

На правах рукописи

Парыгина Мария Николаевна

**МАРКЕРНЫЙ ПРИНЦИП ВЕРИФИКАЦИИ АТРОФИИ
СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА
В БИОПСИЙНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ХРОНИЧЕСКОГО ГАСТРИТА**

3.3.2 – Патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Омск – 2022

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

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

Мозговой Сергей Игоревич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор **Петров Семен Венедиктович**, профессор кафедры общей патологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий лабораторией иммуногистохимии Государственного автономного учреждения здравоохранения «Республиканский клинический онкологический диспансер Министерства здравоохранения Республики Татарстан»

доктор медицинских наук, профессор **Хомерики Сергей Германович**, руководитель лаборатории инновационной патоморфологии государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «22» марта 2022 года в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета 21.2.048.03 при ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России по адресу: 644099, г. Омск, ул. Ленина, д. 12

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России и на сайте <http://www.omsk-osma.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2022 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, доцент

Корпачева Ольга Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Атрофия слизистой оболочки желудка (СОЖ) является «стартовой площадкой», облигатно приводящей к опухолевому росту [Graham D.Y. et al., 2019; Matysiak-Budnik T. et al., 2020; Raza M. et al., 2020]. Атрофия СОЖ в современном представлении характеризуется возникновением количественного дефицита специализированных (желудочных) желез за счет их убыли или качественного дефицита с развитием метаплазии, что в определениях Международной группы экспертов Atrophy Club и классификации OLGA-system получило обозначения неметапластической и метапластической атрофии соответственно. В отечественной литературе аналогом неметапластической атрофии является термин абсолютная атрофия, предложенный С.И. Мозговым [Мозговой С.И. и соавт., 2010].

Несмотря на наличие валидизированных эндоскопических систем оценки атрофии (классификация Kimura-Takemoto [Kimura T., Takemoto K., 1969; Trong D., Niyaama T., 2019]) и кишечной метаплазии (классификация EGGIM – эндоскопическая градация кишечной метаплазии желудка [Pimentel-Nunes P. et al., 2016]), ведущим методом верификации ранних предраковых изменений СОЖ по-прежнему остается морфологическое исследование биопсийного материала [Shah S.C. et al., 2020; Rugge M. et al., 2020]. Однако рутинное исследование с окраской гистологических срезов гематоксилином и эозином является недостаточно объективным: уровень диагностического согласия врачей-патологоанатомов при оценке наличия и градации атрофических изменений СОЖ низок, что указывает на сложность распознавания морфологического феномена [Кононов А.В. и соавт., 2014; Cotruta V. et al., 2017; Кононов А.В. и соавт., 2017; Kwon Y.J. et al., 2019].

Дополнительным фактором, затрудняющим диагностику атрофии СОЖ, выступает несоблюдение международного протокола биопсийного исследования, рекомендованного экспертной группой по изучению *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) в положениях консенсуса Маастрихт V, с получением двух биоптатов из антрального отдела желудка на расстоянии 2 см от привратника по малой и большой кривизне, одного биоптата из угла желудка и двух биоптатов из тела желудка на расстоянии 8 см от розетки кардии по малой и большой кривизне [Malfertheiner P. et al., 2017]. Сложность практической реализации существующего стандарта получения и исследования биопсийного материала является причиной отсутствия объективной оценки выраженности атрофических изменений СОЖ у конкретного пациента [Шиманская А.Г., 2012; Lash J.G. et al., 2013; Kim Y. Et al., 2017]. Между тем, именно интегральная выраженность атрофии СОЖ, то есть стадия хронического атрофического гастрита, служит основанием для персонифицированной канцерпревенции: чем выше этот показатель, тем выше риск развития рака желудка кишечного типа – аденокарциномы [Rugge M. et al., 2008; Pennelli G. et al., 2020; Rugge M. et al., 2021].

Таким образом, объективная оценка стадии хронического гастрита представляется чрезвычайно важной задачей. Ее выполнение может быть обеспечено дополнительным использованием в ходе биопсийного исследования вспомогательных иммуногистохимических (ИГХ) маркеров – белков, ассоциированных с клеточной перестройкой в СОЖ.

Степень разработанности темы исследования. В литературе описан диагностический подход с использованием ИГХ маркеров для верификации, прежде всего, метапластической атрофии при хроническом гастрите [Кононов А.В. и соавт., 2014]. В их числе отмечены CDX2, MUC2, CD10. Однако

закономерности экспрессии маркеров с расчетом их валидности на этапах развития атрофического гастрита в настоящее время не описаны. Отсутствует интегральный диагностический подход, позволяющий проводить оценку стадии атрофического гастрита с использованием ИГХ метода. Для белка кишечной дифференцировки CDX2, который является наиболее универсальным маркером метапластической атрофии [Chawengsaksophak K. et al., 2019; Yuan T. et al., 2019; Zhang M. et al., 2019; Chen H.Y. et al., 2020], не описаны в полной мере особенности экспрессии в СОЖ при различных градациях (стадиях) хронического гастрита. Неясным остается диагностическое и предиктивное значение появления экспрессии CDX2, то есть формирования белка, являющегося продуктом гена кишечной дифференцировки, в клетках желудочного эпителия при хроническом гастрите. Не разработан диагностический подход, позволяющий проводить оценку атрофических изменений СОЖ в условиях несоблюдения протокола забора биопсийного материала.

Цель исследования. Разработка метода диагностики атрофии слизистой оболочки желудка при хроническом гастрите с использованием иммуногистохимических маркеров для повышения информативности биопсийного исследования.

Задачи исследования:

1. Исследовать иммуногистохимический профиль абсолютной и метапластической атрофии на материале диагностических гастробиопсий, выполненных в соответствии с международными протоколами исследования.
2. Оценить возможность диагностики атрофии слизистой оболочки желудка на биопсийном материале, полученном при нарушении условий стандартизованного забора фрагментов слизистой оболочки желудка (нарушение международных протоколов взятия биоптатов), на основе иммуногистохимического определения белков, ассоциированных с метаплазией/атрофией.
3. С помощью статистической модели оценить валидность использования метода иммуногистохимических маркеров в диагностике атрофии при хроническом гастрите и проанализировать его воспроизводимость путем оценки согласия экспертов (каппа-статистика).

Научная новизна. В результате проведенного исследования уточнен характер продукции белка CDX2 в эпителиоцитах слизистой оболочки желудка при хроническом неатрофическом и атрофическом гастрите. Разработан способ полуколичественной ИГХ оценки белка CDX2, позволяющий оценивать и ранжировать интенсивность экспрессии CDX2 в слизистой оболочке желудка для определения выраженности атрофических изменений (патент RUS № 2758888, 2020). Продемонстрирована высокая валидность (чувствительность, специфичность) белка CDX2 как маркера атрофии слизистой оболочки желудка при хроническом гастрите. Показана высокая предиктивная значимость индекса CDX2 в отношении прогнозной оценки риска развития рака желудка кишечного типа (аденокарциномы) при верификации выраженной атрофии (III, IV стадия хронического гастрита).

Теоретическая и практическая значимость. Разработанная в рамках научно-квалификационной работы ориентационная адгезивная полоска для биопсийного материала (патент RUS № 188389, 2018) и способ ориентировки биоптатов с ее использованием (свидетельство государственной регистрации базы данных № 2021622487, 2021) позволяют повысить эффективность патоморфологического исследования материала эндоскопических биопсий

слизистой оболочки желудка, а также степень согласованности диагностических заключений и могут быть использованы в практической работе.

Установлены особенности и описаны закономерности экспрессии ИГХ маркеров CDX2, MUC5AC, MUC6, SMA, CD10, Ki-67 в слизистой оболочке желудка при хроническом гастрите с наличием абсолютной и метапластической атрофии.

Разработанный способ полуколичественной ИГХ оценки белка CDX2 может использоваться в практической работе и научных исследованиях для оценки и ранжирования интенсивности экспрессии CDX2 в диагностическом материале, а также применяться для суррогатной оценки интегрального показателя атрофии слизистой оболочки желудка – стадии хронического гастрита.

Предиктивная статистическая модель, основанная на индексе полуколичественной ИГХ оценки белка CDX2 в трех точках слизистой оболочки желудка (большая кривизна антрального отдела, угол, большая кривизна тела), демонстрирует высокую валидность в отношении стратифицированной оценки риска развития рака желудка кишечного типа.

