

КОМПЛЕКСНАЯ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПРЕДОПУХОЛЕВЫХ ПРОЦЕССОВ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА

ПНПУ имени В.Г. Короленко, г. Полтава

В участках дисплазии эпителия слизистой оболочки желудка выявлена повышенная пролиферативная активность эпителия, которая подтверждена иммуногистохимически повышенной экспансией маркера Ki-67 (IM>30,0%). Показатели митотического режима эпителия слизистой оболочки желудка преобладают в участках дисплазии. Проводимая диагностика показала изменения ДНК эпителия слизистой оболочки желудка, характерные для дисплазии эпителия разной степени тяжести. В случаях с указанными дисплазиями произошли изменения в виде увеличения размеров ампликонов, характерных для каждой из групп. Указанные изменения носят характер микросателлитных экспансий. Существует сильная корреляционная связь между степенью дисплазии определяемой по фенотипическим признакам и показателями характерными для ДНК-типирования эпителия слизистой оболочки желудка. Коэффициент корреляции Пирсона r_{xy} составил соответственно 0,863 и 0,917. Общий результат свидетельствует о существовании статистически достоверной зависимости с вероятностью 0,99.

Ключевые слова: ДНК, ампликоны, фенотип.

Исследование является фрагментом научно-исследовательской работы Харьковского национального медицинского университета «Формирование современных методов хирургического лечения и профилактики осложнений заболеваний и травм органов грудной клетки и брюшной полости» (№ госрегистрации 0110U002649).

Вступление

Диагностика дисплазии эпителия слизистой оболочки желудка, как предопухолевых изменений является актуальной, всё же только метода биопсии с последующим гистологическим исследованием биоптатов недостаточно для разрешения этой важной диагностической проблемы [2, 4]. Тяжелая дисплазия характеризуется клеточной атипией, анизокариозом, гиперхроматозом ядер, резким увеличением ядерно-цитоплазматических соотношений и распространенной псевдостратификацией. Среднее содержание ДНК и число клеток в фазе синтеза ДНК резко увеличено [5].

Известно, что злокачественная трансформация имеет определённые перестройки в геноме клеток, это, в свою очередь, может быть выявлено при анализе геномной ДНК [3, 4].

Гистологический метод является обязательным методом морфологической диагностики злокачественных опухолей, но при разрешении дифференциально-диагностической проблемы между дисплазией и раком желудка его разрешающей способности недостаточно.

PCR является универсальной техникой, которую активно используют с середины 80-х годов. Среди многочисленных маркеров, основанных на использовании PCR, особое место занимают те, которые являются фрагментами ДНК, размещёнными между локусами инвертных повторов ДНК: ISSR (Inter simple sequence repeats). Использованию этих маркеров предшествует открытие того факта, что зукариотные геномы в среднем на 30-90%

представлены высоко полиморфными повторяющимися последовательностями. Повторяющаяся ДНК выполняет своеобразную функцию по абсорбции мутаций в геноме [6].

Относительная насыщенность геномов теми или иными микросателлитными последовательностями является результатом действия многих факторов, среди которых одним из основных является уровень стабильности микросателлитной ДНК. Интенсивное удлинение микросателлитных последовательностей за счёт репликационных ошибок имеет название микросателлитной экспансии [7].

Большенство микросателлитных мутаций связаны с инсерциями или делециями некоторых повторов, которые совершаются во время репликации. Такое нарушение стабильности микросателлитов чаще всего происходит благодаря образованию петель на ДНК во время репликации («slippage») [8].

Характер и закономерности распределения в геноме микросателлитов имеет особый интерес благодаря той роли, которую они играют в развитии онкологических заболеваний [7, 10].

Целью нашего исследования является обнаружение диспластических изменений в слизистой оболочке желудка при помощи иммуногистохимического и молекулярно-биологического метода у пациентов с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки.

Материалы и методы исследования

В работу положены результаты исследований 50 наблюдений слизистой оболочки желудков, которые резецированы по поводу хронической

язвы двенадцатиперстной кишки. Фиксатором служил 10% раствор нейтрального формалина. Объем фиксирующей жидкости в 30 раз превышал объем материала. После промывки под проточной водой в течении 12 часов препараты слизистой оболочки желудка заливали в парафин по общепринятым схемам. Срезы получали из парафиновых блоков на микротоме МПС-2.

