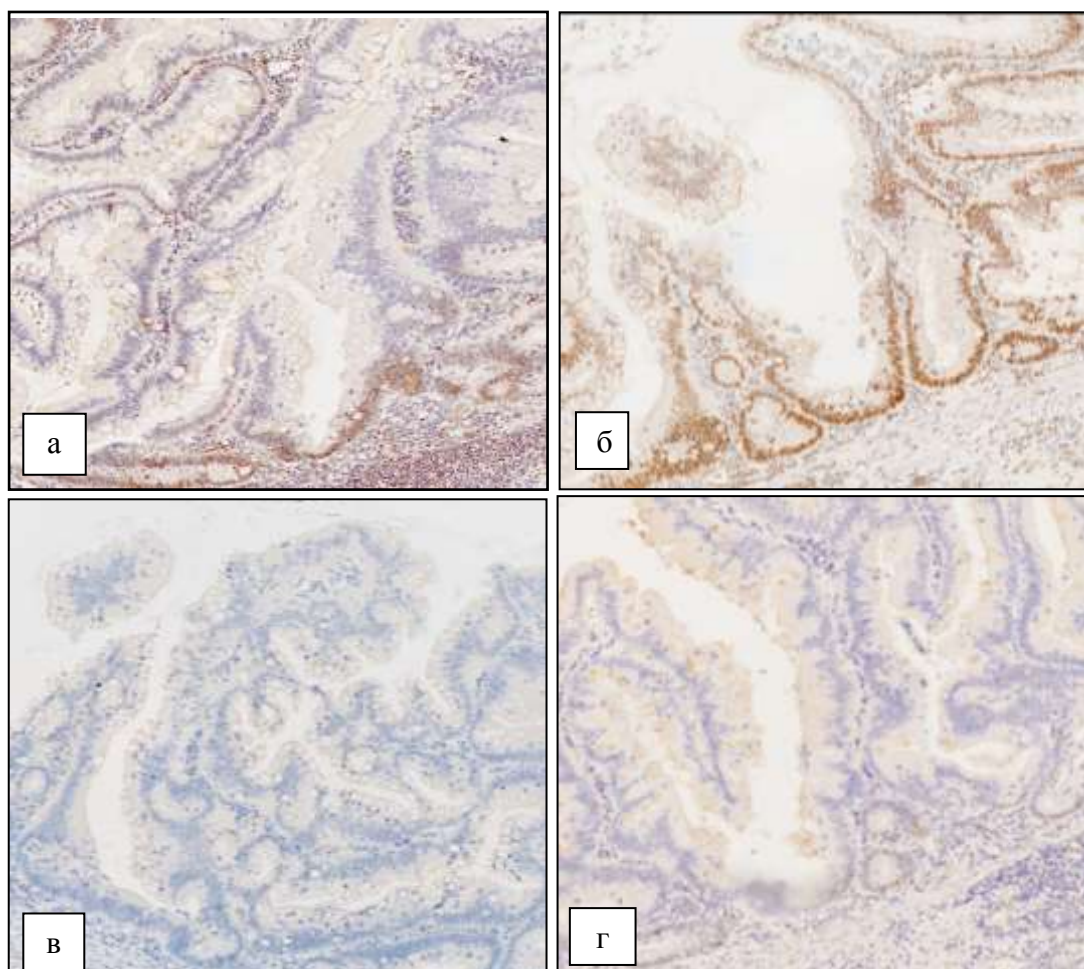


Рисунок 11 - Микрофотографии. ИГХ реакция с маркерами к MLH1 (а), PMS2 (б), MSH2 (в) и MSH6 (г) в сидячем зубчатом поражении червеобразного отростка с дисплазией высокой степени и мутацией гена *KRAS*.

Таким образом, в ходе нашего исследования, удалось определить характерные клиничко-морфологические и молекулярно-генетические особенности типов ЗП толстой кишки (таблица 6).

Таблица 6 - Сводная таблица результатов клинико-морфологического и молекулярно-генетического исследования типов зубчатых поражений толстой кишки.

