

На правах рукописи

Архипова Анна Александровна

**ДИНАМИЧЕСКОЕ ЭНДОСКОПИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ
ОСЛОЖНЕННЫХ ЯЗВ ЖЕЛУДКА**

3.1.9. Хирургия

Автореферат диссертации на соискание учёной степени
доктора медицинских наук

Новосибирск – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

доктор медицинских наук

Анищенко Владимир Владимирович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

член-корреспондент РАН

Стегний Кирилл Владимирович

(Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный федеральный университет», школа медицины, центр хирургии, онкологии медицинского центра ДВФУ, директор школы, г. Владивосток)

доктор медицинских наук, профессор

Галимов Олег Владимирович

(Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой хирургических болезней и новых технологий с курсом ИДПО, г. Уфа)

доктор медицинских наук, профессор

Короткевич Алексей Григорьевич

(Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры хирургии, урологии, эндоскопии и детской хирургии, г. Новокузнецк)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр хирургии имени А. В. Вишневского» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2022 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.046.03, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, д. 52)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52; <http://www.ngmu.ru/dissertation/512>)

Автореферат разослан «_____» _____ 2022 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета

М. Н. Чеканов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы. Язвы желудка остаются распространённым заболеванием, с которым сталкиваются как гастроэнтерологи, так и специалисты ургентной хирургии (Eisner F. et al., 2017; Narayanan M. et al., 2018; Tarasconi A. et al., 2020). Ежегодная частота кровотечений при язвах в общей популяции варьирует от 19,4 до 57,0 случаев на 100 000 населения (Lau J. Y. et al., 2011). Факторы риска, способствующие развитию кровотечения, включают: инфекцию *Helicobacter pylori*, приём нестероидных противовоспалительных препаратов, размер язвы от 2 см, курение, употребление алкоголя, пожилой возраст, сопутствующую патологию, несвоевременное и неадекватное лечение (Lau J. Y. et al., 2011; Kuo M. T. et al., 2015; Laursen S. B., 2016; Tomizawa M. et al., 2017; Luo P. J. et al., 2019; Yim M. H. et al., 2021). Большая часть факторов риска развития кровотечения из язвы и развития рака желудка общие (Захаренко А. А. и соавт., 2018; Yusefi A. R. et al., 2018; Kumar S. et al., 2020; In H. et al., 2021). В доступной литературе за последние 5 лет частота выявления малигнизации при язве желудка варьирует от 1,07 % до 37,8 % (Lord R. et al., 2018; Wan J. J. et al., 2018). Selinger C. P. et al. (2016) считают, что контрольные эндоскопические исследования уменьшают количество диагностических ошибок и, вероятно, являются главной причиной разброса данных о частоте злокачественной трансформации.

Доброкачественный характер язвы желудка, осложненной кровотечением, определённый при первичной эзофагогастродуоденоскопии, не является постоянной характеристикой патологического процесса (Selinger C. P. et al., 2016; Roganovic B. et al., 2016), так как большинство обследований проводятся без биопсии. При отсутствии возможности получения патоморфологического заключения возникает необходимость дополнительных тестов дифференциальной диагностики.

В качестве перспективных предикторов злокачественной трансформации в зарубежных публикациях рассматривают мРНК и миРНК, они стабильны и

легко извлекаются из различных биологических материалов (Link A. et al., 2018; Asakura K et al., 2020), это явилось потенцирующим фактором для проведения научного исследования.

Степень разработанности темы диссертации. В Российских клинических рекомендациях по диагностике и лечению язвы желудка сообщается о низкой частоте малигнизации при наблюдении за пациентами с доброкачественной язвой желудка (Ивашкин В. Т. и соав., 2020). Gielisse E. A. R. с соавт. (2015) связывают низкую частоту выявления малигнизации при язвах желудка с тем, что часто причиной появления язвы на слизистой оболочке желудка и развития осложнения в виде кровотечения является приём ульцерогенных препаратов. Исследователи предлагают не проводить контрольные эзофагогастродуоденоскопии пациентам, у которых исходно эндоскопическая и морфологическая картина соответствует доброкачественной язве (Mañas M. D. et al., 2009; Gielisse E. A. R. et al., 2015). Вместе с тем, доброкачественный характер язвы желудка, осложнённой кровотечением, определённой при первичной ЭГДС, не является постоянной характеристикой патологического процесса (Selinger C. P. et al., 2016), так как большинство обследований проводятся без биопсии, а при проведении контрольных эндоскопических исследований отмечается увеличение количества выявления раннего рака желудка в 3-4 раза (Lv S. X. et al., 2012; Wan J. J. et al., 2018). Вероятно, контрольные эндоскопические исследования с биопсией уменьшают количество диагностических ошибок, но эзофагогастродуоденоскопия является инвазивной, неудобной манипуляцией, в результате отмечается высокий процент неявок на контрольные исследования (Selinger C. P. et al., 2016).

Это послужило поводом для поиска путей улучшения существующих критериев наблюдения и поиска дополнительных тестов дифференциальной диагностики. МикроРНК выделяют среди эпигенетических механизмов регуляции воспаления и рассматривают возможность их использования в качестве предикторов злокачественной трансформации. Уровни экспрессии

миРНК различаются между клетками здоровых тканей и новообразований, а неоплазии разной локализации и морфологии имеют специфический профиль. Благодаря этим свойствам миРНК обладают огромным потенциалом в качестве биомаркеров (Link A. et al., 2018).

Цель. Разработать алгоритм динамического эндоскопического наблюдения с применением профилирования по миРНК и мРНК у пациентов с осложнённой язвой желудка, имеющих высокий риск неопластической трансформации.

Задачи исследования

1. Оценить эндоскопический, цитологический, морфологический, иммуногистохимический методы исследования как возможные предикторы опухолевой трансформации.

2. Создать библиотеку профилей миРНК и мРНК в норме, при дисплазии, при раке желудка с использованием клеточного материала слизистой оболочки желудка, полученного при эзофагогастродуоденоскопии.

3. Провести анализ и создать классификатор, основанный на профилировании миРНК в норме, при дисплазии, при раке желудка с использованием гистологического материала, полученного при эндоскопическом исследовании.

4. Провести анализ и создать классификатор, основанный на профилировании миРНК и мРНК в цитологическом материале слизистой оболочки желудка, полученного при эндоскопическом исследовании.

5. Изучить результаты выполнения браш-биопсии из язвенного поражения желудка, осложненного кровотечением при II В, II С по J. Forrest (1974 г.), и оценить возможность профилирования по миРНК и мРНК при использовании цитологического материала, полученного при экстренной эзофагогастродуоденоскопии.

6. Сравнить результаты экспрессии миРНК, используемых при анализе гистологического и цитологического материала, полученного при эндоскопическом исследовании.

7. Оценить динамику профилей миРНК в отдаленном периоде лечения пациентов с осложненной язвой желудка.

8. Разработать алгоритм выявления групп риска по прогрессии заболевания в неоплазию.

Научная новизна. Впервые создана библиотека профилей миРНК/миРНК и мРНК в норме, при дисплазии, при раке желудка с использованием цитологического и морфологического материала, полученного при эндоскопическом исследовании желудка.

Впервые из гастробиоптатов и браш-препаратов, полученных при эзофагогастродуоденоскопии, получены данные об экспрессии миРНК и мРНК, использованы наборы миРНК и мРНК, играющие роль в развитии рака желудка, для выявления не только рака желудка, но и дисплазии слизистой оболочки желудка с применением метода построения математической модели, основанного на профилировании миРНК и мРНК.

Впервые было проведено сравнение результатов по десяти миРНК, которые были использованы для анализа и гистологического, и цитологического материала, полученного при эзофагогастродуоденоскопии. Установлен ряд различий между гистологическим и цитологическим материалом по экспрессии миРНК.

Впервые проведена оценка динамики профилей миРНК при язве с дисплазией и состоявшимся кровотечением, а также в отдаленном периоде, установлено, что средний промежуток времени до выявления злокачественного характера язвенного поражения составил 9 месяцев, медиана 2 месяца с интерквартильным размахом от 2 месяцев до 12 месяцев, биопсия при первичной ЭГДС ограничивалась 1-2 фрагментами, но, несмотря на малое количество взятых фрагментов, молекулярный классификатор 40 % неопластических поражений после первичной ЭГДС с щипцовой биопсией определил в группу РЖ.

Проведенный анализ профиля миРНК при язвах желудка с дисплазией в отдалённом периоде показал, что при выявлении профиля миРНК,

соответствующего раку желудка, необходимо провести повторную эзофагогастродуоденоскопию с мультифокальной биопсией (при биопсии необходимо взять 3 и более фрагментов) и проведением молекулярно-генетического исследования.

Доказано, что браш-препарат, полученный при эзофагогастродуоденоскопии, дает адекватное количество материала для диагностики неоплазии.

Впервые на основе проведенной работы построен диагностический алгоритм выявления больных с диспластическими изменениями слизистой оболочки желудка и риском прогрессии заболевания.

Теоретическая и практическая значимость работы

1. Разработанная методика предикции неопластической трансформации при эндоскопическом исследовании позволяет выделить группу пациентов, нуждающихся в эндоскопическом динамическом наблюдении.

2. Создана библиотека профилей нормы, дисплазии и рака желудка, что позволяет дифференцировать образцы слизистой, полученные при эзофагогастродуоденоскопии для выявления группы риска по неопластической трансформации.

3. Использование браш-биопсии в случае язвы желудка, осложненной кровотечением (Forrest II B, II C), является безопасной эндоскопической манипуляцией и позволяет в течение 2 дней после первичной эзофагогастродуоденоскопии определить доброкачественный характер язвенного поражения в 94,85 % и в 100 % установить верно характер поражения при злокачественном изъязвлении.