Иммуногистохимическое выявление пролиферации эпителия слизистой оболочки желудка проводили при помощи маркера Ki-67 на депарафинированных срезах толщиной 4-5 мм., с предварительной демаскировкой антигена в цитратном буфере (рН 6,0) в микроволновой печи в течении 10 мин. В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела к Ki-67 (клон М1В-1). Инкубацию с первичными антителами проводили в течении 18 часов. Идентификация реакции проводилась при помощи хромогена 3,3'- диаминобензидин тетрахлорида (DAB, Dako Cytomation). Срезы контрастировали при помощи гематоксилина-эозина.

Для молекулярно-биологического исследования брали образцы слизистой оболочки желудка с признаками дисплазии разной степени, в которых изучали изменения ДНК при помощи полимеразной цепной реакции (PCR) [8; 9].

Индивидуальное ДНК-типирование (генотипирование) образцов слизистой оболочки желудка проводили путём амплификации ДНК в PCR с использованием ISSR – праймера S2, который имел структуру: (AGC)₆G [8].

Амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси, которая содержала 1× реактивный буфер с трифосфатами, праймер приведённой структуры, Таг-полимеразу («Тапотили», ВНИИ генетики, Россия), ДНК добавляли в количестве 10 – 20 нг на реакцию. Температура оджига праймера составляла 57°С, синтез фрагментов ДНК проходил в 30 циклах амплификации на термоциклере (амплификаторе) «Терцик» ТП4-ПЦР 01 («ДНК – технология», Россия) в режиме: I – 95°–2мин., II – 94°–30мин, 57°–2мин, 72°–2мин, III – 72°–10мин. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в 2%-м горизонтальном агарозном геле (Вагофор, Латвия) в 1× ТВЕ-буфере с последующим их окрашиванием в течении 10 мин в 0,5мкг/мл растворе бромистого этидия и многократной промывкой в проточной воде. Визуализацию электрофореграмм проводили на трансиллюминаторе в ультрафиолетовом свете с длиной волны 365 нм с последующим фотографированием. Определение размеров ампликонов выполняли при помощи маркера молекулярной массы 1000вр DNA-Ladder, рUC 19 DNA/ Msp I («Fermentas», Литва) [1].

Результаты исследования и их обсуждение

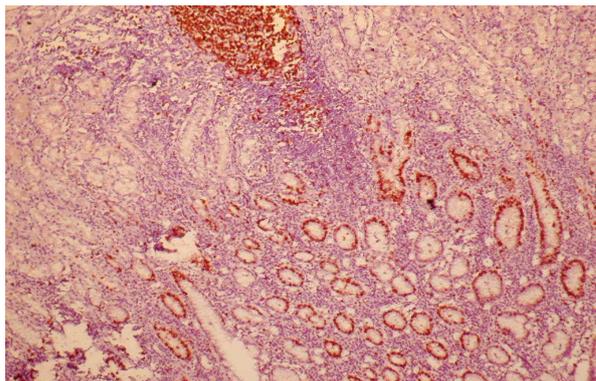


Рис. 1 Высокая пролиферативная активность покровно-язочного эпителия в участке слабой дисплазии его, а также в центре лимфоидного фолликула и распространённых в строме клеток воспалительного инфильтрата. Маркер Ki-67. Увеличение 100.

У пациентов больных хронической язвой двенадцатиперстной кишки, на фоне выраженных форм хронического атрофического и атрофически-гиперпластического гастрита в слизистой оболочке желудка пилорического отдела и малой кривизны показатель митотического индекса был почти одинаковым (рис.2).

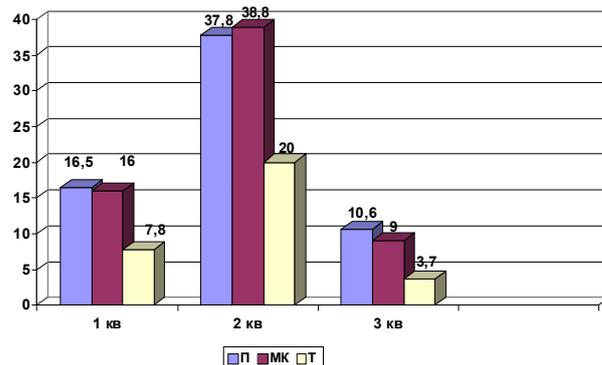


Рис.2. Митотический режим эпителия слизистой оболочки желудка у больных хронической язвой двенадцатиперстной кишки. П – пилорический отдел желудка. МК – малая кривизна. Т – тело. 1 кв – митотический индекс %. 2 кв – количество патологических митозов (%) в метафазе. 3 кв – количество патологических митозов (%).

