Міністерство охорони здоров'я України
Український центр наукової медичної інформації
та патентно-ліцензійної роботи

«УЗГОДЖЕНО»
Директор Департаменту реформ та
розвитку медичної допомоги
МОЗ України
_____М.К.Хобзей
_____ 201 р.

ВИЗНАЧЕННЯ ПАТОМОРФОЛОГІЧНИХ ДИФЕРЕНЦІЙНО ДІАГНОСТИЧНИХ КРИТЕРІЇВ ПЕРЕДПУХЛИННИХ ПРОЦЕСІВ ТА РАКУ ШЛУНКА МЕТОДОМ ГЕНОТИПУВАННЯ ЗРАЗКІВ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ТА ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ

(Методичні рекомендації)

(176.12/70.13)

Київ – 2013

Установа розробник:

Харківський національний медичний університет МОЗ України

Укладачі:

к. мед. н., доцент Харченко О.В. (057) 707-72-79

д. мед. н., професор Марковський В.Д. (057) 707-72-79

Рецензент:

Головний позаштатний спеціаліст зі спеціальності «Патологічна анатомія» МОЗ України к. мед. н., доцент В.А. Діброва

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень 4

Вступ 5

Основна частина

О'бєкт дослідження..... 8

Мета дослідження..... 8

Матеріал і методи..... 8

Результати дослідження 10

Практичні рекомендації 19

Висновки 20

Перелік рекомендованої літератури 22

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ХВШ – хронічна виразка шлунка

ХВДПК – хронічна виразка дванадцятипалої кишки

ВІРШ – виразково-інфільтративний рак шлунка

РШ – рак шлунка

АК – аденокарцинома

СОШ – слизова оболонка шлунка

ХГ – хронічний гастрит

НР – Helicobacter pylori

КМ – кишкова метаплазія

Д – дисплазія

Д -І – слабо виражена дисплазія

Д-ІІ – помірно виражена дисплазія

Д-ІІІ – виражена дисплазія

МІ – мітотичний індекс

МР – мітотичний режим

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ДПК – дисеміновані пухлинні клітини

Вступ

Комплексна патоморфологічна диференційна діагностика передпухлинних процесів і злоякісних новоутворень шлунка(С.16) одна з найважливіших проблем сучасної патоморфології.

Морфологічна характеристика передпухлинних змін слизової оболоноки шлунка при розвитку канцерогенезу важлива для ранньої діагностики пухлини.

Злоякісна пухлина шлунка дуже небезпечна хвороба оскільки до сьогодні залишається невідомою причина виникнення захворювання. При діагностуванні пухлини на ранніх стадіях розвитку можливо вчасно розпочати адекватне лікування. На ранніх стадіях злоякісні захворювання виліковуються.

Актуальною залишається проблема щодо раннього виявлення виникнення пухлини та своєчасного проведення її лікування.

Прояви клінічної картини раку шлунка пов'язані з локалізацією пухлини, формою росту, поширеністю процесу, ускладненнями.

Локалізація злоякісних пухлин визначається кодом номерів Міжнародної Класифікації Онкологічних Хвороб(ICD-O, 3-е видання ВООЗ, 2000). Злоякісне новоутворення шлунку – С.16; злоякісне новоутворення тіла шлунку – С-16,2; злоякісне новоутворення антрального відділу – С-16,3; злоякісне новоутворення пілоричного каналу – С-16,4; злоякісне новоутворення малої кривизни шлунка – С-16,5. Міжнародна класифікація злоякісних пухлин за системою TNM, за суттю є шифром, що відображає індивідуальні особливості онкологічного захворювання. Цифри , що додані до символів Т, N і М вказують на ступінь розповсюдження пухлини.

Символ Т (tumor) характеризує первинну пухлину. Для злоякісних пухлин шлунку прийнято 4 категорії Т: Т1 – пухлина інфільтрує стінку шлунка до підслизового шару, Т2 – пухлина інфільтрує м'язовий шар шлунка до субсерозної оболонки, Т3 – пухлина проростає серозну

оболонку(вісцеральну очеревину) без інвазії в сусідні структури,Т4 – пухлина розповсюджується на сусідні структури. Додатково для деяких випадків передбачені ще дві категорії: Tis – преінвазивна карцинома (Carcinoma in situ) і Т0 застосовується у випадках, коли є метастази раку, а первинну пухлину доступними методами виявити не вдається.