5. Обосновано определение профиля миРНК и мРНК в клеточном материале, полученном при экстренном эндоскопическом исследовании, результаты определения профиля могут быть использованы для эффективного выявления «пациентов с высоким риском» прогрессии заболевания в неоплазию слизистой оболочки желудка.

6. Применение разработанного алгоритма определения групп риска по развитию РЖ позволяет выявлять пациентов с неопластическими изменениями слизистой оболочки желудка, в том числе при обнаружении язвенного поражения желудка, осложнённого кровотечением типа II В, II С по J. Forrest, при эзофагогастродуоденоскопии.

Методология и методы диссертационного исследования. Проведено исследование по промежутку времени наблюдения, которое включало в себя ретроспективное и проспективное исследование групп пациентов. Исследование было направлено на разработку алгоритма динамического эндоскопического наблюдения пациентов с осложнённой язвой желудка, имеющих высокий риск неопластической трансформации, а также разработку и практическое клиническое применение метода профилирования по миРНК и мРНК в норме, при дисплазии, при раке с использованием морфологического и цитологического материала, полученного при эзофагогастродуоденоскопии у 491 пациента.

Весь объём полученных данных подвергался статистическому анализу в программе Excel (Microsoft, США). Стратификацию образцов на разные группы проводили методом построения дерева принятия решений C-RT (Classification and Regression Tree) и C5.0.

Положения, выносимые на защиту

1. Создана библиотека профилей миРНК в норме, при дисплазии, при раке желудка с использованием гастробиоптатов, полученных при эзофагогастродуоденоскопии. Создана библиотека профилей миРНК и мРНК в норме, при дисплазии, при раке желудка с использованием браш-препаратов, полученных при эндоскопическом исследовании.

2. Браш-биопсия является безопасным методом при язве желудка, осложненной кровотечением при гемостазе Forrest II В, II С, соскоб позволяет получить материал с большей площади собственной пластинки слизистой оболочки, чем щипцовая биопсия, и за короткое время определить характер язвенного поражения.

3. Высокий уровень значимости различий получен в гистологическом материале, при сравнении экспрессии миРНК-21, -34а, -196b, -221, -451 в группах РЖ/норма; миРНК-150, -31, -375, -125а в группах РЖ/дисплазия и миРНК-150, -21, -31, -34а, -106b, -125а, -196b, -221, -141, -451 в группах дисплазия/норма, что указывает на возможность использования этих данных для эффективного разделения образцов с опухолевыми и диспластическими изменениями ткани желудка в гистологическом материале.

4. Высокий уровень значимости различий в экспрессии получен в случаях миРНК-125b, 145, -196b, -21, -375 и мРНК TERT, CKS2, FN1 в группе рак/норма; миРНК-375 и мРНК FN1 в группе рак/дисплазия и миРНК-145, -196b, -20а, мРНК CKS2, TERT в группах норма/дисплазия, что указывает на возможность использования этих данных для эффективного разделения образцов с опухолевыми изменениями ткани желудка и нормой в цитологическом материале.

5. При выявлении на эзофагогастродуоденоскопии язвы, осложненной кровотечением Forrest II В, II С, целесообразно заменить щипцовую биопсию на браш-биопсию с определением профилей миРНК и мРНК.

6. При выявлении профилей миРНК и мРНК, соответствующих раку желудка, после снятия угрозы рецидива кровотечения необходимо провести повторную эзофагогастродуоденоскопию с мультифокальной биопсией и молекулярно-генетическим исследованием с последующим наблюдением согласно предложенному алгоритму.

Степень достоверности. Достоверность результатов диссертации основывается на обследовании 491 пациента с осложненной язвой желудка, раком желудка и нормальной слизистой оболочкой, о чем свидетельствуют записи в медицинских картах стационарных и амбулаторных больных, представленные на проверку первичной документации. Перед проведением молекулярно-генетического исследования была проведена экспертная оценка гистологического и цитологического материала. Критериями эффективности предложенного алгоритма являются диагностические характеристики

разработанных математических моделей (специфичность, чувствительность, общая точность, предсказательная ценность положительного результата, предсказательная ценность отрицательного результата) при выявлении дисплазии и рака. Для обоснования корректности сравнения уровней экспрессии между разными группами (рак, дисплазия, норма) изучены уровни экспрессии молекулярных маркеров и подтверждена значимость различий при помощи непараметрического критерия Манна – Уитни при попарном сравнении экспрессии миРНК и мРНК в группах Рак/Норма, Рак/Дисплазия, Норма/Дисплазия в гистологическом, цитологическом материале – это подтверждает диагностическую ценность исследования. Сроки наблюдения пациентов после проведенного исследования больше 24 месяцев.

Апробация результатов диссертации. Основные положения диссертационного исследования доложены и обсуждены на Национальном хирургическом конгрессе совместно с 20-м юбилейным съездом Российского общества эндоскопических хирургов (Москва, 2017), на Хирургическом обществе Новосибирской области и города Новосибирска (Новосибирск, 2017), на городской научно-практической конференции, посвященной 85-летию 2-й Городской клинической больницы г. Новосибирска (Новосибирск, 2018), на 13-ом Сибирском гастроэнтерологическом научном форуме «Новые рубежи гастроэнтерологии» (Новосибирск, 2019), на Общероссийском хирургическом форуме-2020 (online, 2020), на 7-м Московском международном фестивале эндоскопии и хирургии-2020 (Москва, 2020), на научно-практической межрегиональной конференции «Актуальные вопросы современной хирургии-2021» в рамках цикла конференций, посвященных 300-летию Кузбасса, а также 60-летию хирургического отделения № 1 Новокузнецкой городской клинической больницы № 1 имени Г. П. Курбатова (Новокузнецк, 2021), на 8-м Московском международном фестивале эндоскопии и хирургии-2021 (Москва, 2021).

Диссертационная работа апробирована на заседании проблемной комиссии «Актуальные проблемы хирургических методов лечения

заболеваний» ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (Новосибирск, 2021).

Диссертационная работа выполнена в соответствии с утверждённым направлением научно-исследовательской работы ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России по теме: «Разработка и совершенствование методов профилактики, раннего выявления и хирургического лечения повреждений и заболеваний органов грудной и брюшной полости, органов головы, шеи и опорно-двигательного аппарата», номер государственной регистрации АААА-А15-115120910167-4.

Внедрение результатов. Результаты диссертационного исследования применяются в работе эндоскопического отделения ГБУЗ НСО «Городская клиническая больница № 2» для верификации характера язвенного поражения желудка, осложненного кровотечением, и при формировании групп риска по неопластической трансформации слизистой оболочки желудка.

Основные положения диссертационной работы применяются в учебном процессе на кафедре хирургии (ФПК и ППВ) ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, в том числе 11 статей в журналах и изданиях, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, из них 6 статей в журналах, входящих в международную реферативную базу данных и систем цитирования (Scopus).

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 217 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, включающих обзор литературы, материал и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и списка иллюстративного материала. Список литературы

представлен 255 источниками, из которых 219 – в зарубежных изданиях. Полученные результаты проиллюстрированы с помощью 78 таблиц и 42 рисунков.

Личный вклад автора. Материал, изложенный в диссертации, обработан и проанализирован лично автором. Автор проводила забор материала методом браш-биопсии и щипцовой биопсии, а также лично участвовала в создании сравнительной базы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ГБУЗ НСО ГKB № 2 (протокол № 3 от 03.04.2018) и комитетом по этике Новосибирского государственного медицинского университета (протокол № 137 от 16.09.2021).

Дизайн исследования. I этап – наблюдательное поперечное ретроспективное исследование (архивного цитологического и морфологического материала).

II этап – наблюдательное продольное проспективное исследование (исследование 125 случаев язв с дисплазией из базы гистологических образцов I этапа).

III этап – наблюдательное продольное проспективное исследование. В исследовании у 138 пациентов при эзофагогастродуоденоскопии выявлены язвы желудка, осложненные кровотечением Forrest II B, Forrest II C, из этих пациентов сформированы три группы.

Группа I (больные с язвой желудка, осложненной кровотечением), анализ результатов лечения и обследования больных, госпитализированных по экстренным показаниям с диагнозом «желудочно-кишечное кровотечение», с последующей верификацией желудочной язвы. Из этих пациентов сформирована группа I, критериями включения в неё явились: наличие язвенного дефекта с локализацией в антральном отделе или в теле желудка, по данным эзофагогастродуоденоскопии, и признаки состоявшегося кровотечения (Forrest II B, Forrest II C). Критериями исключения пациентов из группы I были сроки наблюдения после выписки из стационара менее двух лет и

диагностированная малигнизация язвенного поражения во время госпитализации, а также отказ пациента от выполнения браш-биопсии и контрольной гастроскопии с щипцовой биопсией.

Группа II (лекарственные язвы желудка), анализ результатов исследований пациентов, ожидающих квоты для планового оперативного лечения. Критериями включения в неё стали: наличие язв на слизистой оболочке антрального отдела и/или тела желудка в области малой кривизны, отсутствие онкологических заболеваний в анамнезе, снижение гемоглобина ниже 120 г/л. Критерии исключения из группы явились: рак желудка у родственников 1-й и 2-й степени родства, выраженные атрофические изменения слизистой оболочки желудка, отказ от участия в исследовании.

Группа III (язвенная форма РЖ, осложненного кровотечением), критерии исключения: отказ от участия в исследовании. Больные с выявленным раком подвергнуты анализу и в последующем исключены из проспективного исследования.