Показатель митотического индекса в теле желудка ($7,8 \pm 1,6\%$) был достоверно ($p < 0,01$) ниже чем в пилорическом отделе ($16,5 \pm 4,2\%$) и на малой кривизне ($16,0 \pm 2,4\%$) (рис.2).

Между показателями количества митозов в метафазе пилорического отдела ($37,8 \pm 7,8\%$) и малой кривизны ($38,8 \pm 3,7\%$) достоверной разницы не было.

В теле желудка количество митозов в метафазе ($20,0 \pm 3,1\%$) было достоверно ниже ($p < 0,01$) чем в пилорическом отделе ($37,6 \pm 7,8\%$) и на малой кривизне ($38,8 \pm 3,7\%$).

Что касается патологических митозов (рис.3.), то отмечается их достоверное снижение ($p < 0,01$) в теле желудка ($3,7 \pm 1,5\%$) в

сравнении с пилорическим отделом ($10,6 \pm 1,3\%$) и малой кривизной ($9,0 \pm 1,4\%$) и не было достоверной разницы между пилорическим отделом и малой кривизной.

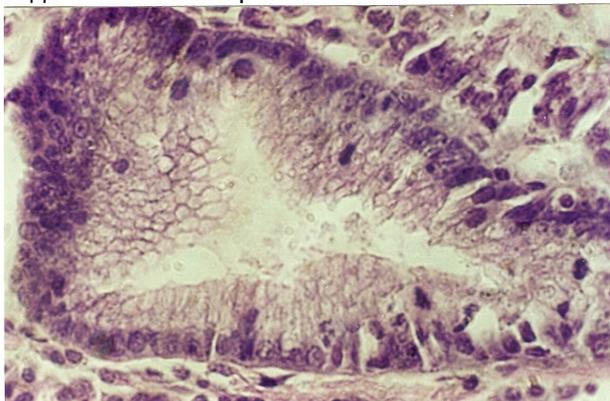


Рис.3. Патологические митозы в глубине ямок желудка. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение 600.

Высокая пролиферативная активность эпителия слизистой оболочки желудка подтверждается экспансией маркера Ki-67 с индексом метки (ИМ) $>30,0\%$ (рис. 1).

Генотипирование эпителия слизистой оболочки желудка пациентов больных хронической язвой двенадцатиперстной кишки, обнаружило разнообразные амплификационные профили ДНК слизистой оболочки желудка.

Среди разнообразия образцов удалось сгруппировать ДНК-профили соответственно к фенотипическим признакам и выделить ПЦР-типы (рис. 4).

Профили маркера слизистой оболочки желудка в норме содержали фрагменты размером 190, 180, 160, 140, 120, 110, 90, 70, 60 п.н. (пар нуклеотидов) и были идентичны в пределах своей группы, однако существенно отличались от ДНК-профилей других исследуемых групп. ДНК-профили размером 220, 210, 200, 190, 180, 160, 140, 120, 110, 100, 90 п.н. соответствовали фенотипу дисплазии первой степени (Д-I). А фенотипы дисплазии второй степени (Д-II) в 90% случаев имели вариант ДНК-профилей размером 300, 260, 240, 220, 210, 190, 180, 160, 140, 120, 100 п.н. (первый вариант), остальные же имели ДНК-профили (второй вариант) 500, 480, 440, 400, 360, 300, 240, 200, 140, 110, 100 п.н. (рис. 5), фенотипы дисплазии третьей степени (Д-III) имели ДНК-профили только одного варианта размером 520, 500, 480, 460, 440, 420, 410, 380, 360, 340, 320 п.н. (рис.6).

