

## КАСКАД CORREA: ЭНДОСКОПИЧЕСКИЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАЛЛЕЛИ

Белова Г.В.<sup>1</sup>, Мельченко Д.С.<sup>1</sup>, Коваленко Т.В.<sup>1</sup>, Карпова Е.С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Медицинский центр Банка России, г.Москва

<sup>2</sup> ФГБУ Минздравсоцразвития России МНИОИ им.Герцена г.Москва

Белова Галина Вячеславовна

e-mail: belovagv@inbox.ru

### РЕЗЮМЕ

**Актуальность темы.** Согласно каскаду Correa, основным состоянием, предшествующим развитию кишечного типа рака является кишечная метаплазия, основным этиологическим фактором развития которой считают *Helicobacter pylori*.

**Цель исследования:** изучить динамику молекулярно-биологических событий, обеспечивающих предопухолевую прогрессию в процессе проведения антигеликобактерной терапии.

**Материалы и методы.** Исследовали биопсийный материал слизистой оболочки желудка 173 пациентов. Использовали иммуногистохимический метод измерения уровня белков, ответственных за пролиферацию (PCNA, Ki-67, p53), апоптоз (bcl-2, Вах), онкопротеин C-erb B2 и муцины Мис-2, Мис-5АС.

**Результаты.** В результате лечения отмечалось достоверное снижение средних показателей пролиферации, активизация процессов апоптоза, снижение выявляемости онкопротеина C-erb B2, увеличение экспрессии Мис-5АС и снижение Мис-2. Однако у пациентов с ранее выявленным ранним раком желудка и у 5 пациентов с дисплазией тяжелой степени сохранялось достоверное ( $p < 0,01$ ) сниженное значение Мис-5АС и дискоординация белков bcl-2, Вах, несмотря положительную морфологическую динамику. Это позволило предположить наличие стойкого повреждения ДНК. Эти пациенты были отнесены в группу с высоким риском развития метаронного кишечного типа рака желудка, им необходимо постоянное динамическое наблюдения, не реже 1 раза в полгода с применением уточняющих эндоскопических методов прицельной множественной биопсией из всех подозрительных участков слизистой

#### Выводы:

1. Инфекция *Hp* нарушает баланс между процессами пролиферации и апоптоза в СОЖ и является установленным фактором риска развития рака.
2. Эрадикационная терапия у больных с предопухолевыми изменениями СОЖ позволяет снизить риск развития рака желудка. Однако индуцированный *Hp* гастроканцерогенез может сохраняться и после проведенного курса лечения.
3. Пациенты с сохраняющимися высокими показателями канцерогенеза требуют постоянного динамического наблюдения, не реже 1 раза в полгода с проведением тщательного эндоскопического осмотра с прицельной множественной биопсией из всех подозрительных участков слизистой.

**Ключевые слова:** каскад Correa; *Helicobacter pylori*; иммуногистохимические исследования; рак желудка; кишечная метаплазия; дисплазия; экспрессия антигенов PCNA, Ki-67, p53, bcl-2, Вах; онкопротеин C-erb B2; пролиферация; апоптоз.



## SUMMARY

**Background.** According to Correa's cascade, intestinal metaplasia is the main precursor of intestinal cancer, *Helicobacter pylori* being its most important etiological factor.

**Aim:** to analyze molecular and physiological events, contributing to precancerous progression during anti-*helicobacter* therapy.

**Materials and methods:** gastric mucosal biopsy samples from 173 patients were investigated with immunomorphologic assay to evaluate proteins, contributing to proliferation (PCNA, Ki-67, p53) and apoptosis (bcl-2, Bax), as well as protein C-erb B2 and mucins Muc-2, Muc-5AC.

**Results:** Anti-*helicobacter* therapy resulted in statistically significant reduction of mean level of proliferation and apoptosis markers, reduced rate of C-erb B2 and Muc-2 expression, and elevation of Muc-5AC expression. Nevertheless, in patients with early gastric cancer and in 5 patients with high-grade dysplasia besides positive morphological trend, Muc-5AC was significantly decreased ( $p < 0.01$ ), while proteins bcl-2 and Bax ratio was disturbed, evidencing persistent DNA damage. These patients were referred to the group of high risk for intestinal type metachronous cancer, who warranted close follow-up every 6 months with endoscopic targeted multiple biopsies of suspicious zones.