Ключевым этапом исследования является создание библиотеки профилей миРНК и мРНК в норме, при раке желудка, при язве с дисплазией, для этого были использованы 194 образца архивного гистологического материала в виде парафиновых блоков и 221 цитологический препарат в виде мазков на предметном стекле. Гистологический и цитологический материал был получен в соответствии с законодательством РФ, все данные были деперсонализированы. Диагнозы, относящиеся к раку желудка и язве, были подтверждены гистологически и цитологически. Перед проведением молекулярно-генетического исследования была проведена экспертная оценка гистологических и цитологических препаратов. Чтобы избежать субъективности в оценке, материал был получен в Городской клинической больнице № 1, Городской клинической больнице № 2 и в Городской клинической больнице скорой медицинской помощи № 2.

Характеристика клинического материала. В III этап исследования включены результаты обследований 138 пациентов, проходивших

обследование и лечение на базе Городской клинической больницы № 2 в период с 2016 по 2019 год. Для создания базы миРНК и мРНК был использован материал и результаты исследований пациентов Городской клинической больницы № 1, Городской клинической больницы № 2 и в Городской клинической больницы скорой медицинской помощи № 2: по гистологическому материалу – 35 образцов рака, 125 образцов язвы с дисплазией и 34 образца нормы, по цитологическому материалу – 108 образцов рака, 27 образцов язвы с дисплазией и 86 образцов нормы. Материал был получен в соответствии с законодательством РФ, все данные были деперсонализированы. Все диагнозы подтверждены гистологически. До выполнения молекулярно-генетического исследования проведена независимая экспертная оценка гистологического материала и цитологических препаратов.

В группе I представлены данные обследования 49 пациентов, госпитализированных в хирургическое отделение по экстренным показаниям с диагнозом «желудочно-кишечное кровотечение», с последующей верификацией желудочной язвы. Гендерное распределение поступивших: мужчин – 17 (34,7 %), женщин – 32 (65,3 %). Возраст больных находился в интервале от 30 до 94 лет, средний возраст составил $(63,25 \pm 14,28)$ года ($M \pm m$). Средние размеры дефекта – $(1,04 \pm 0,68)$ см. Состояние гемостаза на момент поступления у всех пациентов определено как Forrest II B, II C.

В группе II, состоявшей из 58 пациентов, которые принимали НПВС (в том числе кардиомагнил). Гендерное распределение обследуемых: 19 мужчин и 39 женщин, возраст больных $(62,55 \pm 15,53)$ года. Размер дефектов находился в пределах от 0,5 до 1,3 см. У всех пациентов группы II отмечалось снижение уровня гемоглобина (ниже 120 г/л), а также по данным ЭГДС определялось геморрагическое пропитывание дна язвы и/или эрозий.

В группе III представлены данные обследования 31 больного, госпитализированного в стационар с признаками желудочно-кишечного кровотечения, с последующей верификацией язвенного поражения желудка по ЭГДС. Гендерное распределение поступивших: мужчин – 14 (45 %), женщин –

17 (55 %). Средний возраст составил ($74,06 \pm 10,22$) года ($M \pm m$). По данным ЭГДС макроскопическая форма рака представляла собой язвенный дефект или инфильтративно-язвенное поражение с локализацией в антральном отделе и/или в теле желудка.

Методы обследования пациентов. Больные были обследованы с применением клинических, лабораторных и инструментальных методов диагностики. Пациентам III этапа в день госпитализации или амбулаторного приема выполняли первичную эзофагогастродуоденоскопию с браш-биопсией, через 4-5 дней контрольное эндоскопическое исследование с проведением щипцовой биопсии (три и более фрагмента язвенного дефекта). Цитологическое, морфологическое и иммуногистохимическое исследование с определением экспрессии циклооксигеназы 2 проводили по стандартной методике. Также выполнили молекулярно-генетическое исследование, выделение ДНК проводили с помощью фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование однонуклеотидных замен в гене TNF- α при -308 (G; A) проводили с помощью ПЦР в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, комплементарных полиморфным участкам ДНК. Достоверность генотипирования подтверждали секвенированием.

Диагностика плоских язв на бледной анемичной слизистой оболочке желудка. Ввиду того что работа выполнялась с использованием фиброгастроскопа, требуется простая дешевая методика для улучшения визуализации дефектов слизистой оболочки. Методика хромоэндоскопии включала проведение стандартной эзофагогастродуоденоскопии и использование «прямого» способа окрашивания, который изначально был отработан на секционном материале (Рисунки 1 и 2).

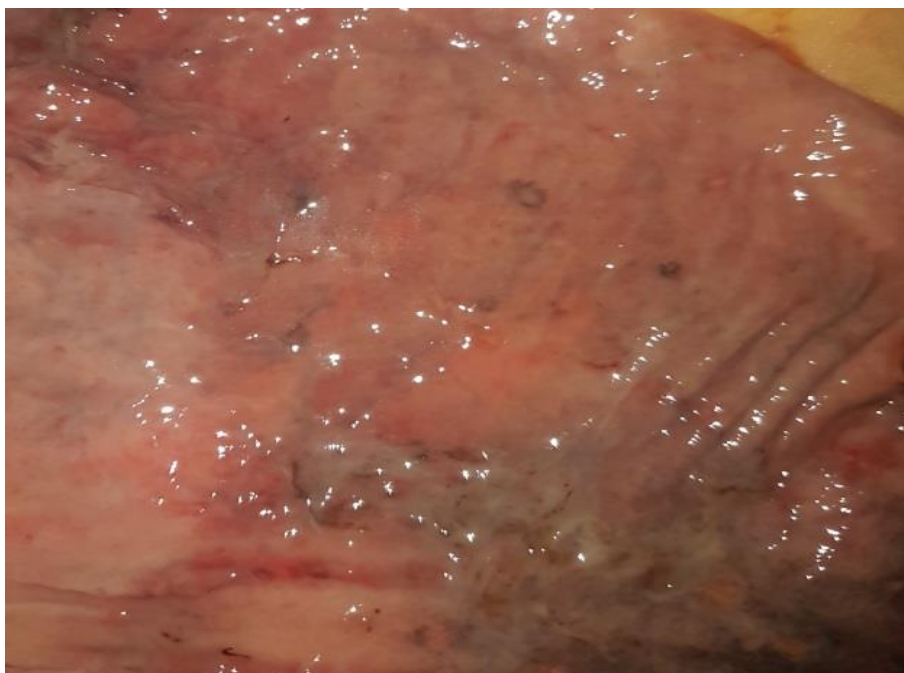


Рисунок 1 – Секционный материал. Фундальный отдел. Хронический атрофический гастрит

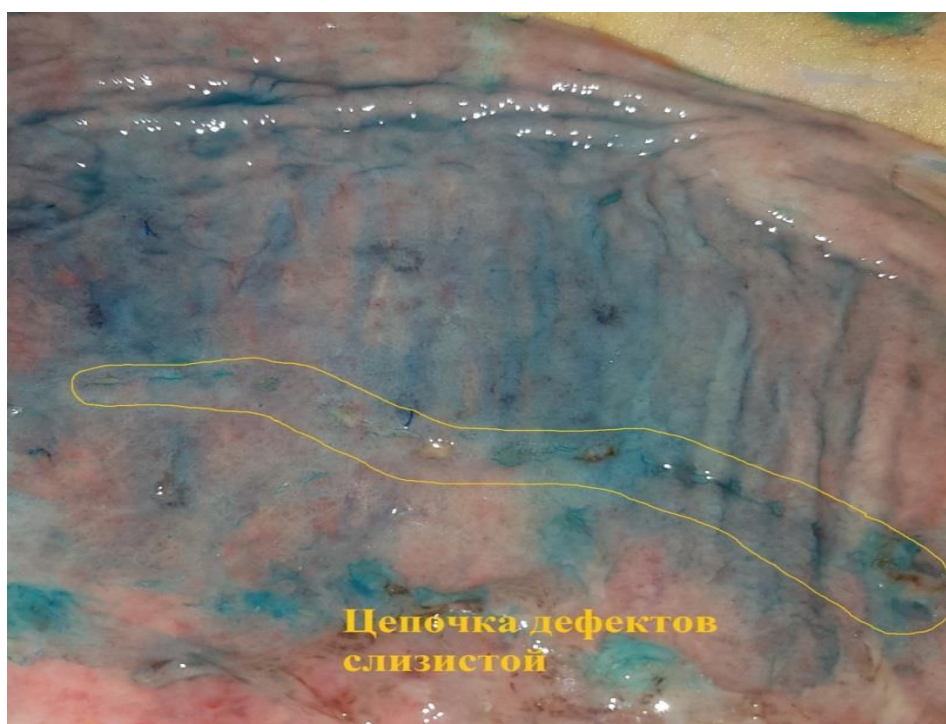


Рисунок 2 – Секционный материал. Фундальный отдел. Хронический атрофический гастрит. После орошения раствором 0,5 % метиленового синего визуализируются эрозии

Применяли прицельное окрашивание, но в ряде случаев орошали всю слизистую 0,25 %-м раствором метиленового синего. При прицельном окрашивании сначала орошали слизистую 0,25 %-м водным раствором бикарбоната натрия для удаления слизи. Затем через спрей-катетер наносили 0,5 %-й раствор метиленового синего (время действия 1–2 минуты). Следующим этапом оценивали рельеф поверхности слизистой, после отмывали слизистую дистиллированной водой. Заключительным этапом был детальный осмотр слизистой оболочки, удаление слизи щипцами, при необходимости – прицельная биопсия. Использован фиброгастроскоп Pentax (Япония) с торцевым расположением оптики, спрей-катетер, 0,25 %-й раствор метиленового синего 40 мл или 0,5 %-й раствор метиленового синего 20 мл, 0,25 %-й водный раствор бикарбоната натрия, биопсийные щипцы, дистиллированная вода.

