

# ХРОМОСОМНЫЕ АБЕРРАЦИИ В ТКАНЯХ ЖЕЛУДКА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЭРОЗИВНОМ ГАСТРИТЕ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МАРКЕР РАННЕЙ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ КЛЕТОК

О.А. Матвеевко<sup>1</sup>, Л.Н. Уразова<sup>1</sup>, М.В. Вусик<sup>1</sup>, Т.В. Авдеенко<sup>1</sup>,  
А.Д. Черемных<sup>2</sup>, И.Н. Лебедев<sup>2</sup>

*НИИ онкологии СО РАМН, г. Томск<sup>1</sup>  
НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск<sup>2</sup>  
634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, e-mail: alterra@inbox.ru<sup>1</sup>*

Проведено изучение молекулярно-цитогенетических характеристик тканей желудка у 10 пациентов с клинической картиной хронического эрозивного гастрита, нарушения хромосомного материала были выявлены в 8 образцах. Наиболее общими аномалиями были амплификации в участках 3p12-23 (37,5 %) с минимальными перекрывающимися регионами 3p14 и 3p22, а также 3q13.1-27 (37,5%) с общими регионами 3q25-26.2 и 3q26.1. Далее следовали амплификации в участках 2p12-23 (25 %) с минимальным регионом 2p16; 2q14.1-32 (25 %) с минимальным общим регионом 2q31; 4q24-25 (25 %), для которой был характерен наименьший перекрывающийся регион 4q25, а также амплификации в участках 6q21 (25 %) и 6q22-24 (25 %). Кроме того, наряду с сегментными анеуплоидиями в одном из обследованных случаев (№ 7) была выявлена трисомия по хромосоме 19. Факт наличия высокого уровня несбалансированных хромосомных aberrаций заслуживает пристального внимания в качестве фактора, сопутствующего развитию диспластических изменений.

Ключевые слова: хронический эрозивный гастрит, хромосомные aberrации, предопухолевые изменения.

## CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN GASTRIC TISSUES OF PATIENTS WITH CHRONIC EROSIIVE GASTRITIS AS A POTENTIAL MARKER OF EARLY MALIGNANT TRANSFORMATION

O.A. Matveenko<sup>1</sup>, L.N. Urazova<sup>1</sup>, M.V. Vusik<sup>1</sup>, T.V. Avdeenko<sup>1</sup>,  
A.D. Cheremnykh<sup>2</sup>, I.N. Lebedev<sup>2</sup>

*Cancer Research Institute, SB RAMS, Tomsk<sup>1</sup>  
Research Institute of Medical Genetics, SB RAMS, Tomsk<sup>2</sup>  
5, Kooperativnyi Street, 634050-Tomsk ; e-mail: alterra@inbox.ru<sup>1</sup>*

Molecular-cytogenetic characteristics of gastric tissues were studied in 10 patients with chronic erosive gastritis. Chromosomal abnormalities were detected in 8 patients. Amplifications at 3p12-23 (37,5 %) with minimal overlapping regions 3p14 and 3p22 as well as 3q13.1-27 (37,5 %) with common regions 3q25-26.2 and 3q26.1 were the most common abnormalities followed by amplifications at 2p12-23 (25 %) with minimal regions 2p16; 2q14.1-32 (25 %) with minimal common region 2q31; 4q24-25 (25 %) with minimal overlapping region 4q25 as well as amplifications at 6q21 (25 %) and 6q22-24 (25 %). Furthermore, in one of the cases (№ 7), a trisomy of chromosome 19 was detected. The fact of the presence of high level of unbalanced chromosomal aberrations deserves great attention as a factor associated with development of dysplastic changes.

Key words: chronic erosive gastritis, chromosomal aberrations, pre-tumor changes.

Согласно концепции пошагового развития неоплазий опухоли желудка формируются на фоне длительно существующих патологических состояний слизистой [8], которые характеризуются нарушениями пролиферативной активности клеток, апоптоза, воспалением слизистой оболочки [14]. Подобные состояния определяются как предраковые и являются ранним событием в развитии опухолей желудка. Вероятность злокачественной трансформации клеток для разных предраковых

изменений варьирует от 0,5 % для гиперпластических полипов до 10–15 % для аденом. В отношении хронических эрозивных гастритов процент подобного злокачественного перехода составляет, по разным оценкам, от 3 до 50 % [4, 5]. Такая вариабельность поднимает вопрос о поиске информативных маркеров, ассоциированных с риском злокачественной трансформации клеток.