Способ оценки выраженности атрофии слизистой оболочки желудка на основании соотношения протяженности покровно-ямочного эпителия, не экспрессирующего MUC6, и глубоких отделов желез желудка, экспрессирующих MUC6, может быть использован в практической деятельности патологоанатомических отделений для определения выраженности абсолютных атрофических изменений СОЖ антрального отдела в условиях недостаточно репрезентативного биопсийного материала.

Методология и методы исследования. В соответствии с целью и задачами дизайн соответствовал одномоментному исследованию методом поперечного среза. В качестве объектов исследования выступали биоптаты СОЖ, полученные от пациентов, предъявлявших диспепсические жалобы. Предмет исследования – морфологические изменения и продукция белков CDX2, MUC5AC, MUC6, SMA, CD10, Ki-67 в слизистой оболочке желудка при хроническом гастрите, оцененная ИГХ методом.

В работе были использованы гистологический, гистохимический и ИГХ методы исследования с последующей обработкой полученных данных методами описательной и аналитической статистики с построением статистической модели.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Белок CDX2 является валидным маркером хронического атрофического гастрита при оценке полуколичественного иммуногистохимического индекса ($CDX2_{\text{сумм}}$). Использование индекса экспрессии $CDX2_{\text{сумм}}$ в условиях соблюдения международного протокола забора биопсийного материала (OLGA-system) позволяет повысить качество диагностики атрофического гастрита стадии III-IV.
2. Разработанная предиктивная статистическая модель, основанная на уравнении простой логистической регрессии с оценкой полуколичественного иммуногистохимического индекса $CDX2_{\text{сумм}}$ в гастробиоптатах из трех точек слизистой оболочки желудка, позволяет обеспечить высокий уровень информативности биопсийного исследования при нарушении протокола взятия биопсийного материала и с высокими валидностью и уровнем воспроизводимости стратифицировать риск развития рака желудка кишечного типа.

Степень достоверности и апробация результатов. Степень достоверности и обоснованность результатов диссертационного исследования обеспечена достаточным объемом выборок исследуемых групп, превышающим вычисленный минимальный объем выборки. Результаты научной работы получены с помощью

широкого спектра гистологических, гистохимических и иммуногистохимических методов исследования; достоверность результатов последнего обеспечивается применением внешнего контроля при проведении реакций. Достоверность выводов подтверждена методами описательной статистики и критериями статистического анализа, выбранными в зависимости от типа данных и задач статистической обработки.

Результаты исследования доложены на научно-практических конференциях и конгрессах: 31 Европейском конгрессе патологов (Ницца, 2019), IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные подходы к морфологической диагностике новообразований человека» (Челябинск, 2019), Форуме междисциплинарных исследований в области медицинских наук и технологий (FIRMST) (Москва, 2020), Всероссийской научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2020), 32 Европейском конгрессе патологов и XXXIII Международном конгрессе международной академии патологии (в онлайн-формате, Глазго, 2020), 33 Европейском конгрессе патологов (в онлайн-формате, Гётеборг, 2021).

Результаты исследования внедрены в учебный процесс (специалитет) кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «ОмГМУ» Минздрава России.

Личный вклад автора. Автором были выполнены следующие этапы работы: анализ публикаций по теме диссертационного исследования, систематический литературный обзор, сбор и группировка материалов гастробиопсий, ориентировка фрагментов биопсийного материала при заливке в парафин, формирование тканевых матриц, гистологическое, гистохимическое, ИГХ исследование, статистическая обработка и анализ полученных результатов, подготовка к публикации статей и заявок на получение патентов.

Структура и объем научно-квалификационной работы. Научно-квалификационная работа изложена на 219 страницах компьютерного текста. Состоит из введения (7 страниц), обзора литературы (34 страницы), описания материала и методов исследования (29 страниц), результатов собственных исследований (93 страницы), обсуждения результатов собственных исследований (23 страницы), заключения и выводов (4 страницы), практических рекомендаций (1 страница), списка литературы (23 страницы). Работа иллюстрирована 32 таблицами и 86 рисунками. Список литературы состоит из 206 источников, включающих 16 отечественных и 190 зарубежных публикаций.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Дизайн исследования

В соответствии с целью и задачами дизайн соответствовал одномоментному исследованию методом поперечного среза (рисунок 1).

Материалами исследования выступали биоптаты СОЖ, полученные от пациентов с хроническим гастритом при проведении фиброгастроскопии в соответствии с протоколами системы OLGA [Rugge M. et al., 2008; Rugge M. et al., 2020]. Основная группа с хроническим атрофическим гастритом была сформирована из биоптатов 155 пациентов/наблюдений. Каждое наблюдение было представлено пятью фрагментами СОЖ (общее число исследованных фрагментов – 775). Группа сравнения с хроническим неатрофическим гастритом (поверхностным гастритом, гастритом стадии 0 по OLGA-system) была сформирована из биоптатов 21 пациента/наблюдения (общее число исследованных биоптатов – 105).



Рисунок 1 – Дизайн исследования

Сбор материалов гастробиопсий и ориентировка биоптатов для получения ориентированных срезов

Набор материалов диагностических гастробиопсий производили в соответствии с международным протоколом Маастрихт V с забором двух биоптатов из антрального отдела желудка на расстоянии 2 см от привратника по малой и большой кривизне, одного биоптата из угла желудка и двух биоптатов из тела желудка на расстоянии 8 см от розетки кардии по малой и большой кривизне [Malfertheiner P. et al., 2016].

В рамках исследования для ориентировки материалов диагностических гастробиопсий применяли специально разработанный и запатентованный метод с использованием адгезивной ориентационной подложки из ацетата целлюлозы с диаметром пор 0,22 мкм [Кононов А.В. и соавт., 2019; Парыгина М.Н. и соавт., 2020]. Биопсийный материал помещали слизистой оболочкой или подслизистой основой на адгезивную подложку при помощи форцепта эндоскопа или тонкой иглы, расправляли на ней, после чего опускали в емкость с фиксирующей жидкостью, а затем фиксировали, проводили и заливали по стандартной методике. После заливки в парафин проводили формирование мультиблоков с использованием метода тканевых матриц (tissue microarray). Столбики парафина, содержащие биоптаты, извлекали из блока с помощью устройства Quick-Ray® Manual Tissue Microarrayer (Sakura, Япония) с диаметром насадки 0,5 см и устанавливали на трехкомпонентную основу, состоящую из тонкой стальной пластинки толщиной 350 мкм, промежуточного слоя из воощенной бумаги с направляющими отрывными ярлычками толщиной 150 мкм и полипропиленовой адгезивной пленки с равномерно нанесенным акриловым клеем общей толщиной 45 мкм [Рубцов В.А. и соавт., 2020]. В каждый мультиблок помещали 25 фрагментов СОЖ, а также внешний контроль. Как правильно ориентированные рассматривали биоптаты, позволяющие получить перпендикулярные поверхности слизистой оболочки срезы, включающие желудочные валики, донные отделы желез и мышечную пластинку.

Гистологические, гистохимические и иммуногистохимические методы исследования

Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Для типирования очагов кишечной метаплазии и определения профиля экспрессируемых эпителиоцитами муцинов применяли комбинированные гистохимические методики

окраски (альциановый синий при pH=2,5, ШИК-реакция, диамин железа) [Мозговой С.И. и соавт., 2014]. Для идентификации *H. pylori* в биоптатах использовали окраску 0,1%-ным толуидиновым синим.

В ИГХ характеристике исследуемых фрагментов СОЖ использовали мышинные моноклональные антитела: CDX2 (Cell Marque, США), клон EPR2764Y в разведении RTU (готовые к использованию); MUC5AC (Novocastra, Великобритания), клон CLH2 в разведении 1:100; MUC6 (Novocastra, Великобритания), клон CLH5 в разведении 1:100; MUC2 (Cell Marque, США), клон MRQ-18 в разведении 1:100; Ki-67 (Cell Marque, США), клон SP6 в разведении RTU (готовые к использованию); CD10 (Cell Marque, США), клон 56C6 в разведении 1:200. Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера в течение 30 секунд – 2 минут.