Молекулярно-генетическое исследование гистологического материала. К двум-трем 5 мкм срезам парафинового блока добавляли 1 мл белого парафинового масла (класс вязкости ISO VG 15), инкубировали в термошейкере при 65 °C 2 минуты. Центрифугировали при 13 000 g в течение 2 минут. К осадку добавляли 700 мкл лизирующего гуанидинового буфера (4М гуанидин изотиоцианат; 25 мМ цитрат натрия; 0,3 % саркозил; 100 мМ Трис-HCl pH 6,5; 0,1 % 2-меркаптоэтанол) и оставляли в термошейкере при 90 °C на 60 мин. Центрифугировали при 13 000 g в течение 2 мин, супернатант переносили в новые пробирки. Далее в пробирки добавляли 600 мкл изопропанола, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 5 мин. Центрифугировали 10 мин при 13 000 g, супернатант сливали, осадок промывали сначала 500 мкл 70 % этанола, а затем 300 мкл ацетона. В 200 мкл деионизованной воды растворяли РНК.

Выбор набора молекулярных маркеров. Первичный отбор набора миРНК для анализа гистологического материала был осуществлен на основании доступной литературы. В итоге был сформирован список из 14 миРНК-маркеров злокачественности (миРНК-145-5p, -150-5p, -20a, -31-5p,

-34a-5p, -375, -21, -106b, -196b, -221, -451, -145, -125a, -125b), для которых в качестве референса использовалась малая ядерная РНК U6.

Синтетические аналоги миРНК. миРНК-олигонуклеотиды были синтезированы в ООО «Биосан» (Новосибирск, Россия). Синтетические миРНК хранили в замороженном виде в ТЕ-буфере при -2 000 °С, при использовании в качестве контролей их разводили на деионизованной воде и добавляли непосредственно в реакционную смесь для обратной транскрипции, минуя стадию выделения.

Олигонуклеотидные праймеры и зонды. Все олигонуклеотиды были синтезированы в АО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия). Олигонуклеотиды выбирали с использованием онлайн-сервиса PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com/>). Последовательности праймеров и зондов доступны по запросу. Для каждой миРНК подбирали несколько комплектов олигонуклеотидов, из которых выбирали те, которые характеризовались наиболее высокой эффективностью обратной транскрипции и ПЦР. Эффективность обратной транскрипции оценивали по значениям циклов квантификации (Cq), полученных при анализе синтетических аналогов миРНК, взятых в известной концентрации. Эффективность амплификации (E) для каждой системы оценивали с помощью построения калибровочной кривой, построенной по разведениям РНК, выделенной клинических проб с высоким содержанием данной миРНК, на деионизованной воде. Значение E для разных систем варьировало от 92,5 % до 98,4 %, с линейным диапазоном 10^8 - 10^2 копий миРНК в реакции, кроме миРНК-21 и -34a, для которых линейный диапазон составил 10^8 - 10^3 копий миРНК.

Выявление миРНК. Детекцию миРНК и мяРНК U6 с помощью ОТ-ПЦР-РВ проводили для всех типов образцов. Для выявления зрелых миРНК использовали метод stem-loop ОТ-ПЦР. Для каждой миРНК отдельно проводили реакцию обратной транскрипции с последующей ПЦР-РВ. Для каждого образца анализ проводили в одном повторе. Нормировку содержания миРНК проводили на содержание малой ядерной РНК U6 в образце с помощью

метода $2^{-\Delta C_q}$ с учетом эффективности реакций. Выявление мяРНК U6 проводилось по той же схеме stem-loop ОТ-ПЦР, которая использовалась для миРНК.

Выделение суммарной РНК. Цитологический препарат снимали со стекла в пробирку и добавляли 600 мкл лизирующего буфера (4 М гуанидин изотиоцианат, 25 мМ цитрат натрия, 0,3 % саркозил, 3 % ДТТ), расфасованного в бескислородной атмосфере (АО «Вектор-Бест», Россия). Пробирки помещали в термошейкер на 10 мин при 65 °С. Раствор центрифугировали 2 мин при 10 000 g, переносили супернатант в новые пробирки и добавляли к нему равный объем изопропанола, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 5 мин. Центрифугировали 10 мин при 12 000 g, супернатант сливали, осадок промывали: 500 мкл 70 % этанола, затем 300 мкл ацетона. В 200 мкл деионизованной воды растворяли РНК.

Выбор набора молекулярных маркеров. При работе с цитологическими образцами использовали 10 миРНК–маркеров (миРНК-145-5р, -150-5р, -20а, -31-5р, -34а-5р, -375, -21, -106b, -196b, -125b), для которых в качестве референса использовалась малая ядерная РНК U6. А также добавили в качестве маркеров мРНК следующих генов: TERT, CDKN2A, CKS2, FN1 с нормировкой на ген домашнего хозяйства PGK1.

Детекция миРНК и мРНК с помощью ОТ-ПЦР-РВ. Для выявления зрелых миРНК и малой РНК U6 использовали метод, предложенный С. Chen и соавторами в 2005 году. Метод включает в себя обратную транскрипцию зрелой миРНК с помощью длинного праймера со шпилькой, с последующей детекцией, полученной к ДНК с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) (Chen С., 2005). Для каждой миРНК отдельно проводили реакцию обратной транскрипции с последующей ПЦР-РВ. Нормировку содержания миРНК проводили на содержание малой ядерной РНК U6 в образце с помощью метода $2^{-\Delta C_q}$. Выявление мяРНК U6 проводилось по той же схеме stem-loop ОТ-ПЦР, которая использовалась для миРНК.

Полуколичественную оценку содержания мРНК проводили методом ОТ-ПЦР-РВ со специфическими праймерами и флуоресцентно-мечеными зондами для выявления мРНК соответствующих генов и гена домашнего хозяйства PGK1 (фосфоглицераткиназа), используемого в качестве нормализатора. Уровень относительной экспрессии рассчитывали с помощью метода $2^{-\Delta Cq}$.

При создании базы были использованы журналы исследований отделений эндоскопического, патологоанатомического и цитологического в период с 2016 по 2019 год и научная лаборатория АО «Вектор-Бест», медиана наблюдения составила 42 месяцев (3,5 года).

Статистическая обработка данных. Данные обрабатывались с помощью программ STATISTICA 10 (StatSoft Inc., США), MS Excel 2016. Распределение на нормальность показателей в группах выполнено с помощью критерий Шапиро – Уилка, для оценки корреляции применён коэффициент Спирмена. Количественные значения представлялись в виде средней арифметической и средней ошибки ($M \pm m$) и в формате медиана и интерквартильный размах $Me (LQ; UQ)$.

Для проверки гипотезы, что генотип GA TNF- α -308 связан с риском развития рака желудка, использовали хи-квадрат (χ^2). Результат считался достоверным при значении абсолютного показателя точности $p < 0,05$. Для определения риска развития заболевания вычисляли отношение шансов (OR).

При анализе диагностической ценности панели миРНК, для выявления рака желудка и дисплазии в гистологическом и цитологическом материале, проводили сравнение двух независимых выборок по количественному признаку при помощи критерия Манна – Уитни. Критический уровень значимости был принят равным 0,007 с учётом поправки Бонферрони. Стратификацию образцов на разные группы проводили методом построения дерева принятия решений C-RT (Classification and Regression Tree) и C5.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты браш-биопсии, выполненной при первичной ЭГДС пациентов III этапа. В группе I в 1 случае (2 %) цитологическое исследование дало положительный результат по злокачественному поражению, однако гистологическое заключение было отрицательным и его расценили как окончательный диагноз. В группе II у 3 пациентов (5,15 %) найдены клетки, подозрительные по раку. Пациенты принимали аспирин, который является причиной реактивных изменений эпителия, при этом картина имитирует аденокарциному. В группе III цитологическое исследование было информативным во всех случаях. Использование браш-биопсии в случае язвы желудка, осложненной кровотечением при гемостазе (Forrest II B, II C), в 8,6 % привело к капиллярному подтеканию крови, которое было остановлено методом аргонплазменной коагуляции.

При плановой работе структурных подразделений лечебного учреждения применение браш-биопсии позволило в течение 2 дней после первой ЭГДС установить доброкачественный характер язвенного поражения в 98 % случаев в группе I, в 94,85 % – в группе II и подтвердить злокачественное новообразование у всех больных (100 %) в группе рака. Исследование мазков значительно улучшает и обогащает гистологическую диагностику.

Следует отметить, что у цитологического исследования есть свои «пределы возможности», прежде всего, это невозможность увидеть инвазию при подозрении на злокачественный характер, к тому же стекла-мазки не всегда обеспечивают репрезентативность разных участков гетерогенной опухоли, а сам клеточный материал чувствителен к внешним воздействиям. Большинство препаратов утрачивают мелкие структурные детали, если от момента приготовления препарата до его окрашивания прошло более 6 часов.

Результаты ЭГДС, морфологического и ИГХ (ЦОГ-2) исследований пациентов III этапа. При использовании хромоэндоскопии у семи пациентов (12 %) из группы II были выявлены язвы на слизистой тела желудка, кроме того, вовремя контрольных эндоскопических исследований в группе I была

выявлена сопутствующая эрозивная гастропатия в 4 (8 %) наблюдениях. Улучшение визуализации дефектов слизистой при контрастировании было получено вследствие того, что:

- краситель, растекаясь по поверхности слизистой, скапливается в складках и углублениях, эрозиях, язвах, тем самым контрастируя рельеф;
- в желудке метиленовый синий не окрашивает нормальную слизистую, но окрашивает фибрин в дне дефекта;
- после смывания красителя с гладкой поверхности слизистой он остаётся в небольшом количестве в местах углублений (дефектов слизистой, эрозий, язв), тем самым обеспечивая их лучшую визуализацию при исследовании.