**Conclusion:**

1. *Hp* infection causes mismatch between proliferation and apoptosis processes in gastric mucosa and is well established risk factor of gastric cancer.
2. *Hp* eradication in patients with precancerous alterations in gastric mucosa can reduce the oncologic risk. Nevertheless, *Hp*-induced gastric cancerogenesis may persist after anti-*helicobacter* therapy.
3. Close follow-up every 6 months with endoscopic targeted multiple biopsies of suspicious zones is recommended for patients with persistently high oncomarkers.

**Keywords:** Correa's cascade; *Helicobacter pylori*; immunomorphologic assay; gastric cancer; intestinal metaplasia; dysplasia; PCNA, Ki-67, p53, bcl-2, Bax antibody expression; protein C-erb B2; proliferation; apoptosis

## АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ

Множественные интерпопуляционные исследования, проведенные в течение первого десятилетия XXI века, продемонстрировали, что с нарастанием предопухольных изменений нарастает и заболеваемость раком. При этом рак желудка, по данным ВОЗ, остается на 2-м месте в структуре мировой онкозаболеваемости [14; 16]. Сохраняет свое значение классификация рака желудка, предложенная в 1965 году Р. Lauren. В ней выделяется два типа рака желудка — «кишечный» (эпидемический, рис. 1 на цветной вклейке в журнал) и «диффузный» (эндемический, рис. 2 на цв. вклейке), различающихся по морфогенезу, гистоструктуре, фенотипу, биологическому поведению [4]. Развитие кишечного типа рака связывают с инфекцией *Helicobacter pylori* (*Hp*), а снижение процента распространения его — с широким применением антигеликобактерной терапии (АГБТ) [1–3; 17; 18].

Однако в последние годы существует также мнение, что АГБТ провоцирует развитие рефлюкс-эзофагита, пищевода Барретта и аденокарциномы пищевода [4–6]. Все это делает необходимым понять действительную роль *Hp* в развитии кишечной формы рака желудка и обоснованность проведения эрадикационной терапии. Обеспечение постоянства структуры слизистой оболочки желудка (СОЖ) возможно при строгой координации процессов пролиферации и гибели клеток. Клеточное обновление регулируется по принципу отрицательной парадной связи: на утрату части популяции генеративная зона отвечает усиленным новообразованием клеток

ускорением их миграции [15]. Незрелые клетки СОЖ погибают под влиянием апоптоза — процесса, направленного на поддержание гомеостаза за счет элиминации клеток, утративших свои функции и представляющих опасность для организма [20; 21]. Согласно каскаду Correa [7–9], основным состоянием, предшествующим раку, является кишечная метаплазия (КМ), которая определяется как очаговая трансформация нормальных эпителиоцитов СОЖ в абсорбтивные эпителиальные клетки кишечного типа и бокаловидные клетки в момент клеточного обновления (рис. 3 на цв. вклейке).

В настоящее время установлена роль *Helicobacter pylori* (*Hp*) в пренеопластической трансформации СОЖ: *Hp* вызывает геномную нестабильность, индуцировав процессы атрофии, кишечной метаплазии (КМ) и дисплазии (Д), однако конкретный механизм вовлечения возбудителя неизвестен [10; 11].

**Цель исследования:** изучить динамику молекулярно-биологических событий, обеспечивающих предопухольную прогрессию в процессе проведения антигеликобактерной терапии.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С этой целью использовали иммуногистохимический метод (ИГХ) для измерения уровня белков, связанных с канцерогенезом в биопсийном материале, полученном при проведении эзофагогастродуоденоскопии. Исследование проводилось с 2005 по 2011 год. Для выявления патологических очагов в

желудке применялись эндоскопические диагностические методы витального окрашивания слизистой 0,2%-ным раствором метиленового синего, увеличительная (Zoom-) эндоскопия, а также осмотр в монохроматическом свете — NBI- и FICE-эндоскопия. Забор биопсийного материала производился прицельно из наиболее измененных участков слизистой. Материалом исследования послужили фрагменты СОЖ 173 пациентов с различной степенью патологических изменений СОЖ в возрасте от 36 до 78 лет, из них 100 мужчин и 73 женщины (табл. 1). Критерием для отбора пациентов в группы были эндоскопически выявленные и гистологически подтвержденные изменения СОЖ в сочетании с контаминацией *Hp*. В качестве контрольной группы использовали архивный материал гастробиопсий нормальной СОЖ