Показатель	Гиперпластические полипы	Сидячие зубчатые поражения	Традиционные зубчатые поражения
Клинические данные	Возраст – 59,6 лет Размер <10 мм (Ср.размер = 6,2 мм) Тип по Парижской классификации – 0-Па	Возраст – 56,8 лет Размер <10 мм (Ср.размер = 8,4 мм) Тип по Парижской классификации – 0-Па	Возраст – 66,7 лет Размер >15 мм (Ср.размер = 16,3мм) Тип по Парижской классификации – 0-Па
Локализация	Левая половина толстой кишки (преимущественно сигмовидная)	Правая половина толстой кишки (преимущественно восходящая часть ободочной кишки)	Левая половина толстой кишки (преимущественно сигмовидная)
СК20	Выраженная экспрессия, кроме основания крипты	Выраженная экспрессия, кроме основания крипты	Выраженная или умеренная экспрессия, преимущественно в поверхностном эпителии
Индекс Ki67	<30%	<30% - без дисплазии >50% - с дисплазией	>40%
MUC2	Выраженная экспрессия, кроме основания крипты	Выраженная экспрессия, кроме основания крипты	Выраженная или умеренная экспрессия, преимущественно в поверхностном эпителии
MUC5AC	Умеренно выраженная очаговая экспрессия	Выраженная экспрессия	Умеренно выраженная очаговая экспрессия
MUC6	Нет	Умеренная и выраженная экспрессия в основании	Нет
Мутация BRAF	+	+	-/+
Мутация KRAS	+	-	+
Мутация NRAS	0	0	0
MCH	MCH-H	MCH-B	MCH-B

Заключение.

Зубчатые поражения толстой кишки – это гетерогенная группа новообразований, отличающаяся морфологическими, иммуногистохимическими и генетическими свойствами, а также различным потенциалом злокачественности. Совокупность многочисленных исследований, проведенных в разных странах, показывает высокий интерес к данной проблеме, а также то, что ЗП еще остаются не до конца изученными. Особое место занимает определение патогенеза каждого из типов ЗП и их роли в канцерогенезе КРР. Гетерогенность

морфологических проявлений приводит к путанице и необходимости получения четких критериев, алгоритмов и дополнительных методов для дифференциальной диагностики ЗП. Патоморфологическая диагностика зубчатых новообразований на сегодняшний день основана на выявлении в гистологических препаратах специфической структуры, в первую очередь зубчатого профиля эпителия и формы крипт. Однако не во всех клинических наблюдениях удается выявить эти характерные гистологические признаки. Наше исследование было направлено на выявление клинических особенностей в совокупности с морфологическими, иммуногистохимическими и молекулярно-генетическими данными, которые позволят правильно классифицировать зубчатые поражения.

Существуют способы диагностики зубчатых образований, при которых традиционное микроскопическое исследование гистологических препаратов дополняется иммуногистохимическим выявлением маркеров, определяющих пролиферативный потенциал, а также секреторного профиля новообразования. В нашей работе были отобраны наиболее значимые иммуногистохимические маркеры, которые характеризуют как патогенетические основы ЗП, так и позволяют оценить течение заболевания и тактику дальнейшего лечения. Мы рекомендуем проводить тщательное наблюдение за пациентами с крупными ЗП или с сопутствующими запущенными аденомами.

В ходе проведенного нами исследования был разработан способ дифференциальной диагностики видов зубчатых новообразований с исследованием залитого в парафин биоптата, что позволяет не только проводить диагностику при поступлении пациента в лечебно-профилактическое учреждение, но и по прошествии времени в случае необходимости уточнения диагноза или проверки точности его формулировки.

Мы определили характерные иммунофенотипические особенности каждого типа ЗП в совокупности с молекулярно-генетическими нарушениями. Полагаем, что это также позволит проводить дифференциальную диагностику КРР, возникших на фоне ЗП и которые развиваются в результате малигнизации классических аденом.

Надеемся, что осведомленность об особенностях ЗП, особенно расположенных в правых отделах ободочной кишки, приведет к большему вниманию к данным новообразованиям толстой кишки и полному своевременному удалению, что существенно снизит риск развития колоректального рака у этих пациентов в будущем.

Выводы.

1. Зубчатые поражения толстой кишки развиваются у пациентов со средним возрастом 59,1 год, и в 1,5 раза чаще у женщин. Наибольшее количество наблюдений (49,5%) составили гиперпластические полипы, затем сидячие зубчатые поражения – 41,8%, традиционные зубчатые аденомы – в 8,7%. Для зубчатых поражений толстой кишки характерен размер до 10 мм (средний размер гиперпластических полипов 6,2 мм, и сидячих зубчатых поражений 8,4 мм). Типичной локализацией гиперпластических полипов и традиционных зубчатых аденом является сигмовидная кишка, сидячих зубчатых поражений – восходящая часть толстой кишки ($p < 0,05$).