Символ N (nodulus) відображає об'єм ураження регіонарних лімфатичних вузлів Регіонарні лімфатичні вузли характеризуються категоріями N: N0 – немає ознак метастатичного враження регіонарних лімфатичних вузлів, N1 – є метастази в 1-6 регіонарних лімфатичних вузлах, N2 – є метастази в 7-15 регіонарних лімфатичних вузлах, N3 – є метастази більш ніж в 15 регіонарних лімфатичних вузлах.

Символ M (metastasis) вказує на наявність або відсутність віддалених метастазів. M1 – враження метастазами віддалених лімфатичних вузлів інших органів або систем. M0 – .відсутність віддалених метастазів.

Важкими для діагностики є інфільтративно-виразкові форми раку шлунка тому, що симулюють звичайну виразку. Їх клінічна картина носить складний характер. На ранніх стадіях виразковий дефект над пухлиною загоюється при консервативному лікуванні. Через деякий час знову виникає виразковий дефект, який також під дією лікування підлягає загоєнню. Так відбувається декілька разів. Макроскопічно така пухлина має вигляд звичайної виразки, що загоїлась. Характер росту пухлини ендофітний, тобто вона росте в стінку шлунка, а слизова оболонка, що знаходиться на місці загоєння знаходиться над пухлиною і на ранніх стадіях, поки пухлина не проросте в слизову оболонку, за допомогою гістологічних і гістохімічних методів не виявляється. Завдяки ендофітному характеру росту інфільтративно-виразкова форма раку шлунка може давати рентгенологічну й ендоскопічну картину звичайної виразки.

Остаточний висновок може бути зроблений тільки після комплексного дослідження біоптатів, взятих із країв і дна виразки.

За останні роки медична наука досягла значних успіхів в галузі онкоморфології: з успіхом використовуються імуногістохімічні і молекулярно-біологічні дослідження.

Процес пухлинного росту проходить ряд етапів розвитку і має прояви дисплазії. Цей термін було запропоновано для визначення передракової епітеліальної проліферації слизової оболонки шлунка. Дисплазія – термін, що використовується для визначення передпухлинних процесів. За визначенням експертів ВООЗ дисплазія епітелію слизової оболонки шлунка характеризується трьома основними ознаками: клітинною атипією, порушенням диференційовки клітин, дезорганізацією структури слизової оболонки. Виділяють три ступеня дисплазії. Дисплазію першого і другого ступеня вважають зворотнім процесом. А дисплазію третього ступеня відносять до групи підвищеного ризику і розглядають як пограничну стадію між передраком і ранньою стадією раку. Такі зміни спостерігаються при хронічному гастриті і в слизовій оболонці шлунка при виразці шлунка та дванадцятипалої кишки.

Диференційна діагностика між дисплазією третього ступеня та раком найбільш важлива в сучасній онкоморфології.

Використання методу гастробіопсії з подальшими гістологічними та гістохімічними дослідженнями біоптатів недостатньо для диференціально-діагностичної проблеми між передпухлинними процесами і раком шлунка тому, що вони базуються на фенотипічних проявах епітелію слизової оболонки і раннього розвитку раку шлунка не виявляють.

Гістологічному методу морфологічної діагностики злоякісних пухлин бракує роздільної здатності, за його допомогою не можливо докладно проаналізувати зміни ядерної ДНК.

У розвитку канцерогенезу, злоякісна трансформація має певні перебудови в геномі клітин, що може бути виявлено при аналізі геномної ДНК. Перспективним у цьому напрямку є застосування молекулярно-біологічної полімеразної ланцюгової реакції, а саме її різновид ISSR-PCR.

Авторський спосіб діагностики інфільтративно-виразкового раку шлунка є таким, що вирішує проблему ранньої діагностики раку шлунка та можливість виявлення раннього метастазування за результатами генотипування зразків периферичної крові.

Методичні рекомендації підготовлені за матеріалами НДР «Формування сучасних методів хірургічного лікування і профілактики ускладнень захворювань і травм органів грудної клітки і черевної порожнини» (№ Держреєстрації 0110U002649), з терміном виконання 2010 – 2012 р. Одна з задач цієї теми було усунення диференціально-діагностичних проблем між звичайною виразкою і виразково-інфільтративним раком. Загострити у лікарів-хірургів онкологічну настороженість, що б в певній мірі зменшити відсоток діагностичних помилок. Це в свою чергу дозволить оптимізувати лікування хворих на доклінічних стадіях захворювання.

Підставою для підготовки методичних рекомендацій було виявлення доклінічних проявів злоякісних новоутворень шлунка та пухлинних клітин в периферичній крові за допомогою реакції ISSR-PCR у дослідній групі хворих.

