

Кононов А.В.<sup>1</sup>, Мозговой С.И.<sup>1</sup>, Поморгайло Е.Г.<sup>1</sup>, Потрохова Е.А.<sup>2</sup>, Шиманская А.Г.<sup>1</sup>, Федотова Ю.А.<sup>1</sup>, Маркелова М.В.<sup>1</sup>, Рубцов В.А.<sup>1</sup>, Керученко М.А.<sup>1</sup>, Парыгина М.Н.<sup>1</sup>, Грищенко Р.К.<sup>1</sup>, Панюшкин Л.В.<sup>3</sup>, Филипенко М.Л.<sup>4</sup>, Иванов М.К.<sup>5</sup>, Титов С.Е.<sup>5</sup>

## Молекулярно-клеточные основы предикции рака желудка. Опыт мультидисциплинарного исследования

1—кафедра патологической анатомии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Омск; 2—Научно-исследовательский клинический институт педиатрии ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, г. Москва; 3—ФГБУЗ Западно-Сибирский медицинский центр ФМБА России, г. Омск; 4—СО РАН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины», г. Новосибирск; 5—АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск

Kononov A.V., Mozgovoy S.I., Pomorgailo E.G., Potrokhova E.A., Shimanskaya A.G., Fedotova J.A., Markelova M.V., Rubtsov V.A., Keruchenko M.A., Parygina M.N., Grishenko R.K., Panushkin L.V., Philipenko M.L., Ivanov M.K., Titov S.E.

## Molecular and cellular basis in prediction of gastric cancer: a multidisciplinary research experience

### Резюме

Представлен самообзор результатов мультидисциплинарных исследований по разработке предиктивной системы в отношении рака желудка кишечного типа (аденокарциномы). Обсуждаются исследования авторов, выполненные в 2007-2017 годах в аспекте современных концепций предикции и превенции рака желудка. Предложена модель предикции рака желудка, включающая оценку нуклеотидных замен в генах воспалительных цитокинов, aberrантную экспрессию микроРНК, детекцию тканевых паттернов атрофии и метатластической атрофии слизистой оболочки желудка, принципы и возможности патоморфологического мониторинга.

**Ключевые слова:** рак желудка, предиктивная система, патоморфологический мониторинг, биомаркеры метатлазии, полиморфные аллели генов воспалительных цитокинов, микроРНК

### Summary

A self-review of the results of multidisciplinary studies on the development of a predictive system for intestinal type gastric cancer (adenocarcinoma) is present. The authors' studies carried out in 2007-2017 in light of recent concepts of prediction and prevention of gastric cancer are discussed. The predictive model for gastric cancer is proposed. This includes an evaluation of inflammatory cytokine genes nucleotide polymorphisms, aberrant expression of microRNA, detection of tissue patterns of gastric atrophy and intestinal metaplasia (metaplastic atrophy), principles and possibilities of pathomorphological monitoring.

**Key words:** gastric cancer, prediction system, pathomorphological monitoring, biomarkers of metaplasia, polymorphic alleles of inflammatory cytokine genes, microRNA

### Введение

В Российской Федерации рак желудка занимает четвертое место в структуре онкологической заболеваемости и второе место в структуре смертности. Ежегодно регистрируют около 50000 новых случаев рака желудка, причем большинство на III-IV стадии [1]. Самая частая форма рака желудка – аденокарцинома, так называемый рак желудка кишечного типа по P.A. Laugen, возникает на 5-6-м десятилетиях жизни на фоне длительно протекающего воспаления слизистой оболочки желудка, приводящего к атрофическому гастриту. На сегодняшний день актуальность верификации атрофии слизистой оболочки

в гастробиоптатах определяется концепцией «стартовой площадки» риска развития рака желудка. Известна последовательность изменений в слизистой оболочке желудка, запускаемая *Helicobacter pylori* (каскад P. Correa): хроническое воспаление – нарушение клеточного обновления – атрофия (атрофический гастрит) – интраэпителиальная неоплазия – инвазивный рак кишечного типа (аденокарцинома) [2]. Причиной атрофического гастрита является в 90% случаев бактерия *Helicobacter pylori*. Инфицированность населения России в разных регионах составляет от 70 до 80%. Известна эпидемиологическая парадигма: из 100 инфицированных *Helicobacter pylori* рак желудка

развивается у 2. Проблема канцерпревенции состоит в том, что хронический гастрит клинических проявлений не имеет, и у пациента при эндоскопическом исследовании обнаруживают уже сформировавшееся предопухолевое состояние – интраэпителиальную неоплазию или даже инвазивный рак. Вторичная профилактика рака желудка осуществляется путем детекции экспрессии генов, приводящих к измененной продукции белков, отражающих аберрантный фенотип эпителиальных клеток. Такие белки относятся не столько к предикторам (предсказателям) риска рака желудка либо интраэпителиальной неоплазии, а собственно уже к прекурсорам – облигатным предшественникам рака желудка.

Известны риски рака желудка: при атрофическом пангастрите в 5-6 раз выше, чем в популяции, при интраэпителиальной неоплазии – прогноз быстрого перехода в рак. Технология вторичной профилактики рака желудка основана на достаточно сложно организованном мониторинге с целью обеспечения верификации атрофии и интраэпителиальной неоплазии слизистой оболочки. Основная задача этого мониторинга – максимально ранняя диагностика рака желудка. В повседневной практике врача-патологоанатома идентификация атрофии осложнена неоднозначной интерпретацией морфологических признаков. Далеко не всегда исследуемый фрагмент слизистой оболочки желудка является репрезентативным и информативным в связи с ограничениями технического характера, обусловленными существующей в отечественном здравоохранении практикой взятия биопсийного материала при фиброгастроскопии. Актуальным является и поиск дополнительных фенотипических критериев атрофии – разработка молекулярных и клеточных мишеней предикции рака желудка, реализация которого возможна только в мультидисциплинарном исследовании.

## Материалы и методы

**Пациенты.** Обследовано 106 детей с *Helicobacter pylori*-ассоциированным хроническим гастритом (поверхностные и эрозивно-язвенные поражения слизистой оболочки желудка). Операционный материал включал в себя 82 образца (желудки, резецированные по поводу рака) больных раком желудка кишечного типа.