2. Зубчатые поражения толстой кишки характеризуются выраженной экспрессией маркеров MUC2 и CK20, и Ki67 в зонах пролиферативной активности. Интенсивность реакции с маркерами MUC5AC и MUC6 зависит от гистологического типа: для гиперпластических полипов характерна очаговая умеренно выраженная экспрессия MUC5AC вдоль длины крипт, для сидячих зубчатых поражений – выраженная экспрессия в основании дилатированных крипт и вдоль их длины, и в традиционных зубчатых аденомах – очаговой экспрессией (более 50 % клеток) с расположением в верхней части крипты и эктопированных криптах; экспрессия MUC6 обнаружена только в сидячих зубчатых поражениях толстой кишки.

3. В зубчатых поражениях толстой кишки выявлена в 37,7% мутация гена *BRAF* и в 17,4% гена *KRAS*, ни в одном наблюдении мутация гена *NRAS* не была зарегистрирована. Мутации генов *BRAF* и *KRAS* в следующих соотношениях были выявлены в типах ЗП:

- в гиперпластических полипах толстой кишки: мутация гена *BRAF* (38,4%), гена *KRAS* (15,4%), отсутствие мутации генов 46,2%;

- в сидячих зубчатых поражениях: мутация гена *BRAF* (52,8%), гена *KRAS* (0%), отсутствие мутации генов (46,2%);

- в традиционных зубчатых аденомах: мутация гена *BRAF* (11,8%), гена *KRAS* (47,1%), отсутствие мутации генов (41,1%).

4. Микросателлитная нестабильность диагностирована во всех типах зубчатых поражений в следующих соотношениях:

- в гиперпластических полипах - микросателлитная нестабильность низкой степени (40%), высокой степени (20%), отсутствовала (40%);

- в сидячих зубчатых поражениях - микросателлитная нестабильность низкой степени (18,7%), высокой степени (31,3%), отсутствовала (50%);

- в традиционных зубчатых аденомах - микросателлитная нестабильность низкой степени (0%), высокой степени (40%), отсутствовала (60%).

Практические рекомендации

Результаты проведенного исследования доказывают патогенез колоректального рака на фоне зубчатых поражений толстой кишки, что обуславливает необходимость в проведении диагностической колоноскопии пациентам для их раннего выявления в рамках скрининга. Для эффективной диагностики зубчатых поражений мы рекомендуем:

1. Во время эндоскопической колоноскопии при выявлении полиповидных или «плоско-приподнятых» образований проводить полипэктомия или резекцию для полного и одномоментного удаления образования. Выполнение биопсии считаем нецелесообразным в виду того, что даже при размерах до 10 мм в зубчатых поражениях, особенно сидячих зубчатых поражений, диагностируются признаки дисплазии. Гиперпластические полипы подлежат полному удалению в связи с возможной дальнейшей трансформацией в сидячие зубчатые поражения и традиционные зубчатые аденомы.

2. При направлении материала на патологоанатомическое исследование в направлении необходимо указывать диагноз, локализацию, размер и тип по Парижской эндоскопической классификации удаленного фрагмента.

3. Патоморфологическое исследование. Важным этапом для дифференциальной диагностики всех полиповидных образований толстой кишки является правильное расположение тканевого образца при вырезке материала и заливке в парафиновые блоки для морфологического исследования с гематоксилином и эозином и ШИК-реакцией в сочетании с альциановым синим. Ключевым моментом при дифференциальной диагностике гиперпластических полипов и сидячих зубчатых поражений является наличие расширенных крипт в основании для сидячих зубчатых поражений, для диагноза традиционных зубчатых аденом – отхождение под прямым углом к основной эктопированных крипт.

4. Иммуногистохимическое исследование с антителами к MUC2, MUC5AC и MUC6 необходимо использовать для определения гистологического типа зубчатых поражений в случае затруднения постановки диагноза на предыдущем этапе (рисунок 12). Определение индекса пролиферативной активности позволяет определить наличие дисплазии в сидячих зубчатых поражениях при его значении более 50%.

5. При выраженной экспрессии MUC5AC и MUC6 увеличивается риск наличия мутации генов *BRAF* и *KRAS*. В связи с этим, рекомендуется более настороженно наблюдать

за такими пациентами. В случае наличия более 2-х зубчатых поражений при текущем исследовании или в анамнезе, а также экспрессии маркеров MUC5AC и MUC6, следующим этапом идет проведение генетического исследования.

6. Независимо от экспрессии маркеров MUC2, MUC5AC и MUC6 рекомендуется проведение иммуногистохимического исследования с антителами к MLH1, PMS2, MSH6 и MSH2 для определения микросателлитной нестабильности.