Хронический эрозивный гастрит представляет собой нарушение эпителия слизистой,

редко затрагивающее мышечную пластинку [2]. Хронические эрозии эндоскопически выглядят как полиповидные образования с пупковидными вдавлениями на вершинах, заполненными фибрином или солянокислым гематином. Число их колеблется от 1 до 15, а размеры – от 3 до 10 мм. Расположены образования, как правило, в виде цепочек в антральном отделе желудка [1]. Морфологически хронический эрозивный гастрит характеризуется коагуляционным некрозом, нейтрофильной и лимфоцитарной инфильтрацией в непосредственной близости от эрозий, что свидетельствует о воспалительном процессе, а также наличием грануляционной ткани в области дна эрозии. В краевых отделах наблюдаются дистрофические и атрофические изменения желез [2, 6].

Как известно, процесс малигнизации инициируется взаимодействием множества факторов, среди которых заметное место занимают генетические нарушения. Наличие числовых и структурных aberrаций хромосом может обуславливать возникновение геномной нестабильности через амплификацию и делецию определенных участков генома, в которых локализованы онкогены или гены-супрессоры опухолей. Действительно, для таких предраковых заболеваний желудка, как аденома или гиперпластические полипы, известны хромосомные аномалии, регистрируемые практически в каждом исследуемом случае [13]. В то же время обширная когорта хронических эрозивных гастритов остается фактически неизученной с цитогенетических позиций. Целью настоящего исследования явилась молекулярно-цитогенетическая характеристика тканей желудка у пациентов с клинической картиной хронического эрозивного гастрита.

### Материал и методы

Проведение настоящего исследования было одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ онкологии СО РАМН. Работа проводилась с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основными законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.93 № 2288). В исследование было включено 10 пациентов с гастроэнтерологическими жалобами

из поликлинической сети г. Томска с установленным диагнозом хронический эрозивный гастрит по данным гастроскопии. Показаниями для гастроскопии являлись жалобы пациентов на боли в области желудка, дискомфорт после приема пищи, тяжесть в животе, отрыжка, рефлюкс-эзофагит. Во время проведения гастроскопии визуально оценивалось состояние слизистой желудка, и из визуально измененных областей слизистой с помощью биопсийных щипцов производился забор ткани для гистологического подтверждения диагноза. По итогам морфогистологического анализа данным пациентам был поставлен диагноз хронический эрозивный гастрит.

Средний возраст пациентов на момент выявления заболевания был 53,9 года (28–76 лет). Забор материала был проведен в 2007–2009 гг. С момента получения необходимого материала для анализа и до окончания исследования прошел год. На протяжении трех лет получения биоптатов и на момент подготовки настоящей публикации (август 2010 г.) не было зарегистрировано повторных обращений данных пациентов по поводу ухудшения состояния здоровья в клинику НИИ онкологии СО РАМН.

Для детекции хромосомных aberrаций был использован метод сравнительной геномной гибридизации (CGH) [9]. Образцы геномной ДНК были получены из биопсийного материала с помощью обработки протеиназой К с последующей фенол-хлороформной экстракцией ДНК [3]. Мечение тестовой и контрольной ДНК, выделенной из лимфоцитов периферической крови здорового индивида мужского пола, осуществлялось в ходе реакции ник-трансляции с помощью дизоксирибонуклеотидов, меченых флуорохромами TAMRA (красный) и Fluorescein (зеленый) соответственно [12]. Переосаждение смеси контрольной и анализируемой ДНК осуществлялось в присутствии 40-кратного избытка  $C_0t1$ -DNA в течение 24 ч при  $-20^{\circ}\text{C}$ , после чего проводилось растворение зондов в гибридизационной смеси, в состав которой входил 100 % формамид, декстрансульфат и спермальная ДНК лосося. После денатурации ДНК-зондов и препаратов хромосом осуществлялась конкурентная гибридизация меченых ДНК-библиотек с метафазами здорового индивида в течение 72 ч

Таблица

**Хромосомные нарушения в клетках эпителиальной ткани  
при хроническом эрозивном гастрите**

Номер случая	Результат CGH-анализа
1	ish cgh 46,XX
2	ish cgh enh(5)(p13p14)
3	ish cgh 46,XY
4	ish cgh enh(3)(p22)
5	ish cgh enh(1)(p21p31, q31q32), enh(2)(p11.2, p16, q31, q33), enh(3)(p14, q13.3q24, q25q26.2), enh(4)(q21, q25), enh(6)(q21), enh(7)(q21, q31), enh(10)(q21q24), enh(11)(p15, q22), enh(12)(p12, q15, q21q22)
6	ish cgh enh (3)(q26.1), enh (5)(q21)
7	ish cgh enh(1)(p35p36.1), enh(19)(p13.1p13.3, q13.1q13.3), enh(22)(q13), dim(13)(q14, q21)
8	ish cgh enh(2)(p12p23, q14.1q32), enh(3)(p12p23, q13.1q27), enh(4)(p13p14, q24q25, q27, q28-32), enh(6)(p22, q16q21, q22q24), enh(7)(p14)
9	ish cgh enh(6)(q22q24)
10	ish cgh enh(3)(p24, q21q23), enh(7)(q32q35)