Для исследования микроРНК исследован биопсийный материал желудков 19 пациентов с жалобами на диспепсию и операционный материал 28 пациентов с диагнозом рак желудка кишечного типа.

В каждом случае имелось информированное согласие пациентов на проведение молекулярно-генетического исследования. Исследования были одобрены локальным этическим комитетом.

**Эксперты.** В состав группы экспертов входили стажированные врачи-патологоанатомы, имеющие ежедневную практику работы с материалом диагностических гастробиопсий, для которых верификация хронического гастрита являлась одним из компонентов рутинной морфологической диагностики.

Исследование операционного материала рака желудка. Вырезку фрагментов слизистой оболочки желудка

проводили из параканкротозной зоны (на расстоянии 5 мм от границы слизистой оболочки желудка с опухолью) и из дистантной зоны: малая, большая кривизна, передняя, задняя стенки антрального отдела; угол желудка; малая, большая кривизна, передняя, задняя стенки тела желудка. Дополнительно вырезали фрагмент опухоли.

Исследование полиморфизма генов воспалительных цитокинов. Для определения полиморфных локусов C+3953T, C- 511T гена ИЛ-1β и VNTR-полиморфизма во 2 интроне гена ИЛ-1RN (2R, 3R, 4R, 5R, 6R) в лейкоцитах периферической крови применяли метод полимеразной цепной реакции с использованием наборов ИХБиФМ СО РАН (г. Новосибирск), полиморфных локусов G-308A гена TNF-α и G-1082A гена ИЛ-10 – наборы «SNP-экспресс» (НПФ «Литех», Россия).

Фрагменты слизистой оболочки желудка фиксировали в 10 %-ном нейтральном забуференном (pH 7,2-7,4) формалине на протяжении 12-24 часов. Гистологическую проводку, заливку в парафин и приготовление парафиновых срезов проводили общепринятыми методами с помощью аппарата STP-120, заливочной станции ЕС-350 и ротационного микротомы HM 340E (Microt, Германия).

Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Для оценки атрофии и выраженности воспаления в слизистой оболочке желудка использовали визуальную-аналоговую шкалу Российского пересмотра Международной классификации хронического гастрита OLGA.

Анализ содержания микроРНК. Оценка содержания микроРНК miR-146a, miR-155, miR-21, miR-223, miR-192, miR-200b, miR-221, miR-375 проводили в препаратах РНК, выделенной гуанидиновым методом из парафиновых срезов, полученных из фрагментов слизистой оболочки желудка. Содержание микроРНК оценивали методом полуквантитативной шпильной ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени с использованием реакционных смесей и олигонуклеотидов производства АО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Нормализацию проводили на малую РНК U6.

Иммуногистохимическое исследование выполняли на парафиновых срезах. Демаскировку антигенов осуществляли в цитратном буфере (pH=6,0) при кипячении на водяной бане на протяжении 1 часа. Использовали следующие моноклональные антитела: CDX-2 (RTU, клон ISO80, «CellMarq», США), MUC 2 (разведение 1:100, клон Ccp58, «Novocastra», Великобритания), CD10 (RTU, клон 56C6, «Novocastra», Великобритания). Биотинилированные антитела второго слоя и стрептавидин, меченный пероксидазой, входили в систему визуализации KP-500 («Diagnostic Biosystems», США).

Просмотр и фотографирование микропрепаратов осуществляли на микроскопе Axioskop 40 с цифровой фотокамерой Axiocam MRc5 («Carl Zeiss», Германия).

Расчет критерия согласия и параметров валидности методов детекции атрофии выполнен с использованием программы MedCalc 10.4.0.0.

Подробное описание методических подходов и статистической обработки представлено в опубликованных ранее работах [3, 4, 5, 6].

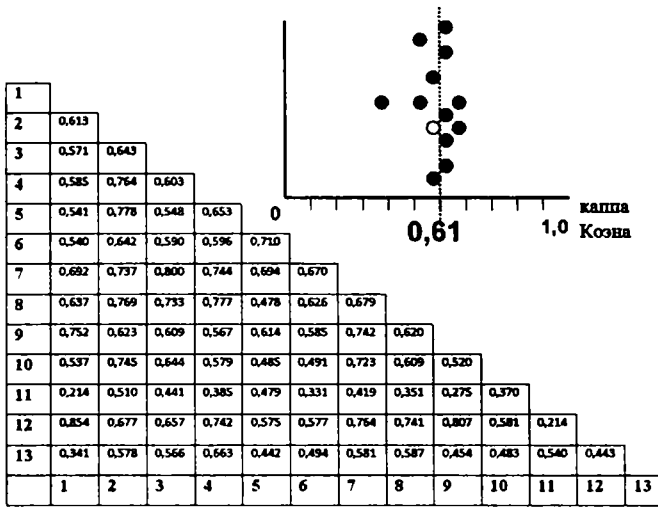


Рис. 1. Матрица значений взвешенной каппы (критерий согласия) при сопоставлении результатов оценки градации атрофии с использованием визуально-аналоговой шкалы 13 экспертами на заочном этапе работы Российской группы по пересмотру Международной классификации хронического гастрита. График отражает диагностическую вариабельность и значение генеральной каппы, равное 0,61. Белой меткой обозначен результат оценки, отражающий индивидуальное значение каппы авторов предложенной визуально-аналоговой шкалы.

**Результаты и обсуждение**

Группа европейских и американских патологов и гастроэнтерологов, объединившихся в ассоциацию Atrophy Club и OLGA (Operative Link on Gastritis Assessment), предложила в качестве персонализированного риска канцерогенеза оценивать интегральный показатель атрофических изменений слизистой оболочки желудка, обозначив этот показатель стадией хронического гастрита. Стадия атрофического гастрита (0-IV) стала ключевой характеристикой новой его классификации – OLGA-system [7]. Модифицированный нами вариант OLGA-system – Российский пересмотр классификации хронического гастрита [8] был утвержден III Съездом Российского общества патологоанатомов (Самара, 2009). Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития Российской Федерации утверждена новая медицинская технология\*, в которой для интегральной оценки атрофии слизистой оболочки использована оригинальная визуально-аналоговая шкала, разработанная в виде таблицы стадий хронического гастрита.