Выбор клона CDX2 проводили в соответствии с международными рекомендациями NordiQC, отмечающими наилучшие результаты при применении клона EPR2764Y (Nordic Immunohistochemical Quality Control, CDX2 run 61, 2021). В качестве внешнего контроля рассматривали слабое или умеренное диффузное окрашивание ядер клеток протокового эпителия поджелудочной железы, возможное только в условиях оптимально откалиброванного протокола с чувствительными антителами. В качестве позитивных CDX2-меток расценивали наличие диффузного ядерного окрашивания. Для ранжирования выраженности экспрессии CDX2 использовали разработанный индекс экспрессии $CDX2 = ПЭ + ПМ \times ИМ$, где ПЭ – паттерн экспрессии, оцениваемый в исследуемом материале следующим образом: разрозненные позитивно окрашенные клетки (допускается до трех рядом расположенных клеток) – 1 балл, очаговая экспрессия более чем в трех рядом расположенных клетках без экспрессии во всех клетках железы и соответствующей ей зоны покровно-ямочного эпителия – 2 балла, линейная сплошная экспрессия во всей железе и соответствующей ей зоне покровно-ямочного эпителия – 3 балла; ПМ – протяженность метки, учитывающая процент CDX2-позитивных клеток в биоптате: экспрессия отсутствует (0%) – 0 баллов, экспрессия очаговая (1-5%) – 1 балл, фокальная (5-25%) – 2 балла, мультифокальная (25-50%) – 3 балла, распространенная (более 50%) – 4 балла; ИМ – интенсивность метки, оцениваемая следующим образом: отсутствие метки – 0 баллов; слабая интенсивность, соответствующая светло-коричневому окрашиванию ядра – 1 балл; выраженная интенсивность, соответствующая темно-коричневому окрашиванию ядра – 2 балла [патент RUS № 2758888, 2020]. При сочетании паттернов и/или вариантов интенсивности окрашивания ядра расчет индекса CDX2 проводили по превалирующему компоненту.

Экспрессию желудочных (MUC5AC, MUC6) и кишечного (MUC2) муцинов проводили по шкале интенсивности (0 – отсутствие, 1 – слабая, 2 – умеренная, 3 – выраженная). При этом дополнительно рассчитывали значение соотношения протяженности покровно-ямочного эпителия СОЖ к глубоким отделам железы, экспрессирующим MUC6, в 10 железах. Значение, меньшее или равное 2, расценивали как норму (отсутствие атрофии слизистой оболочки антрального отдела желудка); более 2 – наличие атрофии слизистой оболочки антрального отдела желудка. Оценку общей выраженности атрофии СОЖ в исследуемом гастробиоптате осуществляли путем расчета среднего арифметического показателя по формуле:

$$A = \frac{a_1 + a_2 + a_3 + a_4 + a_5 + a_6 + a_7 + a_8 + a_9 + a_{10}}{10},$$

где а – атрофические изменения в одной железе СОЖ антрального отдела,

А – атрофические изменения СОЖ в гастробиоптате.

Экспрессию маркера CD10 оценивали бинарно по принципу наличия или отсутствия в исследуемом объеме материала. Индекс пролиферации оценивали

с помощью маркера Ki-67 как долю (в %) позитивных ядерных меток эпителиоцитов СОЖ при 400-кратном увеличении микроскопа в десяти случайно выбранных полях зрения (≥ 1000 клеток).

Методика оценки согласия экспертов при верификации атрофии слизистой оболочки желудка

Для оценки согласованности диагностических мнений врачей-патологоанатомов использовали метод оценки согласия экспертов с расчетом каппа-коэффициента (κ) Коэна. Проводили попарное сравнение показателей («каждый с каждым») с расчетом индивидуального показателя согласия (медианы от всех значений κ для каждого исследователя) и генерального показателя согласия (медианы от полученных индивидуальных показателей).

Для номинальных параметров (градация и стадия атрофии) была рассчитана невзвешенная, линейная взвешенная и квадратичная взвешенная каппа, для бинарных (есть атрофия/нет атрофии) – невзвешенная каппа. Применение взвешенной оценки в расчетах позволяло оценить меру согласованности в зависимости от количественной выраженности оцениваемого показателя (индекса экспрессии CDX2). Оценку каппа-коэффициента проводили согласно критериям:

- менее 0,2 – плохое согласие, плохая степень согласованности;
- от 0,21 до 0,4 – удовлетворительное согласие (сносное), удовлетворительная степень согласованности;
- от 0,41 до 0,6 – умеренное согласие (среднее), умеренная степень согласованности;
- от 0,61 до 0,8 – хорошее согласие, хорошая степень согласованности;
- более 0,81 – очень хорошее (значительное) согласие, очень хорошая степень согласованности [Cohen J., 1960; Warrens J., 2011; McHugh M.L., 2012; Kaniadakis G Et al., 2020].

В исследовании приняло участие пять врачей-патологоанатомов, не специализирующихся на работе с материалами диагностических гастробиопсий (частота просмотра гастробиоптатов – 5-10 случаев в неделю). Стаж врачей составил 3, 5, 10, 12 и 15 лет. В число отобранных для оценки диагностических случаев было включено по 5 случаев, соответствующих каждой из стадий I-IV по системе OLGA (всего 20 случаев): 10 случаев низкого (стадии I-II по системе OLGA) и высокого (стадии III-IV по системе OLGA) риска развития рака желудка. Случаи были отобраны таким образом, чтобы выраженность атрофических изменений в них была обусловлена сочетанием абсолютной и метапластической атрофии, и биоптаты, включенные в них, не подвергались дополнительной ориентировке. Далее, в соответствии с проведенной оценкой полуколичественного индекса экспрессии белка CDX2 в различных точках взятия биопсийного материала СОЖ и построенными моделями логистической регрессии, из каждого отобранного диагностического случая исключали биоптаты №2 (малая кривизна антрального отдела желудка) и №4 (малая кривизна тела желудка) протокола взятия OLGA-system, и предоставляли врачам случай, включающий гистологические срезы трех гастробиоптатов из точек 1 (большая кривизна антрального отдела желудка), 3 (угол) и 5 (большая кривизна тела), окрашенные ИГХ методом с целью детекции белка CDX2. Для удобства расчета полуколичественного индекса белка CDX2 с каждого из включенных в исследование биоптатов изготавливали серию микрофотографий на разных увеличениях ($\times 40$, $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$).

На первом этапе исследования врачи-патологоанатомы, пользуясь разработанным индексом полуколичественной балльной оценки белка CDX2, выносили решение об отнесении случая в группу низкого или высокого риска развития рака желудка кишечного типа. По завершении этапа было проведено краткое

обучение с обсуждением методики оценки параметров рассчитываемого индекса CDX2 (процента ИГХ меток, определения интенсивности ИГХ окрашивания и паттерна экспрессии).

Второй этап исследования проводили спустя 2 недели от момента получения результатов первого этапа. На втором этапе исследования врачам-патологоанатомам предлагали повторно оценить предложенные ранее случаи хронического атрофического гастрита и вновь вынести суждение об их принадлежности к группе низкого или высокого риска развития аденокарциномы желудка на основании тех же критериев. Наличие временного интервала, разделяющего этапы исследования, позволило минимизировать вероятность механического воспроизведения собственного данного ранее заключения. Для дополнительной объективизации исследования между его этапами провели ремаркировку предлагаемых для диагностики случаев с рандомизированным присвоением им новых порядковых номеров.

Методы статистической обработки данных

Для описательной статистики использовали пакет анализа Microsoft Office Excel-2010. Описательная статистика номинальных данных и порядковых переменных (менее 10 возможных вариантов) была представлена в виде процентных долей (%). Для описательной статистики количественных переменных в случае распределения, соответствующего нормальному, рассчитывали среднеарифметическое \pm стандартное отклонение; при отличии распределения количественных переменных от нормального и использовании порядковых данных (более 10 возможных вариантов) – медиану, 25 и 75 перцентили, максимальное и минимальное значения. Проверка соответствия распределения переменных нормальному проводилась с помощью гистограмм, квартиль-квартильных графиков, критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка.