Ранее хромоэндоскопия с использованием раствора метиленового синего для визуализации плоских язв в условиях анемии на бледной слизистой оболочке желудка не применялась.

При морфологическом исследовании дисплазия была выявлена у 7 больных группы I (7 случаев – 14,3 % – low-grade из 49 наблюдений) и у 3 больных группы II (3 случая – 5,1 % – low-grade из 58 наблюдений), во всех случаях гистологически поражение было охарактеризовано как хроническая язва с началом регенерации.

Анализ результатов исследований группы I показал, что выраженная реакция (+++) с ЦОГ-2 ($\times 400$) отмечается при наличии фокусов дисплазии и размерах язвенного дефекта более 1,5 см. Для оценки корреляции использовали коэффициент Спирмена. Критическое значение $p = 0,01$, $r = 0,365$. Установлено влияние на результат ИГХ размеров язвенного дефекта и морфологической характеристики (0.726208, 0.649518).

В группе II были язвы малых и средних размеров, дисплазия выявлена в 3 наблюдениях. Выраженная реакция (+++) с ЦОГ-2 ($\times 400$) отмечена при наличии фокусов low-grade у 3 пациентов. При ИГХ исследовании (ЦОГ-2) больных группы III выраженная реакция получена во всех наблюдениях.

Результаты определения генотипов TNF- α при -308 (G; A) в группе III и в группе II представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Частота генотипов и аллелей G-308A гена TNF- α пациентов группы III и группы II

Обследуемые	Аллели и генотипы	Группа III		Группа II		P
		n	%	n	%	P I–II
Все обследуемые	AA	0	0	0	0	–
	GA	13	42	12	21	0,034
	GG	18	58	46	79	0,034
	A	13	20,97	12	10,34	NS
	G	49	79,03	104	89,66	NS
Мужчины	AA	0	0	0	0	–
	GA	6	42,86	4	21,05	NS
	GG	8	57,14	15	78,95	NS
	A	6	21,43	4	10,53	NS
	G	22	78,57	34	89,47	NS
Женщины	AA	0	0	0	0	–
	GA	7	41,18	8	20,51	NS
	GG	10	58,82	31	79,49	NS
	A	7	20,59	8	10,26	NS
	G	27	79,41	70	89,74	NS
Примечание. NS – различие не значимо.						

Распределение генотипов TNF- α при -308 (G; A) составило: GG 58 %, GA 42 % и AA 0 % у пациентов с раком желудка и GG 79 %, GA 21 % и AA 0 % в группе II. В группе больных с раком желудка гетерозиготный генотип GA гена TNF- α встречался чаще, чем в группе II: 42 % против 21 % (хи-квадрат = 4.514; $p = 0,034$). При вычислении показателя отношения шансов было обнаружено, что генотип GA ассоциирован с риском развития рака желудка (OR = 2,769; нижняя граница 95 % ДИ (CI) = 1,065, верхняя граница

95 % ДИ (CI) = 7,197). В нашем исследовании генотип AA не встретился ни в группе I, ни в группе II, ни в группе III.

Гистологический материал (два-три 5 мкм среза парафинового блока) и браш-препараты всех язв и карцином были направлены на молекулярно-генетическое исследование с помощью анализа экспрессии миРНК и мРНК. Морфологический материал, полученный из всех язв с дисплазией по профилю миРНК определен в группу дисплазия. Браш-препараты больных из группы рак желудка с помощью созданной математической модели для цитологических образцов по профилю экспрессии миРНК и мРНК определены в группу рак.

Результаты молекулярно-генетического исследования гистологического материала. В исследовании было использовано 125 гистологических образцов язв с дисплазией, 35 образцов аденокарциномы желудка, 34 образца нормальной слизистой оболочки. Уровень экспрессии миРНК-145, -150, -20a, -21, -31, -34a, -106b, -375, -125a, -125b, -196b, -221, -141, -451 определялся с помощью ОТ-ПЦР в режиме РВ. В таблице 2 приведены данные по статистической значимости различий между экспрессией миРНК в образцах разных типов, использован непараметрический критерий Манна – Уитни.

Таблица 2 – Уровень значимости при попарном сравнении экспрессии миРНК в разных типах гистологических образцов

миРНК	РЖ/Норма	РЖ/Дисплазия	Норма/Дисплазия
миРНК-145	0,658799	0,024481	0,020678
миРНК-150	0,001427	$2,39 \times 10^{-9}$	$1,6 \times 10^{-12}$
миРНК-20a	0,087065	0,005350	0,000184
миРНК-21	$1,62 \times 10^{-7}$	0,002382	$7,27 \times 10^{-9}$
миРНК-31	0,397360	0,000001	$1,19 \times 10^{-10}$
миРНК-34a	$4,69 \times 10^{-11}$	0,007694	$1,89 \times 10^{-11}$
миРНК-106b	0,1716	0,2515	0,0004
миРНК-375	0,001012	0,000007	0,078223
миРНК-125a	0,0240	$3,28 \times 10^{-6}$	$2,28 \times 10^{-6}$

Продолжение таблицы 2

миРНК	РЖ/Норма	РЖ/Дисплазия	Норма/Дисплазия
миРНК-125b	0,3218	0,7866	0,3207
миРНК-196b	$8,25 \times 10^{-6}$	0,0011	0,0024
миРНК-221	$5,97 \times 10^{-6}$	0,0985	$3,43 \times 10^{-5}$
миРНК-141	0,4983	0,0002	$3,88 \times 10^{-5}$
миРНК-451	$1,24 \times 10^{-8}$	0,8374	$1,07 \times 10^{-10}$
Примечание. Жирным шрифтом выделены значимые ($p < 0,007$) различия.			

Для деления образцов на разные группы использовались алгоритмы построения дерева решений C-RT и C5.0, разделяющие исходные данные на подмножества, которые становятся все более и более гомогенными относительно определенных признаков, в результате чего формируется древовидная иерархическая структура. В ходе исследования были построены три дерева, математическая модель с лучшими диагностическими характеристиками была построена с помощью алгоритма C5.0 и в нее вошли миРНК (-150, -451, -196b, -34a, -145, -31). Дерево принятия решения выглядит следующим образом:

миР-150 > (-8,31) Диагноз = Дисплазия

миР-150 < = (-8,31)

.....миР-451 > 0 Диагноз = Норма

.....миР-451 < = 0

.....миР-196b < = (-2637,61)

.....миР-34a > (-26,82) Диагноз = Дисплазия

.....миР-34a < = (-26,82)

.....миР-145 < = (-39,92) Диагноз = Дисплазия

.....миР-145 > (-39,92)

.....миР-34a < = (-44,17) Диагноз = Норма

.....миР-34a > (-44,17) Диагноз = РЖ

.....миР-196b > (-2637,61)

.....миР-31 < = (-57,21) Диагноз = РЖ

.....миР-31 > (-57,21)

.....миР-145 > (-10,6) Диагноз = РЖ

.....миР-145 < = (-10,6)

.....миР-150 > (-62,78) Диагноз = Дисплазия

.....миР-150 < = (-62,78)

.....миР-31 < = (-25,18) Диагноз = Дисплазия

.....миР-31 > (-25,18) Диагноз = РЖ

Данные о диагностических характеристиках определения РЖ и дисплазии с помощью этого дерева решений на выборке гистологических образцов, использованных в работе, представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3 – Диагностические характеристики выявления рака желудка и дисплазии с помощью дерева принятия решения при использовании гистологических образцов

Параметры	Рак желудка, %	Дисплазия, %
Специфичность	100,00	94,20
Чувствительность	88,57	98,40
Общая точность	97,94	96,91
ПЦПР	100,00	96,85
ПЦОР	97,55	97,01
Примечания: 1. ПЦПР – предсказательная ценность положительного результата. 2. ПЦОР – предсказательная ценность отрицательного результата.		

Таблица 4 – Результаты выявления рака и дисплазии на основании данных об экспрессии миРНК с помощью дерева принятия решения № 3 для гистологических образцов

Параметры	Рак желудка	Дисплазия
Достоверно положительный	31	123
Ложно положительный	0	4
Достоверно отрицательный	159	65
Ложно отрицательный	4	2

Результаты молекулярно-генетического исследования цитологического материала. В исследование был включён 221 цитологический препарат: 108 образцов аденокарциномы, 27 образцов язвы с дисплазией, 86 образцов нормальной слизистой оболочки. Уровень экспрессии миРНК-145, -150, -21, -20а, -31, -34а, -375, -125b, -196b, -106b и мРНК следующих генов: TERT, CDKN2A, CKS2, FN1, – определялся с помощью ОТ-ПЦР в режиме РВ. В таблице 5 приведены данные по статистической значимости различий между экспрессией миРНК и мРНК в образцах разных типов, использован непараметрический критерий Манна – Уитни.

Таблица 5 – Уровень значимости при попарном сравнении экспрессии миРНК и мРНК в разных типах цитологических образцов

миРНК	РЖ/Норма	РЖ/Дисплазия	Норма/Дисплазия
миРНК-125b	$5,56 \times 10^{-6}$	0,5491	0,0620
миРНК-145	$1,87 \times 10^{-8}$	0,1165	$4,84 \times 10^{-9}$
миРНК-196b	$1,62 \times 10^{-12}$	0,0486	0,0005
миРНК-20а	0,0713	0,0928	0,0002
миРНК-150	$1,03 \times 10^{-9}$	0,3557	$1,93 \times 10^{-5}$
миРНК-21	$4,40 \times 10^{-10}$	0,0385	0,0079
миРНК-375	$5,08 \times 10^{-9}$	$2,93 \times 10^{-9}$	0,0007
миРНК-106b	0,5174	0,3674	0,5609
миРНК-31	$3,71 \times 10^{-7}$	0,0281	0,0475
миРНК-34а	$3,74 \times 10^{-7}$	0,6937	$6,80 \times 10^{-5}$
мРНК TERT	$4,34 \times 10^{-8}$	0,4407	$2,26 \times 10^{-5}$
мРНК CKS2	$2,78 \times 10^{-11}$	0,4490	$2,15 \times 10^{-7}$
мРНК FN1	$2,18 \times 10^{-12}$	$2,38 \times 10^{-5}$	0,4705
мРНК CDKN2A	$1,48 \times 10^{-5}$	0,1868	0,1033
Примечание. Жирным шрифтом выделены значимые ($p < 0,0012$) различия.			