Патоморфологический мониторинг риска развития рака желудка

Оценка воспроизводимости Российского пересмотра классификации хронического гастрита проведена методом расчета критерия согласия экспертов. Расчет осуществляли путем попарного сравнения заключений экспертов с вычислением взвешенной  $\kappa$ . В табличном

изображении они представлены в ячейках, соответствующих номеру, присвоенному эксперту, – от 1 до 13 (рис. 1). Таким образом, для каждого эксперта было получено 12 показателей, медиана которых на графике (рис. 2) и представляет индивидуальный показатель согласия для каждого эксперта. Итоговый показатель – генеральная взвешенная  $\kappa$  (медиана индивидуальных показателей) составила 0,61, что укладывается в интервал хорошей степени согласованности.

Итоговый показатель критерия согласия Международной группы Atrophy Club  $\kappa=0,73$  находится в одном интервале с результатом заочного этапа работы отечественных патологоанатомов-экспертов ( $\kappa=0,61$ ), что соответствует градации хорошей степени согласованности. Принципиально важно, что задачи, поставленные перед российской и международной группами экспертов, примерно совпадали. Тем и другим были предложены референтные изображения, в которых следовало провести детекцию атрофии, причем задача перед российскими экспертами была сформулирована сложнее. В международной группе эксперту достаточно было ответить: есть атрофия – нет атрофии, в российской группе патологоанатомам было предложено провести градацию атрофии: нет атрофии, слабая, умеренная, выраженная.

Поскольку группу экспертов составили ведущие патологоанатомы России, интересным представляется проанализировать «выбросы» – два крайне низких ин-

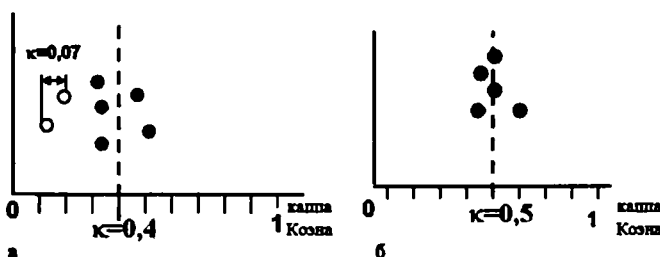


Рис. 2. Значения индивидуальных показателей согласия каждого эксперта и значения генеральной каппы на очном этапе работы Российской группы по пересмотру Международной классификации хронического гастрита до (а) и после (б) устранения значений «выбросов», обозначенных белыми метками.

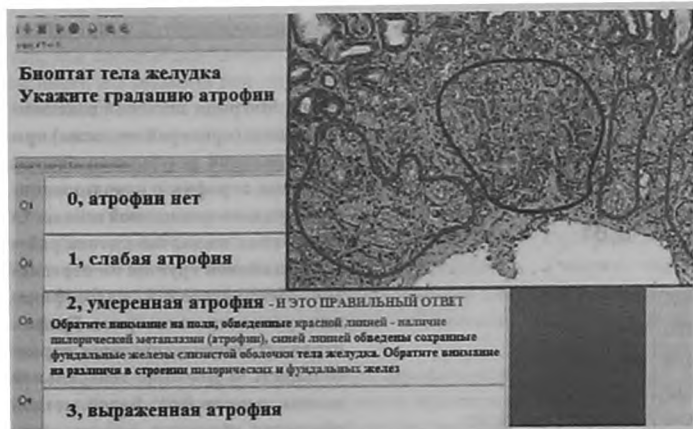


Рис. 3. Пример задания учебно-методического комплекса 2-го уровня: использование детального описания с обоснованием выбора правильного ответа

дивидуальных значения критерия согласия и низкую согласованность между этими двумя экспертами. Подобные статистические результаты обычно объясняют методическими нарушениями в работе эксперта: он не следует общим техническим рекомендациям, пытается изменить новую информацию в соответствии с некими личными представлениями об объекте и технологии, которые не соответствуют заданным условиям экспертной оценки. Анализ критерия согласия в группах экспертов, сформированных по разным принципам в соответствии с поставленными перед ними задачами, позволил сделать заключение о возможности практического применения Российского пересмотра Международной классификации хронического гастрита OLGA-system и выявил ряд субъективных препятствий его применения, устранение которых позволит решить одну из проблем стандартизации патологоанатомических исследований – биопсийной диагностики атрофического гастрита как «стартовой площадки» рака желудка кишечного типа.

Нам представляется важным обсудить еще одну существенную подробность: отечественные патологи не имеют навыков работы с тест-препаратами, как правило, пренебрегают выполнением жесткого алгоритма последовательности действий над объектом. В связи с изложенным, нами предложен метод обучения, основанный на многоуровневом подходе с использованием базы данных референтных изображений. Оценка эффективности разработанного обучающего модульного блока (рис. 3) оценена путем расчета коэффициента согласия спустя 3–4 недели после обучения 24 врачей-экспертов. Модульный принцип обучения с использованием референтной базы данных позволил существенно повысить критерий согласия – увеличение взвешенной капсы с 0,226 до 0,436, что соответствует умеренному уровню согласованности.

Разумеется, важнейшим компонентом патоморфологического мониторинга риска развития аденокарциномы желудка является оценка этапа, следующего за атрофией слизистой оболочки в каскаде Р. Согеа, – интраэпителиальной неоплазии. Попытки международного консенсуса (Падуанская и Венская классификации неоплазий пищеварительного тракта) показали крайнюю субъективность

заключений патологов по референтным препаратам [9]. Категоризация изменений, соответствующих интраэпителиальной неоплазии (табл.), создает лишь поддержку в принятии решения, но не объективизирует патологоанатомическое заключение по биоптату слизистой оболочки желудка [10, 11].

