

На правах рукописи

МИДИБЕР КОНСТАНТИН ЮРЬЕВИЧ

**КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
ПОДТИПЫ КАРЦИНОМЫ ЖЕЛУДКА ДИФФУЗНОГО ТИПА**

3.3.2 – Патологическая анатомия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва — 2023

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского».

Научный руководитель:

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук,
профессор

**Михалева
Людмила Михайловна**

Официальные оппоненты:

Заведующая отделом онкоморфологии
МНИОИ им. П. А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии»
Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор

**Волченко
Надежда Николаевна**

Заведующий патолого-анатомическим отделением,
старший научный сотрудник ГБУЗ МКНЦ имени А.С. Логинова ДЗМ,
кандидат медицинских наук

**Карнаухов
Николай Сергеевич**

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (344037, Российская Федерация, Ростовская область, г. Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63).

Защита диссертации состоится «__» _____ 2024 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.204.02 на базе Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» по адресу: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д.3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» и на сайте <http://www.med.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.1.204.02,
кандидат биологических наук

**Тихонова
Наталья Борисовна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Проблема рака желудка (РЖ) остается чрезмерно актуальной для России и всего мира в целом, ведь несмотря на все имеющиеся достижения в области диагностики и лечения, статистически РЖ продолжает занимать лидирующие позиции как по частоте встречаемости, так и по высокой летальности среди всех злокачественных заболеваний (Каприн А. Д., 2022). Пациенты с диагнозом «рак желудка диффузного типа» (РЖДТ) имеют низкую выживаемость (в среднем 18 месяцев), которая лишь незначительно увеличилась за последние десятилетия (Kaaіj R. T. et al., 2020). Такой плохой прогноз связан с тем, что диагноз обычно ставится на поздней стадии опухолевого процесса, а традиционные методы лечения часто неэффективны или приводят к резистентности (Petrelli F. et al., 2017). Лишь классификация РЖ, созданная на основе молекулярных подтипов, дает возможность применять персонализированную терапию онкобольным. Биомаркеры, в частности микросателлитная нестабильность (Microsatellite Instability, MSI), лиганд запрограммированной клеточной гибели 1 (Programmed death-ligand 1, PD-L1), рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (Human epidermal growth factor receptor 2, HER2), вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus, EBV), все чаще определяют подходы к системной терапии и позволяют идентифицировать группы населения, которым будет показана иммуно- и таргетная терапия (Joshi S. S. и Badgwell, B. D., 2021). По данным молекулярно-генетической классификации, РЖДТ относится к молекулярному подтипу со стабильным геномом (GS), при котором эффективна «классическая» химиотерапия (Bass A. J. et al., 2014). Имеются единичные исследования, где были выявлены случаи РЖДТ, обусловленные микросателлитной (MSI) или хромосомной нестабильностью (CIN), которые имели генетическую схожесть с пациентами, страдающими раком желудка кишечного типа (РЖКТ) (Fukamachi H. et al., 2019). В выборе тактики лечения у этих пациентов имеет значение тот факт, что пациенты с РЖ и MSI при лечении стандартными подходами системной химиотерапии могут иметь неблагоприятный онкологический прогноз (Pietrantonio F. et al., 2019). Имеются данные о том, что у пациентов с РЖ и MSI была отмечена повышенная выживаемость при выполнении только хирургического вмешательства, в то время как при сочетании периоперационной химиотерапии и хирургического вмешательства выживаемость уменьшалась (Choi Y. Y. et al., 2019).

Степень разработанности темы. На сегодняшний день РЖДТ продолжает рассматриваться как гомогенное заболевание с точки зрения молекулярной классификации. В научной литературе нет сведений и алгоритмов для оценки РЖДТ как гетерогенного молекулярно-генетического заболевания, а случаи, в которых обнаруживаются молекулярные подтипы, обусловленные MSI или CIN, обычно не подлежат систематическому анализу со стороны практикующих патологоанатомов и ученых.

Иммуногистохимические панели, используемые в повседневной диагностике РЖДТ, не способствуют изменению подходов к тактике лечения, большинство маркеров не имеют специфичности в отношении РЖДТ. Известно, что MSI опухоли обладают хорошим ответом на лечение препаратами класса ингибиторов контрольных точек, а в научных публикациях обнаружена обратная взаимосвязь между применением классической химиотерапевтической схемы у пациентов с РЖ, обусловленным MSI, с течением заболевания и продолжительностью жизни.

Крайне важной проблемой современной патоморфологической диагностики РЖДТ является отсутствие обязательного определения молекулярных подтипов с помощью иммуногистохимических методов. Молекулярно-генетическое исследование карцином желудка

на сегодняшний день является крайне важным, однако порой труднодоступным и дорогим методом диагностики.

Поиск иммуногистохимической панели, способствующей на одном из начальных этапов исследования выявить пациентов с РЖДТ, у которых возможен иной молекулярный подтип, значительно бы ускорило и сэкономило временные и финансовые затраты. Комплексный подход к изучению неоднородности РЖДТ позволит расширить диагностические критерии и более персонализировано подходить к выбору тактики лечения.

Все вышеизложенное определило актуальность и выбор темы настоящего исследования.

Цель исследования: на основании клиничко-морфологических и молекулярно-генетических критериев обосновать наличие различных подтипов карциномы желудка диффузного типа.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Провести патоморфологическое исследование биопсийного и операционного материала пациентов с карциномами желудка диффузного типа по классификации Lauren в зависимости от возраста, пола и локализации.

2. Обосновать наличие молекулярных подтипов рака желудка диффузного типа с помощью иммуногистохимических маркеров E-cadherin, MSI, p53 и EBV с последующим определением PD-L1 и HER2-статусов опухоли.

3. Определить частоту встречаемости *H. pylori*, вируса Эпштейна-Барр (EBV), а также наличие цитомегаловируса (CMV) и герпесвируса 6 типа (HHV6) в биопсийном и операционном материале карцином желудка диффузного типа.

4. Охарактеризовать иммунофенотип молекулярных подтипов карциномы желудка диффузного типа на основании экспрессии маркеров CK7, CK20, MUC1, MUC2, MUC5AC, CDX-2.

5. Разработать алгоритм клиничко-патоморфологического и иммуногистохимического исследования биопсийного и операционного материала для дифференциальной диагностики различных подтипов карциномы желудка диффузного типа.

Научная новизна исследования. Впервые на основании клиничко-морфологических и молекулярно-генетических данных обосновано наличие различных подтипов карциномы желудка диффузного типа.

Впервые проведено сравнительное иммуногистохимическое исследование молекулярных подтипов карциномы желудка диффузного типа в рамках теории существования «кластеров» с помощью предложенной панели иммуногистохимических антител.

На основании полученных результатов расширены возможности персонализированного подхода к диагностике и выбору тактики лечения у пациентов с раком желудка диффузного типа, основываясь на различных молекулярных подтипах.

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведенное комплексное клиничко-патоморфологическое исследование позволило охарактеризовать существование «кластеров» рака желудка диффузного типа в зависимости от иммуногистохимических и молекулярно-генетических характеристик.

Полученные результаты расширяют иммуногистохимические критерии молекулярного подтипа карциномы желудка, обусловленной микросателлитной нестабильностью.

Представленные результаты могут послужить основой для дальнейшего изучения вопроса «кластеров» рака желудка диффузного типа, а также позволят оптимизировать патолого-анатомическую диагностику диффузной карциномы желудка, при этом, на основе

полученного алгоритма будет возможно персонализировать тактику лечения пациентов с раком желудка диффузного типа в клинической практике.

Методология и методы исследования. Материалом для исследования явились фрагменты опухолевой ткани желудка, удаленные у пациентов, проходивших лечение в ГБУЗ «Городская клиническая больница №31 имени академика Г.М. Савельевой Департамента здравоохранения города Москвы» в период с 2016 по 2022 годы. Всего на ретроспективный анализ было отобрано 192 случая от пациентов в возрасте от 29 до 96 лет, из них 145 биопсийных фрагментов и 47 операционный материал. Из них в 52 наблюдениях с РЖДТ нами проведен комплекс всех методов исследования: гистологический, гистохимический, иммуногистохимический, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени. У остальных 140 были проведены только окраска гематоксилином и эозином, комбинированная ШИК-реакция в сочетании с альциановым синим, а также оценка протоколов операции. Это связано с отсутствием парафиновых блоков с гистологическим материалом от данных наблюдений, так как они были переданы в специализированные учреждения.