Для аналитической статистической обработки данных использовали пакет программы IBM SPSS Statistics (23 версия). Для сравнения выборок порядковых данных (более 10 возможных вариантов) и количественных данных для двух независимых выборок был использован непараметрический критерий Манна-Уитни (U-критерий), для трех и более независимых выборок – критерий Крускала-Уоллиса с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Нулевой считалась гипотеза о совпадении медианных значений двух независимых групп. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез при сравнении двух групп принимали $p < 0,05$, четырех – 0,008, пяти – 0,005. Достоверность различий между частотами встречаемости порядковых данных оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным сравнением групп между собой с поправкой Бонферрони на множественные сравнения, а также коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). При интерпретации значения коэффициента ранговой корреляции Спирмена $r=0$ принималось как отсутствие связи, интервал $0 < r < 0,3$ – слабая связь, интервал $0,3 < r < 0,7$ – связь умеренной силы, $0,7 < r \leq 1$ – выраженная связь между переменными. Для оценки прогностического и диагностического потенциала исследуемых показателей использовался метод простой логистической регрессии. Оценку достоверности моделей и влияния предикторной переменной на переменную отклика проводили путем расчета критерия согласия χ^2 , p -значения критерия Вальда χ^2 , R^2 Найджелкерка. Для определения диагностической точности модели (Ac) использовали четырехпольные таблицы, в оценке чувствительности (Se) и специфичности (Sp) моделей применяли ROC-анализ с расчетом показателя площади под кривой (AUC) и оценкой порога отсечения для расчета оптимальных параметров. За критический уровень значимости принимали $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика основной группы исследования

Описание гистологических признаков в каждом из фрагментов осуществляли на основании визуально-аналоговой шкалы модифицированной Сиднейской системы [Dixon M.F., 1996]. Степень и стадию хронического гастрита оценивали согласно визуально-аналоговой шкале Российского пересмотра Международной классификации хронического гастрита OLGA [Кононов А.В. и соавт., 2009]. В 84 случаях основной группы исследования (40 наблюдений группы низкого развития рака желудка и 44 наблюдения – группы высокого риска) из 155 стадия хронического гастрита была обусловлена сочетанием метапластической и абсолютной атрофии СОЖ. В 71 наблюдении (60 – группы низкого риска развития рака желудка и 11 – группы высокого риска) абсолютная атрофия СОЖ встречалась в отсутствие метапластической. Дополнительно оценивали фенотипический вариант хронического гастрита. Распределение исследованных случаев отражено в таблице 1.

Таблица 1 – Распределение диагностических случаев основной группы исследования в соответствии с классификационными характеристиками, определенными по визуально-аналоговым шкалам Российского пересмотра Международной классификации OLGA-system

Фенотипический вариант хронического гастрита	Число случаев, n	Число случаев, n					Число <i>H. pylori</i> -позитивных случаев, n
		Стадия 0 OLGA	Стадия I OLGA	Стадия II OLGA	Стадия III OLGA	Стадия IV OLGA	
атрофический антрум-гастрит	55	0	47	8	0	0	35
мультифокальный атрофический гастрит	47	0	0	37	9	1	37
пангастрит	53	0	0	8	24	21	32
итого	155	0	47	53	33	22	104

При гистохимической окраске биоптатов СОЖ в зонах абсолютных атрофических изменений в покровно-ямочном эпителии антрального отдела и тела желудка было отмечено истончение слоя ШИК-позитивных гликопротеинов, очагово приобретающего вид тонкой малиновой полосы, а также было отмечено смещение ШИК-позитивных мукоцитов в направлении шейки желез, что расценивалось как косвенный показатель абсолютной атрофии.

В участках кишечной метаплазии цитоплазма бокаловидных клеток при окраске альциановым синим при pH=2,5 приобретала сине-голубой цвет, что свидетельствовало о преобладании сиаломуцинов. При преобладании нейтральных муцинов после проведения ШИК-реакции цитоплазма бокаловидных клеток имела пурпурно-красный оттенок; при сочетании нейтральных и сиаломуцинов окрашивалась в фиолетовый цвет. В единичных биоптатах слизистой оболочки антрального отдела желудка при окраске диамином железа была выявлена продукция сульфомуцинов бокаловидными и высокими цилиндрическими клетками, что позволило диагностировать толстокишечный тип метаплазии (III). В высоких цилиндрических клетках, расположенных между бокаловидными, в очагах полной тонкокишечной метаплазии ШИК-реакция позволила выявить тонкую ШИК-позитивную полосу на апикальном крае клеток. В очагах неполной метаплазии в апикальных частях клеток определялись мелкие ШИК-позитивные вакуоли.

В основной группе исследования в очагах абсолютной атрофии отмечалась продукция секретируемых муцинов MUC5AC и MUC6; при этом протяженность зон экспрессии секретируемых муцинов (MUC5AC/MUC6) приобретала соотношение 3:1 или 4:1. Экспрессия MUC5AC также отмечалась в очагах пилорической/псевдопилорической метаплазии слизистой оболочки тела желудка.

Очаги метапластической атрофии характеризовались экспрессией CDX2 во всех клетках; ядерная метка имела ярко-коричневый цвет в участках полной тонкокишечной метаплазии (тип I) и светло-коричневый цвет – в очагах неполной кишечной метаплазии (типы IА, IВ, III). Была характерна экспрессия MUC2 в цитоплазме бокаловидных клеток в участках кишечной метаплазии любого из типов, а также экспрессия CD10 в зоне щеточной каемки высоких цилиндрических клеток в очагах полной тонкокишечной (тип I) метаплазии.

Нередко отмечалась экспрессия CDX2 в клетках желудочного эпителия. Несмотря на то, что нередко встречалось сочетание CDX2-позитивных меток в желудочном эпителии и наличие участка кишечной метаплазии в пределах того же биоптата (26 случаев из 69), в большинстве случаев (43 случая из 69) CDX2-позитивные метки в желудочном эпителии встречались изолированно.

В группе сравнения во всех биоптатах слизистой оболочки антрального отдела желудка ИГХ картина соответствовала таковой в малоизмененной слизистой оболочке. В железах была зарегистрирована продукция секретируемых муцинов MUC5AC и MUC6; метка имела цитоплазматический характер с преимущественно супра- и перинуклеарной локализацией. Распределение муцинов в пределах железы соответствовало нормальному: MUC5AC обнаруживался в поверхностном фовеолярном эпителии, тогда как MUC6 локализовался в области тела и дна желез; протяженность зон экспрессии муцинов (MUC5A/MUC6) соответствовала соотношению 2:1. В единичных гастробиоптатах была обнаружена слабая экспрессия CDX2 в ядрах отдельных эпителиоцитов в области перешейка желез антрального отдела в СОЖ без признаков атрофии. В группе хронического поверхностного гастрита CD10 и MUC2 не были обнаружены ни в одном случае проведения ИГХ реакции.

Таким образом, оптимальным диагностическим маркером атрофии СОЖ был выбран белок CDX2. Его выбор был обусловлен выявленной ассоциацией экспрессии CDX2 с атрофией СОЖ, сравнительной простотой оценки ядерного характера экспрессии маркера, а также наличием метки на всем протяжении желез, что может быть особенно важно при исследовании гистологических срезов после неправильной ориентировки биопсийного материала.

При расчете индекса $CDX2_{сумм}$ в основной группе исследования была отмечена прямая корреляция его значений со стадией хронического гастрита по системе OLGA ($F(3, 151)=64,097, p<0,01$) (рисунок 2).

Для оценки возможности использования полуколичественного индекса $CDX2_{сумм}$ в качестве диагностического маркера, позволяющего установить стадию хронического гастрита, был проведен корреляционный анализ с расчетом коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r -Spearman's). Его значение для всех диагностических случаев основной группы исследования ($n=155$) составило $r=0,70$ ($p<0,01$), что соответствует выраженной положительной корреляции. Выраженная положительная корреляция сохранялась также для случаев выборки с сочетанием в биоптатах абсолютной и метапластической атрофии ($n=56$) $r=0,79$ ($p<0,01$); для случаев, где стадия OLGA была обусловлена наличием только абсолютных атрофических изменений ($n=71$), коэффициент Спирмена принимал значение, равное 0,42 при $p<0,01$ (соответствует положительной корреляции умеренной силы). Для определения достоверности

различий значений индекса между диагностическими случаями, отнесенными к различным стадиям хронического атрофического гастрита (OLGA стадия I – OLGA стадия IV), был использован критерий Крускала-Уоллиса с поправкой Бонферрони на множественные сравнения. Значение критерия Хи-квадрат составило 79,07 при асимптотической значимости $p=0,005$. Отличия были оценены как достоверные.