Проблема однозначной интерпретации гистологической картины гастробиоптатов была во многом решена введением понятия «метапластическая атрофия» – изменение фенотипа желудочного эпителия на кишечный, при котором железы, целиком или частично построенные из эпителия кишечного типа, утрачивают (снижают) свою функцию и, следовательно, подвергаются атрофии. Классификация хронического атрофического гастрита, основанная на идентификации только «метапластической атрофии», обладает высокой воспроизводимостью. Критерий согласия экспертов при ее использовании приближается к 1,0 [12].

Детекция тканевых паттернов слизистой оболочки желудка как маркерный принцип предикции рака

Однако проблема детекции атрофии в гастробиоптатах и, соответственно, проблема предикции рака желудка по-прежнему сохраняется. Дело в том, что современные классификации хронического гастрита: Модифицированная Сиднейская система, OLGA-system (и ее Российский пересмотр), OLGIM – требуют для оценки атрофии на уровне органа выполнения четкого алгоритма взятия биоптатов из 5 точек, что нарушается при выполнении подавляющего числа фиброгастроскопий. Исследования, проводимые в России и США, показали, что требованиям современных классификаций в отношении соблюдения алгоритма забора материала, ориентировки фрагментов слизистой оболочки желудка при гистологической обработке отвечают не более 4% биопсийных исследований [13, 14].

Решение проблемы представляется возможным с помощью иммуногистохимической идентификации хорошо изученных ключевых молекул (протеиновый профиль метапластической атрофии) – биомаркеров атрофии слизистой оболочки желудка. В рамках пилотного исследования отобрано 200 диагностических случаев с

Таблица. Гистопатология дифференциальной диагностики интраэпителиальной неоплазии слизистой оболочки желудка [11, 22]

Признак	Категория неоплазии			
	Неопределенная неоплазия		Неоплазия низкой степени	Неоплазия высокой степени
	Атипичная фовеолярная гиперплазия	Гиперпролиферативная кишечная метаплазия		
1. Гистоархитектоника	Ямки увеличены, расширены, складывается впечатление об увеличении их числа; железы не изменены	Очаговое или тотальное замещение кишечным эпителием	Железы округлой формы, встречаются овальные, неправильных очертаний, группируются в отчетливые фокусы, отличающиеся от окружающей слизистой оболочки	Плотное расположение желез «спина к спине», ложные и истинные сосочки, встречаются лишь единичные неизменные железы
2. Локализация атипичных клеток	Фовеолярная зона	Только глубокие отделы желез	Фовеолярная зона, поверхностные и глубокие отделы желез	Фовеолярная зона, поверхностные и глубокие отделы желез
3. Зона расположения дифференцированных клеток	Внизу желез и на верхушке валиков	Только на верхушке валиков	Может быть представлена в поверхностных отделах слизистой оболочки	Обычно отсутствует
4. Форма и размеры клеток	Любая	Удлиненная	Удлиненная	Полиморфная
5. Секрция слизи	Сохранена	Сохранена	Снижена, но присутствует	Обычно отсутствует
6. Размеры ядра	Умеренно увеличены, встречаются крупные	Умеренно увеличены, встречаются крупные	Умеренно увеличены, встречаются крупные	Выраженное увеличение
7. Форма ядра	Округлая	Округлая	Округлая или вытянутая	Полиморфная
8. Митозы	Нет	Встречаются	Встречаются	Встречаются часто
9. Ядрышки	Встречаются редко, неотчетливые	Встречаются редко, неотчетливые	Встречаются редко, отчетливые, не более 2	Встречаются часто, можно встретить более 2
10. Полярность ядра	Присутствует: базальная	Присутствует: базальная	Как правило присутствует: базальная	Утрата полярности: средняя и/или апикальная часть клетки (псевдоэпифификация)
11. Ядерная мембрана	Регулярного строения	Регулярного строения	Обычно регулярного строения	Часто нерегулярного строения, есть зоны утолщения
12. Гиперхромия ядра	Выраженная	Умеренная	Умеренная	Выраженная или гипохромия

морфологическим заключением «хронический гастрит». Из исследования исключены случаи неопределенной атрофии, очаговой фовеолярной гиперплазии, полипов, интраэпителиальной неоплазии, аденомы, инвазивной карциномы, эрозивно-язвенного дефекта. Единственным условием для возможности проведения оценки уровня атрофии слизистой оболочки желудка являлось наличие достаточного количества исследуемого материала при эндоскопическом заборе (не менее 4-5 фрагментов). Оценка атрофии слизистой оболочки желудка проведена 3 экспертами по достаточно искусственно заданному условию отбора: выбраковывался любой гистологический препарат, по поводу которого хотя бы у одного эксперта было сомнение о наличии атрофии. Из оставшихся образцов (гистологический препарат – парафиновый блок) методом рандомизации были выбраны 50 блоков. Из этих

блоков приготовили серийные срезы, в которых и была проведена детекция маркерных признаков. Аналогичным методом были отобраны 50 образцов слизистой оболочки желудка, в которых отсутствовала атрофия слизистой оболочки. В качестве иммуногистохимических маркеров метапластической атрофии были выбраны признаки, отражающие дефицит желез (гиперплазия гладкомышечных клеток, аргирофильных и эластических волокон), а так же изменение клеточного фенотипа (метаплазия кишечная и пилорическая): CDX2 – белок мукоцита, вставшего на путь кишечной дифференцировки, белок Shh – условный признак желудочной дифференцировки эпителия, белки (виллин, мембрано-ассоциированная пептидаза – CD10) ассоциированные со щеточной каемкой, а также кислый муцин кишечного типа MUC2 и нейтральный муцин поверхностных отделов желудка, выполня-