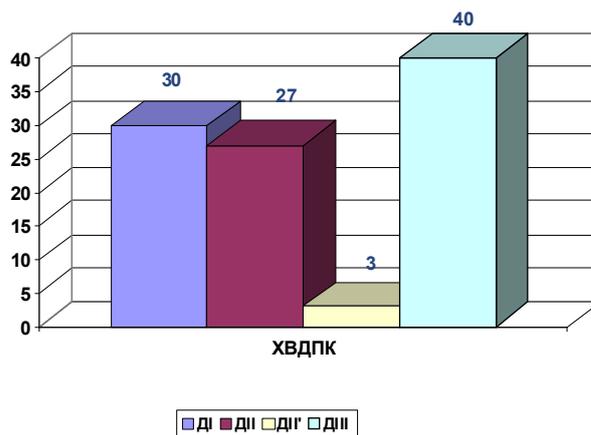


Рис. 4. Распределение ДНК-профилей слизистой оболочки желудка у больных с хронической язвой двенадцатиперстной кишки.

ДНК-профили слизистой оболочки желудка, которые соответствовали фенотипу Д-I имели определенное сходство ($63,6\%$) с маркером нормы.

Фенотипу Д-II соответствовали два варианта ДНК-профилей с присутствием ампликонов размером в пределах 500 п.н. и без них. Последние имели значительное подобие на уровне $36,4\%$ с ДНК-профилями слизистой оболочки желудка типа Д-III. Это свидетельствует, что ДНК-профили Д-II изменяются и имеют переходные формы к ПЦР типу Д-III.



Рис. 5 Электрофореграммы продуктов амплификации образцов ДНК слизистой оболочки желудка Д-II:

1, 4 – амплификационные профили Д-II первого варианта; 2, 3 – амплификационные профили Д-II второго варианта; М – маркер размера фрагментов ДНК.

ДНК профили слизистой оболочки желудка с Д-III содержали ампликоны размером 520 п.н. и имели генетическое отличие от других групп наблюдения, но были подобны в пределах своей группы. ДНК-профили по результатам проведения типирования методом ISSR-PCR в каждом случае выявляются по максимальному проявлению дисплазии. Если фенотипически в

слизистой оболочке выявлена одновременно дисплазия от Д-I до Д-III, то результат генотипирования будет отвечать максимальному показателю Д-III с ДНК-профилями, которые имеют ампликоны размером 520 п.н. Амплификационные профили Д-II имеют два варианта, однако второй вариант имеет определённое сходство с профилем Д-III.

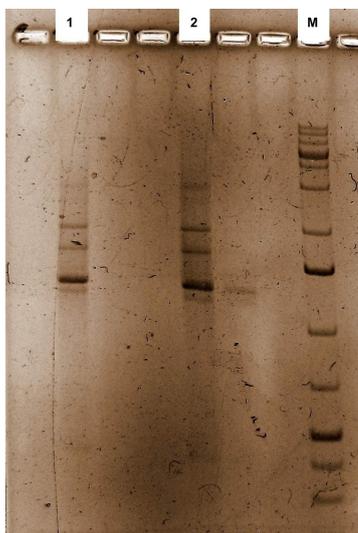


Рис. 6. Электрофореграммы продуктов амплификата образцов ДНК слизистой оболочки желудка:

1,2 – профили Д-III; М – маркер размера фрагментов ДНК.

С целью определения определённой зависимости между показателями ДНК-типирования образцов слизистой оболочки по методу ISSR-PCR и степенью выраженности дисплазии эпителия слизистой оболочки желудка больных с хронической язвой двенадцатиперстной кишки по фенотипическим признакам, а также между степенью выраженности последней и показателями митотического режима, а также маркера Ki-67 проведен корреляционный анализ. (табл.).

Результаты корреляционного анализа между показателями дисплазии эпителия слизистой оболочки желудка по фенотипическим признакам и показателями по результатам генотипирования у больных с хронической язвой двенадцатиперстной кишки.

Таблица

	Степень дисплазии- ДНК-тип min	Степень дисплазии - ДНК-тип max
Коэффициент корреляции Пирсона r_{xy}	0,863	0,917
Теснота связи	сильная	очень сильная
Коэффициент детерминации $D=r_{xy}^2$	0,744	0,842
Критическое значение коэффициента корреляции с вероятностью 0,95	0,2732	0,2732
Критическое значение коэффициента корреляции с вероятностью 0,99	0,3511	0,3511
Сравнение коэффициента корреляции r_{xy} с критическим (табличным) значением r_{cr} для значимости 0,95	$r_{xy} > r_{cr}$	$r_{xy} > r_{cr}$
Сравнение коэффициента корреляции r_{xy} с критическим (табличным) значением r_{cr} для значимости 0,99	$r_{xy} > r_{cr}$	$r_{xy} > r_{cr}$
Коэффициент ковариации	78,673	100,898
Общий результат	статистически достоверная зависимость с вероятностью 0,99	статистически достоверная зависимость с вероятностью 0,99