при 37°C. Детекцию гибридационных сигналов проводили с использованием люминесцентного микроскопа «Axioskop 50» («Carl Zeiss», Германия) с CCD-камерой с набором специфичных светофильтров. Анализ гибридационных профилей осуществлялся с помощью программы «CGHView 3.0» («Applied spectral imaging», USA). Для повышения разрешающей возможности метода использовали опцию CGH высокого разрешения (High Resolution CGH, HR-CGH). Принцип HR-CGH заключается в использовании доверительного интервала, предварительного построенного на основе сравнительной гибридации нескольких контрольных образцов ДНК с метафазами, полученными от здорового индивида. При проведении исследования нахождение гибридационного профиля в пределах доверительного интервала рассматривается как норма, тогда как выход за границы интервала принимается в качестве аномалии – амплификации или делеции. Разрешающая способность такого подхода составляет около 6 млн п.о. В анализ гибридационного профиля для каждого пациента включалось 10 метафазных пластинок. Во избежание ложноположительных результатов прицентроммерные регионы хромосом 1, 9, 15, 16, содержащих крупные гетерохроматиновые блоки, были исключены из анализа. Кроме того, в анализе не учитывались теломерные районы всех хромосом набора, в которых поведение гибридационного профиля является чрезвычайно вариабельным.

### Результаты и обсуждение

Нарушения хромосомного материала были выявлены в восьми из десяти образцов хронического эрозивного гастрита (таблица). Наиболее общими аномалиями были амплификации в участках 3p12-23 (37,5 %) с минимальными перекрывающимися регионами 3p14 и 3p22, а также 3q13.1-27 (37,5 %) с общими регионами 3q25-26.2 и 3q26.1. Далее следовали амплификации в участках 2p12-23 (25 %) с минимальным регионом 2p16; 2q14.1-32 (25 %) с минимальным общим регионом 2q31; 4q24-25 (25 %), для которой был характерен наименьший перекрывающийся регион 4q25, а также амплификации в участках 6q21 (25 %) и 6q22-24 (25 %). Наряду с сегментными анеуплоидиями в одном из обследованных случаев (№ 7) была выявлена трисомия по хромосоме 19.

Отсутствие опубликованных данных о хромосомных аномалиях при хроническом эрозивном гастрите на сегодняшний день делает невозможным сопоставление выявленных нами нарушений с абберациями кариотипа при данной патологии. Однако в мировой практике существуют работы по идентификации хромосомных нарушений при других типах предопухольных заболеваний желудка. Так, одной из наиболее исследованных патологий на предмет хромосомных аббераций является аденома желудка. Наиболее частыми нарушениями хромосомного материала в клетках аденоматозной

ткани являются делеции в 16p и 17p, 6q10-q22.1, 6p21.1-q16.3, 13q21.2-21.33, 5q22.1-q23.2 участках, а также амплификации в 20q13.12-q13.33, 11q23.2, 9q33.1-q34.3 районах [10]. Кроме того, по некоторым данным, трисомия по хромосоме 20 и моносомия по хромосоме 10 являются частыми хромосомными аномалиями при аденоме желудка [7]. В исследовании аденомы пилорической железы были обнаружены амплификации короткого и длинного плеч хромосомы 17 и 20q и делеции хромосомного материала в 4q, 5q и 6q. Кроме того, с высокой частотой выявлялась амплификация участка 15q26 [11].

Из вышеизложенной информации следует, что клетки тканей различных предопухолевых состояний желудка значительно различаются по структуре нарушений хромосомного материала. Данный факт может свидетельствовать о различных патогенетических путях развития малигнизационных процессов в слизистой желудка, что указывает на дифференцированные программы трансформации клеток, формирование устойчивых клеточных клонов с определенным набором хромосомных aberrаций, которые могут способствовать преодолению клетками эндогенных регуляторных механизмов и приводить к образованию опухоли с определенным фенотипом.

Следует отметить, что в ранее опубликованных работах были выявлены аномалии хромосом, характерные как для опухоли, так и для предраковых заболеваний. Действительно, в клетках тканей аденомы и аденокарциномы желудка интестинального типа обнаружены идентичные нарушения в хромосомных регионах 17p и 20q13. Однако подобные aberrации были детектированы только в тканях, взятых от одного и того же пациента, тогда как в тканях от различных индивидов данной картины не обнаружено [10]. Кроме того, опухолевые ткани отличаются более высоким уровнем хромосомных нарушений в отличие от предопухолевых изменений. Наличие одинаковых типов хромосомных aberrаций в клетках при предопухолевых заболеваниях и непосредственно в самой неоплазии, а также различный уровень аномалий хромосом могут быть объяснены с позиции аккумуляции хромосомных aberrаций в ходе развертывания программы малигнизации клеток и пошагового развития неоплазии.