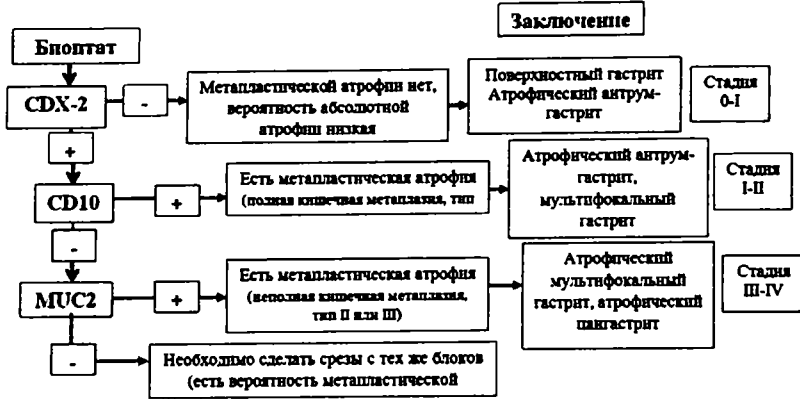


Рис. 4. Алгоритм использования валидных маркеров атрофии слизистой оболочки желудка при оценке формы хронического гастрита по биопсийному материалу

ющий протективную функцию MUC5AC. Определение валидности признаков металластической атрофии слизистой оболочки желудка проводили в соответствии с рекомендациями «Руководства по медицине, основанной на доказательствах в патологии и лабораторной медицине» [15] путем расчета чувствительности и специфичности иммуногистохимических маркеров металластической атрофии, а также связанных с ними показателей: прогностическая ценность положительного и отрицательного результатов, отношения правдоподобия для положительного и отрицательного результатов. Чувствительность – доля (%) гистологических препаратов, в которых иммуногистохимически обнаружен искомый маркер среди всех гистологических препаратов выборки с атрофией. Специфичность – доля (%) гистологических препаратов, в которых не обнаружен иммуногистохимически маркер металластической атрофии среди всех гистологических препаратов выборки без атрофии слизистой оболочки желудка. Прогностическая ценность положительного результата – доля гистологических препаратов с наличием атрофии слизистой оболочки желудка среди всех гистологических препаратов с положительным результатом определения иммуногистохимически металластической маркера атрофии. Прогностическая ценность отрицательного результата – доля гистологических препаратов с отсутствием атрофии слизистой оболочки желудка среди всех гистологических препаратов с отрицательным результатом определения маркера металластической атрофии. Отношение правдоподобия для положительного результата указывает на значимость маркера металластической атрофии слизистой оболочки желудка для повышения уверенности относительно выявления атрофии:  $\text{чувствительность} / (1 - \text{специфичность})$ . Отношение правдоподобия для отрицательного результата указывает на значимость маркера металластической атрофии для повышения уверенности относительно отсутствия атрофии:  $(1 - \text{чувствительность}) / \text{специфичность}$ . Для каждой характеристики признака (чувствительность, специфичность, прогностическая ценность положительного и отрицательного результата) рассчитывали доверитель-

ный интервал. Расчет параметров валидности методов детекции металластической атрофии выполнен с использованием программы MedCalc 10.4.0.0.

Высокие показатели чувствительности и специфичности белка CDX2 являются ожидаемыми. Действительно, не было выявлено ни одного наблюдения металластической атрофии слизистой оболочки желудка, где бы этот маркер отсутствовал. Феномен выработки CDX2 клетками, имеющими желудочный фенотип, неоднократно описан в литературе, а также зафиксирован в нашем исследовании [16, 17, 18]. Интересно, что после выполнения серийных срезов с блоков, в которых была выявлена продукция CDX2 желудочным эпителием, в 2 случаях гистологически и гистохимически было обнаружено наличие участков кишечной металазии. Вполне понятно, что экспрессия CDX2 предшествует формированию кишечного фенотипа. Детекция данного белка в гастроблиоптатах может являться методом прогноза появления кишечной металазии, то есть металластической атрофии. Это следует, вероятно, использовать при нарушенной ориентировке кусочка для детекции металластической атрофии, что позволит оценить стадию хронического гастрита в препаратах, которые по требованиям современных классификаций атрофического гастрита OLGA-system и OLGIM считаются неинформативными. Выделение еще 2 валидных иммуногистохимических признаков/маркеров позволило сформулировать алгоритм детекции атрофии слизистой оболочки в биоптатах, взятых не по протоколу, неправильно ориентированных, но неизменным условием является наличие менее 3 фрагментов слизистой оболочки обязательно из двух отделов желудка: тела и антрума (рис. 4).

Молекулярное профилирование и предикция рака желудка

Зависимость между полиморфизмом генов воспалительного ответа и риском развития рака желудка кишечного типа интенсивно изучается во всем мире после публикации в 2000 году основополагающей статьи Е.М. El-Отаг и соавт. [19]. Нами в качестве объекта исследования были избраны 106 детей в возрасте 10-14 лет, предъ-

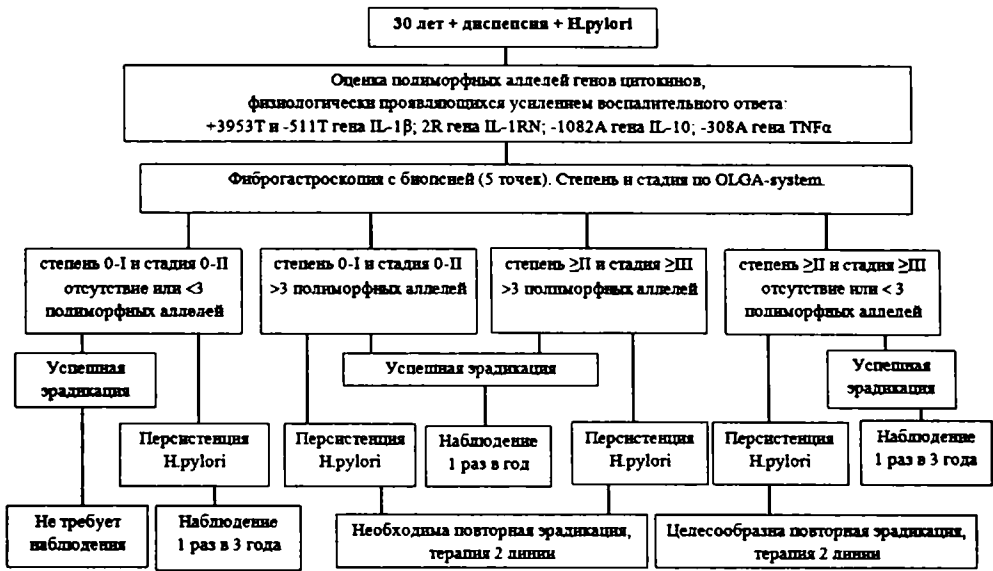


Рис. 5. Предиктивная модель формирования группы риска возникновения рака желудка с оценкой полиморфных аллелей генов цитокинов