В ходе выполнения диссертационной работы были использованы следующие **методы исследования:**

1. Клинический метод:
 - Оценка пола и возраста пациентов, данных операции (локализация поражения и его распространенность).
2. Гистологический метод:
 - Окраска срезов биопсийного и операционного гематоксилином и эозином для установления диагноза рака желудка диффузного типа (по классификации Lauren (1965 г.)).
3. Гистохимический метод:
 - Комбинированная ШИК-реакция в сочетании с альциановым синим с целью определения перстневидных клеток. Оценка процентного содержания перстневидно-клеточного компонента опухоли с градацией полученных данных проводилась по системе International Gastric Cancer Association.
 - Окраска по Романовскому–Гимзе для выявления колоний бактерий *H. pylori*.
4. Иммуногистохимический метод:
 - Оценка экспрессии маркеров E-cadherin, MSI, p53 и EBV для уточнения молекулярного подтипа рака желудка диффузного типа.
 - Оценка экспрессии маркеров CK7, CK20, MUC1, MUC2, MUC5AC, CDX-2, PD-L1, HER2 для определения иммунофенотипа опухоли.
5. Молекулярно-биологический метод:
 - Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени с использованием флуоресцентно меченых олигонуклеотидных зондов для детекции продуктов амплификации ДНК вируса Эпштейна-Барр, CMV и HHV6.
6. Морфометрический метод:
 - Анализ экспрессии E-cadherin проводился с использованием системы подсчета баллов, в которой баллы 0 и 1 (0 = полное отсутствие экспрессии и 1 = цитоплазматическая экспрессия) считались отрицательной экспрессией, а баллы 2 и 3 (2 = цитоплазматическая в сочетании с мембранной экспрессией и 3 = мембранная экспрессия) как положительная экспрессия.
 - Оценка микросателлитной нестабильностью проводилась по отсутствию экспрессии одного из маркеров (MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6).

– Экспрессия p53 оценивалась по процентному соотношению позитивно окрашенных ядер независимо от интенсивности, где аберрантным считалось позитивное окрашивание 70% или более ядер в образце.

– Оценка PD-L1 статуса опухоли производилась по системе Combined Positive Score (CPS) – количество окрашенных PD-L1 клеток (опухолевых и лимфоидных) по отношению к общему количеству жизнеспособных опухолевых клеток, умноженное на 100, с пороговым значением 1%.

– HER2-статус опухоли оценивали по балльной шкале от 0 до 3+.

– Интенсивность экспрессии CK7 и CK20 оценивалась с использованием полуколичественного способа по балльной шкале от 0 до 3, а также оценивалась доля окрашенных клеток в процентном соотношении с целью формирования групп для интерпретации результата.

– Интерпретация реакции с антителами к MUC1, MUC2, MUC5AC, CDX2, EBV проводилась по критерию интенсивности экспрессии и оценивалась полуколичественным способом по балльной шкале от 0 до 3.

7. Статистический метод:

– Материалы исследования были статистически обработаны с использованием методов параметрического и непараметрического анализа. Совокупности количественных показателей, распределение которых отличалось от нормального, описывались при помощи значений медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q1-Q3). Для сравнения независимых совокупностей в случаях отсутствия признаков нормального распределения данных использовался U-критерий Манна–Уитни. Сравнение номинальных данных проводилось при помощи критерия χ^2 Пирсона, а также χ^2 с поправкой Йейтса и точного критерия Фишера. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Положения, выносимые на защиту:

1. Средний возраст пациентов с раком желудка диффузного типа соответствует 68 годам. Медиана возраста женщин в когорте заболевших на 4 года старше, чем мужчин (Me_м – 68, Me_ж – 72, $p = 0,006$). Наиболее частой локализацией рака желудка диффузного типа является тело желудка – 40,1% наблюдений. Пол и возраст пациентов не связан с локализацией опухоли.

2. Рак желудка диффузного типа является молекулярно-генетически гетерогенным заболеванием с наличием различных подтипов:

а) Молекулярный подтип со стабильным геномом, характеризующийся отрицательной экспрессией E-cadherin и отрицательным PD-L1 статусом ($p = 0,0288$).

б) Подтип, обусловленный микросателлитной нестабильностью, характеризующийся положительной экспрессией E-cadherin ($p = 0,0187$) и CK7 ($p = 0,0009$), отрицательной экспрессией CK20 ($p = 0,01$) и MUC1 ($p < 0,001$), и положительным PD-L1 статусом.

в) Молекулярный подтип, обусловленный хромосомной нестабильностью, характеризуется аберрантной экспрессией p53 в сочетании с положительной экспрессией E-cadherin ($p < 0,001$) и положительным PD-L1 статусом.

Степень достоверности и апробация результатов. Проведенное исследование было выполнено на достаточном объеме материала для каждой исследованной группы с использованием современных методов исследования, задачи исследования логично изложены, достоверность результатов подтверждается выбором методов и результатами статистического исследования, а также сравнительной оценкой полученных данных с литературными.

Апробация диссертационной работы состоялась на заседании межлабораторной конференции Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» 22 ноября 2023 года. Основные положения диссертационного исследования были доложены и обсуждались на I Крымском форуме «Онкология, патоморфология и патофизиология: от теории к практике» (Крым, 7-8 октября 2020 г.), Международной научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 12-13 ноября 2020 г.), Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной памятной дате Института (60-летию НИИ морфологии человека) (Москва, 18-19 ноября 2021 г.), 34th European Congress of Pathology (Basel, 3–7 сентября 2022 г.), V Юбилейном международном форуме онкологии и радиотерапии ForLife (Москва, 19–23 сентября 2022 г.), Всероссийской научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии. Регенеративная биология и медицина» (Москва, 15-16 ноября 2023 г.).

Результаты исследования внедрены в работу патолого-анатомического отделения Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница № 31 имени академика Г. М. Савельевой Департамента здравоохранения города Москвы».

Личный вклад автора заключался в сборе литературных данных, их анализе и обобщении, отборе материала, анализе и получении клинических данных, проведении морфометрии ИГХ реакций, статистической обработке, обобщении и обсуждении полученных результатов, подготовке и написании научных публикаций.

Результаты исследования изложены в 8 научных публикациях, 2 из которых опубликованы в журналах Scopus, входящих в перечень рецензируемых научных изданий ВАК, где должны быть размещены основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Диссертация изложена на 153 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, практических рекомендаций, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 80 рисунками и 9 таблицами. Список литературы включает 200 источников, из них 10 отечественных и 190 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Результаты и их обсуждение. На первом этапе нашего исследования нами был выполнен ретроспективный анализ 192 пациентов с гистологически подтвержденным РЖДТ с использованием гистологической окраски гематоксилином и эозином, а также гистохимической комбинированной ШИК-реакции в сочетании с альциановым синим, и учет эндоскопической картины первичной локализации опухоли. Среди всех исследуемых случаев РЖДТ 98 составили мужчины, женщины – 94 (Рисунок 1), средний возраст исследуемых в обеих группах – 68,8 лет (61–79 лет).