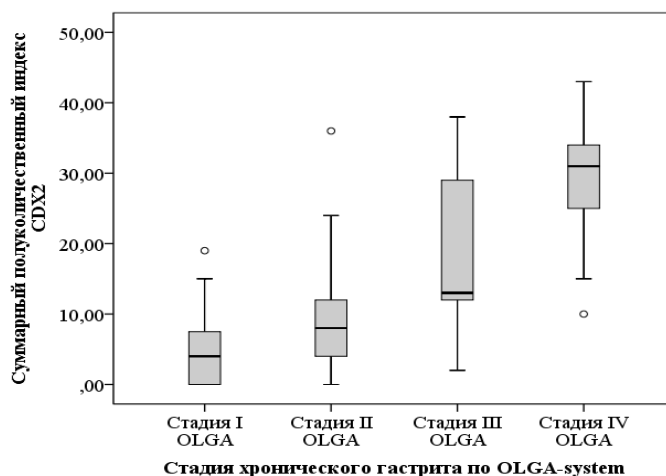


Рисунок 2 – Распределение суммарного индекса $CDX2_{\text{сумм}}$ в зависимости от стадии хронического гастрита по OLGA-system

Для оценки порога отсечения индекса $CDX2_{\text{сумм}}$, имеющего диагностическую значимость для определения наличия у пациента хронического атрофического гастрита любой степени выраженности (стадия I – стадия IV по OLGA-system), был проведен ROC-анализ, по результатам которого значение площади под кривой (AUC) составило 0,836 [ДИ 0,773; 0,887]. Порог отсечения, соответствующий максимальной суммарной Se и Sp полуколичественного ИГХ индекса $CDX2_{\text{сумм}}$, составил 4 балла (таблица 2).

Таблица 2 – Значения порогов отсечения по результатам ROC-анализа в зависимости от целевого критерия

Целевой критерий	Значение порога	Se	ДИ	Sp	ДИ
Se_{max}	0	83,2%	76,4 - 88,7	71,4%	47,8 - 88,7
Sp_{max}	11	42,6%	34,7 - 50,8	100%	83,9 - 100,0
суммарная Se_{max} и Sp_{max}	4	73,6%	65,9 - 80,3	85,7%	63,7 - 97,0

С диагностических позиций наибольшую ценность имеют различия между группой низкого риска развития рака желудка кишечного типа (стадии I-II по OLGA-system) и высокого риска развития рака желудка кишечного типа (стадии III-IV по OLGA-system). При расчете U-критерия Манна-Уитни между этими группами было получено значение критерия, равное 537,5 ($p<0,01$), что также свидетельствует о достоверных различиях в значении индекса $CDX2_{\text{сумм}}$ между этими группами. Аналогичная закономерность сохранялась и при исключении из выборки случаев с метапластической атрофией ($U=113$ при $p<0,01$).

Для уточнения порога отсечения индекса $CDX2$, имеющего диагностическую значимость при стадиях хронического атрофического гастрита высокого риска развития рака желудка (стадии III-IV по системе OLGA), ROC-анализ был проведен повторно; при выборе в качестве переменной отклика принадлежности диагностического случая к стадиям III-IV по системе OLGA значение площади

под кривой (AUC) составило 0,893 [ДИ 0,842; 0,945]. Порог отсечения, соответствующий максимальной суммарной чувствительности и специфичности полуколичественного ИГХ индекса $CDX2_{\text{сумм}}$, составил 12 баллов (таблица 3).

Таблица 3 – Значения порогов отсечения по результатам ROC-анализа в зависимости от целевого критерия

Целевой критерий	Значение порога	Se	ДИ	Sp	ДИ
Se_{max}	0	100%	93,6 - 100,0	26,3%	17,9 - 36,1
Sp_{max}	36	7,2%	2,0 - 17,3	100%	96,3 - 100,0
суммарная Se_{max} и Sp_{max}	12	80,4%	67,6 - 89,8	84,8%	76,2 - 91,3

Оценка потенциала индекса белка CDX2 в качестве диагностического маркера хронического атрофического гастрита при дефектах забора диагностического материала

Поскольку в рутинной практике протокол забора биопсийного материала OLGA соблюдается лишь в крайне небольшом числе случаев – как правило, не более 4% [Шиманская А.Г., 2012; Lash J.G. et al., 2013], – критически важной становится оценка вклада изменений в каждой из точек биопсийного исследования в суммарную градацию атрофических изменений – стадию хронического гастрита.

При оценке коэффициента корреляции между стадией хронического гастрита по системе OLGA и значением полуколичественного индекса CDX2 в каждой из точек биопсийного исследования по протоколу забора наиболее высокий уровень корреляции был выявлен для точек 3 и 1 (рисунок 3).

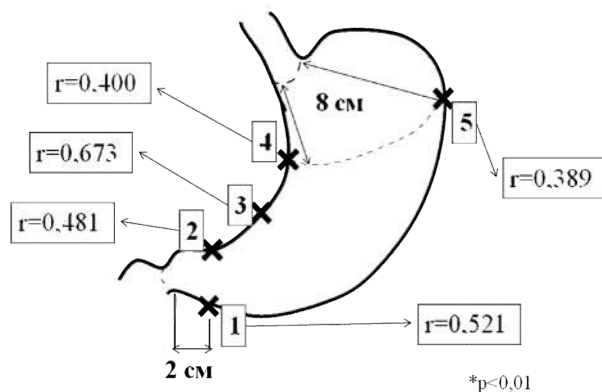


Рисунок 3 – Корреляция значений полуколичественного индекса оценки белка CDX2 в каждой из точек биопсийного исследования протокола OLGA и стадии хронического гастрита по системе OLGA ($p < 0,01$)

Тем не менее, диагностическое заключение о выраженности стадии гастрита не может быть сделано на основании изменений в одной точке СОЖ. Кроме того, в практической деятельности наиболее частым является забор двух/трех фрагментов слизистой оболочки [Шиманская А.Г., 2012; Lash J.G. et al., 2013].

При оценке корреляции суммарного индекса CDX2 по двум фрагментам СОЖ и стадии хронического гастрита по системе OLGA наиболее высокий показатель корреляции, равный 0,671 ($p < 0,01$), был выявлен для точек 2+3.

Взятие во время процедуры фиброгастроскопии фрагмента слизистой оболочки угла желудка (точка 3) является оправданным с позиций эволюции предраковых изменений и состояний СОЖ и способствует ранней и наиболее полной их диагностике [Rugge M., 2016; Pellegrino C. et al., 2018; Zhang M. et al., 2019]. Однако получение биоптатов из точек 2 и 3, принадлежащих к антральному отделу желудка,

делает невозможным высказывание о III-IV стадии хронического атрофического гастрита по OLGA-system, поскольку стадии высокого риска развития рака желудка предполагают мультифокальные изменения, затрагивающие слизистую оболочку как антрального отдела, так и тела желудка [Rugge M. et al., 2008; Rugge M. et al., 2020]. С учетом этого может быть более предпочтителен забор биопсийного материала из точек 3 (угол желудка) и 5 (тело желудка, большая кривизна), где индекс CDX2 также имеет высокие значения коэффициента корреляции со стадией хронического гастрита. Кроме того, сочетание точек «3+5» продемонстрировало наиболее высокий показатель коэффициента корреляции, равный 0,624 ($p < 0,01$), при оценке корреляции суммарного индекса CDX2 по двум фрагментам СОЖ и стадий хронического гастрита III-IV по системе OLGA.

Таким образом, обнаружение экспрессии CDX2 в точках 3 и 5 с наибольшей вероятностью указывает на наличие у пациента хронического атрофического гастрита и повышает статистическую вероятность детекции диагностического случая группы высокого риска развития рака желудка кишечного типа.

При оценке корреляции суммарного индекса CDX2 по трем фрагментам СОЖ и стадии хронического гастрита по системе OLGA наиболее высокий показатель корреляции, равный 0,699 ($p < 0,01$), был выявлен для точек 1+2+3.

Наиболее высокий показатель коэффициента корреляции для сочетания биоптатов антрального отдела желудка является ожидаемым и отражает прогрессию атрофических изменений СОЖ, наиболее часто дебутирующих в антруме и затем постепенно распространяющихся в проксимальном направлении [Rugge M., 2016; Pellegrino C. et al., 2018; Zhang M. et al., 2019]. Однако принадлежность всех точек к антральному отделу желудка, несмотря на полученный высокий коэффициент корреляции, не позволяет диагностировать стадии III и IV хронического гастрита по системе OLGA, поскольку не отражает состояния слизистой оболочки тела желудка. В связи с этим был проведен повторный расчет коэффициента r для оценки корреляции суммарного индекса CDX2 по трем фрагментам СОЖ и стадий хронического гастрита III-IV по OLGA-system. Наиболее высокий показатель корреляции, равный 0,592 ($p < 0,01$), был выявлен для сочетания точек «1+3+5».