Методичні рекомендації призначені для лікарів-патологоанатомів, онкологів, хірургів-онкологів, лікарів загальної практики – сімейних лікарів.

Основна частина

Об'єкт дослідження – слизова оболонка, вилучена з післяопераційного матеріалу шлунків та з матеріалу гастробіопсій і зразки периферичної крові.

Мета дослідження – розробити патоморфологічні диференційно діагностичні критерії передпухлинних процесів та раку шлунка, шляхом застосування генотипування.

Матеріал і методи.

Досліджено операційний матеріал шлунків, що резеційовані з приводу інфільтративно-виразкового раку – 50, хронічної виразки шлунка – 50, хронічної виразки дванадцятипалої кишки – 50.

Оперативно видалені шлунки досліджені з метою порівняння морфологічних особливостей стану гастральної системи та диспластичних змін епітелію слизової оболонки шлунка при виразково-інфільтративному раку, виразковій хворобі шлунка і дванадцятипалої кишки.

У цих хворих для вивчення частоти виявлення дисплазій досліджувалась слизова оболонка шлунка яку брали з країв виразки(пухлини), центру виразки (пухлини), навколо пухлини, з пілоричного відділу, малої кривизни та тіла шлунка.

З парафінових блоків із різних топографоанатомічних відділів слизової оболонки шлунка одержали зрізи, які фарбували гематоксилін-еозином, пікрофуксином за Ван-Гізоном, за загальноприйнятими схемами та вміщували в полістерол. Вплив інфекції Helicobacter pylori на стан слизової оболонки шлунка вивчали на напівтонких зрізах, виготовлених з епоксидних блоків. В якості барвника використовували 0,1% розчин толуїдинового синього на фосфатному буфері з pH 7,4.

Фіксатором слугував 10% розчин нейтрального формаліну або 4% холодний розчин глютаральдегіду.

При дослідженні паралельно з гістологічним методом (маркер фенотипу), за допомогою якого вивчалась динаміка дисплазій СОШ, проводилось вивчення змінень ДНК(як маркер генотипу) СОШ в динаміці за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

В СОШ виявляли характер диспластичних змін покривно-ямкового епітелію та на ділянках з кишковою метаплазією.

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

Індивідуальне ДНК-типування (генотипування) зразків СОШ проводили шляхом ампліфікації ДНК(вибіркове копіювання певних дільниць ДНК) в полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) (PCR) з використанням ISSR – праймеру S2, який мав структуру: $(AGC)_6G$. ISSR- PCR (Inter-Simple

Sequence Repeat – ампліфікація послідовностей між простими повторами) відрізняється високим рівнем інформативності.

При використанні одного ISSR- праймеру в одній реакції аналізується одразу 8-20 ДНК-локусів (фіксованих локалізацій генів на ДНК).

Використання двох ISSR-систем з різними праймерами дає можливість проаналізувати 16-40 локусів.

Ампліфікацію проводять в 25 мкл реакційної суміші, що містить 1× реакційний буфер з трифосфатами, праймер наведенної структури, Tag-полімеразу, ДНК додають в кількості 10 – 20 нг на реакцію.

Температура відпалу праймера становить 57°С, синтез фрагментів ДНК проходить в 30 циклах ампліфікації на термоциклері (ампліфікаторі) в режимі: I – 95°–2хв., II – 94°–30с, 57°–2хв, 72°–2хв., III – 72°–10хв.

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводять в 2%-му горизонтальному агарозному гелі з наступним їх фарбуванням протягом 10 хв в 0,5мкг/мл розчині бромистого етидію і багаторазовою промивкою в проточній воді.

Візуалізацію електрофореграм (одержаних нуклеотидних послідовностей в нуклеїнових кислотах) проводять на трансілюмінаторі в ультрафіолетовому світлі з довжиною хвилі 365 нм з наступним фотографуванням.

Визначення розмірів ампліконів (скопійованих дільниць ДНК) виконують за допомогою маркера розміру фрагментів ДНК.

Результати дослідження

Гістологічний аналіз гастральної системи при хронічній виразці шлунка, хронічній виразці дванадцятипалої кишки, виразково-інфільтративному раку шлунка, а також слизової оболонки шлунка навколо пухлини та навколо виразки, підтверджує належність виражених форм хронічного атрофічного гастриту, а також інфекції Helicobacter pylori до стабільного фонового стану.

При захворюванні на ХВШ та ХВДПК НР знайдені в 46 (92%) і 45 (90%) спостереженнях, але в СОШ хворих на ВІРШ бактерії виявлені лише в 35 (70%) спостереженнях відносно 50 спостережень в кожній розглянутій групі.