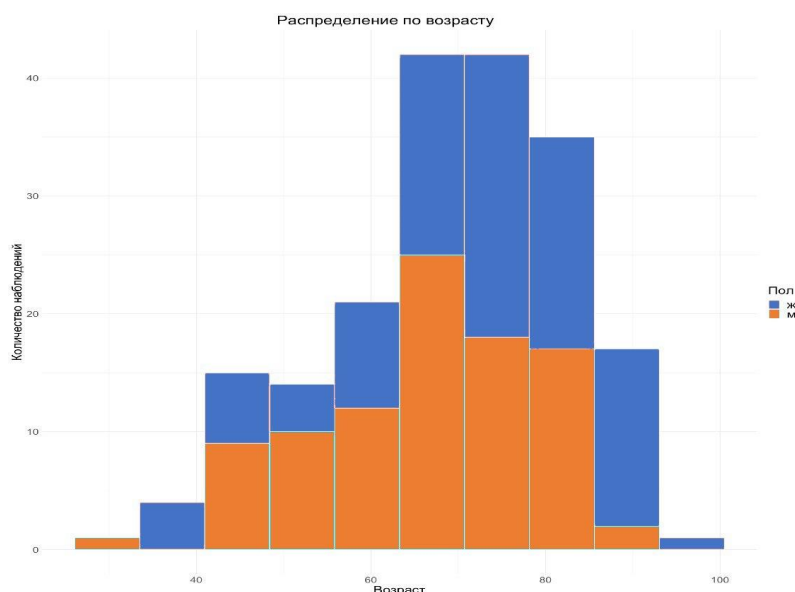


Рисунок 1 – Распределение пациентов с РЖДТ по полу и возрасту

РЖДТ в последние десятилетия демонстрирует неуклонный рост (Drubay V. et al., 2022). В работе Yao Q. et al. (2020) отражено, что данный тип карциномы желудка диагностируется в более молодом возрасте и чаще у лиц женского пола. По данным Wang S. et al. (2022), в целом случаи РЖКТ и РЖДТ были равномерно распределены между полами до 40 лет при расположении опухоли в кардиальном отделе желудка, но стали более распространенными у мужчин, чем у женщин, после 40 лет. Thrift A. P. et al. (2023) сообщили, что уровень заболеваемости РЖ в общем снизился за последние 5 десятилетий в США, хотя заболеваемость некардиальным РЖ среди взрослых в возрасте до 50 лет и РЖ на поздних стадиях у латиноамериканцев растет. Нами выявлено, что возраст пациентов мужчин (Me – 68 (59; 77)) с РЖДТ был меньше, чем у женщин (Me – 72 (66; 82); $U = 3543$, $p = 0,006$), чаще данная карцинома диагностировалась у мужчин. Пол и возраст пациентов не связан с локализацией опухоли (Рисунок 2).

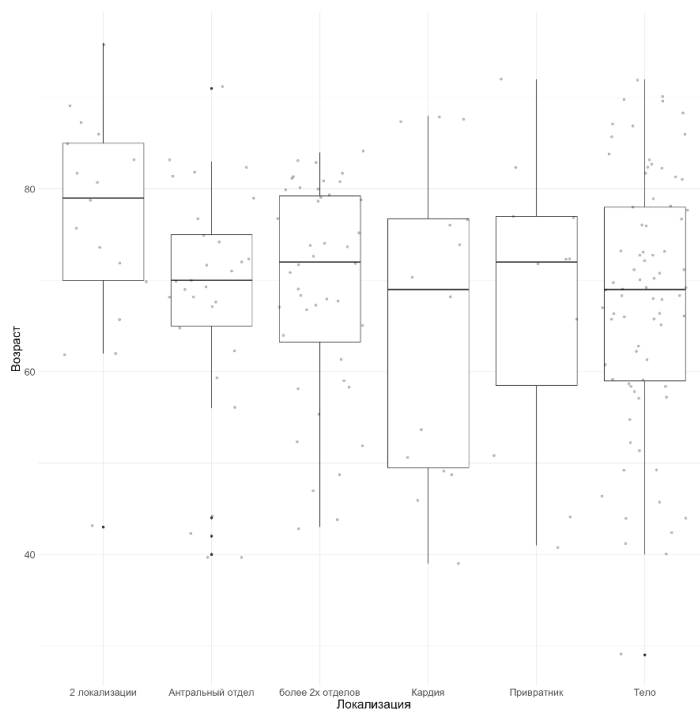


Рисунок 2 - Распределение пациентов с РЖДТ по возрасту и локализации опухоли

По результатам Wu H. et al. (2009), РЖДТ чаще локализовался в проксимальных отделах. По нашим данным, анализ эндоскопических протоколов операций показал, что опухоль чаще локализовалась в теле желудка (40,1%), следующим по частоте был распространенный вариант на две и более локализации (22,9%; Таблица 1). Этот показатель отражает несвоевременное обращение пациентов за медицинской помощью, что приводит к запущенному онкологическому процессу.

Таблица 1 – Анализ пациентов с раком желудка диффузного типа по полу, возрасту и локализации опухоли

Характеристика	Число наблюдений
Пол	Мужчины 98 (51,1%) Женщины 94 (48,9%)
Возраст (лет)	
Медиана	68,8
ИКР	61–79
Локализация	
Кардиальный отдел	14 (7,3%)
Тело желудка	77 (40,1%)
Антральный отдел	29 (15,1%)
Привратник желудка	11 (5,7%)
2 отдела	17 (8,9%)
Более 2 отделов	44 (22,9%)

Следующим этапом нами проведен анализ процентного содержания перстневидно-клеточного компонента согласно рекомендациям International Gastric Cancer Association. Таким образом, по нашим данным в исследуемой группе под критерии SRC-1 попали 3,85%, SRC-2 – 88,46%, а SRC-3 – 7,69% случаев (Рисунок 2, Рисунок 3).

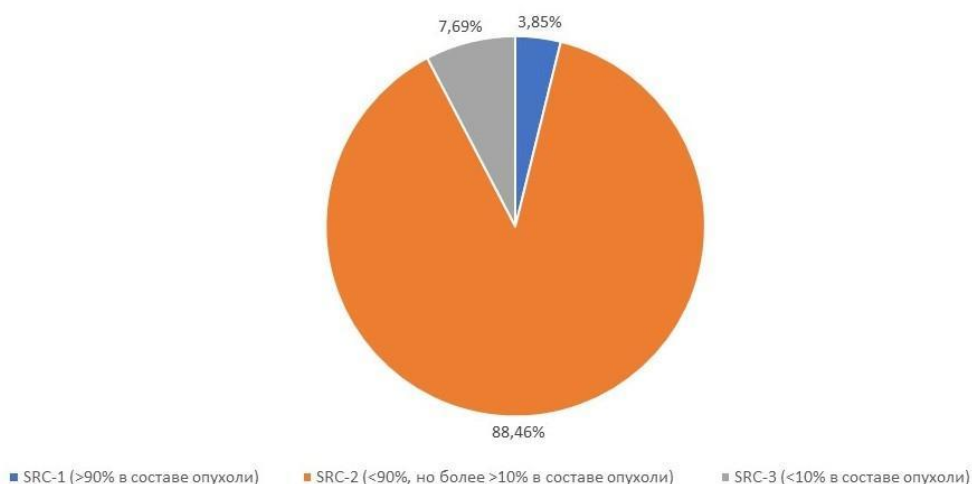


Рисунок 2 - Анализ процентного содержания перстневидно-клеточного компонента РЖДТ

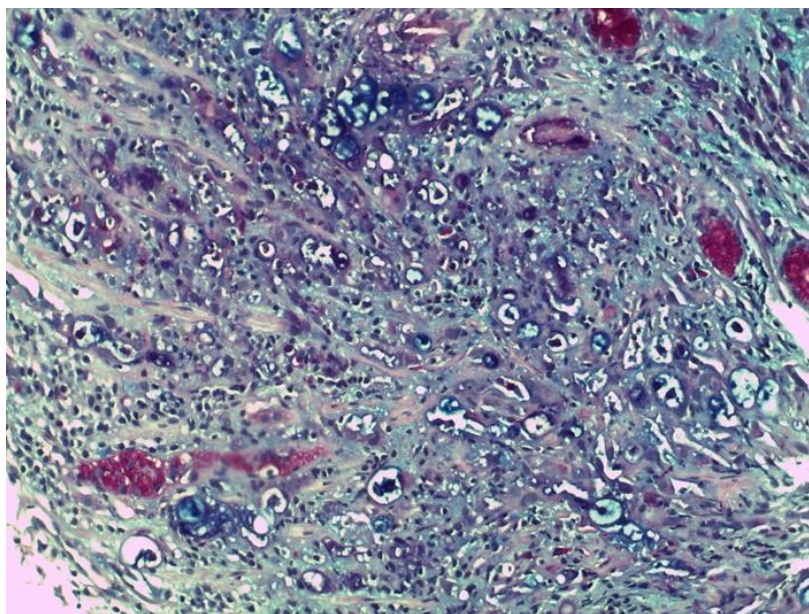


Рисунок 3 - Микрофотография. Содержание перстневидно-клеточного компонента $<90\%$, но $>10\%$. Комбинированная окраска ШИК-реакция в сочетании с альциановым синим, $\times 200$

Современное исследование Roviello F. et al. (2022) подтверждает, что пятилетняя общая выживаемость значительно выше в группе SRC-2 по сравнению с группой SRC-3, а риск смертности был более чем в четыре раза выше у пациентов в группе SRC-3 по сравнению с пациентами из группы SRC-2. Чуть ранее Bencivenga M. et al. (2020) сообщили, что долгосрочная выживаемость была значительно выше в группе SRC1 по сравнению со случаями, отнесенными к группам SRC2 и SRC3.