Между степенью дисплазии эпителия слизистой оболочки желудка по фенотипическим признакам и показателями ДНК-типирования образцов слизистой оболочки желудка коэффициент корреляции Пирсона r_{xy} составляет соответственно 0,863 и 0,917, что означает сильную и очень сильную по тесноте связь между показателями. Коэффициент детерминации $D=r_{xy}^2$ составил 0,744 и 0,842 соответственно. Критическое значение коэффициента корреляции с вероятностью 0,95 было 0,2732. Критическое значение коэффициента корреляции с вероятностью 0,99 было 0,3511. Сравнение коэффициента корреляции r_{xy} с критическим (табличным) значением r_{cr} для значимости 0,95

соответствовало $r_{xy} > r_{cr}$. Сравнение коэффициента корреляции r_{xy} с критическим (табличным) значением r_{cr} для значимости 0,99 соответствовало $r_{xy} > r_{cr}$. Коэффициент ковариации был 78,673 и 100,898 соответственно, что даёт возможность сделать вывод статистически достоверной зависимости между указанными показателями с вероятностью 0,99 (табл.).

Выводы

В участках дисплазии эпителия слизистой оболочки выявляется повышенная пролиферативная активность эпителия, что подтверждено иммуногистохимически повышенной экспансией маркера Ki-67 (IM>30,0%). Показатели митотического режима эпителия слизистой оболочки желудка

преобладают в участках дисплазии.

Дисплазии эпителия слизистой оболочки желудка у больных с хронической язвой двенадцатиперстной кишки по результатам генотипирования эпителия слизистой оболочки желудка при помощи реакции ISSR-PCR имеют характерные изменения, которые находятся в соответствующей зависимости с их ДНК-профилями.

Амплификационный ДНК-профиль нормы имеет спектр ампликонов размером в пределах от 190 – 60 п.н., дисплазия (Д-I) слабо выраженная имеет амплификационный ДНК-профиль со спектром ампликонов размером от 220 до 60 п.н., дисплазия (Д-II) умеренно выраженная в 90% имеет амплификационные ДНК-профили со спектром ампликонов размером 300 – 100 п.н. (I - вариант) и в 10% ДНК-профили 500 – 100 п.н. (II – вариант), что свидетельствует о генетической неоднородности дисплазий второй степени. Дисплазия Д-III имеет один вариант амплификационного ДНК-профиля со спектром ампликонов 520 – 320 п.н. Реакция ISSR-PCR выявляет удлинение микросателлитных последовательностей ДНК.

По результатам генотипирования эпителия слизистой оболочки желудка мы наблюдаем микросателлитные экспансии. Удлинение микросателлитных последовательностей за счёт репликационных ошибок называется микросателлитными экспансиями.

Существует сильная по тесноте связь между степенью дисплазии эпителия слизистой оболочки желудка по фенотипическим признакам и показателями ДНК-типирования образцов слизистой оболочки желудка, коэффициент корреляции Пирсона r_{xy} составил соответственно 0,863 и 0,917. Общий результат свидетельствует о существовании статистически достоверной зависимости с вероятностью 0,99.

ISSR-PCR является информативным методом для выявления изменений генетической структуры эпителия слизистой оболочки желудка. Учитывая доступность, относительную простоту и возможность визуального считывания результатов без применения специальной аппаратуры, с успехом применён при изучении ДНК-типирования эпителия слизистой оболочки желудка с фенотипами дисплазий эпителия и позволяет выявить изменения, которые в них происходят.

Перспективы дальнейших исследований

В дальнейшем маркер ISSR-PCR планируется исследовать на практике с целью диагностики неопластических изменений эпителия слизистой оболочки желудка у больных с другими заболеваниями желудка.