Таким образом, обнаружение экспрессии CDX2 в точках 1, 3 и 5 с наибольшей вероятностью указывает на наличие хронического атрофического гастрита и имеет наибольшую эффективность при отнесении диагностического случая к группе высокого риска развития рака желудка кишечного типа.

Оценка потенциала индекса белка CDX2 в качестве предиктивного маркера хронического атрофического гастрита при дефектах забора диагностического материала

Для оценки значимости белка CDX2 в дифференциальной диагностике между стадиями хронического гастрита было построено несколько моделей простой логистической регрессии. Во всех построенных моделях в качестве независимой переменной выступал индекс белка CDX2, а в качестве зависимой переменной – стадия хронического атрофического гастрита по OLGA.

Наиболее высокие показатели чувствительности, специфичности и диагностической точности были продемонстрированы при использовании модели простой логистической регрессии, где каждый случай был представлен одним диагностическим случаем, включающим три биоптата – из точек 1, 3 и 5 СОЖ. Бинарная переменная отклика принимала значение 1 для стадий III-IV хронического гастрита по OLGA и 0 – для стадий I-II хронического гастрита по OLGA (таблица 4).

Таблица 4 – Модель простой логистической регрессии, переменная отклика – принадлежность к стадиям III-IV хронического гастрита по OLGA-system, предикторная переменная – полуколичественный индекс CDX2

Основные параметры модели: -2 Log правдоподобие: 118,589; критерий согласия χ^2 (1)=84,200; R квадрат Найджелкерка=0,574; $p < 0,0001$		
N=155	Константа(B0)	Индекс CDX2
Коэффициент (β)	-3,104	0,292
Стандартная ошибка	0,457	0,048
p-значение	0,000	0,000
Критерий Вальда χ^2	46,214	37,024
p-значение	0,000	0,000
Отношение шансов	0,045	1,339
-95%ДИ		1,219
+95%ДИ		1,471

Индекс полуколичественной ИГХ экспрессии CDX2 показал статистически значимую положительную связь с наличием хронического атрофического гастрита стадий III-IV по системе OLGA (группа высокого риска развития рака желудка кишечного типа). В соответствии с моделью, при увеличении значения индекса CDX2 на 1 балл вероятность диагностики хронического атрофического гастрита стадий III-IV по системе OLGA повышается в 0,8 раз (ОШ=1,34, 95% ДИ=[1,219-1,471]; Критерий Вальда χ^2 84,200, $p < 0,0001$). Предсказанная принадлежность исследуемых биоптатов СОЖ, полученных из точек 1, 3 и 5, к группе хронического атрофического гастрита (стадии III-IV по системе OLGA) совпадала с фактическими данными в 83,9% случаев.

Для оценки эффективности модели и определения порога отсечения был проведен ROC-анализ, по результатам которого площадь под кривой AUC составила 0,895 [ДИ 0,836; 0,939]. Порог отсечения, соответствующий максимальной суммарной Se и Sp полуколичественного ИГХ индекса CDX2_{сумм}, составил 7 баллов (таблица 5).

Таблица 5 – Значения порогов отсечения по результатам ROC-анализа в зависимости от целевого критерия

Целевой критерий	Значение порога	Se	ДИ	Sp	ДИ
Se _{max}	0	100%	93,6 - 100,0	30,30%	21,5 - 40,4
Sp _{max}	16	50%	36,3 - 63,7	100%	96,3 - 100,0
суммарная Se _{max} и Sp _{max}	7	80,36%	67,6 - 89,8	82,83%	73,9 - 89,7

Следовательно, согласно результатам сопоставления прогнозируемых и фактических данных распределения биоптатов, модель, а, соответственно, и белок CDX2 как маркер хронического атрофического гастрита имеет чувствительность 80,4%, специфичность 82,8%, диагностическую точность 83,9%.

Оценка воспроизводимости определения риска развития рака желудка при хроническом гастрите с использованием иммуногистохимического маркера CDX2

Для проверки состоятельности способа оценки риска развития рака желудка кишечного типа и диагностики хронического гастрита с использованием ИГХ маркера CDX2 проведена оценка согласованности заключений врачей-патологоанатомов методом kappa-статистики.

На первом этапе исследования рассчитаны значения коэффициентов согласия для параметров, характеризующих особенности экспрессии CDX2: паттерна, протяженности и интенсивности ИГХ окрашивания. Все полученные значения невзвешенных k -коэффициентов лежали в диапазоне от 0,33 (для протяженности экспрессии – процента позитивно окрашенных клеток в биоптате) до 0,47 (для интенсивности экспрессии), что свидетельствует об умеренной степени согласия врачей-участников исследования. При расчете взвешенных k -коэффициентов независимо от методики взвешивания наиболее воспроизводимой являлась оценка паттерна экспрессии (линейная взвешенная $k = 0,55$; квадратичная взвешенная $k = 0,7$); все полученные значения взвешенной линейной капшы Коэна говорили об умеренной согласованности заключений, а значения взвешенной квадратичной капшы – о хорошей (рисунок 4).

При сопоставлении уровней согласия врачей-участников исследования при расчете полуколичественного индекса белка CDX2 получено значение невзвешенного k -коэффициента, равное 0,27. Взвешенная капша Коэна для того же параметра достигла значения 0,8 (квадратичное взвешивание), что свидетельствует о большем уровне согласия врачей-патологоанатомов при наличии высоких значений индекса CDX2 по сравнению с низкими, что, соответственно, отражает наличие более согласованной оценки в условиях детекции выраженных атрофических изменений СОЖ (рисунок 5).

Уровень согласованности мнений врачей-патологоанатомов при оценке риска развития рака желудка в каждом из диагностических случаев на основании значения индекса CDX2 составил 0,4, что позволило говорить лишь об удовлетворительном согласии между участниками исследования. Из 20 исследуемых случаев 10 (2 случая группы низкого риска развития аденокарциномы желудка и 8 – группы высокого риска) были однозначно оценены всеми врачами-патологоанатомами, участвующими в исследовании, и стратифицированы ими так же, как и при определении группы риска по данным рутинного морфологического исследования.

По завершении первого этапа исследования было проведено обсуждение его результатов, в рамках которого были озвучены все выявленные источники несовпадения диагностических мнений: трудоемкость точного подсчета процента CDX2-позитивных меток, сложность детекции ИГХ-меток слабой интенсивности и их недоучет с занижением итогового индекса CDX2, неоднозначная интерпретация градации 3 паттерна экспрессии (линейная сплошная экспрессия во всей железе и соответствующей ей зоне покровно-ямочного эпителия). Для повышения согласованности мнений участников было проведено совместное обсуждение трех самостоятельных, ранее не включенных в исследование случаев хронического атрофического гастрита с расчетом индекса CDX2.

После обсуждения расчетных параметров полуколичественного индекса белка CDX2 расчет показателей согласованности при оценке параметров, используемых для расчета индекса CDX2, были оценены повторно. Все полученные значения невзвешенных k -коэффициентов лежали в диапазоне от 0,84 (для паттерна экспрессии) до 0,88 (для протяженности экспрессии) и соответствовали, таким образом, крайне высокому уровню согласия врачей-участников исследования. Показатели k -коэффициентов с применением квадратичного взвешивания для всех расчетных параметров превышали 0,89 и также свидетельствовали о крайне высокой степени согласия экспертов. Наиболее высокий показатель взвешенной капшы Коэна, равный 0,97, отмечен для протяженности зоны экспрессии CDX2 (рисунок 4).

При оценке согласованности мнений врачей-патологоанатомов при расчете индекса белка CDX2 получено значение невзвешенного k -коэффициента, равное 0,8; значения взвешенной капшы Коэна составило 0,97. Оба рассчитанных значения лежат в

интервале, указывающем на значительный уровень согласия врачей, включенных в исследование, при оценке полуколичественного индекса белка CDX2 (рисунок 5).