Кишкова метаплазія найбільш часто зустрічається при ВІРШ – 44 (88%), при ХВШ – 40 (80%) спостереженнях, найменший показник при ХВДПК – 38 (76%) відносно 50 спостережень в кожній розглянутій групі.

В СОШ малої кривизни показник частоти кишкової метаплазії достовірно більший при ХВШ(64,7±8,3) та ВІРШ(64,7±8,3) в порівнянні з ХВДПК(37,7±9,0%) $p<0,01$. В СОШ тіла показник частоти КМ більший при ВІРШ(29,4±7,9) від такого при ХВШ(23,5±7,4%) і достовірно більший від аналогічного при ХВДПК(9,0±4,6%) $p<0,01$.

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

Для всіх розглянутих випадків характерно, що дисплазія епітелію виявляється в усіх відділах шлунка.

Звертає на себе увагу, що в тілі шлунка хворих на ВІРШ частота дисплазії першого ступеня (Д-І) (90,9±3,7) достовірно вище в порівнянні з ХВДПК(50,0±9,3) і ХВШ(55,9±8,5) $p<0,001$. Дисплазії другого ступеня(Д-ІІ) у цій ділянці домінує при ВІРШ(87,9±4,2%) у порівнянні з ХВДПК(23,3±7,8%) і ХВШ(38,2±8,5%) $p<0,001$.

Дисплазія третього ступеня (Д-ІІІ) при ВІРШ має достовірно найбільшу частоту(54,5±6,5%) в порівнянні з ХВДПК(3,3±3,3%) $p<0,001$.

У групі ХВШ в слизовій оболонці тіла шлунка Д-ІІІ не спостерігається.

Розповсюдження Д в тілі шлунка при всіх ступенях її вираження низьке. Але при ВІРШ розповсюдження Д-І в СОШ тіла достовірно вище (21,5±2,2%) ніж у хворих з ХВДПК(2,9±0,9%) і ХВШ(3,1±0,6) $p<0,001$. В пілоричному відділі розповсюдження Д-І було найбільшим при ВІРШ

(32,0±1,1%), потім при ХВДПК(25,2±1,6%) і ХВШ(12,2±1,1%). Д-II і Д-III також превалювали при ВІРШ. Аналогічні співвідношення цього показника і на малій кривизні. Але найбільшим показник розповсюдження Д-I зареєстрований навколо пухлини (34,9±2,2%), що достовірно вищий в порівнянні з таким навколо виразки шлунка (13,3±1,4%) $p<0,001$. Аналогічно більшими при ВІРШ є показники розповсюдження Д-II і Д-III навколо пухлини.

Характерним для всіх груп дослідження є те, що в тілі шлунка показники мітотичного режиму нижчі ніж в пілоричному відділі і на малій кривизні.

Звертає на себе увагу той факт, що в тілі шлунка при ВІРШ достовірно вища кількість мітозів у метафазі 44,9±2,8% в порівнянні з показниками при ХВДПК(20,0±3,1%) і ХВШ (20,6±8,3%) $p<0,001$(Таблиця 1).

Таблиця 1.

Порівняльна характеристика показників мітотичного режиму при ВІРШ, ХВШ, ХВДПК.

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

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

При ВІРШ показники мітотичного режиму вищі від таких при ХВШ та ХВДПК. Всі вище вказані показники є свідченням певних змін на рівні тканин і клітин, тобто фенотипічні.

Гістологічний метод хоч і є базисним методом в морфологічній диференційній діагностиці дисплазій і раку шлунка, але має специфічність 90% і чутливість 90%, що свідчить про обмежену роздільну здатність.

У комплексі з гістологічним методом виконали метод генотипування (ДНК-типування) з метою диференційної діагностики дисплазії третього ступеня і раку шлунка.

Генотипування епітелію СОШ пацієнтів, хворих на хронічну виразку дванадцятипалої кишки, хронічну виразку шлунка та інфільтративно-виразковий рак шлунка, виявило різні ампліфікаційні профілі ДНК(спектри ампліконів з певною послідовністю).

В межах відповідних нозологічних груп ДНК-профілі відрізнялись за якісним складом.

Профілі маркеру СОШ в нормі містили фрагменти розміром 190, 180, 160, 140, 120, 110, 90, 70, 60 п.н. (пар нуклеотидів).