Третий этап нашего исследования включал определение молекулярного подтипа РЖДТ с помощью иммуногистохимического метода. В основу дизайна этого этапа нами была взята схема, которую Ramos M. F. et al. (2021) использовали для определения молекулярного подтипа у пациентов с РЖКТ. Используя иммуногистохимический метод в нашей работе, у 15,38% пациентов были выявлены признаки MSI (Рисунок 4, Рисунок 5). При этом в качестве внешнего контроля иммуногистохимическую реакцию ставили на срезах червеобразного отростка. Медиана возраста в группе с микросателлитной нестабильностью составила 70,5 лет (69,25–75,25 лет), в группе без микросателлитной нестабильности – 66 лет (58–73,25 года).

Это является крайне важным, но имеет немаловажное значение в переосмыслении патогенеза развития РЖДТ как гетерогенного заболевания с точки зрения молекулярной классификации, так как определение MSI подтипа служит способом выявления претендентов на терапию препаратами ингибиторов контрольных точек.

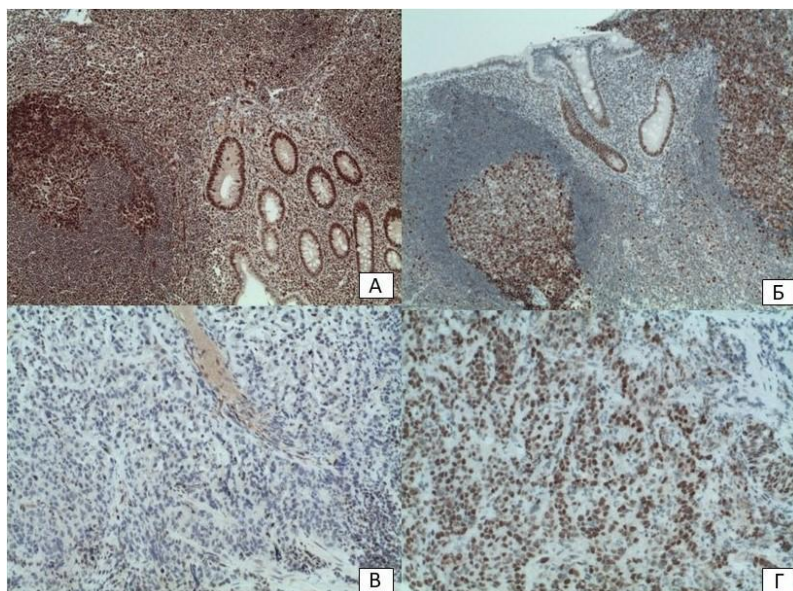


Рисунок 4 – Микрофотография. Стенка червеобразного отростка, внешний контроль антител к MLH1 (А – x100) и MSH2 (Б – x100). Отрицательная экспрессия MLH1 в опухоли (В – x200) и равномерная экспрессии MSH2 в опухоли (Г – x200)

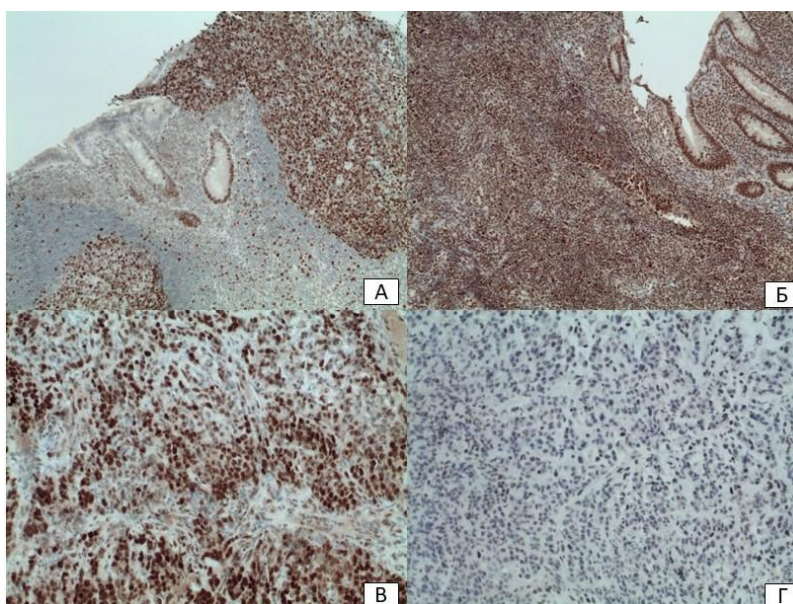


Рисунок 5 – Микрофотография. Стенка червеобразного отростка, внешний контроль антител к MSH6 (А – x100) и PMS2 (Б – x100). Равномерная экспрессия MSH6 в опухоли (В – x200) и отсутствие экспрессии PMS2 в опухоли (Г – x200)

Zepeda-Najar C. et al. (2021), и даже раньше, Вае Y. S. et al. (2015), в своих исследованиях также сообщали о выявлении признаков MSI в РЖДТ, однако ученые не стали делать на этом акцент или пытаться связать данную находку с какими-либо другими результатами своих работ. В работе Nascimento C.N. et al (2022) отражено, что MSI при РЖ у женщин сочетается с более высокой общей выживаемостью, по другим данным MSI-опухоли были связаны с пожилым возрастом и субтотальным поражением желудка (Pereira, M. A. et al., 2018). По нашим данным при анализе случаев микросателлитной нестабильности в наблюдениях РЖДТ, согласно протоколу эндоскопического исследования, оказалось, что признаки MSI были отмечены у тех

пациентов, где злокачественная опухоль распространялась на две и более локализации (Рисунок 6).

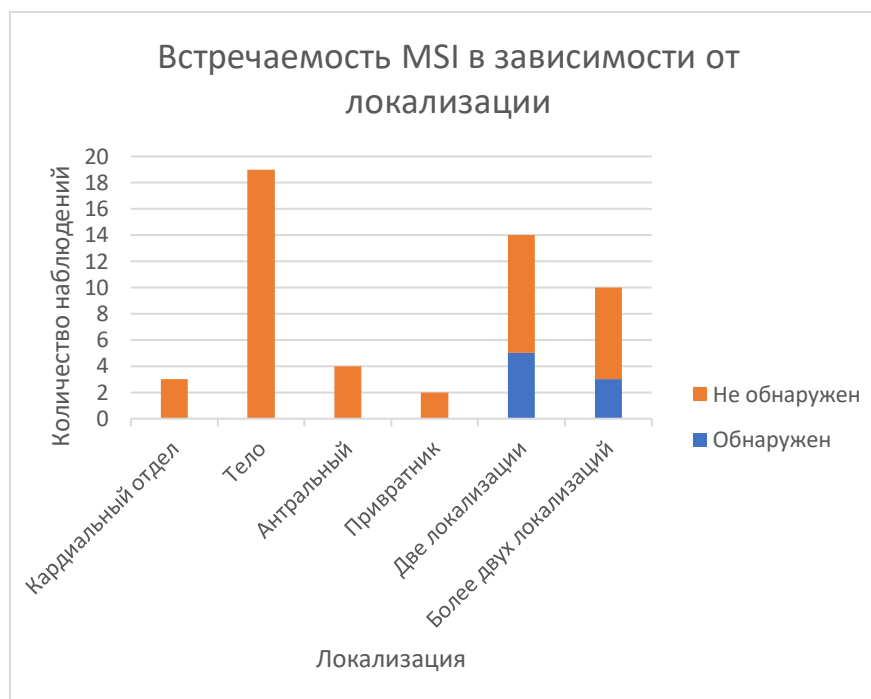


Рисунок 6- Сравнительная характеристика иммуногистохимической реакции с маркерами микросателлитной нестабильности у пациентов с РЖДТ в зависимости от локализации опухолевого процесса

Экспрессия p53 может использоваться как прогностический фактор в отношении мутации белка TP53 (Hwang H. J. et al., 2020), а значит, с помощью ее оценки возможно определить молекулярный подтип опухоли (Ramos M. F. et al., 2021), в том числе и в случаях РЖДТ. Согласно дизайну исследования, те случаи, где была выявлена гиперэкспрессия антитела к p53 (70% и более положительных опухолевых клеток), мы определяли как aberrantный вариант. Таким образом, мы выявили 21,1% случаев с aberrantным вариантом экспрессии антител к p53 (Рисунок 7), а также определили статистически значимые различия между aberrantной экспрессией p53 для пациентов, у которых отсутствовали ИГХ признаки MSI ($p < 0,05$).