В ходе нашего исследования на момент проведения молекулярно-цитогенетического анализа тканей эпителия желудка при хроническом эрозивном гастрите данных о переходе предопухолевого изменений у обследованных пациентов в онкологическое заболевание не получено. В определенной степени это может объясняться длительностью развития неопластического процесса. С другой стороны, для данного типа заболевания показан определенный курс терапии, и при своевременном проведении всех необходимых мероприятий хронические эрозии эпителия желудка поддаются лечению. Однако факт существования нарушений хромосомного материала в исследуемых тканях показывает наличие патологического процесса в клетках железистого эпителия на хромосомном уровне.

Следует отметить, что частота и спектр нарушений хромосомного материала, несмотря на наличие некоторых общих аномалий хромосом, значительно варьируют внутри исследуемой группы. Данный факт может быть объяснен наличием различных мутантных клеточных клонов в отдельно взятом биоптате, а также контаминацией нормальными клетками, что, в свою очередь, может являться причиной невозможности детекции некоторых аномалий. Кроме того, возможно, что развитие хронического эрозивного гастрита не всегда сопровождается нарушениями хромосомного материала на стадии воспалительной инфильтрации и гиперплазии, как показано для двух из десяти исследованных нами случаев. И напротив, значительный уровень хромосомных нарушений, в частности амплификаций, у трех пациентов (№ 5, 7, 8) показывает предположительно более высокий риск малигнизации клеток слизистой по сравнению с остальной группой. Анализируя разнообразие хромосомных аномалий, следует иметь в виду, что полученные генетические профили представляют собой картину нарушений хромосомного материала на определенном временном этапе развития патологического процесса. Кроме того, следует отметить, что результатом CGH-анализа являются данные не о кариотипе какой-то определенной группы клеток, а о комплексных нарушениях в нескольких клеточных клонах, каждый из которых имеет свой набор aberrаций вследствие определенных мутационных событий.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что хромосомные нарушения являются ранним событием при развитии патологических процессов в клетках эпителия желудка. Факт наличия высокого уровня несбалансированных хромосомных aberrаций заслуживает пристального внимания в качестве фактора, сопутствующего развитию диспластических изменений.

Данная работа поддержана государственным контрактом № П1706 Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. М.: Триада-Х, 1998. 496 с.
2. Маев И.В. Эрозивный гастрит: отдельная нозологическая единица или универсальная реакция слизистой оболочки на повреждение? // Рос. ж. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. 2005. № 6. С. 53–60.
3. Маниатис Т., Фрэнч Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 265–266.
4. Писарева Л.Ф., Коломиец Л.А. Рак желудка в регионе Сибири и Дальнего Востока. Факторы риска. Томск: STT, 2001. 276 с.
5. Сельчук В.Ю., Никулин М.П. Рак желудка // Русский медицинский журнал. 2003. Т. 11, № 26. С. 1441–1448.
6. Циммерман Я.С. Диагностика и комплексное лечение основных гастроэнтерологических заболеваний. Пермь, 2003. 288 с.
7. Buffart T.E., Carvalho B., Mons T. et al. DNA copy number profiles of gastric cancer precursor lesions // BMS Genomics. 2007. Vol. 8. P. 345–349.
8. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. First American Society Lecture on Cancer Epidemiology and prevention // Cancer Rev. 1992. Vol. 52. P. 6735–6740.
9. Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Sudar D. et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetics analysis of solid tumor // Science. 1992. Vol. 258. P. 818–821.
10. Kim Y.H., Kim N.G., Lim J.G. et al. Chromosomal alterations in paired gastric adenomas and carcinomas // Am. J. Pathol. 2001. Vol. 158 (2). P. 655–662.
11. Koshima R., Vieth M., Borchard F. et al. Gastric-type well-differentiated adenocarcinomas and pyloric gland adenoma of the stomach // Gastric Cancer. 2006. Vol. 9. P. 177–184.
12. Rooney D.E., Czepulkowski B.H. Human cytogenetics. A practical approach // New York.: Oxford University Press. 1992. Vol. 1. P. 274.
13. Weiss M.M., Snijders A.M., Kuipers E.J. et al. Determination of amplicon boundaries at 20q13.2 in tissue samples of human gastric adenocarcinomas by high-resolution microarray comparative genomic hybridization // J. Pathol. 2003. Vol. 200. P. 320–326.
14. Yoon J., Kim, Jun W. Chang, So J. Lee et al. Progression from chronic atrophic gastritis to gastric cancer; Tangle, Toggle, Tackle with Korea Red Ginseng // J. Clin. Biochem. Nutr. 2010. Vol. 46. P. 195–204.

Поступила 1.06.10