При хронічній виразці дванадцятипалої кишки(ХВДПК) фенотипу слабо вираженої дисплазії (Д-І) епітелію слизової оболонки шлунка відповідали ДНК-профілі розміром 220, 210, 200, 190, 180, 160, 140, 120, 110, 100, 90 п.н., що відповідало 30%(15) Але фенотипи Д-ІІ в 27%(13) випадків мали варіант ДНК-профілів розміром 300, 260, 240, 220, 210, 190, 180, 160, 140, 120, 100 п.н.(перший варіант), решта ж 3%(2) мала ДНК-профілі (другий варіант) 500, 480, 440, 400, 360, 300, 240, 200, 140, 110, 100 п.н. Фенотипи Д-ІІІ мали ДНК-профілі одного варіанту 520, 500, 480 460, 440, 420, 410, 380, 360,340,320 п.н.і складали 40%(20) від загальної кількості абс.(%) (див.таблиця 2).

При хронічній виразці шлунка(ХВШ) ДНК-профілі при Д-І мали розмір – 220, 210, 200, 190, 160, 120, 110, 90, 80, 70, 60 п.н. При Д-ІІ ДНК-профілі мали два варіанти перший розміром– 320, 300, 240, 220, 210, 200, 190, 180, 160, 140, 120 п.н. і другий розміром – 520, 500, 480, 460, 440, 420, 410, 400, 360, 300, 220 п.н. ДНК-профілі, що відповідали фенотипу Д-ІІІ були двох варіантів: перший розміром – ,600, 580, 540, 520, 500, 480, 460, 420, 410, 340

320 п.н. і другий – 620, 610, 600, 580, 560, 540, 520, 500, 480, 460, 440 п.н. абс. (%) (див.таблиця 2).

Таблиця 2

Порівняльна характеристика результатів генотипування (ДНК-типування) зразків слизової оболонки шлунка пацієнтів з ХВДПК та ХВШ

Вираженість дисплазії епітелію слизової оболонки шлунка	ХВДПК	ХВШ
Д-І	30%(15)	20%(10)
Д-ІІ І-варіант	27%(13)	12%(6)
Д-ІІ ІІ-варіант	3%(2)	14%(7)
Д-ІІІ І-варіант	40%(20)	50%(25)
Д-ІІІ ІІ-варіант		4%(2)
Всього	100% (50)	100%(50)

Генотипування епітелію слизової оболонки шлунка пацієнтів, хворих на інфільтративно-виразковий рак шлунка, виявило досить стабільні ДНК-профілі розміром від 520 до 620 п.н. в усіх спостереженнях та мали повну відмінність від профілю норми.

Локалізувалися новоутворення в 62,0±4,5% випадків в пілоричному відділі шлунка(С.16,4), в 30,0±4,0% на малій кривизні(С.16,5) і в 8,0±2,5% в області тіла(С.16,2).

Пухлини мали різну гістологічну структуру, що представлено в таблиці 3.

Таблиця 3.

Розподілення ВІРШ за гістологічними формами.

Гістологічна форма ВІРШ (G)	Кількість та частота спостережень	
	Рс РШ*32	РРШ**18
Низькодиференційована аденокарцинома (АК) (G-3)	3 (7,5±4,2%)	6 (30,0±10,5%)
Низькодиференційована АК (G-3) з переходом в персневидноклітинний рак	9 (22,5±6,7%)	6 (30,0±10,5%)
Недиференційований рак (G-4)	14 (35,0±7,6%)	3 (15,0±8,0%)
Персневидноклітинний рак	6 (15,0±5,7%)	3 (15,0±8,0%)

*РсРШ – розповсюджений рак шлунка; **РРШ – ранній рак шлунка.

При недиференційованих і перстневидноклітинних раках в поверхневих відділах можуть зустрічатись осередки аденокарциноми(АК), іноді навіть високодиференційованої, АК в поверхневих відділах може мати гістологічну структуру більш високої диференційовки, ніж в глибоких. Перстневидноклітинні раки в поверхневих відділах нерідко мають осередки недиференційованого раку, а в недиференційованих раках можуть бути виявлені осередки перстневидноклітинного.

Генотипування зразків пухлини пацієнтів хворих на виразково-інфільтративний рак шлунка, та взятих від них зразків переферичної крові виявило досить стабільні ДНК-профілі в матеріалі пухлини, де превалювали фрагменти з молекулярною масою розміром 520 та 620 п.н.(пар нуклеотидів), але ампліфікаційні профілі периферичної крові цих пацієнтів виявили аналогічні фрагменти лише в п'яти випадках, що представлено в таблиці 4.

