



УКРАЇНА

(19) UA (11) 60117 (13) U
(51) МПК
G01N 33/58 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РОЗВИТКУ РАКУ ШЛУНКА У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ АТРОФІЧНИЙ ГАСТРИТ

1

2

(21) u201014092

(22) 26.11.2010

(24) 10.06.2011

(46) 10.06.2011, Бюл.№ 11, 2011 р.

(72) ЗАК МАКСИМ ЮРІЙОВИЧ, МОСІЙЧУК ЛІДІЯ
МИКОЛАЇВНА, ГАЙДАР ЮРІЙ АДОЛЬФОВИЧ

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА ІНСТИТУТ ГАСТРО-
ЕНТЕРОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ

(57) Спосіб прогнозування розвитку раку шлунка у хворих з хронічним атрофічним гастритом, який включає проведення ендоскопічного дослідження із забором біопсійного матеріалу та визначення ступеня запалення та стадії атрофії за системою OLGA, який відрізняється тим, що додатково визначають індекс проліферації та індекс апоптозу у слизовій оболонці шлунка з подальшим статистичним аналізом їх співвідношень.

Можливість прогнозування розвитку раку шлунка (РШ) у хворих хронічним атрофічним гастритом (ХАГ) - гостра та не вирішена проблема сучасної гастроентерології.

Першим етапом у прогнозуванні розвитку РШ є визначення хворих з передраковою атрофічною перебудовою слизової оболонки (СО) шлунка (Ш) [5]. Відомий спосіб діагностики ХАГ [6], у якому за допомогою аналізу сироваткових показників гастрину-17 і пепсиногену-1 виявляються пацієнти з атрофічними змінами відповідно в антральному відділі або в тілі шлунка (або атрофія обох відділів шлунка). Головною перевагою цього методу є його неінвазивність - для діагностики не потрібно проведення ендоскопії з біопсією, а достатньо зробити визначення зазначених маркерів за допомогою імуноферментного аналізу.

До недоліків методу можна віднести:

1. Обмежену чутливість - зниження показників не фіксується при початкових стадіях атрофії.

2. Виконання цих тестів вимагає наявності спеціального устаткування, кваліфікованого персоналу й дорогих реактивів.

3. Відповідно до діючих протоколів, для постановки клінічного діагнозу необхідні дані морфологічного дослідження СО Ш.

Даний спосіб є аналогом до того, що заявляється.

До сучасних методів діагностики ХАГ відноситься система OLGA (Operative Link for Gastritis Assessment) [7]. Головною перевагою цієї системи є інтегральний підхід до аналізу атрофії у СО Ш. У даній системі виділяють 4 стадії атрофії, пацієнти

з III та IV стадіями атрофії відносяться до групи високого ризику розвитку некардіального РШ. Доповненням до даної класифікації запропонована візуально-аналогова шкала, у якій вказані еталони морфологічних змін, правила розрахунків стадії атрофії.

До недоліків даної системи можна віднести відсутність можливості прогнозування ризику розвитку РШ серед пацієнтів з однією й тією же стадією атрофії. Так відомо, що серед пацієнтів з порівняною стадією атрофії, в одному випадку РШ може розвинути протягом декількох місяців, в іншому - через десятиліття, у третьому - не розвинути зовсім.

Даний спосіб прогнозування розвитку РШ у хворих на ХАГ є найближчим до способу, що заявляється по технічній суті та ефекту, що досягається і тому обраний за прототип.

Відомо, що РШ кишкового типу розвивається в результаті порушення процесів клітинного відновлення в СО Ш. Клітинне відновлення складається із двох основних процесів - клітинної проліферації і апоптозу. Найбільш високу чутливість і специфічність серед існуючих маркерів проліферації має білок Ki-67, серед маркерів апоптозу - каспаза-3. Ці маркери визначаються імуногістохімічним методом у біоптатах СО Ш. В умовах, коли зростання клітин (процес проліферації) значно випереджає фізіологічне відмирання клітин (апоптоз) настає канцерогенна ситуація. Тобто, хворий на ХАГ, у якого у СО Ш процеси проліферації значно перевищують апоптоз має високий ризик розвитку РШ [2, 4, 5].