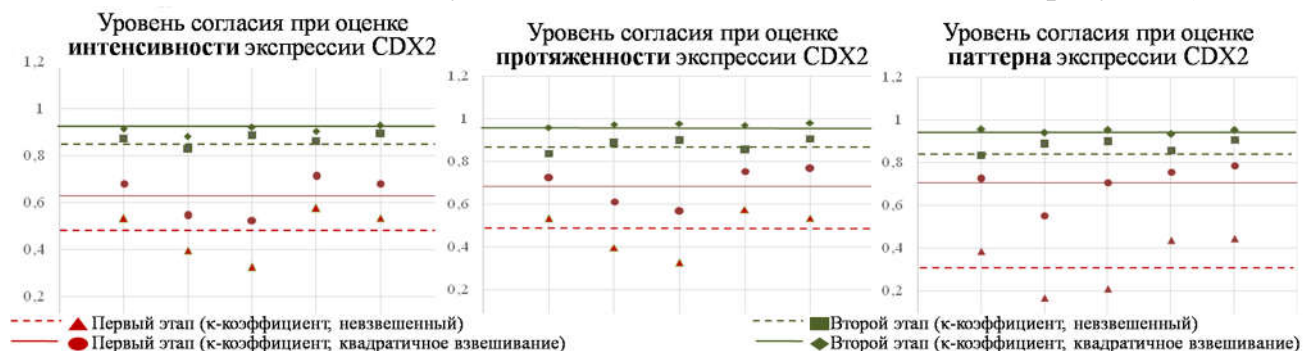


Рисунок 4 – Значения индивидуальных показателей взвешенного к-коэффициента каждого участника исследования (обозначены маркерами) и генеральной невзвешенной (обозначены пунктирной линией) и взвешенной (обозначены сплошной линией) каппы, полученные при оценке расчетных параметров индекса CDX2 (интенсивности окрашивания, протяженности и паттерна экспрессии) на каждом этапе работы



к-коэффициент, невзвешенный						к-коэффициент, невзвешенный					
Участник1	Участник2	Участник3	Участник4	Участник5		Участник1	Участник2	Участник3	Участник4	Участник5	
Участник1						Участник1					
Участник2	0,117					Участник2	0,467				
Участник3	0,0722	-0,0178				Участник3	0,675	0,626			
Участник4	0,0104	-0,0499	0,00524			Участник4	0,303	0,415	0,36		
Участник5	0,198	0,0323	-0,0283	0,263		Участник5	0,569	0,517	0,73	0,512	
	0,0994	0,0204	0,007835	0,057185	0,11625		0,5035	0,50625	0,59775	0,3975	0,582
					0,060214						0,5174
к-коэффициент, квадратичное взвешивание						к-коэффициент, квадратичное взвешивание					
Участник1	Участник2	Участник3	Участник4	Участник5		Участник1	Участник2	Участник3	Участник4	Участник5	
Участник1						Участник1					
Участник2	0,711					Участник2	0,96				
Участник3	0,753	0,51				Участник3	0,965	0,98			
Участник4	0,863	0,824	0,635			Участник4	0,97	0,971	0,969		
Участник5	0,932	0,817	0,655	0,94		Участник5	0,98	0,974	0,971	0,981	
	0,81475	0,7155	0,63825	0,8155	0,836		0,96875	0,97125	0,97125	0,97275	0,9765
					0,764						0,9721

Рисунок 5 – Значения индивидуальных показателей к-коэффициента каждого участника исследования (обозначены маркерами) и генеральной невзвешенной (обозначены пунктирной линией) и взвешенной (обозначены сплошной линией) каппы, полученные при расчете индекса CDX2 на каждом этапе работы (а); матрицы значений индивидуальных показателей к-коэффициента при оценке полуколичественного индекса ИГХ экспрессии белка CDX2 на первом (б) и втором (в) этапах исследования

Значение k -коэффициента при бинарной оценке группы риска развития рака желудка в случаях, включенных в исследование, достигло 0,9, что также указывает на значительный показатель согласия врачей-патологоанатомов. Из 20 исследуемых случаев 15 (5 случаев группы низкого риска развития аденокарциномы желудка и 10 – группы высокого риска) были однозначно оценены всеми врачами-участниками работы и стратифицированы ими так же, как и при определении группы риска по данным рутинного морфологического исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диагностика атрофии СОЖ с определением ее интегральной выраженности является важнейшей мерой стратификации риска развития рака желудка и наиболее значимым инструментом канцерпревенции. Несмотря на то, что иммуногистохимический метод исследования гастробиоптатов не является в настоящее время альтернативой оценки хронического гастрита в соответствии с международным протоколом OLGA-system, его применение востребовано в условиях недостаточно репрезентативного биопсийного материала (нарушение международных протоколов взятия биоптатов). Вспомогательное использование иммуногистохимических маркеров CDX2, MUC2, MUC5AC, MUC6, CD10 способно дать представление о наличии и выраженности как метапластических, так и абсолютных атрофических изменений СОЖ.

Наиболее универсальным из перечисленных иммуногистохимических маркеров является белок CDX2. Он определяется в ядрах эпителиоцитов СОЖ при хроническом гастрите любой градации атрофии (стадии 0-IV хронического гастрита по системе OLGA). При этом суммарные значения полуколичественного индекса $CDX2_{\text{сумм}}$ в пяти точках забора биопсийного материала постепенно возрастают по мере повышения стадии хронического атрофического гастрита по системе OLGA.

Прямая взаимосвязь индекса $CDX2_{\text{сумм}}$ и интегральной выраженности атрофических изменений позволяет использовать полуколичественный иммуногистохимический индекс CDX2 как дополнительный суррогатный маркер атрофии в условиях дефицита биопсийного материала. Наибольшую эффективность в диагностике стадии хронического атрофического гастрита белок CDX2 демонстрирует при получении биопсийного материала из трех точек (№1 (большая кривизна антрального отдела), №3 (угол) и №5 (большая кривизна тела желудка)). При использовании указанной схемы получения биопсийного материала с расчетом полуколичественного иммуногистохимического индекса белка $CDX2_{\text{сумм}}$ пороговое значение индекса, равное 7, характеризуется наибольшей специфичностью в диагностике хронического атрофического гастрита стадий I-IV и оптимальным соотношением параметров чувствительности и специфичности в диагностике хронического атрофического гастрита стадий III-IV, а также крайне высоким уровнем воспроизводимости ($k=0,97$). Все вышеперечисленное позволяет говорить об индексе CDX2 как об эффективном инструменте детекции атрофии слизистой оболочки желудка на уровне органа, а, следовательно, и предикции рака желудка.

ВЫВОДЫ

1. Использование специализированной адгезивной ориентационной полоски для ориентировки биопсийного материала слизистой оболочки желудка позволяет повысить качество диагностики атрофических изменений и информативность биопсийного исследования за счет увеличения доли ориентированных гистологических срезов.
2. При оценке иммуногистохимического профиля абсолютной и метапластической атрофии слизистой оболочки желудка при хроническом гастрите с использованием маркеров CDX2, MUC5AC, MUC6, SMA, CD10, Ki-67 как наиболее валидный маркер был расценен белок CDX2, обладающий высокой диагностической эффективностью в условиях тангенциального/поперечного среза, универсальностью использования как в очагах кишечной метаплазии, так и в зонах абсолютной атрофии и высоким уровнем воспроизводимости при оценке позитивной ИГХ метки.
3. Разработанный полуколичественный индекс оценки CDX2 ($CDX2_{сумм}$), учитывающий паттерн экспрессии, протяженность метки (процент CDX2-позитивных клеток) и интенсивность метки, позволяет ранжировать выраженность атрофических изменений ($\chi^2=79,07$ при $p=0,005$). Между значениями полуколичественного индекса оценки CDX2 ($CDX2_{сумм}$) и градацией атрофии слизистой оболочки желудка определяется прямая корреляционная связь умеренной силы ($r=0,665$, $p<0,001$).
4. Пороговое значение индекса $CDX2_{сумм}$ в пяти точках забора биопсийного материала, позволяющее диагностировать хронической атрофический гастрит любой градации, соответствует 4 (чувствительность – 73,6%, специфичность – 85,7%). Пороговое значение индекса $CDX2_{сумм}$ в пяти точках забора биопсийного материала, позволяющее диагностировать хронической атрофический гастрит стадии III-IV по системе OLGA и отнести диагностический случай к группе высокого риска развития рака желудка кишечного типа, соответствует 12 (чувствительность – 81,8%, специфичность – 85%).
5. При оценке корреляции между значениями $CDX2_{сумм}$ и стадиями хронического гастрита I-IV по системе OLGA наибольшее значение коэффициента Спирмена ($r=0,699$, $p<0,01$) соответствует комбинации следующих трех точек забора биопсийного материала: №1 (большая кривизна антрального отдела), №2 (малая кривизна антрального отдела) и №3 (угол желудка); при оценке корреляции со стадиями хронического гастрита III-IV наибольшее значение коэффициента Спирмена ($r=0,592$, $p<0,01$) соответствует сочетанию показателей из биоптатов в точках забора биопсийного материала №1 (большая кривизна антрального отдела), №3 (угол) и №5 (большая кривизна тела желудка).
6. С учетом показателей разработанной предиктивной статистической модели, основанной на уравнении простой логистической регрессии, наибольшей валидностью применительно к предиктивной оценке риска развития рака желудка обладает исследование материала из точек №1 (большая кривизна антрального отдела), №3 (угол) и №5 (большая кривизна тела желудка) с расчетом $CDX2_{сумм}$. В рамках предложенной схемы забора биопсийного материала пороговое значение индекса, равное 7, соответствует наибольшей специфичности в диагностике хронического атрофического гастрита стадий I-IV (89,9%) и оптимальному соотношению параметров чувствительности (80,4%) и специфичности (82,8%) в диагностике хронического атрофического гастрита стадий III-IV.
7. Предложенный подход к стратификации риска развития рака желудка кишечного типа при хроническом гастрите, основанный на расчете полуколичественного индекса белка CDX2, обладает высоким уровнем воспроизводимости диагностической оценки