являющих диспептические жалобы, у которых инфекция *Helicobacter pylori* была идентифицирована не менее, чем 3 методами. Одной из основных молекул, запускающей и регулирующей воспалительный ответ в слизистой оболочке желудка, колонизированной *Helicobacter pylori*, является ИЛ-1β. Кроме того, ИЛ-1β считают одним из наиболее мощных ингибиторов секреции соляной кислоты париетальными клетками в желудке. Гипохлоргидрия, вызванная действием ИЛ-1β, приводит к распространению *Helicobacter pylori* из антрального отдела желудка в тело, что вызывает развитие атрофического пангастрита с абсолютным уменьшением желудочных желез – стадия III-IV. Вслед за атрофией и параллельно ей развивается кишечная метаплазия, интраэпителиальная неоплазия эпителия и рак желудка. Следовательно, чем больше вырабатывается в слизистой оболочке желудка ИЛ-1β, тем более выражено его действие и тем выше риск развития рака желудка. Таким образом, сочетание свойств ИЛ-1β вызывать гипохлоргидрию и стимулировать воспаление слизистой оболочки желудка позволяет отнести его к ключевым факторам канцерогенеза. Известно, что ген ИЛ-1β является полиморфным. Транзиции С-511Т и С+3953Т в гене ИЛ-1β приводят к увеличению продукции ИЛ-1β и, соответственно, обеспечивают больший его биологический эффект – выраженный и продолжительный воспалительный ответ. Анализ результатов проведенного нами генетического исследования полиморфизма гена ИЛ-1β (С-511Т) показал, что аллель Т определяется чаще у пациентов с более выраженным воспалением слизистой оболочки желудка ( $\chi^2=4,041$ ;  $p=0,044$ ), что позволяет говорить об ассоциации Т аллеля гена ИЛ-1β (С-511Т) с более тяжелым течением хронического гастрита (OR=3,2088; CI=1,21-8,52). В то же время ассоциации полиморфизма гена ИЛ-1β (С+3953Т) со степенью выраженности вос-

паления обнаружено не было. Следует отметить, что физиологическое проявление нуклеотидных замен в генах воспалительных цитокинов этнозависимо. Принято выделять особенности «Неазиатской» и «Азиатской» популяции. Население Юга Омской области, где мы проводили исследования, разумеется, нельзя полностью идентифицировать с «Азиатской» популяцией, под которой понимают жителей Юго-Восточной Азии, равно как и с популяцией европейской или северо-американской («Неазиатской») [15]. Тем не менее, нам удалось выделить ассоциацию из трех полиморфных аллелей, которая проявляется высокой продукцией цитокинов: +3953Т и -511Т гена интерлейкина-1β; ИЛ-RN\*2 гена рецепторного антагониста интерлейкина-1β; -1082А гена интерлейкина-10; -308А гена фактора некроза опухолей-α. Была предложена предиктивная модель формирования группы риска возникновения рака желудка кишечного типа (рис. 5). Мы предлагаем обследовать не лиц старше 45 лет, а 30-летних, представляющих диспептические жалобы, титруя их в соответствии с генетическим уровнем воспалительного ответа и, при необходимости, организму патоморфологический мониторинг.

Однако в последние 3-5 лет стало очевидно, что не только и не столько замены нуклеотидов в генах воспалительных цитокинов определяют физиологически значимый высокий уровень воспалительного ответа, но процессы эпигенетической регуляции. [21]. Многочисленные исследования показали, что одним из перспективных кандидатов на роль предикторов рака желудка является aberrantная экспрессия микроРНК в слизистой оболочке желудка.

МикроРНК представляют собой некодирующие РНК, состоящие в среднем из 22 нуклеотидов. Связывание микроРНК с 3'-UTR мРНК генов-мишеней по

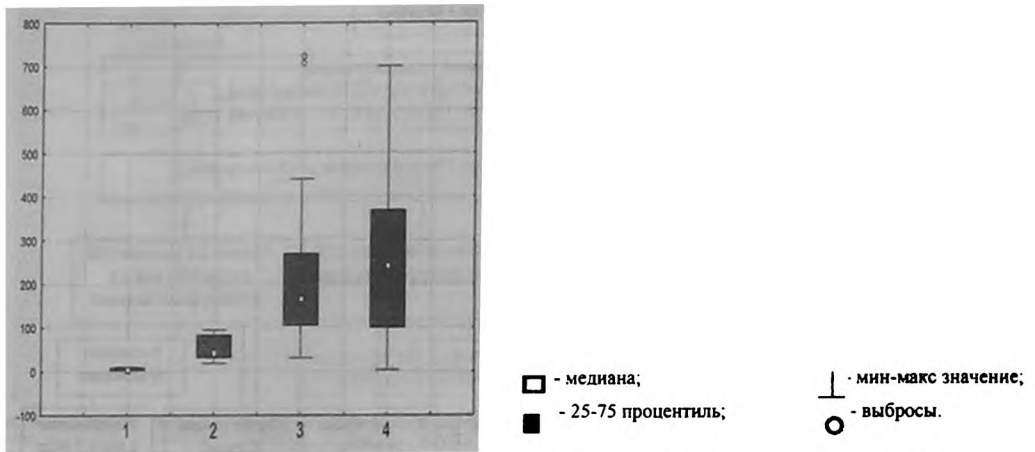


Рис. 6. Относительные уровни экспрессии микроРНК-21, в образцах тканей слизистой оболочки желудка (нормировано на количество РНК U6 в пробе). 1 – минимальные изменения слизистой оболочки желудка подростков, 2 – *H. pylori*-ассоциированный хронический гастрит, 3 – дистантная зона (вне опухолевого роста - хронический гастрит с атрофией желез), 4 – низкодифференцированная аденокарцинома желудка.