У 32-х пацієнтів із 50, в яких діагностовані розповсюджені форми ВІРШ з метастазами в лімфатичні вузли, в периферичній крові за реакцією

ISSR-PCR в усіх випадках незалежно від гістологічної форми були виявлені дисеміновані пухлинні клітини(ДПК).

При низькодиференційованій АК(G-3) ДПК в крові були виявлені в 3 (9,37%)- випадках, при низькодиференційованих АК(G-3) з переходом в перстневидноклітинний рак в 9-ти (28,12%), при недиференційованих формах раку(G-4) в 14-ти(43,75%) і при перстневидноклітинному в 6-ти(18,75%) випадках із 32 спостережень.

Серед 18 (36%) хворих, в яких діагностовано ранній рак шлунка з відсутністю метастазів в лімфатичні вузли(M_0), ДПК були виявлені в 5-ти(27,8%) випадках, з яких при низькодиференційованій АК та низькодиференційованій АК(G-3) з переходом в перстневидноклітинний рак – в 5,55% відповідно, при недиференційованому раку(G-4) в 11,11% і при перстневидноклітинному в 5,55%.

Результати досліджень, в котрих були виявлені метастази в лімфатичні вузли та ДПК в периферичній крові за допомогою молекулярно-біологічної реакції ISSR-PCR, надані в таблиці 4.

Таблиця 4.

Наявність метастазів та ізольованих пухлинних клітин периферичної крові хворих на ВІРШ

Гістологічна форма (G)	Кількість спостережень 50		
	Рс РШ 32		РРШ 18
	*Ме в ЛВ	**ДПК ПК	**ДПК ПК
Низько диференційована АК (G-3)	3 9,37%	3 9,37%	1 5,55%
Низько диференційована АК (G-3) з переходом в	9 28,12%	9 28,12%	1 5,55%

перстневидно клітинний рак			
Недиференційований рак(G-4)	14 43,75%	14 43,75%	2 11,11%
Перстневидно клітинний рак	6 18,75%	6 18,75%	1 5,55%
всього	32	32	5

*Ме в ЛВ – метастази в лімфатичні вузли. **ДПК ПК – дисеміновані пухлинні клітини периферичної крові.

Приведені вище данні свідчать про те, що в периферичній крові хворих на виразково-інфільтративний рак шлунка, у яких традиційними методами діагностують відсутність метастазів (M_0) за допомогою молекулярно-біологічної реакції ISSR-PCR, специфічність якої 100% і чутливість 100%, пухлинні клітини виявлені в 5-ти (27,8%) із 18 випадків.

Отримані результати свідчать, що в ряді випадків в периферичній крові за допомогою високочутливої молекулярно-біологічної реакції ISSR-PCR виявляються дисеміновані пухлинні клітини, їх виявлення треба обов'язково брати до уваги при формуванні діагнозу і прогнозуванні перебігу хвороби. Виявлення пухлинних клітин в крові треба розцінювани як ризик ранього метастазування.

Патологоанатомічна класифікація pTNM побудована аналогічно представленій раніше клінічній. Категорії pT, pN, pM відповідають T, N і M категоріям. При гістологічному аналізі матеріалу регіонарної лімфаденектомії повинно досліджуватись не менше 15 лімфатичних вузлів. Якщо лімфатичні вузли негативні, але досліджено менше 15, класифікують як pN0.

Ступінь гістопатологічної диференційовки пухлини позначається символом G (gradus). Він має категорії: G1 – високий ступінь диференційовки, G2 – середній ступінь диференційовки, G3 – низький ступінь диференційовки, G4 – недиференційовані пухлини.

Успіх лікування в значному ступені залежить від своєчасної первинної діагностики пухлин при перших зверненнях хворого до лікаря.

Широке використання на теперішній час виявлення ступеня пухлинного процесу за допомогою класифікації злоякісних пухлин по системі TNM має високу прогностичну цінність, але треба звернути увагу на ізольовані пухлинні клітини периферичної крові які виявлені при катигорії M_0. Дисеміновані пухлинні клітини виявлені в периферичній крові молекулярно-біологічним методом треба класифікувати відповідно до схеми використовуючи символ (mol) додаючи до M_0, тобто M_0(mol+).

Багатофакторний аналіз, що вміщує показники дослідження периферичної крові, розмір пухлини, статус лімфатичних вузлів, результати гістопатологічного аналізу, показує, що десиміновані пухлинні клітини периферичної крові є суттєвим показником прогнозу хвороби у онкологічних хворих.