Литература

1. Абрамов Д.Д. Точность метода полимеразной цепной реакции «в реальном времени» / Д.Д.Абрамов, Д.Ю.Трофимов, Д.В.Ребриков // Прикл. биохимия и микробиология. – 2006. Т.42. С.485 – 488.
2. Аруин Л.И. Новая Международная классификация дисплазий слизистой оболочки желудка / Л.И. Аруин // Росс. журн. гастроэнтерол., гепатол., колонопроктол. – 2002. - №3. – С.15 – 17.
3. Канцерогенез / Под ред. Д.Г.Заридзе. – Москва: Медицина, 2004. – 576 с.
4. Карселадзе А.И. Некоторые основополагающие понятия онкоморфологии в свете достижений современной молекулярной биологии / А.И. Карселадзе // Арх. пат. – 2009. – Вып.5. – С.17–21.
5. Серов В.В. Ранний рак желудка: морфология, гисто- и морфогенез / В.В.Серов, В.Б.Золотаревский, А.В. Берестова // Арх. патол.- 1990.- №5. – С. 70 – 74.
6. Baldi P. Sequence analysis by additive scales: DNA structure for sequences and repeats lengths / P. Baldi, P.F. Baisnee // Bioinformatics. – 2000. – V. 16. – P. 865 – 889.
7. Freimer N.B. Microsatellites: evolution and mutational process / N.B. Freimer, M. Slatkin // Ciba Found Symp. – 1996. – №197. – P. 51 – 67.
8. Mullis K.B. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction / K.B.Mullis, F.Faloon // Meth. Enzymol. – 1987. – №155. – С.335 – 350.
9. Tsanev R. Molecular mechanisms of cancer cells survival / R.Tsanev // J.BUON. – 2005. – №10. P.309 – 318.
10. [Wooster R.](#) Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers / [R.Wooster](#), [A.M.Cleton-Jansen](#), [N.Collins](#), [J.Mangion](#), [R.S.Cornelis](#), [C.S.Cooper](#), [B.A.Gusterson](#), [B.A.Ponder](#), [A.von Deimling](#), [O.D.Wiestler](#) // Nat Genet. – 1999. – №6. – P.152 – 156.

Резюме

КОМПЛЕКСНА ІМУНОГІСТОХІМІЧНА І МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА ПЕРЕДПУХЛИННИХ ПРОЦЕСІВ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА

Харченко А.В.

Ключові слова: ДНК, амплікони, фенотип.

В осередках дисплазії епітелію слизової оболонки шлунка виявлена підвищена проліферативна активність, яка підтверджена імуногістохімічно підвищеною експансією маркеру Ki-67 (IM>30,0%). Показники мітотичного режиму епітелію слизової оболонки шлунка переважають в осередках дисплазії.

Діагностика, яка проводилась, показала зміни ДНК епітелію слизової оболонки шлунка, характерні для дисплазії епітелію різного ступеня тяжкості. У випадках з указаними дисплазіями відбулися зміни у вигляді збільшення розмірів ампліконів, характерних для кожної з груп. Указані зміни мають характер мікросателітних експансій. Існує сильний кореляційний зв'язок між ступенем дисплазії, що визначається за фенотипічними ознаками і показниками характерними для ДНК-типування епітелію слизової оболонки шлунка. Коефіцієнт кореляції Пірсона r_{xy} склав відповідно 0,863 і 0,917. Загальний результат свідчить про існування статистично достовірної залежності з вірогідністю 0,99.

Summary.

IMMUNOHISTOCHEMICAL AND MOLECULAR-BIOLOGICAL DIAGNOSIS OF PRETUMOROUS PROCESSES OF GASTRIC MUCOSA

Kharchenko A.V.

Key words: DNA, amplicones, phenotype.

In the foci of epithelial dysplasia of gastric mucosa there has been revealed increased proliferative activity, which is confirmed by the increased immunohistochemical expansion of the Ki-67 marker (MI>30.0%). The parameters of mitotic mode of gastric epithelial mucosa cells predominate in dysplasia.

Diagnostic procedures have shown DNA changes in gastric epithelium which are typical for epithelial dysplasia of varying severity. In the cases of dysplasia mentioned above the changes are manifested by the increased in size amplicones specific to each of the group. Above mentioned changes are mainly presented by the microsatellite expansion nature. There is a strong correlation between the severity of dysplasia that is determined by phenotypic characteristics and parameters specific to DNA typing of epithelial gastric mucosa. Pearson correlation coefficient r_{xy} was 0.863 and 0.917 respectively. The overall result indicates the existence of statistically significant dependence of 0.99 likelihood.