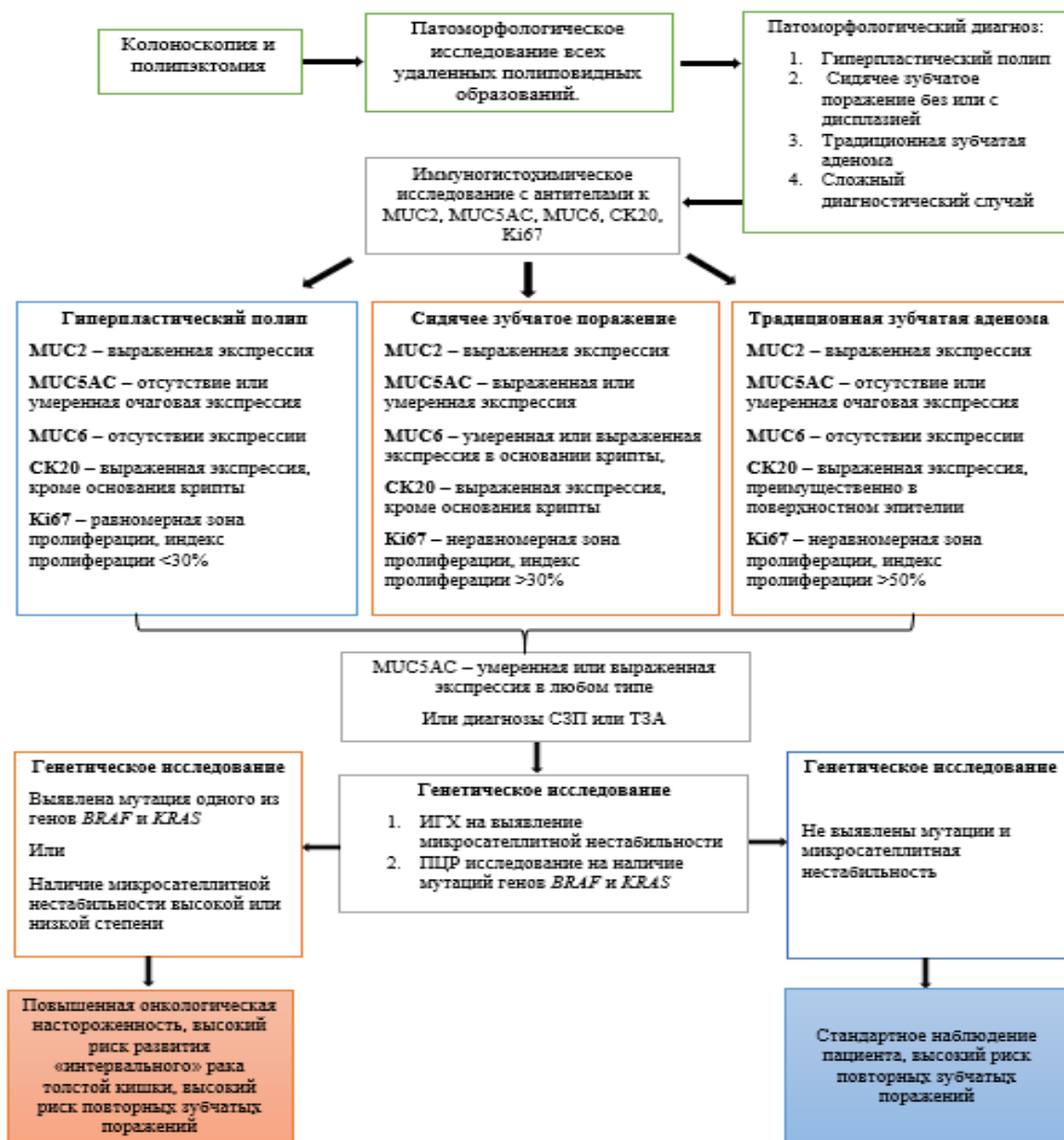


Рисунок 12 – Схема алгоритма диагностики зубчатых поражений толстой кишки

Таким образом, исследование зубчатых поражений толстой кишки должно проходить комплексно с учетом клинических, макроскопических, морфологических и иммуногистохимических данных. Это позволит правильно оценить гистологический тип, который напрямую влияет на риск развития колоректального рака, а при наличии признаков

малигнизации – назначить таргетную терапию, определяемую наличием микросателлитной нестабильности и мутацией гена *KRAS* или *BRAF*. Полученные данные, на наш взгляд, имеют важное значение для формирования рекомендаций проведения скрининга рака толстой кишки.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук и учёной степени доктора наук