З метою ранньої діагностики інфільтративно-виразкового раку шлунка рекомендовано при виявленні в біоптаті патогістологічним методом вираженої дисплазії(Д-III) епітелію слизової оболонки шлунка дослідження по виявленню пухлинних клітин проводити методом ПЛР із застосуванням ISSR-PCR реакції.

Периферичну кров пацієнта досліджують і при виявленні ДНК-профілів розміром 520 – 620 пар нуклеотидів виявляють десиміновані пухлинні клітини.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. При верифікації Д епітелію слизової оболонки шлунка слід враховувати її ступінь
2. При наявності в гастробіопсіях Д-III епітелію необхідно ретельне повторне обстеження хворих
3. Хворі з Д-III епітелію в подальшому підлягають ендоскопічному обстеженню з взяттям гастробіопсій не рідше ніж один раз у півроку.
4. Морфологічна діагностика РШ повинна базуватися на комплексі гістологічних і молекулярно-біологічних ознак відрізняючих його від дисплазій епітелію
5. Д-III епітелія, виявлені в біоптатах з проксимальних відділів шлунка в віддаленні від виразки, треба досліджувати за допомогою реакції ISSR-PCR.
6. При наявності за результатами генотипування СОШ за реакцією ISSR-PCR високомолекулярних ампліконів розміром від 620 до 520 п.н. діагностують рак
7. У хворих на рак шлунка з категорією M_0, необхідне обов'язкове проведення досліджень по виявленню пухлинних клітин в периферичній крові за реакцією ISSR-PCR, з метою уточнення стадії захворювання і формування груп ризику по ранньому метастазуванню.

ВИСНОВКИ

1. За допомогою гістологічного методу встановлено, що фенотипічно дисплазії при ХВДПК, ХВШ і ВІРШ мають схожий вигляд, але показники мітотичного режиму епітелію слизової оболонки шлунка при ВІРШ превалюють над такими при ХВДПК та ХВШ.
2. Позитивний ефект впровадження в практику охорони здоров'я реакції ISSR-PCR надає можливість виявляти пухлинні клітини на доклінічній стадії, це дасть можливість лікарю-онкологу визначити оптимальну тактику лікування хворого.
3. Результати генотипування епітелію СОШ за реакцією ISSR-PCR пацієнтів з ХВДПК, ХВШ і ВІРШ показало, що диспластичні зміни при них дещо відрізняються відповідно із їхніми ДНК.
4. Встановлено, що ампліфікаційний ДНК-профіль норми має спектр ампліконів в межах 190 – 60 п.н нуклеотидів.
5. Дисплазія (Д-І) слабо виражена має ампліфікаційний ДНК-прорфіль зі спектром ампліконів від 220 до 60 п.н.
6. Дисплазія (Д-ІІ) помірно виражена має два варіанти ампліфікаційних ДНК-профілів зі спектром ампліконів 300 – 100 п.н.(І - варіант) та 500 – 100п.н.(ІІ – другий варіант).
7. Дисплазія Д-ІІІ при хронічній виразці дванадцятиперсної кишки має один варіант ампліфікаційного ДНК-профілю зі спектром ампліконів 520 – 320 п.н.
8. Дисплазія Д-ІІІ при хронічній виразці шлунка має два варіанти ампліфікаційних ДНК-профілів 600 – 320 п.н.(І - варіант) та 620 – 440 п.н.(ІІ – варіант).
9. Результати генотипування епітелію СОШ пацієнтів хворих на ВІРШ виявляють досить стабільні ДНК-профілі зі спектром ампліконів 620 – 520 п.н. (пар нуклеотидів) в усіх спостереженнях, що вказує на злоякісність і значну відмінність відносно таких при ХВШ та ХВДПК.

10. Застосування методу ISSR-PCR дає можливість ранньої діагностики раку шлунка з матеріалу ендоскопічних біопсій СОШ.
11. В периферичній крові хворих на рак шлунка категорії M_0 за допомогою молекулярно-біологічної реакції ISSR-PCR в 27,8% виявлено десиміновані пухлинні клітини. Наявність їх в крові вказує на ризик раннього метастазування.
12. Морфологічна діагностика РШ повинна базуватись на комплексній оцінці ознак, відрізняючих його від Д-ІІІ епітелію та інших змін що симулюють пухлину, співставляючи результати патогістологічних досліджень і генотипування.

ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Аруин Л.И., Кононов А.В., Мозговой С.И. Международная классификация хронического гастрита: что следует принять и что вызывает сомнения // Арх. пат. – 2009. – Вып.4. – С. 11 – 18.