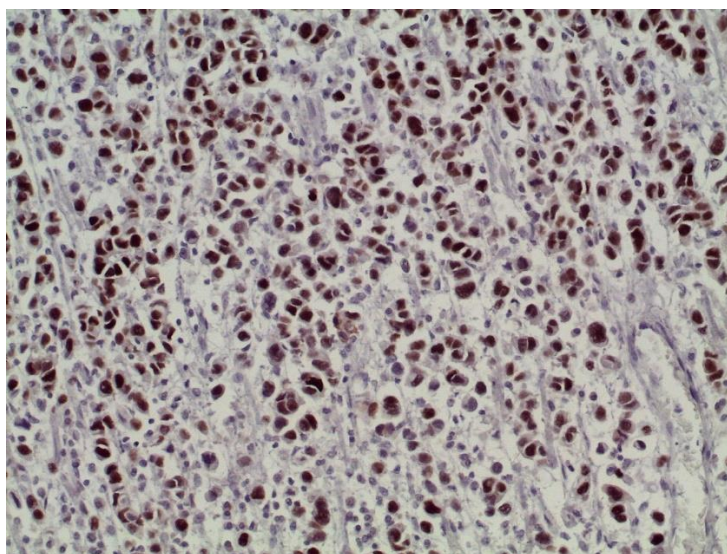


Рисунок 7 - Микрофотография. Иммуногистохимия. Аберрантная экспрессия антитела к p53, x200

В нашей работе отрицательная экспрессия E-cadherin наблюдалась в 44,23% случаев с учетом случаев цитоплазматической экспрессии (Таблица 2). Отрицательная экспрессия E-cadherin обычно наблюдается при РЖДТ и на поздних стадиях РЖКТ (Crețu, O. I., et al., 2022). Многие исследователи практически за все время изучения РЖДТ сообщают об отрицательной экспрессии E-cadherin примерно в 50% случаев (Schizas D. et al., 2017).

Таблица 2 – Оценка ИГХ экспрессии с антителом к E-cadherin

Количество наблюдений (n)	Полное отсутствие экспрессии – 0 баллов	Цитоплазматическая экспрессия – 1 балл	Цитоплазматическая в сочетании с мембранной экспрессией – 2 балла	Мембранная экспрессия – 3 балла
52	16	7	10	19
	Отрицательная экспрессия 23 (44,23%)		Положительная экспрессия 29 (55,77%)	

Проведенный статический анализ связи экспрессии E-cadherin и случаев MSI показал, что во всех случаях РЖДТ с MSI была выявлена положительная реакция E-cadherin ($p = 0,0187$; Рисунок 8). Анализируя научную литературу, мы не обнаружили исследований, изучающих связь экспрессии E-cadherin с молекулярным подтипом MSI. Вероятнее всего, это связано с тем фактом, что потеря экспрессии E-cadherin чаще всего связана с молекулярным подтипом GS, и поэтому поиск взаимосвязи положительной реакции с другими подтипами мог не вызвать интереса в научной среде.

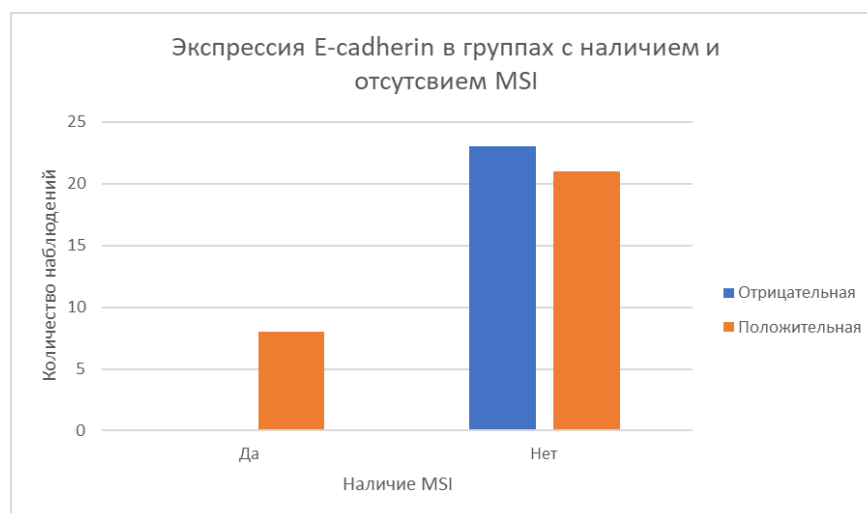


Рисунок 8 - Сравнительная характеристика взаимосвязи экспрессии E-cadherin в случаях с наличием или отсутствием MSI

Согласно дизайну нашего исследования, следующий этап включал оценку PD-L1 и HER2-статусов опухоли.

В нашей работе положительный PD-L1 статус опухоли мы обнаружили в 15,38% случаев (Рисунок 9).

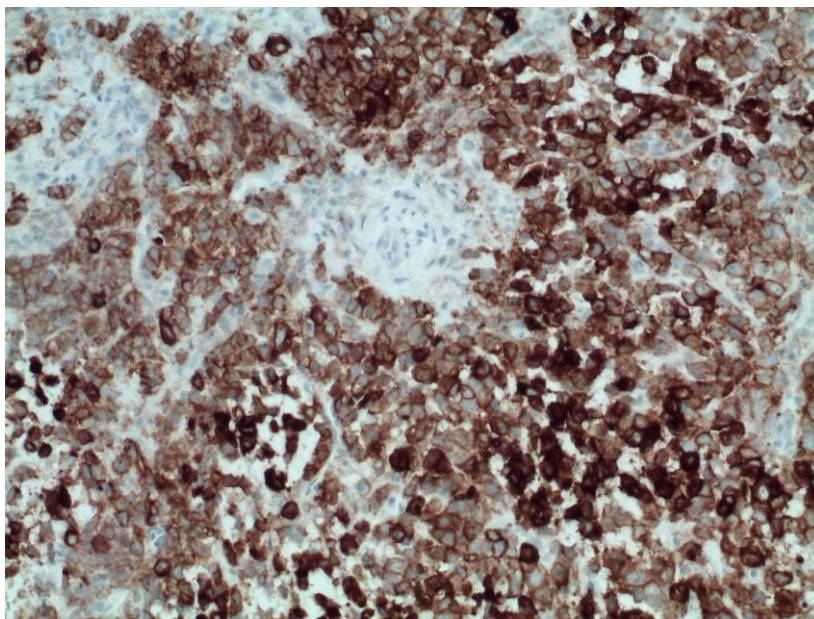


Рисунок 9 – Микрофотография. Иммуногистохимическое исследование с антителом к PD-L1, CPS >10, но <20, x400

Экспрессия PD-L1 часто наблюдается в молекулярных подтипах, обусловленных EBV и MSI (Yoshida T. et al., 2022). Нам также удалось выявить достоверно статистическую значимость между экспрессией PD-L1 и MSI-статусом опухоли ($p < 0,001$). Само по себе сочетание положительной экспрессии PD-L1 и MSI опухоли является благоприятным прогностическим фактором для лечения больных с РЖ (Liu X. et al., 2020). Второе важное обстоятельство, которое мы зарегистрировали – это то, что во всех положительных PD-L1 случаях всегда была положительная экспрессия антител к E-cadherin. Этот факт, на наш взгляд, является логичным, исходя из данных, что отрицательная экспрессия E-cadherin сопряжена с GS молекулярным подтипом опухоли (Bass A. J. et al., 2014). В 3,84% наблюдениях нами был выявлен положительный PD-L1 статус опухоли в сочетании с aberrантной экспрессией p53, вероятнее всего, именно эти случаи могут быть отнесены к молекулярному подтипу, обусловленному CIN.

Kim W. H. et al. (2018), по данным своего исследования, сообщили, что общая распространенность гиперэкспрессии HER2 среди пациентов с РЖ составляет 14,2%. Нами положительный HER2-статус опухоли был обнаружен в 3,84% случаев, еще у 5,77% – неопределенный, однако после проведения флуоресцентной гибридизации *in situ* все случаи с неопределенным статусом оказались негативными. Beer A. et al. (2020) в своем исследовании сообщали о значительно более высоких показателях экспрессии PD-L1 в HER2-отрицательных опухолях, в то время как Wang L. et al. (2018) выявили противоположные результаты. Нами не было выявлено статистически значимых различий между PD-L1 и HER2-статусами опухоли, что совпадает с результатами исследований Attia S. et al. (2022) и Lordick F. et al. (2022).