Для деления образцов на разные группы использовали алгоритмы построения дерева решений C-RT и C5.0, были построены шесть

математических моделей, дерево решения с лучшими диагностическими характеристиками было построено с помощью алгоритма C5.0, и в него вошли миРНК-125b, -145, -196b, -21, -20a и -375 и мРНК генов CKS2, TERT и FN1.

Дерево принятия решения выглядело следующим образом:

миР-375 $\leq (-14,273)$ Диагноз = Рак

миР-375 $> (-14,273)$

.....CKS2 $> 1,853221$ Диагноз = Норма

.....CKS2 $\leq 1,853221$

.....миР-196b $\leq (-30894,83)$ Диагноз = Норма

.....миР-196b $> (-30894,83)$

.....миР-145 $> (-37,9232)$

.....FN1 $> 0,2643117$ Диагноз = Рак

.....FN1 $\leq 0,2643117$

.....TERT $\leq 0,02677348$ Диагноз = Рак

.....TERT $> 0,02677348$ Диагноз = Норма

.....миР-145 $\leq (-37,9232)$

.....миР-125b $> (-9,207474)$ Диагноз = Дисплазия

.....миР-125b $\leq (-9,207474)$

.....FN1 $\leq 0,01168407$ Диагноз = Норма

.....FN1 $> 0,01168407$:

.....TERT $\leq 0,00008631$ Диагноз = Норма

.....TERT $> 0,00008631$

.....миР-145 $\leq (-412,5019)$ Диагноз = Дисплазия

.....миР-145 $> (-412,5019)$

.....миР-20a $> (-4,228479)$ Диагноз = Рак

.....миР-20a $\leq (-4,228479)$

.....миР-21 $\leq 1,656485$ Диагноз = Рак

.....миР-21 $> 1,656485$ Диагноз = Дисплазия

Данные о диагностических характеристиках определения РЖ и дисплазии с помощью этого дерева решений на выборке цитологических образцов, использованных в работе, представлены в таблицах 6 и 7.

Таблица 6 – Диагностические характеристики выявления рака желудка и дисплазии с помощью дерева принятия решения при использовании цитологических образцов

Параметры	Рак желудка, %	Дисплазия, %
Специфичность	92,04	98,96
Чувствительность	97,22	67,86
Общая точность	94,57	95,02
ПЦПР	92,11	90,48
ПЦОР	97,20	95,50

Таблица 7 – Результаты выявления рака и дисплазии на основании данных об экспрессии миРНК и мРНК с помощью дерева принятия решения № 6 для цитологических образцов

Параметры	Рак желудка	Дисплазия
Достоверноположительный	105	19
Ложноположительный	9	2
Достоверноотрицательный	104	191
Ложноотрицательный	3	9

Между группами рак/дисплазия значимые различия оказались только для двух маркеров (миРНК-375, мРНК *FN1*), поэтому при высокой специфичности выявления дисплазии чувствительность оказалась заметно ниже. Дисплазия является переходной формой от нормы к раку, при отсутствии четко прочерченных границ между этими группами результаты морфологического и молекулярного анализа могут не совпадать в силу того, что появление ранних молекулярных маркеров злокачественности может не сопровождаться заметными морфологическими проявлениями.

Важным преимуществом разработанной методики на основе профилирования миРНК и мРНК для дифференциальной диагностики дисплазии и РЖ по сравнению с нормальной слизистой в образцах цитологического материала, полученного при экстренном эндоскопическом исследовании, является то, что высокая чувствительность клеточного материала к внешним воздействиям и время, затраченное на транспортировку, не влияют на результат молекулярно-генетического исследования.

Сопоставление уровней значимости различий между группами для цитологического и гистологического материала. Изначально в нашей работе мы разработали алгоритм классификации образцов слизистой желудка на норму, дисплазию и рак с помощью данных об относительном содержании миРНК в гистологическом материале. В процессе исследования была решена подобная задача на цитологических образцах, при сравнении результатов экспрессии по тем миРНК, которые были использованы для анализа и гистологического, и цитологического материала, выявлены различия. Результаты сопоставления уровней экспрессии представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Сопоставление уровней значимости различий между группами для цитологического и гистологического материала

миРНК	РЖ/Норма		РЖ/Дисплазия		Норма/Дисплазия	
	гистология	цитология	гистология	цитология	гистология	цитология
миРНК-145	0,658799	$1,87 \times 10^{-8}$	0,0244	0,1165	0,020678	$4,84 \times 10^{-9}$
миРНК-150	0,001427	$1,03 \times 10^{-9}$	$2,39 \times 10^{-9}$	0,3557	$1,6 \times 10^{-12}$	$1,93 \times 10^{-5}$
миРНК-20a	0,0870	0,0713	0,0053	0,0928	$1,84 \times 10^{-4}$	0,0002
миРНК-21	$1,62 \times 10^{-7}$	$4,40 \times 10^{-10}$	0,0024	0,0385	$7,27 \times 10^{-9}$	0,0079
миРНК-31	0,397360	$3,71 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-6}$	0,0281	$1,19 \times 10^{-10}$	0,0475
миРНК-34a	$4,69 \times 10^{-11}$	$3,74 \times 10^{-7}$	0,007694	0,6937	$1,89 \times 10^{-11}$	$6,80 \times 10^{-5}$
миРНК-375	0,001012	$5,08 \times 10^{-9}$	$7,0 \times 10^{-6}$	$2,93 \times 10^{-9}$	0,078223	0,0007
миРНК-106b	0,1716	0,5174	0,2515	0,3674	0,0004	0,5609
миРНК-125b	0,3218	$5,56 \times 10^{-6}$	0,7866	0,5491	0,3207	0,0620
миРНК-196b	$8,25 \times 10^{-6}$	$1,62 \times 10^{-12}$	0,0011	0,0486	0,0024	0,0005
Примечание. Жирным шрифтом выделены значимые ($p < 0,007$) различия.						

Из таблицы 8 следует, что присутствует ряд различий между гистологическим и цитологическим материалом по экспрессии 10 миРНК. Часть из них связана с разными структурами выборок: в работе по гистологическому материалу было 35 образцов рака, 125 – дисплазии и 34 – нормы, а в работе по цитологическому материалу – 108 образцов рака, 27 – дисплазии и 86 – нормы. То есть соотношение между группами получается разным, размер выборки тоже отличается. Кроме того, материал для гистологического исследования фиксирован в 10 %-ом растворе формалина, затем проведена специальная обработка и заключение в парафин, а цитологический материал высушивается на воздухе и окрашивается по Романовскому-Гимзе. Клеточный состав также отличается, так в мазках, полученных щеткой, присутствуют сохранные и отмирающие слущивающиеся клетки покровно-ямочного эпителия, а полученный щипцами гастробиоптат представлен тканью слизистой и подслизистой оболочки желудка.

Анализ ошибок дифференциальной диагностики дисплазия и рак желудка. Были проведены ретроспективный анализ результатов эндоскопического и морфологического исследований 125 наблюдений пациентов с язвами желудка с дисплазией и молекулярно-генетическое исследование образцов архивного гистологического материала в виде парафиновых блоков этих пациентов. Далее пациентов, чьи блоки были использованы, мы приглашали на эндоскопические исследования через 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 месяцев, комплаенс составил 3,2 % (на повторные исследования явились 4 пациента). В связи с этим больных из второго этапа исследования наблюдали при помощи электронной базы БАРС Медицинской информационной системой. В результате выявлено 10 (8 %) случаев рака желудка, средний возраст больных раком – $(59 \pm 5,4)$ года, гендерное распределение: мужчин – 6, женщин – 4.

Учитывая малое количество наблюдений, каждому распознанному случаю злокачественного новообразования присвоен порядковый номер, далее проведён подробный анализ. Главные результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Характеристика выявленных случаев злокачественных новообразований желудка

№ наблюдения	Архивный гистологический материал, заключение: язва	Диагностирован рак желудка	Размер язвенного поражения желудка	Гистологический диагноз	Стадирование по TNM	Оперативное лечение
1	Январь 2017	Май 2020	4,0 см в диаметре	Низко дифференцированная аденокарцинома	T3NxMo	—
2	Август 2017	Октябрь 2017	4,0 × 5,0 см	Умеренно дифференцированная аденокарцинома	TxNxM1	—
3	Ноябрь 2017	Декабрь 2019	3,5 × 4,0 см	Низко дифференцированная аденокарцинома	TxNxM1	—
4	Декабрь 2017	Март 2018	4,0 см в диаметре	Умеренно дифференцированная аденокарцинома	TxNxMo	—
5	Январь 2018	Март 2018	2,5 см в диаметре	Высоко дифференцированная аденокарцинома	T1aNoMo G1	Субтотальная дистальная резекция + D 2
6	Март 2018	Апрель 2018	6,0 × 9,0 см	Низкодифференцированная аденокарцинома	TxNxM1	—
7	Август 2018	Ноябрь 2019	5,0 см в диаметре	Умеренно дифференцированная аденокарцинома	T4aN1Mo (после операции)	Субтотальная дистальная резекция + D 2
8	Сентябрь 2018	Октябрь 2018	5,0 × 3,5 см	Низко дифференцированная аденокарцинома	T2-3N1Mo (после операции)	Гастрэктомия + D2
9	Декабрь 2018	Февраль 2019	3,5 × 4,0 см	Умеренно дифференцированная аденокарцинома	TxNxM1	—

Шесть наблюдений (2, 4, 6, 8, 9, 10) — это несвоевременно выявленный рак желудка, инфильтративно-язвенная форма. Госпитализация наблюдений (2, 4, 6, 8, 9, 10) была выполнена по экстренным показаниям с признаками желудочно-кишечного кровотечения в хирургическое отделение, в день госпитализации при эзофагогастродуоденоскопии был выявлен гигантский, более 3,0 см, язвенный дефект с признаками состоявшегося кровотечения, после эндоскопического исследования больных переводили в отделение. На 5-е сутки со дня госпитализации выполнялось повторное эндоскопическое исследование, однако в дне язвенного дефекта определялись мелкие тромбированные сосуды (чёрные точки), из-за риска рецидива кровотечения мультифокальная биопсия не проводилась, манипуляция ограничивалась забором 1-2 фрагментов, а после выписки рекомендовалось пройти гастроскопию с биопсией.