UA (11) 60117 (13) U

Спільними ознаками найближчого аналога (прототипу) та способу, що заявляється є: проведення ендоскопічного дослідження із забором біопсійного матеріалу з антруму - 3 фрагменти та з тіла шлунка - 2 фрагменти. Далі, за рекомендаціями системи OLGA, визначаються ступінь запалення та стадія атрофії.

Відмітними ознаками прототипу та способу, що заявляється є: визначення індексу проліферації та індексу апоптозу у СО Ш з подальшим статистичним аналізом їх співвідношень.

В основу корисної моделі поставлене завдання удосконалення способу прогнозування розвитку РШ у хворих на ХАГ таким чином, щоб серед пацієнтів з порівняною стадією атрофії СО Ш можна було визначити групу осіб з високим ризиком розвитку РШ.

Вказаний технічний результат досягається тим, що в способі прогнозування розвитку РШ у хворих на ХАГ, включають ендоскопічне дослідження із забором біопсійного матеріалу з антруму - 3 фрагменти та з тіла шлунка - 2 фрагменти, а потім визначають індекс проліферації та індекс апоптозу з подальшим статистичним аналізом їх співвідношень.

Суть способу прогнозування ризику розвитку РШ у хворих на ХАГ, полягає в наступному:

1. Хворому проводять клінічне обстеження: збір скарг, анамнезу та об'єктивне дослідження.

2. Виконують ендоскопічне дослідження шлунка із забором біопсійного матеріалу з антруму - 3 фрагменти та з тіла шлунка - 2 фрагменти.

3. За системою OLGA визначають ступінь запалення та стадію атрофії у СО Ш.

4. За допомогою імуногістохімічного дослідження визначають індекс проліферації та індекс апоптозу. Якщо у хворого індекс проліферації вірогідно ($p < 0,05$) перевищує індекс апоптозу, у такого хворого можливо прогнозувати високий ризик розвитку РШ.

Методика гістологічного дослідження. Біоптати СО Ш фіксують в 10,0 % розчині нейтрального формаліну, зневоднюють в спиртах висхідної концентрації і заливають у парафін. Гістологічні зрізи товщиною 5 мкм забарвлюють гематоксиліном і еозином за Маллорі-Спинченко. Для напівкількісної оцінки морфологічних змін СО Ш використовують візуально-аналогову шкалу, у якості градації використовують позначення: 0 - відсутність ознаки; 1 - слабкий ступінь виразності ознаки; 2 - помірна; 3 - виражена. Потім по таблиці (табл. 1) визначають стадію атрофії [1].

Таблиця 1.

Інтегральний показник стадії гастриту в системі OLGA.

Анtrum	Тіло			
	0	I	II	III
0	Стадія 0	Стадія I	Стадія II	Стадія II
I	Стадія I	Стадія II	Стадія II	Стадія III
II	Стадія II	Стадія II	Стадія III	Стадія IV
III	Стадія III	Стадія III	Стадія IV	Стадія IV

Імуногістохімічне дослідження виконували на парафінових зрізах із застосуванням стрептавідин-біотинного методу. У якості первинних антитіл використовують мишачі моноклональні антитіла: Ki-67, клон MIB-1; каспаза-3, клон JHM62. Для другого шару використовують біотиліновані антитіла й стрептавідин, мічений пероксидазою. Як хромоген використовується 3,3-діамінобензидину тетрахлорид. Ядра клітин дофарбують гематоксиліном Майера. У препаратах при 400-кратному збільшенні мікроскопу визначають ядерну мітку Ki-67. Індекс проліферації розраховують як частку (в %) позитивно пофарбованих ядер епітеліоцитів СО Ш у межах проліферативного компартменту (верхня третина залоз, регіон перехідної й покровно-ямковий епітелій, де виявляється мітка при розширенні зони проліферації) в 5-ти випадково обраних полях зору (>500 клітин). Індекс апоптозу (перинуклеарна або цитоплазматична мітка csp32 - caspase-3) визначався як відсоток позитивно пофарбованих епітеліоцитів у 10-ти випадково обраних полях зору (>1000 клітин), оскільки «зони апоптозу» у СО Ш розташовані більш варіабельно, ніж зони проліферації [1].