Следующий этап нашего исследования заключался в определении частоты встречаемости *H. pylori* и герпесвирусов (EBV, CMV и HHV6) среди пациентов с РЖДТ. В нашей работе мы использовали гистохимический и иммуногистохимический методы выявления *H. pylori*. Оба метода показали наличие *H. pylori* у 9,61% пациентов. Behera A. K. et al. (2022) сообщают, что при гистопатологическом исследовании ассоциация *H. pylori* была обнаружена у

32,07% пациентов с РЖДТ. По данным ученых из России (Сенчукова М. А. и др., 2021), более высокая степень контаминации слизистой желудка коккоидными формами *H. pylori* достоверно чаще наблюдалась при РЖДТ. Низкий показатель выявления *H. pylori* в нашей работе, вероятнее всего, связан с тем, что не во всех случаях мы имели возможность оценить контаминацию *H. pylori* непосредственно в интактной слизистой желудка, а отрицательный результат в ткани опухоли не исключает возможного наличия бактерий у данных пациентов.

Tavakoli A. et al. (2020), по данным своего крупного мета-анализа выявили, что общая распространенность EBV среди больных раком желудка из 26 стран составляет 8,77%, с примерно одинаковой частотой как при РЖКТ, так и РЖДТ. Алентов И. И. и др. (2021) сообщили, что в России частота EBV-положительных РЖ составила 2,4%, это значительно ниже, чем в странах Западной Европы. Имеются единичные данные, свидетельствующие о возможном вкладе в развитие карциномы желудка не только EBV, но и других герпесвирусов, таких как CMV и HHV6 (Cantalupo P. G. et al., 2018). В нашей работе диагностика EBV с помощью ИГХ метода не выявила положительных наблюдений, однако используя у этих же пациентов метод ПЦР в реальном времени, положительный результат был зафиксирован у 46,15%. CMV был обнаружен у 15,38%, а HHV6 – у 9,61% наблюдений (Рисунок 10).



Рисунок 10 – Результаты полимеразной цепной реакции в реальном времени на наличие вирусов

Противоречивые, на первый взгляд, данные, полученные нами в ходе диагностики вируса EBV методом ИГХ и ПЦР в режиме реального времени, обусловлены, несомненно, более высокой специфичностью метода ПЦР в режиме реального времени, ввиду определения частиц ДНК, оставшихся в клетках памяти человека после перенесенной EBV инфекции, которая часто протекает в латентной форме.

В заключительный этап нашего исследования входило иммунофенотипирование с использованием панели антител: CK7, CK20, MUC1, MUC2, MUC5AC, CDX2.

В нашей работе мы отметили положительную экспрессию с антителами к CK7 в 82,7% наблюдений, а к CK20 в 48%, данные результаты совпадают с мировыми научными данным, в том числе и с последним проведенным исследованием Kim M. A. et al. (2004). При оценке вариационных комбинаций экспрессии CK7 и CK20 нами были получены следующие показатели: CK7-/CK20- в 3,85% (n = 2) наблюдений, сочетание CK7-/CK20+ выявлено в 13,46% (n = 7), CK7+/CK20- в 48,08% (n = 25) случаев и CK7+/CK20+ в 34,61% (n = 18) (Таблица 2), что соответствует данным крупного анализа экспрессии CK7/CK20 в различных опухолях (Dum D. et al., 2022).

Таблица 2 – Распределение результатов иммуногистохимической экспрессии с антителами к СК7/СК20 по группам

Количество случаев (n)	СК7-/СК20-(%)	СК7-/СК20+ (%)	СК7+/СК20- (%)	СК7+/СК20+ (%)
52	3,85% (n = 2)	13,46% (n = 7)	48,08% (n = 25)	34,61% (n = 18)

Проведенный нами статистический анализ также выявил взаимосвязь положительной экспрессии с антителами к СК7 в группе с наличием MSI ($p = 0,0009$), во всех этих случаях наблюдалась выраженная интенсивность окрашивания опухолевых клеток (Рисунок 11).

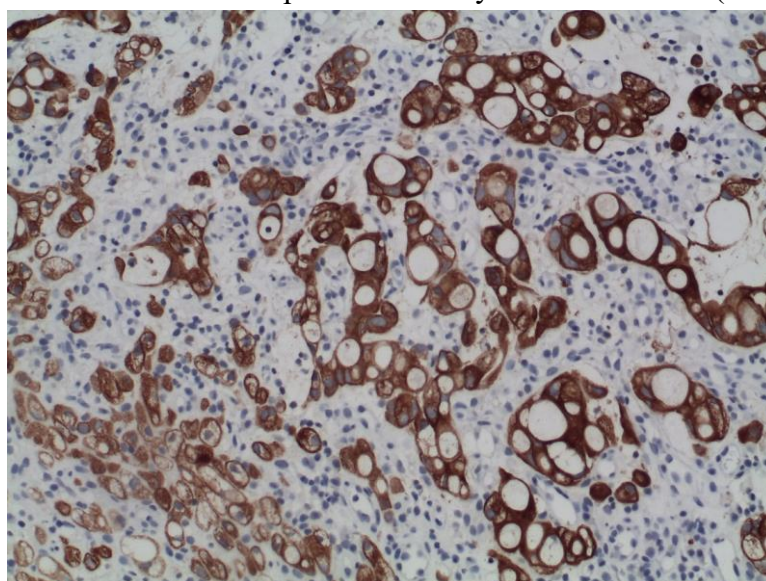


Рисунок 11 - Микрофотография. Иммуногистохимия. Сильная реакция с антителами к СК7, x200

Кроме того, были получены достоверные данные связи отрицательной экспрессии СК20 в группе с наличием MSI ($p = 0,01$), что совпадает с результатами Dum D. et al. (2022). Единственной комбинацией варианта экспрессии цитокератинов при наличии MSI была СК7+/СК20-.

В нашей работе положительная экспрессия с антителами к MUC1 была выявлена в 82,69%, а отрицательная – в 17,31% случаев (Таблица 3). Не существует единого мнения о связи экспрессии MUC1 с прогнозом и гистологическими формами РЖ. Так, İlhan Ö. et al. (2010) сообщали, что уровень экспрессии MUC1 снижался при потере опухолевой дифференцировки, Lee H. S. et al. (2001) выявили, что у пациентов с MUC1-положительным раком выживаемость была значительно ниже, чем у пациентов с MUC1-отрицательным раком.

Современные научные исследования сообщают о том, что выраженная экспрессия MUC1 сопряжена с более агрессивным течением болезни и обычно ассоциирована с РЖДТ или распространенными формами течения РЖКТ (Kim Y. I. et al., 2023), что соотносится с нашими собственными результатами. Также мы выявили взаимосвязь между отрицательной экспрессией с антителами к MUC1 в группе с наличием MSI ($p < 0,001$). Однако нами не было найдено публикаций, в которых исследователи оценивали экспрессию муцинов с РЖ, обусловленным MSI.

Отсутствие единого мнения в отношении экспрессии MUC2 также прослеживается в анализе научной литературы. İlhan Ö. et al. (2010) сообщают о том, что частота положительной экспрессии MUC2 была выше при РЖДТ, чем РЖКТ, однако Xiao L. J. et al. (2012) получили противоположные данные, которые показывают, что MUC2 чаще выявляется в РЖКТ. В недавнем опубликованном систематическом обзоре и мета-анализе (Hu L. N. et al., 2021) сообщается, что положительные случаи MUC2 коррелируют с более низкой стадией опухоли и более низкой скоростью лимфатической инвазии, однако не было выявлено значимой связи между экспрессией MUC2 и другими клинико-патологическими параметрами, включая пол, размер опухоли, классификацию Lauren и степень дифференцировки опухоли. В нашем исследовании положительная экспрессия с антителом к MUC2 была выявлена в 17,31% наблюдений, а отрицательная – у 82,69% пациентов с РЖДТ (Таблица 3).