принципу полной или частичной комплементарности приводит к разрушению мРНК либо ингибированию ее трансляции, за счет чего микроРНК посттранскрипционно регулируют генную экспрессию. микроРНК участвуют в регуляции пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток. Аберрантная экспрессия микроРНК обнаружена во многих опухолях.

Для анализа паттерна экспрессии микроРНК в гастробιοптатах пациентов с хроническим гастритом и раком желудка в сравнительном аспекте были исследо-

ваны: 10 биоптатов с минимальными изменениями слизистой оболочки антрального отдела желудка подростков в возрасте 9-14 лет, инфицированных *Helicobacter pylori*, 9 биоптатов слизистой оболочки антрального отдела желудка взрослых в возрасте 40-70 лет *Helicobacter pylori*-ассоциированным хроническим гастритом и 28 образцов операционного материала желудка, резецированных по поводу рака, из которых для исследования были взяты фрагменты опухоли (низкодифференцированная аденокарцинома) и ткань дистантной зоны, вне опухолевого

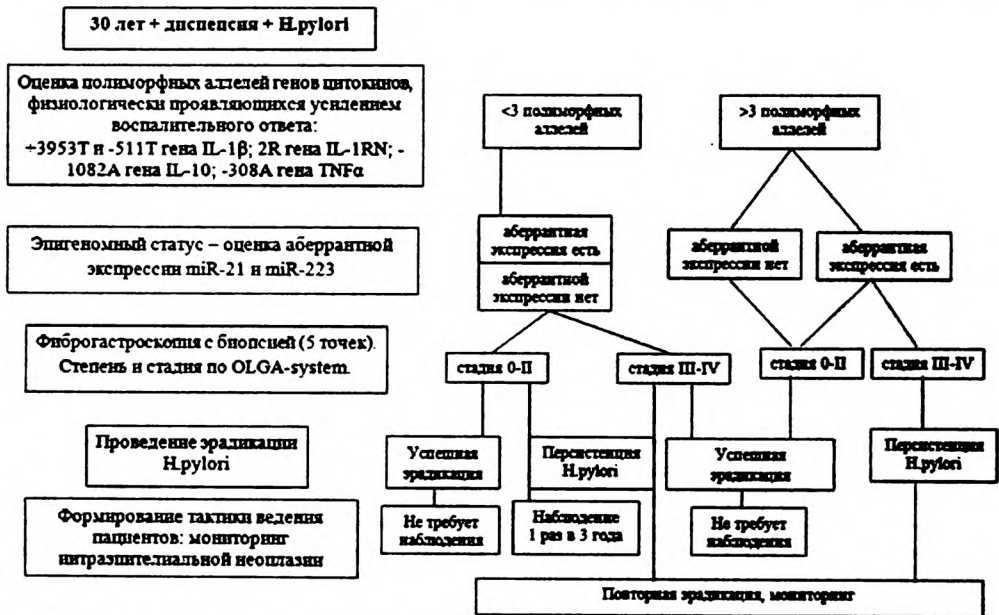


Рис. 7. Предиктивная модель формирования группы риска возникновения рака желудка с оценкой полиморфных аллелей генов цитокинов и микроРНК



роста (хронический атрофический гастрит стадия III-IV). Наиболее показательные результаты были выявлены при анализе экспрессии miR-21 (рис. 6), аналогичные результаты были получены и для miR-223. Таким образом, статистически значимое и последовательно нарастающее повышение экспрессии miR-21, miR-223 в ряду образцов хронического неатрофического и атрофического гастрита, аденокарциномы желудка (рис. 6), свидетельствуют о важной роли этих микроРНК в развитии рака желудка кишечного типа.

С учетом известного спектра мишеней регуляторного воздействия изученных микроРНК концепция предикции рака желудка может быть представлена следующим образом (рис. 7). 30-летние пациенты, инфицированные *Helicobacter pylori*, имеющие «провоспалительную» ассоциацию полиморфных аллелей генов цитокинов и аберрантную экспрессию miR-21 и -223, составляют группу риска, которую можно разделить по степени предиктивной значимости тканевых паттернов слизистой оболочки желудка, ассоциированных с ее атрофией.

## Заключение

Мультидисциплинарный подход к проблеме предикции рака желудка продемонстрировал возможность создания достаточно воспроизводимой системы, позволяющей формировать группу риска до наступления «точки невозврата» – изменений слизистой оболочки желудка, соответствующей атрофическому пангастриту. Мониторинг целесообразен для лиц старше 30 лет, предъявляющих диспептические жалобы. Он должен начинаться с оценки генетических изменений, проявляющихся физиологически высоким уровнем воспалительного ответа, и изменений эпигеномного статуса. Уровень атрофии слизистой оболочки желудка возможно оценить с помощью панели биомаркеров, отражающих протеомный профиль, соответствующий кишечной дифференцировке желудочного эпителия. Далее следует индивидуальная программа курации пациента, включающая эрадикационную терапию в отношении *Helicobacter pylori* и патоморфологический мониторинг. Предлагаемая система легко встраивается в существующую практику здравоохранения в сфере вторичной профилактики рака желудка, делает ее, на наш взгляд, стандартизированной и воспроизводимой. Однако мы отчетливо представляем, что мультидисциплинарно разработанная предиктивная система нуждается в проверке в хорошо организованных мультицентровых исследованиях. ■

*Исследование поддержано грантами: грант компании «ОПТЭК» (2013г), гранты Президента РФ для молодых ученых-докторов наук, 2014-2015 гг, грант № МД-4372.2014.7; 2017-2018 гг, грант № МД-692.2017.7.*