1. Михалева Л.М., Комлева Р.А., Бирюков А.Е., Шахпазян Н.К. Зубчатые аденомы толстой кишки: клиничко-морфологическая и молекулярно-генетическая характеристика // Архив патологии. 2017. № 1 (79). С. 19–27.
2. Михалева Л.М., Вандышева Р.А., Шахпазян Н.К., Федоров Е.Д., Бирюков А.Е., Мидибер К.Ю., Печникова В.В. Сравнительная оценка экспрессии Muc 2, Muc 5AC и Muc 6 в зубчатых новообразованиях толстой кишки // Архив патологии. 2019. № 2 (81). С. 10–17.
3. Михалева Л.М., Вандышева Р.А., Козлов И.С., Васюкова О.А., Мидибер К.Ю., Печникова В.В., Акопян Э.П., Шахпазян Н.К., Гущин М.Ю. Сидячая зубчатая аденома червеобразного отростка: обзор литературы и клинические наблюдения // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2019. № 10 (170). С. 105–109.
4. Mikhaleva L.M., Vandysheva R.A., Midiber K.Yu., Vasyukova O.A., Pechnikova V.V., Patsap O.I., Beylerli O., Somasundaram S.G., Kirkland C.E., Aliev G. Colorectal Serrated Lesions: a Current View on Clinical, Morphological, Molecular, and Genetic Diagnostic Criteria // Current Medicinal Chemistry. 2021. (e-pub). DOI:10.2174/0929867328666210715125428

Другие публикации

1. L. Mikhaleva, R. Komleva, N. Shakhpazyan, A. Birukov. Serrated lesion: Clinical, morphological and genetic studies. 28th Congress of the European Society of Pathology, 25 - 29 September 2016, KölnMesse in Cologne, Germany, Virchows Archiv, European Journal of Pathology, Vol.469, Suppl.1, September 2016, Pg. 263
2. Вандышева Р. А. Молекулярно-биологические и генетические особенности зубчатых новообразований толстой кишки. Материалы V съезда Российского общества патологоанатомов с международным участием, Челябинск, 2017. С. 58.
3. Л.М. Михалева, Р.А. Вандышева, А.Е. Бирюков, Н.К. Шахпазян, Н.В. Золотенкова. Клиничко-морфологические, иммуногистохимические и генетические особенности зубчатых новообразований толстой кишки. «Научно-практическая конференция, посвященная 65-летию городской клинической больницы №17», Москва, 22 сентября 2017 года, сборник статей. С. 108-113.
4. Вандышева Р.А., Михалева Л.М. Применение иммуногистохимического маркера MUC5AC для диагностики сидячих зубчатых аденом и гиперпластических полипов толстой кишки с наличием и без мутации гена *BRAF*// Сборник научных трудов международной научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». - Москва, 2018, с.9-10
5. Mikhaleva L, Birukov A, Shakhpazyan N, Vandysheva R. Correction to: Abstracts : 29th European Congress of Pathology. Virchows Arch. 2018 Feb;472(2):305. doi: 10.1007/s00428-017-2255-3. Erratum for: Virchows Arch. 2017 Sep;471(Suppl 1):1-352. PMID: 29143109.
6. Вандышева Р. А., Михалева Л. М. Значение потери экспрессии белка микросателлитной нестабильности mlh1 в сидячих зубчатых поражениях толстой кишки и червеобразного

отростка //Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2020. – Т. 10. – №. 3. – С. 85-85.

7. Вандышева Р. А. , Васюкова О. А., Шахпазян Н.К., Печникова В. В., Мидибер К.Ю., Акопян Э. П., Гуцин М. Ю., Козлов И. С., Бирюков А. Е., Михалева Л.М. Молекулярно-генетическая характеристика сидячих зубчатых новообразований аппендикса и толстой кишки. «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Сб.науч. трудов. с. 27-28. 12-13 ноября 2020 г. Москва.

Патенты

Патент на изобретение:

Способ дифференциальной диагностики зубчатых новообразований толстой кишки// Патент России RU 2702009 С1 от 08.04.2019 Бирюков А.Е., Вандышева Р.А., Мидибер К.Ю., Михалева Л.М., Печникова В.В.

Список сокращений:

ЗП – зубчатые поражения

КРР – колоректальный рак

ГП – гиперпластический полип

СЗП – сидячее зубчатое поражение

ТЗА – традиционная зубчатая аденома

МВГП – микровезикулярный гиперпластический полип

ББГП – богатый бокаловидными клетками гиперпластический полип

МСН – микросателлитная нестабильность

МСН-Н – микросателлитная нестабильность низкой степени

МСН-В – микросателлитная нестабильность высокой степени

ИГХ – иммуногистохимическое исследование