Таблица 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУПП ПАЦИЕНТОВ ДО НАЧАЛА ЛЕЧЕНИЯ	
Диагноз	Число
Хронический гастрит (ХГ)	30
Хронический атрофический гастрит (ХАГ)	42
Кишечная метаплазия (КМ)	74
Дисплазия легкой степени (Д1)	11
Дисплазия тяжелой степени (Д2)	11
Ранний рак желудка (РР)	5
Всего	173

Таблица 2

СРОКИ ЭНДОСКОПИЧЕСКОГО НАБЛЮДЕНИЯ В ДИНАМИКЕ В РАЗЛИЧНЫХ ГРУППАХ ПАЦИЕНТОВ (КРИТЕРИИ АМЕРИКАНСКОГО ОБЩЕСТВА ГАСТРОЭНТЕРОЛОГОВ)	
Тип метаплазии	Сроки динамического наблюдения
Кишечная метаплазия (КМ)	Через 1 или 2 года (в зависимости от типа)
Дисплазия легкой степени (Д1)	Через 1, 3 и 6 месяцев (в дальнейшем через 1 год)
Дисплазия тяжелой степени (Д2)	Через 1 месяц, в дальнейшем или пациент переходит в другую группу, или решается вопрос о типе и методе лечения

Таблица 3

ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУПП ПАЦИЕНТОВ ЧЕРЕЗ 1,5 МЕСЯЦА ПОСЛЕ ОКОНЧАНИЯ КУРСА ЛЕЧЕНИЯ	
Диагноз	Число
Хронический гастрит (ХГ)	45
Хронический атрофический гастрит (ХАГ)	35
Кишечная метаплазия (КМ)	74
Дисплазия легкой степени (Д1)	19
Всего	173

30 пациентов в возрасте от 28 до 52 лет (15 мужчин и 15 женщин) при отрицательном анализе на *Hp*. Морфологическая характеристика групп пациентов до начала лечения в соответствии с принятой классификацией OLGA представлена в табл. 1.

Все пациенты проходили обследование в динамике в соответствии со сроками наблюдения, утвержденными Американским обществом гастроэнтерологов (табл. 2) и лечение соответственно утвержденным международным стандартам (Маастрихтское соглашение III) в сочетании с цитопротективной и антиоксидантной терапией.

Пациентам с ранней формой рака желудка (РР, во всех случаях не было прорастания в подслизистый слой) и 3 пациентам с дисплазией тяжелой степени (Д2) при неэффективности консервативной терапии и сохраняющихся тяжелых диспластических изменениях через 1 месяц была проведено эндоскопическое внутриспросветное лечение: мукозэктомия в сочетании с аргоноплазменной коагуляцией (5 пациентов) и фотодинамической терапией (3 пациента).

Нами была исследована экспрессия ряда антигенов, позволяющих судить об интенсивности пролиферации (PCNA, Ki-67, p53), реализации процессов апоптоза (bcl-2, Вах), наличии онкопротеинов (C-erbB2), особенностях функциональной перестройки СОЖ (Muc-2, Muc-5AC) до начала лечения и через 1,5 месяца после окончания АГБТ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В контрольной группе пациентов с гистологически нормальной СОЖ при отсутствии обсемененности слизистой *Hp* были выявлены сбалансированные показатели пролиферации и апоптоза, отсутствие или низкие показатели онкопротеинов, выраженная экспрессия Muc-5AC и спорадическая экспрессия Muc-2.