Случай № 1, в январе 2017 года госпитализация по неотложным показаниям с клиникой желудочно-кишечного кровотечения в хирургическое отделение, по данным первого эндоскопического осмотра в антральном отделе найдена язва размером 1,2 см Forrest II C, через 5 дней выполнена повторная гастроскопия с биопсией. В описании эзофагогастродуоденоскопии указано, что язвенный дефект уменьшился до 0,9 см, а в дне язвы появился регенерирующий эпителий. При морфологическом исследовании получено заключение — хронический периульцерозный гастрит с фокусами low-grade дисплазии. В мае 2020 года (через 40 месяцев) больная поступила по скорой помощи с диагнозом желудочно-кишечное кровотечение, в период госпитализации было выявлено злокачественное образование желудка, гистологическое заключение — низкодифференцированная аденокарцинома, ввиду тяжёлой коморбидности специализированное лечение пациентке было противопоказано.

Случай № 3, в ноябре 2017 года амбулаторное обращение с астеническим синдромом, пациент был направлен на эзофагогастродуоденоскопию, на которой выявили язву препилорического отдела с субкомпенсированным

стенозом привратника, выполнили щипцовую биопсию, получено 3 фрагмента ткани из язвенного дефекта. Пациент был проконсультирован хирургом, ему рекомендовали хирургическое лечение, на которое он согласился. Однако в ходе подготовки к плановой госпитализации на фоне консервативной терапии стеноз привратника был купирован, и пациент отказался от операции, несмотря на то что при морфологическом исследовании обнаружили фокусы high-grade дисплазии. Вновь обратился к участковому терапевту в декабре 2019 (через 26 месяцев) с жалобами на снижение массы и увеличение размера живота. При ультразвуковом исследовании органов брюшной полости найдены метастазы в печени и асцит.

Случай № 5, в январе 2018 года госпитализация по экстренным показаниям с желудочно-кишечным кровотечением, выполнен эндоскопический гемостаз. Перед выпиской из стационара больной прошёл в плановом порядке гастроскопию с биопсией для проведения гистологического исследования, в результате получено заключение: хроническая язва с high-grade дисплазией и началом регенерации. Пациент выписан из стационара и направлен к онкологу.

Случай № 7, на фоне приёма кардиомагния в стандартной дозе больной начал испытывать боли в эпигастрии, был направлен участковым терапевтом на эзофагогастродуоденоскопию, при которой найден язвенный дефект овальной формы размером до 1,0 см, большую часть дна язвы покрывал регенерирующий эпителий, а фибрин составлял примерно одну треть. Выполнена биопсия – гистологическое заключение: хроническая язва, регенерация. Через 15 месяцев больной поступил по экстренным показаниям с желудочно-кишечным кровотечением, при эндоскопическом исследовании найдена язва $4,0 \times 5,0$ см, после стабилизации гемостаза выполнена повторная гастроскопия с биопсией, морфологическое исследование показало переульцерозный гастрит с очагами кишечной метаплазии и фокусами high-grade дисплазии. Пациент выписан из стационара и направлен к онкологу.

Наблюдения № 1, № 3, № 5, № 7 объединяет длительный язвенный анамнез, в каждом случае дольше 5 лет. В первые 12 месяцев после установления диагноза рака желудка умерли все пациенты, кроме случаев заболевания № 5, № 7. Все образцы архивного гистологического материала вошли в исследование, имея заключение: язва с дисплазией. При использовании разработанного нами метода по профилю экспрессии миРНК в 4-х случаях (№ 4, № 6, № 9, № 10) классификатор отнёс поражения желудка в группу рак. Библиотека случаев метода построения математической модели, основанного на профилировании молекулярных маркеров, уже превышает 490 случаев, при этом общая точность при выявлении рака 97 %, а для дисплазии более – 98 %, что подтверждает необходимость применения профилирования по миРНК и мРНК при каждом выявленном случае дисплазии. При этом в качестве альтернативы щипцовой биопсии можно использовать браш-биопсию: она менее травматична.

В результате проведенного исследования 125 случаев язв с дисплазией из базы гистологических образцов при среднем времени наблюдения 9 месяцев (медиана 2 месяца, интерквартильный размах от 2 до 12 месяцев) выявлено 10 случаев (8 %) РЖ, в связи с чем мы предлагаем изменить критерии наблюдения (Рисунок 3) и предлагаем включать, помимо стандартного обследования больных с язвенными поражениями желудка, определение генотипа TNF- α при -308 (G; A), браш-биопсию, молекулярно-генетическое, в качестве дополнительных методов, позволяющих в короткие сроки и наиболее достоверно определить характер поражения.

Генотип TNF- α при -308 (G; A) целесообразно определять при первом обращении с диспепсическими симптомами к терапевту или гастроэнтерологу как простой и дешевый метод предикции.

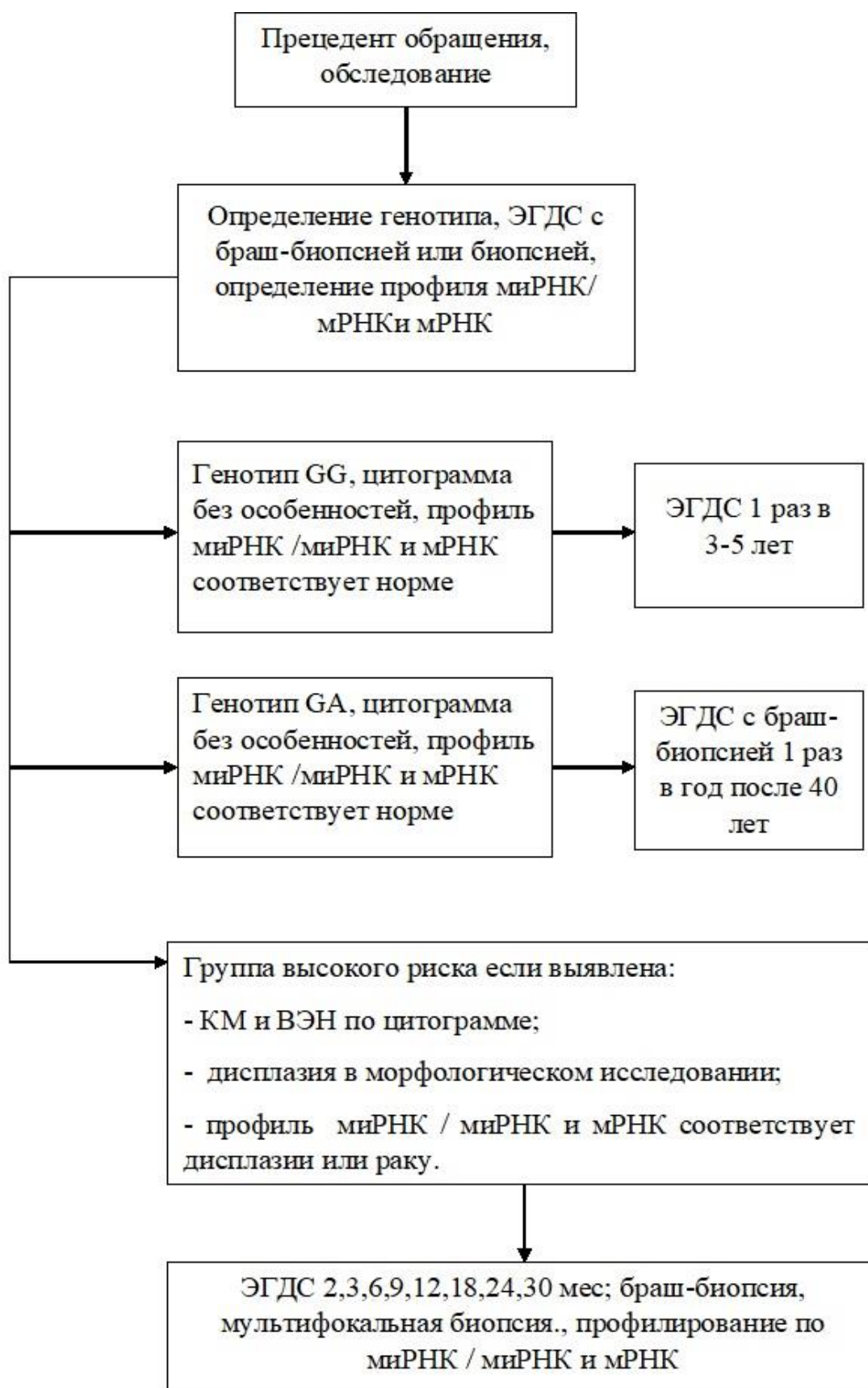


Рисунок 3 – Алгоритм выявления больных с диспластическими изменениями слизистой оболочки желудка и риском прогрессии заболевания

Алгоритм может работать без определения генотипа, однако определение генотипа TNF- α при -308 (G; A) желательно.