В отношении экспрессии MUC5AC также имеются данные о том, что уровень экспрессии снижался с потерей опухолевой дифференцировки (İlhan Ö. et al., 2010). Kim S. M. et al. (2014) выявили, что низкая экспрессия MUC5AC была идентифицирована как независимый плохой прогностический фактор при РЖДТ. Rico S. D. et al. (2021) сообщают о высоких показателях положительных результатов экспрессии с антителами к MUC5AC, которые наблюдались при РЖДТ в 44% случаев. В нашей работе положительная экспрессия с антителами к MUC5AC была выявлена в 71,15%, а отрицательная – в 28,85% наблюдений (Таблица 3). Кроме того, нами показана статистическая взаимосвязь между положительной экспрессией MUC5AC в группе с отсутствием признаков MSI ($p < 0,001$).

Таблица 3 – Результаты иммуногистохимической экспрессии с антителами к муцинам

Результат экспрессии	MUC1 (%)	MUC2 (%)	MUC5AC (%)
Положительный	82,69 % (n = 43)	17,31% (n = 9)	71,15% (n = 37)
Отрицательный	17,31 % (n = 9)	82,69% (n = 43)	28,85% (n = 15)

Мы провели сравнительную характеристику иммуногистохимической реакции с АТ к MUC1, MUC2 и MUC5AC. Так, сочетание MUC1+, MUC2+, MUC5AC+ было зафиксировано в 6 наблюдениях, MUC1+, MUC2-, MUC5AC+ встречалось у 29 пациентов, MUC1+, MUC2-, MUC5AC- – в 8 случаях, MUC1-, MUC2-, MUC5AC- – у 4 пациентов, MUC1-, MUC2+, MUC5AC- – в 3 наблюдениях, MUC1-, MUC2-, MUC5AC+ – у 2 пациентов (Рисунок 12).

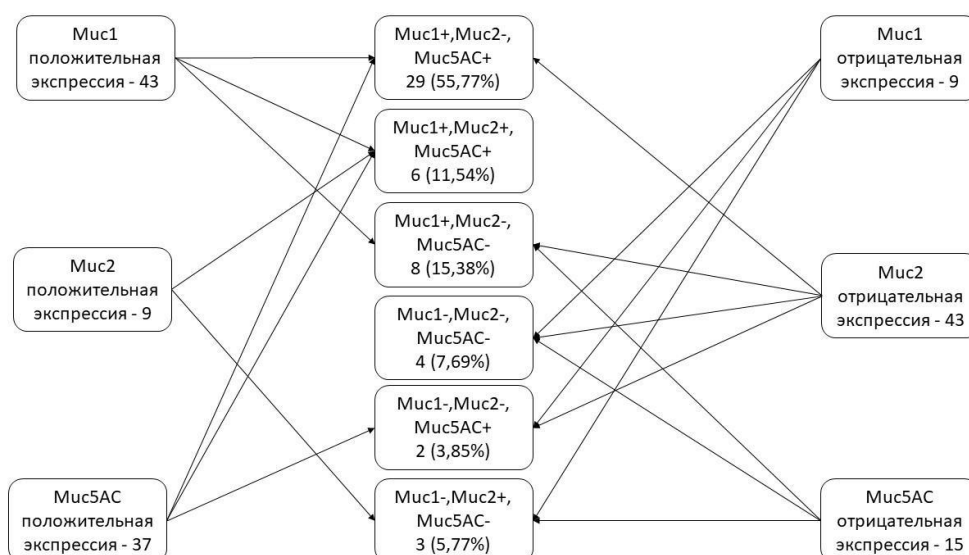


Рисунок 12 - Оценка иммуногистохимической экспрессии с антителами к муцинам

Sardar A. A. et al. (2022) в своем исследовании продемонстрировали, что экспрессия CDX2 обнаруживается как при РЖКТ, так и при РЖДТ, однако в РЖДТ положительная экспрессия выявляется значительно реже, чем при РЖКТ; эти результаты совпадают с данными Qin R. et al. (2012) и Kim K. et al. (2021). В нашей работе мы исследовали экспрессию CDX2 только у пациентов с РЖДТ. Положительная экспрессия с антителами к CDX2 была выявлена в 40 наблюдениях (76,93%; Рисунок 13).

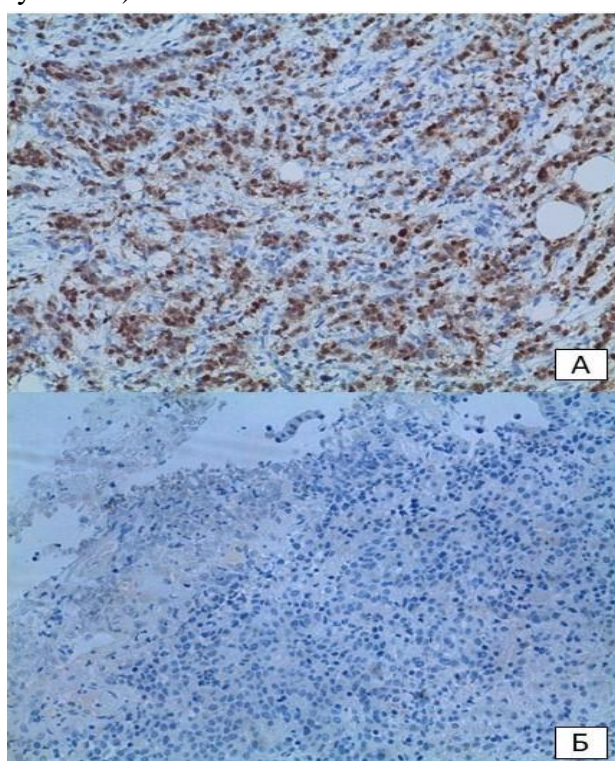


Рисунок 13 - Микрофотография. Иммуногистохимия. Положительная иммуногистохимическая экспрессия с антителами к CDX2 (А), отрицательная (Б), х200

Исходя из полученных результатов нашей работы, мы можем предположить схему определения молекулярного подтипа внутри случаев РЖДТ с помощью метода ИГХ. Главными

показателями здесь будут служить результаты ИГХ исследования с антителами к EBV, MSI, p53 и E-cadherin. Так, при положительной экспрессии с антителами к EBV данный случай следует отнести к EBV-ассоциированному молекулярному подтипу, однако мы считаем необходимым отметить, что положительный результат необходимо подтвердить, используя метод гибридизации *in situ*. Следующим этапом происходит определение экспрессии MSI, и при положительном результате данный случай РЖДТ классифицируется как обусловленный MSI. Третьим этапом мы оцениваем экспрессию E-cadherin, при отрицательной экспрессии следует отнести такой случай в молекулярный подтип GS. Заключительным этапом в определении молекулярного подтипа производится оценка p53, где при выявлении aberrантной экспрессии в сочетании с положительным PD-L1 статусом следует считать такой случай как обусловленный CIN.

Мы считаем, что каждый этап в данном диагностическом пуле необходим для исключения ошибочной трактовки полученных данных, и поэтому стоит рекомендовать в каждом случае генетическое исследование материала для подтверждения молекулярного подтипа РЖДТ.

В ходе проведенного нами исследования был разработан алгоритм и способ дифференциальной диагностики молекулярных подтипов РЖДТ (Рисунок 14), а также были получены данные об особенностях экспрессии MUC1, CK7, CK20, E-cadherin и PD-L1 в случаях выявления молекулярного подтипа РЖДТ, обусловленного MSI.



Рисунок 14 – Алгоритм исследования с раком желудка диффузного типа

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение РЖДТ остается перспективным направлением в современной онкоморфологии, особенно повышается актуальность этой темы благодаря развитию и высокой доступности сочетания патоморфологических и молекулярно-генетических исследований. Новые научные концепции позволяют взглянуть на РДЖТ как на гетерогенное по своей молекулярно-генетической структуре заболевание. Если первоначально считалось, что РДЖТ является GS-молекулярным подтипом, то на сегодняшний день принято говорить, что РДЖТ в основном представлен GS-молекулярным подтипом. Практикующие патологоанатомы и научные исследователи чаще обращают внимание на выявление молекулярных подтипов MSI и CIN при диагностике РЖДТ. Здесь мы считаем необходимым снова обратиться к теории существования «кластеров» РЖДТ: исходя из ее концепции, все случаи РЖДТ, обусловленные GS-молекулярным подтипом, следует трактовать как основной «кластер» РЖДТ, а наблюдения, в которых будет выявлен иной молекулярный подтип РЖДТ (MSI, CIN, EBV), необходимо отнести к кишечноподобному «кластеру» РЖДТ. Наше исследование было направлено на выявление морфологических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических данных, которые позволили нам правильно классифицировать различные варианты «кластера» РЖДТ.