2. Данилова И.А., Аничков Н.М. Комплексное изучение основных морфологических форм рака желудка в связи с показателями их прогностической оценки // Арх. пат. – 2009. – Вып.5. – С. 27–32.

3. Карселадзе А.И. Некоторые основополагающие понятия онкоморфологии в свете достижений современной молекулярной биологии // Арх. пат. – 2009. – Вып.5. – С. 17– 21.

4. Кононов А.В., Мозговой С.И., Маркелова М.В., Шиманская А.Г. Морфогенез атрофии слизистой оболочки желудка как основа фенотипа хронического гастрита // Арх. пат. – 2011. – Вып.3. – С. 26 – 31.

5. Марковський В.Д., Харченко О.В. Виявлення дисемінованих пухлинних клітин у периферичній крові у хворих на виразково-інфільтративний рак шлунка // Вісник морфології (Reports of Morphology). – 2012. –Т.18, №1. – С.135–139.

6. Марковський В.Д., Харченко О.В. Комплексна патоморфологічна диференційна діагностика передпухлинних процесів і раку шлунка // Патологія. – 2012. №3. – С.15 – 18.

7. Москвина Л.В., Мальков П.Г. Современные представления о молекулярных механизмах прогрессии рака желудка // Арх. пат. – 2010. – Вып.4. – С. 58 – 62.

8. Осинский С.П., Глузман Д.Ф. Диссименированные опухолевые клетки в крови и костном мозге (молекулярный прогноз в клинической онкологии) // Онкология. – 2006. – Т.8. №2. С. 102 – 109.

9. Чехун В.Ф. Функціональний онкогеном – основа сучасної діагностики та нової стратегії протипухлинної терапії // Онкология. – 2006. – Т.8, №2. С.96 – 101.

10. Харченко О.В., Балацкий В.М., Москаленко О.В. Перспективи методу ISSR-PCR та морфологічних методів при вивченні функціонального онкогеному та фенотипу злоякісних пухлин // Вісник морфології (Reports of Morphology). – 2007. – Т.13, №1. – С. 204 – 206.

11. Харченко О.В. Порівняльна характеристика різних форм хронічного гастриту у пацієнтів з виразкою дванадцятипалої кишки, шлунка та виразково-інфільтративним раком шлунка // Світ медицини та біології. – 2008. – №4. – С.76 – 81.

12. Харченко О.В. ISSR-PCR в дослідженні злоякісної перебудови ДНК слизової оболонки шлунка // Сучасні проблеми патологічної анатомії: Матеріали VIII міжнародного конгресу патологів України, 21 – 23 травня 2008 р. – Полтава, 2008. – С.19.

13. Харченко О.В. Порівняльна характеристика мітотичного режиму епітелію різних топографо-анатомічних відділів слизової оболонки шлунка у пацієнтів з виразкою дванадцятипалої кишки, шлунка та виразково-інфільтративним раком шлунка // Вісник проблем біології і медицини. – 2008. – Вип. 4. – С. 157 – 159.

14. Харченко О.В. Порівняльна характеристика кишкової метаплазії епітелію різних топографо-анатомічних відділів слизової оболонки шлунка у пацієнтів з виразкою дванадцятипалої кишки, шлунка та виразково-інфільтративним раком шлунка // Актуальні проблеми сучасної медицини. – 2008. Т.8, – Вип. 4. – С. 139 – 141.

15. Харченко О.В. Порівняльна характеристика дисплазій епітелію різних топографо-анатомічних відділів слизової оболонки шлунка у пацієнтів з виразкою дванадцятипалої кишки, шлунка та виразково-інфільтративним раком шлунка // Вісник морфології (Reports of Morphology). – 2008. – Т.14, №2. – С. 337 – 340.

16. Харченко О.В. Динаміка проявів фенотипу дисплазій епітелію слизової оболонки шлунка у відповідності з їх генотипом на матеріалі

вивчення світлової мікроскопії та ДНК-типування за методом ISSR-PCR // Вісник морфології (Reports of Morphology). – 2009. –Т. 15, №2. – С. 396 – 402.

17. Пат.76768 UA, МПК A61B 10/00. Спосіб діагностики інфільтративно-виразкового раку шлунка: Пат.76768 UA, МПК A61B 10/00 / О.В. Харченко(UA); В.Д.Марковський (UA); В.М. Балацький(UA). № u2012 09011; Заявл.23.07.2012; Опубл. 10.01.2013; Бюл.№1. -3 с.

18. WHO International Classification of Diseases for Oncology ICD-O/ Fritz A., Perey C., Jack A. et al. – 3 rd ed. – Geneva : WHO, 2000.