($k_{\text{взвещ}}=0,97$) при реализации предиктивного подхода в отношении риска развития рака желудка кишечного типа.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Предложенный способ ориентировки биопсийного материала может быть рекомендован к использованию в практике специальности патологическая анатомия для повышения информативности биопсийного исследования (увеличения доли ориентированных гистологических срезов), совершенствования преаналитического этапа подготовки исследуемых тканевых фрагментов и повышения уровня согласованности мнений врачей-патологоанатомов при оценке морфологических изменений.

С целью объективизации верификации атрофии слизистой оболочки желудка, в том числе в условиях нарушения пробоподготовки (нарушение международных протоколов взятия биоптатов), рутинное исследование биопсийного материала целесообразно дополнять применением иммуногистохимических маркеров MUC6 (маркера донных отделов желез) и CDX2 (фактора дифференцировки кишечного эпителия).

Разработанный индекс полуколичественной ИГХ оценки белка CDX2 может быть использован в качестве дополнительного маркера в системе поддержки принятия решений при оценке атрофических изменений в слизистой оболочке желудка. При несоблюдении протокола получения биопсийного материала, регламентированного международными протоколами исследования, целесообразна бинарная оценка диагностического случая, основанная на расчете полуколичественного индекса белка CDX2 в трех биоптатах слизистой оболочки желудка (большая кривизна антрального отдела, угол, большая кривизна тела), с отнесением его в группу низкого (индекс $CDX2_{\text{сумм}} \leq 7$) или высокого (индекс $CDX2_{\text{сумм}} > 7$) риска развития рака желудка кишечного типа (аденокарциномы), что соответствует высокому уровню валидности (чувствительность – 80,4%, специфичность – 82,8%, диагностическая точность – 83,9%).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Молекулярно-клеточные основы предикции рака желудка. Опыт мультидисциплинарного исследования / А. В. Кононов, С. И. Мозговой, Е. Г. Поморгайло [и др.] // **Уральский мед журнал.** – 2017. – №4 (148). – С. 9-18.
2. Консенсус как способ оценки воспроизводимости диагноза интраэпителиальной неоплазии / дисплазии слизистой оболочки желудка: возможности использования в процессе непрерывного профессионального образования врачей-патологоанатомов / С. И. Мозговой, А. Г. Шиманская, М. А. Керученко [и др.] // **Уральский мед журнал.** – 2018. – №2 (157). – С. 84-90.
3. Иммунофенотип клеток воспалительного инфильтрата как физиологическое проявление полиморфизма генов цитокинов при хроническом гастрите / А. В. Кононов, Е. Г. Поморгайло, С. И. Мозговой [и др.] // **Уральский мед. журнал.** – 2019. – № 10. – С. 81-85.
4. Сравнительная оценка способов ориентировки биопсийного материала слизистой оболочки желудка / М. Н. Парыгина, Е. Г. Поморгайло, А. Г. Шиманская [и др.] // **Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание.** – 2020. – №1. – Публикация 3-10. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2020-1/3-10.pdf>.
5. Белок CDX2 как суррогатный маркер атрофии слизистой оболочки желудка / М. Н. Парыгина, С. И. Мозговой, А. Г. Шиманская, А. В. Кононов // **Журнал анатомии и гистопатологии.** – 2021. – Т.10, №3. – С. 60-67.

6. Адгезивная подложка для ориентировки биопсийного материала слизистой оболочки желудка : пат. 188389 Российская Федерация, МПК А 61 В 10/00. Полезная модель : №2018140444/18 : заявл. 15.11.18 : опубл. 09.04.19 / Кононов А. В., Мозговой С. И., Шиманская А. Г., Парыгина М. Н., Рубцов В. А., Керученко М. А., Панюшкин Л. В. ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России. – 3 с.

7. Способ формирования тканевых матриц для гистологического исследования : пат. 2711621 Российская Федерация, МПК А61G01N 1/00. Изобретение : № 2018108688/04 : заявл. 13.03.18 : опубл. 17.01.20 / Мозговой С. И., Кононов А. В., Рубцов В. А., Грищенко Р. К., Парыгина М. Н., Керученко М. А., Шиманская А. Г.; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России. – 4 с.

8. Способ полуколичественной оценки белка PDCD4 иммуногистохимическим методом: пат. 2706005 Рос. Федерация : МПК G01N 33/50, G01N 33/53 : №2018135219/04(057936) : заявл. 04.10.2018 : опубл. 13.11.2019 / В.А. Рубцов, М.А. Керученко, А.Г. Шиманская, М.Н. Парыгина, С.И. Мозговой, Е.Г. Поморгайло, А.В. Кононов; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России – 4 с.

9. Методика формирования тканевых матриц с использованием адгезивной подложки : база данных 2020621879 Рос. Федерация : № 2020521786 : заявл. : 05.10.2020, опубл. 14.10.2020 / В.А. Рубцов, С.И. Мозговой, М.А. Керученко, М.Н. Парыгина, Е.Г. Поморгайло, А.Г. Шиманская, А.В. Кононов, заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России. – 1 с.

10. Способ визуальной полуколичественной оценки экспрессии белка CDX-2 в тканях иммуногистохимическим методом : пат. 2758888 Российская Федерация, МПК G01N 33/53 G01N 1/30 . Изобретение : № 2020143364 : заявл. 28.12.20 : опубл. 02.11.21 / Парыгина М. Н., Кононов А. В., Мозговой С. И., Шиманская А. Г., Остроглядова И. А.; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России. – 1 с.

11. Технологическая карта способа ориентировки биопсийного материала с использованием специализированной адгезивной подложки : база данных 2021622487 Рос. Федерация : № 2021622367 : заявл. : 01.11.2021, опубл. 15.11.2021 / М.Н. Парыгина, А.В. Кононов, С.И. Мозговой, А.Г. Шиманская, заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России. – 1 с.

ГРАНТОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке гранта «УМНИК» Омская область Фонда содействия инновациям №14020ГУ/2019 от 14.05.2019 «Разработка технологии обработки диагностического материала для раннего выявления злокачественных новообразований с использованием адгезивной подложки с перфоративными отверстиями на основе ацетата целлюлозы», программы «СТАРТ» Фонда содействия инновациям №4102ГС1/68692 от 13.07.2021 «Разработка набора для ориентировки биопсийного материала для ранней диагностики злокачественных новообразований».

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ИГХ	–	иммуногистохимический(ая)
СОЖ	–	слизистая оболочка желудка
Ac	–	ассурасу (диагностическая точность)
CDX2	–	caudal type homeobox 2 (гомеобоксный транскрипционный фактор 2)
<i>H. pylori</i>	–	<i>Helicobacter pylori</i>
OLGA-system	–	Operative Link on Gastritis Assessment (рабочая классификация по мониторингу признаков хронического гастрита)
Se	–	sensitivity (чувствительность)
Sp	–	specificity (специфичность)

Парыгина Мария Николаевна

**МАРКЕРНЫЙ ПРИНЦИП ВЕРИФИКАЦИИ АТРОФИИ
СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА
В БИОПСИЙНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ХРОНИЧЕСКОГО ГАСТРИТА**

3.3.2 – Патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Омск – 2022

Подписано в печать 12.01.22

Формат 60×84/16

П.л. – 1,0

Способ печати – оперативный

Тираж 100 экз.

Издательско-полиграфический центр ОмГМУ
644050, г. Омск, пр. Мира, 30; тел. (3812) 60-59-08