В нашей работе с помощью ИГХ нам удалось выявить случаи РЖДТ с признаками MSI, а дальнейшая оценка ИГХ профиля выявила особенности экспрессии некоторых антител у данной группы пациентов. К этим особенностям следует отнести отрицательную экспрессию MUC1, сочетание выраженной положительной экспрессии CK7 при наличии отрицательной экспрессии CK20, положительную экспрессию E-cadherin и положительный статус PD-L1. Помимо этого, мы обратили внимание на aberrантную экспрессию p53 как на возможный предиктор диагностики РЖДТ, обусловленного CIN, но только в сочетании с положительным PD-L1 статусом. Говоря о EBV, научное сообщество не отрицает возможную роль вируса как одного из инициаторов патогенеза развития РЖДТ, однако пока не было сообщено об обнаружении молекулярного подтипа РЖДТ, обусловленного EBV. Практически во всех описанных в научной литературе случаях EBV-ассоциированных карцином желудка данную опухоль относят к гистологическому типу с выраженной лимфоидной стромой. Полученные нами данные подтверждают теорию существования «кластеров» РЖДТ, а некоторые результаты нашего исследования могут быть применены для дальнейшего углубленного изучения этой темы, формирования персонализированных подходов к диагностике и ведению пациентов с РЖДТ. В ходе проведенного нами исследования был разработан способ дифференциальной диагностики «кластеров» РЖДТ, а также были получены данные об особенностях экспрессии MUC1, CK7, CK20, E-cadherin и PD-L1 в случаях выявления молекулярного подтипа РЖДТ, обусловленного MSI.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что средний возраст пациентов с раком желудка диффузного типа соответствует 68 годам, при этом медиана возраста у мужчин 68 лет, а у женщин – 72, $p = 0,006$. Соотношение мужчин и женщин в когорте обследованных составило 1:1. Локализация злокачественной опухоли чаще наблюдалась в теле желудка (40,1%), на втором месте по распространенности следует поражение двух или более локализаций (38,1%).

2. Рак желудка диффузного типа относится к молекулярно-генетическому гетерогенному заболеванию: молекулярный подтип со стабильным геномом представлен в

44,23% наблюдений; молекулярный подтип, обусловленный микросателлитной нестабильностью, – в 15,38%; молекулярный подтип, связанный с хромосомной нестабильностью – 3,84%; молекулярного подтипа, ассоциированного с вирусом Эпштейн-Барр, выявлено не было; 36,5% клинических наблюдений не были отнесены ни к одному из молекулярных подтипов рака желудка диффузного типа.

3. Установлено, что частота встречаемости *H. pylori* у пациентов с раком желудка диффузного типа составила 9,61% наблюдений, EBV – 46,15%, CMV – 15,38% и HHV6 – 9,61%. Взаимосвязи между инфекционным агентом и молекулярным подтипом рака желудка диффузного типа выявлено не было.

4. Для рака желудка диффузного типа со стабильным геномом характерна отрицательная экспрессия E-cadherin и отрицательный PD-L1 статус ($p = 0,0288$); для случаев, обусловленных микросателлитной нестабильностью, – положительная экспрессия E-cadherin ($p = 0,0187$) и CK7 ($p = 0,0009$), отрицательная экспрессия CK20 ($p = 0,01$) и MUC1 ($p < 0,001$), положительный PD-L1 статус опухоли ($p < 0,001$); для молекулярного подтипа, связанного с хромосомной нестабильностью, выявлены: aberrантная экспрессия p53, положительная экспрессия E-cadherin ($p < 0,001$) и положительный PD-L1 статус опухоли.

5. Для клинико-морфологической диагностики молекулярно-генетических подтипов рака желудка диффузного типа необходимо проведение гистологической и гистохимической окраски ШИФФ-реактивом в сочетании с альциановым синим с целью выявления перстневидно-клеточного компонента, а также иммуногистохимическое исследование с панелью антител, включающей E-cadherin, p53, MSI, EBV, MUC1, CK7, CK20, HER2 и PD-L1.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты проведенного исследования показывают клинико-морфологическую и молекулярно-генетическую неоднородность рака желудка диффузного типа и необходимость расширенного патоморфологического исследования у пациентов с данной формой карциномы. Для эффективной диагностики рака желудка диффузного типа мы рекомендуем:

1. Проводить патоморфологическое исследование срезов, окрашенных гематоксилином и эозином и ШИК-реакцией в сочетании с альциановым синим, для определения перстневидно-клеточного компонента. В заключении необходимо отражать процентное соотношение содержания перстневидных клеток, используя следующие градации: менее 10%, от 10 до 90% и более 90% в составе опухоли.

2. Определить молекулярно-генетический подтип, используя антитела к E-cadherin, p53, MSI, EBV. В случае положительного результата с любым из вышеперечисленных антител необходимо подтвердить результат с помощью генетических методов исследования.

3. Независимо от результатов определения молекулярно-генетического подтипа провести иммуногистохимическое исследование с антителами к MUC1, CK7, CK20, HER2 и PD-L1 (клон SP263), используя систему подсчета Combined Positive Score (CPS).

4. При формировании заключения прижизненного патолого-анатомического исследования необходимо использовать две гистологические классификации (Lauren и ВОЗ), отразить процентное содержание перстневидно-клеточного компонента, HER2 и PD-L1 статус опухоли.

Таким образом, исследование рака желудка диффузного типа должно проходить с учетом морфологических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических данных. Это позволит правильно трактовать гистологический тип и молекулярно-генетический подтип, который напрямую влияет на определение тактики лечения, выбора пациентов, которым показана таргетная терапия и не рекомендована неоадьювантная и системная химиотерапия.

Полученные данные, на наш взгляд, имеют важное значение для формирования рекомендаций прижизненного патоморфологического исследования рака желудка диффузного типа, а также расширяют представления о молекулярно-генетической неоднородности данного типа карциномы в рамках теории «кластеров».

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, индексируемых в базах данных Scopus, входящих в перечень ВАК в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук:

1. Патоморфологические и молекулярно-генетические особенности диффузного типа рака желудка / Михалева Л.М., **Мидибер К.Ю.**, Печникова В.В., Васюкова О.А., Гущин М.Ю. // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2021. – Т. 20. – № 2. – С. 168-175.

2. Клинико-морфологическая неоднородность рака желудка диффузного типа / **Мидибер К.Ю.**, Бирюков А.Е., Печникова В.В., Грачева Н.А., Шахпазян Н.К., Гюева З.В., Михалева Л.М.// **Клиническая и экспериментальная морфология.** – 2021. – Т. 10. – № S4. – С. 34-41.

Другие публикации:

1. Михалева, Л. М. Современный подход к диагностике и лечению раннего рака желудка / Л. М. Михалева, А. Е. Бирюков, **К. Ю. Мидибер** // **Новости клинической цитологии России.** – 2019. – Т. 23. – № 3. – С. 5-14.

2. Смешанный тип рака желудка: классификация, морфологическая диагностика и прогноз заболевания / Михалева Л.М., Акопян Э.П., **Мидибер К.Ю.**, Васюкова О.А. // **Клиническая медицина.** – 2020. – Т. 98. – № 3. – С. 197-202.

3. **Мидибер, К. Ю.** Диагностические возможности определения иммунофенотипа диффузного типа рака желудка в условиях гастробиопсии / К. Ю. Мидибер, Л. М. Михалева // **Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины.** – 2020. – Т. 10. – № 3. – С. 103.

4. **Мидибер, К. Ю.** Современные проблемы классификации карциномы желудка / К. Ю. Мидибер, Л. М. Михалева // **Сборник научных трудов всероссийской научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии».** — М.: Группа МДВ, 2020. — С.105-106.

5. **Мидибер, К. Ю.** Новый взгляд на морфологические варианты рака желудка диффузного типа / К. Ю. Мидибер, Л. М. Михалева // **Сборник научных трудов всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной памятной дате института (60-летию НИИ морфологии человека им. академика А.П. Авцына).** — М.: ФГБНУ НИИМЧ им. академика А.П. Авцына, 2021. — С. 133.

6. Immunohistochemical evaluation of diffuse gastric cancer morphological variants / L. Mikhaleva, **K. Midiber**, K. Maslennikina, A. Biryukov, Z. Gieva // **Virchows Arch.** – 2022. – Vol. 481 (Suppl 1). – S1–S364. – P. S219.