В исследуемых группах до начала лечения по мере прогрессирования изменений слизистой в соответствии с каскадом Correa отмечалось достоверное прогрессивное увеличение показателей

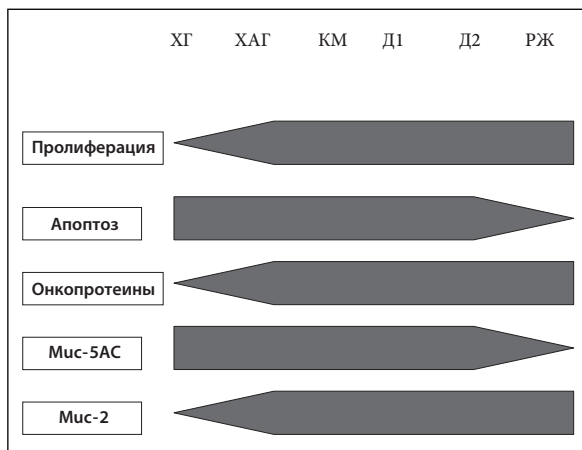


Рис. 4. Схема иммуногистохимических и морфологических изменений слизистой желудка

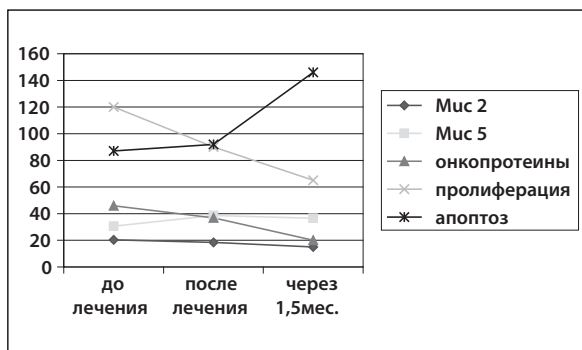


Рис. 5. Динамика иммуногистохимических показателей канцерогенного потенциала

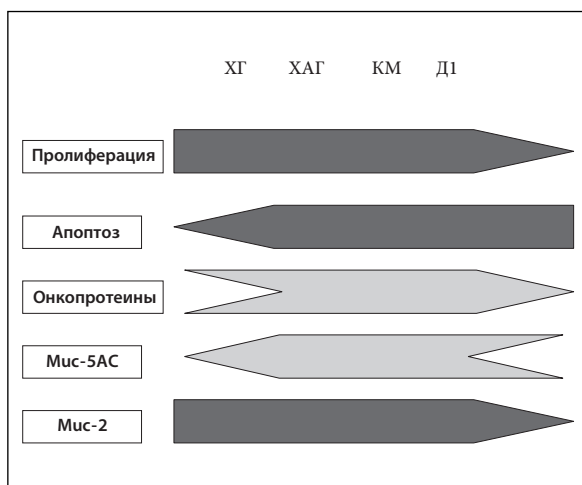


Рис. 6. Схема иммуногистохимических и морфологических изменений слизистой желудка через 1,5 месяца после окончания курса лечения

пролиферации, угнетение процессов апоптоза в виде дискоординации белков bcl-2, Вах, нарастание выявляемости онкопротеинов (C-erbB2), прогрессивное снижение экспрессии Мис-5АС и нарастание Мис-2 ( $p < 0,01$  по сравнению с нормальной СОЖ) по мере углубления морфологических изменений (рис. 4).

При исследовании через 1,5 месяца после окончания курса лечения эрадикация *Нр* была достигнута во всех случаях. Статистические данные эндоскопического исследования с морфологической верификацией диагноза группы представлены в табл. 3.

По данным ИГХ-исследования биопсийного материала также отмечалась положительная динамика: достоверное снижение ( $p < 0,01$  по сравнению с показателями до начала лечения) средних значений показателей пролиферации (38%), активизация процессов апоптоза (43%), снижение выявляемости онкопротеинов C-erbB2 (9%), увеличение экспрессии Мис-5АС (18%) и снижение Мис-2 (27%) (рис. 5 и 6). Однако у всех пациентов с ранее выявленным РР и у 5 пациентов с Д2 сохранялось достоверное ( $p < 0,01$ ) сниженное значение Мис-5АС и дискоординация белков bcl-2, Вах, несмотря на положительную морфологическую динамику. Это позволило предположить наличие стойкого повреждения ДНК. Все эти пациенты были отнесены в группу с высоким риском развития метакронного кишечного типа рака желудка, им необходимо постоянное динамическое наблюдения не реже 1 раза в полгода, с проведением тщательного эндоскопического осмотра, желательного с применением уточняющих эндоскопических методов Zoom-, NBI- или FICE-эндоскопии и прицельной множественной биопсией из всех подозрительных участков слизистой.

## ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обратное развитие кишечной метаплазии у *Нр*-позитивных больных после АГБТ продемонстрировано в ряде рандомизированных исследований [11; 12; 19], в том числе в [9; 18]. При этом существенная роль в них отводилась как собственно антихеликобактерному лечению, так и длительному применению антиоксидантных витаминно-минеральных комплексов [9; 19]. В крупном рандомизированном плацебо-контролируемом исследовании, включавшем 587 инфицированных *H. pylori*-пациентов, было показано, что успешная эрадикация снижала темпы прогрессирования кишечной метаплазии, но не приводила к ее обратному развитию [13].

Наше исследование не только подтвердило приведенные данные, но и позволило конкретизировать молекулярно-биологический путь изменений. Это позволило разработать схему изменений и наметить дальнейшие пути решения проблемы anti-cancer не только на основании принципов выявления групп риска среди данной категории пациентов, определения сроков и принципов динамического наблюдения, но и, возможно, дальнейшей таргетной терапии.

## ВЫВОДЫ

1. Инфекция *Нр* нарушает баланс между процессами пролиферации и апоптоза в СОЖ и является установленным фактором риска развития рака.

2. Эрадикационная терапия у больных с предопухолевыми изменениями СОЖ позволяет снизить риск развития рака желудка. Однако индуцированный *Нр* гастроканцерогенез может сохраняться и после проведенного курса лечения.

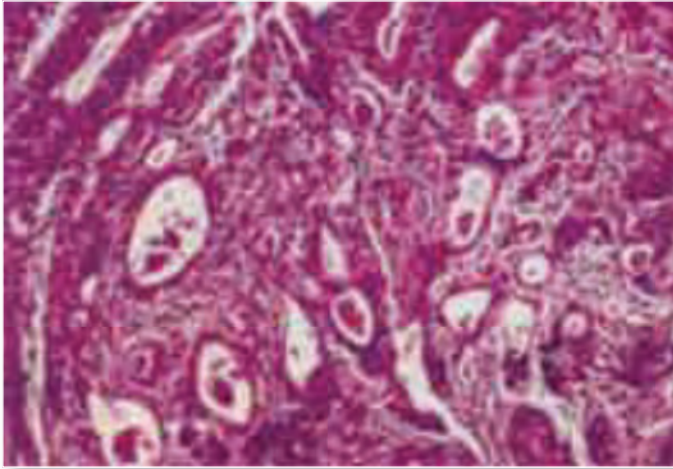
3. Пациенты с сохраняющимися высокими показателями канцерогенеза требуют постоянного динамического наблюдения не реже 1 раза в полгода с проведением тщательного эндоскопического осмотра, желательного с применением методов Zoom-, NBI- или FICE-эндоскопии и прицельной множественной биопсией из всех подозрительных участков слизистой.