Если по данным морфологического или цитологического исследования не выявлены дисплазия или РЖ, а по профилю миРНК / миРНК и мРНК материал определен в группу дисплазия или рак, то пациент переводится в группу высокого риска.

ВЫВОДЫ

1. Браш-биопсия позволяет в течение 2 дней после первичной эзофагогастродуоденоскопии установить доброкачественный характер язвенного поражения в 94,8 % случаев и в 100 % установить верно характер поражения при злокачественном изъязвлении. По данным морфологического исследования в 9,3 % (в группе I и II) была выявлена дисплазия в крае хронической язвы с началом регенерации. Выраженная реакция (++++) с ЦОГ-2 ($\times 400$) отмечается при размере язвенного дефекта 1,5 см и более при наличии дисплазии и при раке желудка.

2. В результате проведённого исследования создана библиотека профилей молекулярных маркеров в норме, при дисплазии, при раке желудка. В библиотеку профилей включены 194 образца архивного гистологического материала (норма, язва с дисплазией, рак желудка) в виде парафиновых блоков и 221 цитологический препарат (норма, язва с дисплазией, рак желудка) в виде мазков на предметном стекле.

3. Чувствительность созданной математической модели при использовании гистологического материала при выявлении рака составила 88,57 %, специфичность 100 %, а для дисплазии чувствительность составила 98,40 %, специфичность 94,20 %.

4. Чувствительность созданной математической модели при использовании цитологического материала при выявлении рака желудка составила 97,22 %, специфичность 92,04 %, а для дисплазии чувствительность составила 67,86 %, специфичность – 98,96 %.

5. Браш-биопсия из язвенного поражения желудка при гемостазе тип II В, II С по J. Forrest (1974 г.) в 8,6 % привела к капиллярному подтеканию крови тип I В по J. Forrest (1974 г.), которое было остановлено методом аргонплазменной коагуляции. Браш-препараты всех язвенных поражений (группа I, II, III) при гемостазе тип II В, II С по J. Forrest (1974 г.) прошли молекулярно-генетическое исследование, чувствительность созданной математической модели для пациентов III группы составила 100 %.

6. Несмотря на то, что выявлены различия по экспрессии десяти миРНК, которые были использованы для анализа цитологического и гистологического материала, созданные математические модели характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью и позволяют эффективно разделять образцы на разные группы как при использовании гистологического, так при использовании цитологического материала.

7. В результате ретроспективного и проспективного анализа обследований 125 наблюдений язв с дисплазией выявлено 10 случаев (8 %) рака желудка. Классификатор по профилю миРНК, полученной после первичной эзофагогастродуоденоскопии с биопсией (ретроспективный материал из первичного осмотра), определил в группу «рак желудка» 4 поражения из 10. Средний промежуток времени до выявления рака желудка составил 9 месяцев, медиана 2 месяца с интерквартильным размахом от 2 до 12 месяцев.

8. Разработанный диагностический алгоритм выявления групп риска по прогрессии заболевания в неоплазию позволяет выявлять пациентов при наличии язвенного поражения желудка, осложненного кровотечением, при гемостазе тип II В, II С по J. Forrest.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При обследовании пациентов с язвенными поражениями слизистой оболочки желудка рекомендуется дополнить эзофагогастродуоденоскопию с щипцовой биопсией выполнением браш-биопсии и определением в цитологическом материале профиля миРНК и мРНК.

2. При выявлении профилей миРНК и мРНК, соответствующих раку

желудка, после снятия угрозы рецидива кровотечения необходимо провести повторную эзофагогастродуоденоскопию с щипцовой биопсией 3 и более фрагментов и молекулярно-генетическим исследованием. При выявлении дисплазии high-grade направить пациента к онкологу. При выявлении дисплазии low-grade наблюдать пациента согласно предложенному алгоритму. При регрессе дисплазии наблюдать пациента 1 раз в год (ЭГДС, браш-биопсия, МГА).

3. В случаях язвенного поражения желудка, осложненного кровотечением при гемостазе тип II В, II С по J. Forrest (1974 г.), рекомендуется выполнить браш-биопсию при первичной ЭГДС с определением профиля экспрессии миРНК и мРНК после цитологического исследования.

4. В постгеморрагическом периоде на анемизированной слизистой рекомендовано использовать хромогастроскопию с 0,5 %-м растворами метиленового синего для улучшения визуализации язвенных поражений.

5. При формировании групп риска по развитию рака рекомендовано после прецедента обращения дополнить обследование определением генотипа TNF-а-308.

6. Применение разработанного диагностического алгоритма рекомендовано после прецедента обращения, в том числе при осложнённых язвах желудка, для выявления «пациентов с высоким риском», которым следует повторять ЭГДС с выполнением мультифокальной щипцовой биопсии, с обязательным проведением МГА гистологического материала каждые 3–6 месяцев в течение 2,5 лет, и «пациентов с низким риском», которым можно проводить ЭГДС 1 раз в 3–5 лет.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Архипова, А. А.** Первый опыт использования метода выявления источника кровотечения на высоте геморрагии в эндоскопии / А. А. Архипова, А. В. Кузнецов, В. В. Рыбин // **Сибирское медицинское обозрение.** – 2018. – № 6. – С. 63–66.

2. **Архипова, А. А.** Хромогастродуоденоскопия в диагностике язвенного поражения у пациентов с сердечной-сосудистой патологией в сочетании с анемией / **А. А. Архипова**, А. В. Кузнецов // **Acta Biomedica Scientifica**. – 2019. – № 4 (1). – С. 102–106.
3. **Архипова, А. А.** Характеристика язв желудка, осложнённых кровотечением / **А. А. Архипова**, В. В. Анищенко // **Acta Biomedica Scientifica**. – 2020. – № 5 (1). – С. 42–46.
4. Возможности дифференциальной диагностики рака желудка и предраковых изменений слизистой желудка с помощью анализа экспрессии шести микроРНК / С. Е. Титов, В. В. Анищенко, Т. Л. Полоз [и др., в том числе **А. А. Архипова**] // **Клиническая лабораторная диагностика**. – 2020. – № 65 (2). – С. 131–136.
5. **Архипова, А. А.** Связь между полиморфизмом гена TNF-A-308G/A и риском рака желудка / **А. А. Архипова**, В. В. Анищенко // **Медицина в Кузбассе**. – 2020. – №1. – С. 42–45.
6. **Архипова, А. А.** Дисплазия лёгкой степени, эндоскопические предикторы, тактика ведения / **А. А. Архипова**, В. В. Анищенко // **Хирургическая практика**. – 2020. – № 2. – С. 10–14.
7. **Архипова, А. А.** Гастроскопия с биопсией и/или серологическая биопсия в качестве первичной диагностики состояния слизистой оболочки желудка / **А. А. Архипова**, В. В. Анищенко, Р. Р. Мирсадиков // **Хирургическая практика**. – 2020. – № 4. – С. 23–28.
8. Динамический скрининг предраковых состояний пищевода с помощью молекулярно-генетического анализа / В. В. Анищенко, С. Е. Титов, Т. Л. Полоз [и др., в том числе **А. А. Архипова**] // **Сибирский онкологический журнал**. – 2020. – № 19 (6). – С. 38–45.
9. Анализ ошибок дифференциальной диагностики дисплазии и рака желудка / В. В. Анищенко, **А. А. Архипова**, С. Е. Титов [и др.] // **Медицина в Кузбассе**. – 2021. – №2. – С. 50–54.

10. **Архипова, А. А.** Современные возможности и перспективы ранней диагностики рака желудка / **А. А. Архипова**, В. В. Анищенко // **Acta Biomedica Scientifica**. – 2021. – № 6 (3). – С. 113–125.

11. Анализ экспрессии миРНК и мРНК в клеточном материале слизистой оболочки желудка, полученного при эзофагогастродуоденоскопии, для выявления дисплазии и рака желудка / В. В. Анищенко, **А. А. Архипова**, С. Е. Титов [и др.] // **Хирургическая практика**. – 2021. – № 4 – С. 53–60.

12. Эндоскопический гемостаз при кровотечении из верхних отделов желудочно-кишечного тракта / А. В. Кузнецов, **А. А. Архипова**, С. С. Йолчиев [и др.] // Междисциплинарные аспекты многопрофильной клиники: диагностика, лечение, профилактика : материалы научно-практического образовательного форума 17–18 мая 2018. – Новосибирск, 2018. – С. 217.

13. Возможности аргон-плазменной коагуляции в эндоскопии при кровотечениях из верхних отделов ЖКТ / А. В. Кузнецов, **А. А. Архипова**, Г. К. Кусатов, С. С. Йолчиев // Национальный хирургический конгресс совместно с 20-м юбилейным съездом РОЭХ, г. Москва 4–7 апреля 2017 г. : тезисы. – М., 2017 // Альманах Института хирургии им. А. В. Вишневского. – 2017. – № 1.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЭГДС	– эзофагогастродуоденоскопия
РЖ	– рак желудка
мРНК	– матричная рибонуклеиновая кислота
миРНК	– малая интерферирующая рибонуклеиновая кислота
CKS2	– CDC28 Protein Kinase Regulatory Subunit 2
FN1	– Fibronectin 1
CDKN2A	– Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
TERT	– Telomerase Reverse Transcriptase
ОТ-ПЦР РВ	– полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени
ЦОГ-2	– циклооксигеназа 2