*Кононов А.В., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской*

*Федерации (ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России), г. Омск; Мозговой С.И., д.м.н., доцент, профессор кафедры патологической анатомии Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России), г. Омск; Паморгайло Е.Г., д.б.н., доцент, профессор кафедры патологической анатомии Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России), г. Омск; Потрахова Е.А., д.м.н., профессор, руководитель отделения реабилитации детей радиационного риска Научно-исследовательского клинического института педиатрии (НИКИ педиатрии) имени академика Ю.Е. Вельтищева Российского национального исследовательского медицинского университета (РНИМУ) имени Н.И. Пирогова, г. Москва; Шиманская А.Г., к.м.н., доцент, доцент кафедры патологической анатомии Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России), г. Омск; Федотова Ю.А., заочный аспирант, ассистент кафедры патологической анатомии Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России), г. Омск; Маркелова М.В., к.м.н., старший преподаватель кафедры патологической анатомии Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России), г. Омск; Рубцов В.А., клинический ординатор кафедры патологической анатомии Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России), г. Омск; Керученко М.А., клинический ординатор кафедры патологической анатомии Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России), г. Омск; Паригина М.Н., клинический ординатор кафедры патологической анатомии Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России), г. Омск; Грищенко Р.К., очный аспирант, ассистент кафедры патологической анатомии Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Омский государственный медицинский университет»*

Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России), г. Омск; Панишкин Л.В., заведующий эндоскопическим отделением ФГБУЗ ЗСМЦ ФМБА России врач-эндоскопист высшей квалификационной категории, г. Омск; Филипенко М.Л. к.б.н., заведующий лабораторией фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

(ИХБФМ СО РАН), г. Новосибирск; Иванов М.К. к.б.н., заведующий лабораторией ПЦР АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск; Титов С.Е. научный сотрудник лаборатории ПЦР АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск; Автор, ответственный за переписку – Керученко Мария Александровна, 644099, г. Омск, ул. Партизанская, 20, кафедра патологической анатомии ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России, e-mail: profavkononov@mail.ru

## Литература:

1. Мерабишвили В.М. Аналитическая эпидемиология рака желудка. Вопросы онкологии. 2013; 5: 565-0.
2. Rugge M., Genta R.M., Graham D.Y. et al. Chronicles of a cancer foretold: 35 years of gastric cancer risk assessment. Gut. 2016; 65(5): 721-5.
3. Кононов А.В., Мозговой С.И., Шиманская А.Г. и соавт. Российский пересмотр классификации хронического гастрита: воспроизводимость оценки патоморфологической картины. Арх. пат. 2011; 4: 52-5.
4. Новиков Д.Г. Особенности воспалительного инфильтрата и атрофии в параканкрозной и дистантной зонах слизистой оболочки желудка у больных раком желудка кишечного типа, носителей полиморфных аллелей генов цитокинов. Молодой ученый. 2012; 3: 447-2.
5. Кононов А.В., Помораило Е.Г., Потрохова Е.А., Филипенко М.Л. Полиморфизм генов цитокинов в развитии *Helicobacter pylori*-инфекции. Вестник Российской Академии медицинских наук. 2010; 2: 8-12.
6. Помораило Е.Г., Федотова Ю.А., Рубцов В.А. Экспрессия микроРНК при раке желудка: от молекулярных основ до новых подходов к диагностике и лечению. Молодой ученый. 2016; 8: 423-7.
7. Rugge M., Correa P., Di Mario F. et al. OLGA staging for gastritis: a tutorial. Digestive and liver disease. 2008; 40 (8): 650-8.
8. Аруин Л.И., Кононов А.В., Мозговой С.И. Международная классификация хронического гастрита: что следует принять и что вызывает сомнения. Арх. пат. 2009; 4: 11-8.
9. Fujita R., Kaminishi J.M., Schlemper R.J. Early Cancer of the Gastrointestinal Tract. Endoscopy, Pathology, and Treatment. Verlag Tokyo: Springer; 2006.
10. Кононов А.В., Мозговой С.И., Шиманская А.Г., Маркелова М.В., Филимонов В.А. Диагностика атрофии слизистой оболочки желудка: от математической модели до «диагностической машины». Мир науки, культуры, образования 2013; 6: 462-4.
11. Кононов А.В. Интерпретация понятия дисплазия/интраэпителиальная неоплазия в международных классификациях опухолей пищеварительного тракта. Арх.пат. 2005; 67 (6): 44-8.
12. Capelle L.G., de Vries A.C., Haringsma J. et al. The staging of gastritis with the OLGA system by using intestinal metaplasia as an accurate alternative for atrophic gastritis. Gastrointest Endosc. 2010; 71(7): 1150-8.
13. Lash J.G., Genta R.M. Adherence to the Sydney System guidelines increases the detection of *Helicobacter* gastritis and intestinal metaplasia in 400738 sets of gastric biopsies. Aliment Pharmacol Ther. 2013; 38(4): 424-3.
14. Шиманская А.Г. Морфологические методы и экспертный подход при верификации атрофии слизистой оболочки желудка в биопсийной диагностике атрофического гастрита. Молодой ученый. 2012; 4: 496-5.
15. Marchevsky A.M., Wick M.R. Evidence based pathology and laboratory medicine. New York: Springer; 2011.
16. Yan L.H., Wei W.Y., Xie Y.B., Xiao Q. New insights into the functions and localization of the homeotic gene CDX2 in gastric cancer. World J. Gastroenterol. 2014; 20(14): 3960-6.
17. Кононов А.В., Мозговой С.И., Маркелова М.В., Шиманская А.Г. Морфозенез атрофии слизистой оболочки желудка как основа фенотипа хронического гастрита. Архив патологии 2011; 3: 26-31.
18. Кононов А.В., Мозговой С.И., Шиманская А.Г., Гриценко Р.К., Назаров А.Н. Иммуногистохимическая детекция биомолекулярных маркеров метапластической атрофии слизистой оболочки в гастробиоптатах. Архив патологии 2014; 6: 44-50.
19. El-Omar E.M., Carrington M., Chow W.H. et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer Nature. 2000; 404(6776): 398-2.
20. Кононов А.В. Генетическая регуляция и фенотип воспаления при *Helicobacter pylori*-инфекции. Арх. пат. 2009; 5: 57-3.
21. Valenzuela M.A., Canales J., Corvalán A.H., Quest A.F. *Helicobacter pylori*-induced inflammation and epigenetic changes during gastric carcinogenesis. World J Gastroenterol. 2015; 21(45):12742-56.
22. Fassan M., Pizzi M., Farritati F. et al. Lesions indefinite for intraepithelial neoplasia and OLGA staging for gastric atrophy. Am J Clin Pathol. 2012; 137(5): 727-32.