## ЛИТЕРАТУРА

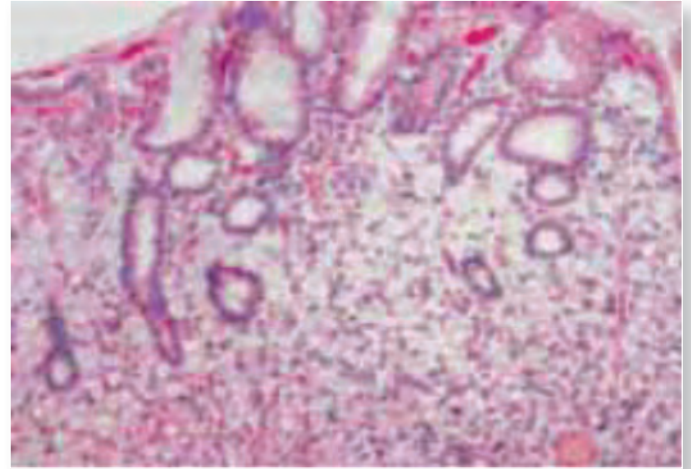
1. Аруин Л.И. *Helicobacter pylori*: каким образом один возбудитель вызывает разные болезни // Эксперим. и клин. гастроэнтерол. — 2004. — № 1. — С. 36–41.
2. Аруин Л.И. Из 100 инфицированных *Helicobacter pylori* рак желудка возникает у двоих. Кто они? // Эксперим. и клин. гастроэнтерол. — 2004. — № 1 (внеочередной вып.). — С. 12–18.
3. Исаков В.А., Дамарадский И.В. Хеликобактериоз. — М.: Медирактика-М., 2003. — 412 с.
4. Маев И.В., Зайратьянц О.В., Кучерявый Ю.А. Кишечная метаплазия слизистой оболочки желудка в практике гастроэнтеролога: современный взгляд на проблему // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. — 2006. — № 4. — С. 38–48.
5. Мозговой С.И., Яковлева Э.В., Лининг Д.А., Кононов А.В. Кишечная метаплазия слизистой оболочки желудка: классификация, методика детекции и сложности гистопатологической интерпретации с позиции современной практической гистохимии // Эксперим. и клин. гастроэнтерол. — 2004. — № 1 (внеочередной вып.). — С. 114–125.
6. Склянская О.Л., Лапина Т.Л. Атрофический гастрит, вызванный *Helicobacter pylori*, как предраковое заболевание // Арх. патол. — 2004. — № 6. — С. 57–60.
7. Annibale B., Di Giulio E., Caruana P. et al. The long-term effects of cure of *Helicobacter pylori* infection on patients with atrophic body gastritis // Aliment. Pharmacol. Ther. — 2002. — Vol. 16. — P. 1723–1731.
8. Camargo M.C., Yezpey M.C., Ceron C. et al. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: Comparison of two areas with contrasting risk of gastric cancer // Helicobacter. — 2004. — Vol. 9. — P. 262–270.
9. Correa P., Fontham E.T.H., Bravo J.C. et al. Chemoprevention of gastric dysplasia: randomised trial of antioxidant supplements and anti-*Helicobacter pylori* therapy // J. Natl. Cancer Inst. — 2000. — Vol. 92. — P. 1881–1888.
10. Genla R.M. Can atrophic gastritis be diagnosed in the presence of *Helicobacter pylori* infection? // Helicobacter pylori. Basic Mechanisms to Clinical Cure 2000 / Eds. R.H. Hunt, G.N.J. Tytgat. — Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 2000. — P. 229–237.
11. Hojo M., Miwa H., Ohkusa T. et al. Alteration of histological gastritis after cure of *Helicobacter pylori* infection // Aliment. Pharmacol. Ther. — 2002. — Vol. 16. — P. 1923–1932.
12. Kim N., Lim S.H., Lee K.H. et al. Long-term effects of *Helicobacter pylori* eradication on intestinal metaplasia in patients with duodenal and benign gastric ulcers // Dig. Dis. Sci. — 2000. — Vol. 45. — P. 1754–1762.
13. Leung W.K., Lin S.R., Clung J.Y. et al. Factors predicting progression of gastric intestinal metaplasia: results of a randomised trial on *Helicobacter pylori* eradication // Gut. — 2004. — Vol. 53, № 9. — P. 1244–1249.
14. Machado J.C., Figueiredo C., Canedo P. Proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric adenocarcinoma // Gastroenterology. — 2003. — Vol. 125. — P. 364–371.
15. Niwa T., Ikehara Y., Nakanishi H. et al. Mixed gastric- and intestinal-type metaplasia is formed by cells with dual intestinal and gastric differentiation // J. Histochem. Cytochem. — 2005. — Vol. 53, № 1. — P. 75–85.
16. Rozen P. Cancer of the gastrointestinal tract: Early detection or early prevention? // Eur. J. Cancer Prev. — 2004. — Vol. 13. — P. 71–75.
17. Sakaki N., Kozswa H., Egaea N. et al. Ten-year prospective follow-up study on the relationship between *Helicobacter pylori* infection and progression of atrophic gastritis, particularly assessed by endoscopic findings // Aliment. Pharmacol. Ther. — 2002. — Vol. 16. — P. 198–203.
18. Satoh K. Does eradication of *Helicobacter pylori* reverse atrophic gastritis and intestinal metaplasia? Data from Japan // Gastroenterol. Clin. North Am. — 2000. — Vol. 29. — P. 829–835.
19. Walker M.M. Is intestinal metaplasia of the stomach reversible? // Gut. — 2003. — Vol. 52. — P. 1–4.
20. Wright N.A. Mechanisms involved in gastric atrophy // Helicobacter pylori. Basic Mechanisms to Clinical Cure 2000 // Eds. R.H. Hunts G. N.J. Tytgat. — Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers. — 2000. — P. 239–247.
21. Xia H.H., Talley N.J. Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implication in gastric carcinogenesis // Am. J. Gastroenterol. — 2001. — Vol. 96, № 1. — P. 16–26.



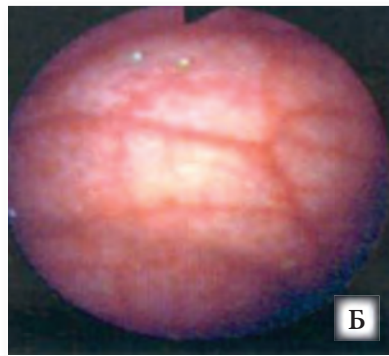
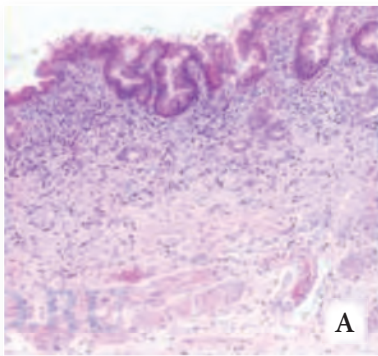
**КАСКАД CORREA: ЭНДОСКОПИЧЕСКИЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАЛЛЕЛИ**



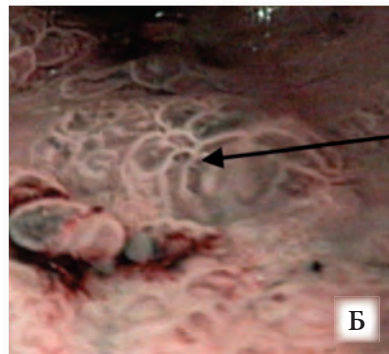
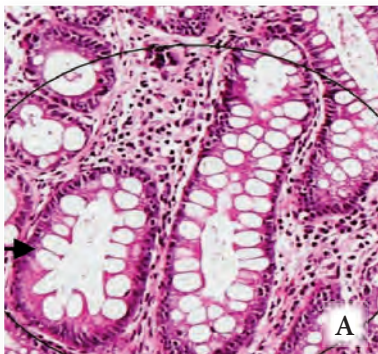
**Рис. 1.** Гистограмма. Рак желудка кишечного типа. Нормального строения слизистая оболочка замещена тубулярными структурами. Окраска гематоксилин и эозином,  $\times 200$



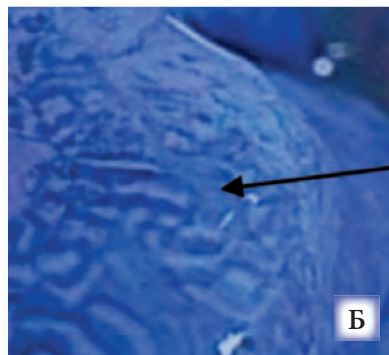
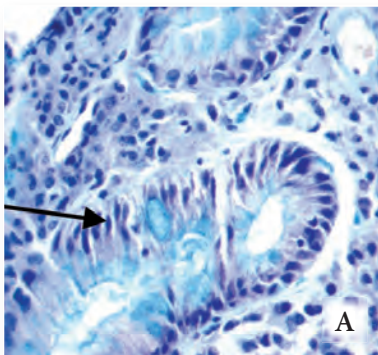
**Рис. 2.** Гистограмма. Перстневидно-клеточный рак желудка диффузного типа. Определяется диффузная инфильтрация слизистой оболочки желудка перстневидными клетками. Вместе с тем нет признаков кишечной метаплазии и гастрита. Окраска гематоксилин и эозином,  $\times 200$



1. Атрофический гастрит:  
А — гистограмма; Б — эндосфото.



2. Атрофический гастрит с кишечной метаплазией: А — гистограмма (стрелкой указаны бокаловидные клетки); Б — эндосфото (стрелкой указаны очаги кишечной метаплазии при NBI-эндоскопии + увеличение)



3. Рак желудка: А — гистограмма; Б — эндосфото (стрелкой указана нерегулярная ворсинчатая структура слизистой при окрашивании метиленовым синим в сочетании с осмотром с увеличением)

**Рис. 3.** Каскад Correa: эндосфото + гистограммы (окраска гематоксилин и эозином,  $\times 200$ ):