Потім проводять статистичний аналіз індексу проліферації апоптозу. Для порівняння розподілу

частот індексу проліферації й індексу апоптозу використовують критерій %2 або критерій Смирнова-Колмогорова. Відмінність вважається вірогідною, якщо досягнутий рівень значимості (p) нижче 0,05 [3].

Запропонований спосіб дозволяє визначити серед хворих на ХАГ осіб з високим ризиком розвитку РШ. За даним методом обстежено 183 хворих з різною стадією атрофії СО Ш. Підвищений ризик розвитку РШ серед 43 пацієнтів з IV стадією атрофії був встановлений у 9 (20,9 %) осіб, серед 59 хворих з III стадією атрофії - у 11 (18,6 %) осіб, серед 49 пацієнтів з II стадією атрофії - у 2 (4,1 %) осіб та був відсутній у хворих з I стадією атрофії (32 особи).

Використовування способу прогнозування розвитку РШ у хворих з хронічним атрофічним гастритом лікування пацієнтів з ХАГ, що заявляється, ілюструється наступними прикладами конкретного застосування.

Приклад 1. Хвора С., 52 роки, звернулась до ДУ «Інститут гастроентерології АМН України» 18.10.2010 зі скаргами на почуття тяжкості, переповнення у верхній часті живота після їди, поганий апетит, нудоту, загальну слабкість, втомлюваність.

З анамнезу: хворіє на хронічний гастрит більш 20 років.

При огляді стан хворої середньої тяжкості. Шкіра звичайного кольору, язик у кореня обкладений білим нальотом. Набряків немає. Тони серця ритмічні, приглушені. АТ 125/80 мм.рт.ст., пульс - 79 уд/хв. Над легеньми дихання везикулярне, хрипів немає. Живіт при пальпації болісний у ділянці епігастрію та підреб'ях.

Загальний аналіз крові: гемоглобін - 129 г/л, еритроцити - 4,7, цв.пок. - 0,89, лейкоцити - 5,6, ШЗЕ - 10 мм/год., палички - 2 %, сегменти - 54 %, лімфоцити - 38 %, моноцити - 6 %, тромбоцити - 325.

Біохімічний аналіз крові: загальний білок - 80 г/л, білірубін загальний - 14,9 ммоль/л, прями - немає, лужна фосфатаза - 0,72 Е/л, АлАТ - 5,7 ммоль/л, глюкоза - 4,0 ммоль/л, амілаза - 9,6 г/л.

ФЕГДС: вогнищева атрофія СО Ш, гастропатія. Уреаза тест - позитивний.

Морфологічне дослідження біоптатів СО Ш за системою OLGA. Ступінь запалення - III, стадія атрофії - II.

Цитологічне дослідження біоптатів з антрального відділу шлунка - хелікоподібна флора, високий ступінь заселення.

Рівень індексу проліферації склав (78,70±6,45) од., рівень індексу апоптозу - (51,30±5,04) од. (p<0,05). Вірогідне підвищення індексу проліферації над індексом апоптозу свідчить про високий ризик розвитку РШ у даної хворої.

Приклад 2. Хворий С, 60 років. Звернувся до ДУ «Інститут гастроентерології АМН України» 03.09.2010 зі скаргами на появу ниючого болю й дискомфорту в надчревній області після їди, почуття швидкого насичення, відрижка, схильність до запору, сухість шкіри, втомлюваність, слабкість.

З анамнезу: хворіє на хронічний гастрит близько 15 років.

При огляді стан хворого відносно задовільний. Шкіра звичайного кольору. Язик обкладений білим нальотом. Набряків немає. Тони серця ритмічні, приглушені. АТ 130/80 мм.рт.ст., пульс - 68 уд/хв. Над легеньми дихання везикулярне, хрипів немає. Язик вологий, обкладений білим нальотом. Живіт при пальпації помірно болісний в епігастрію та підреб'ях. Печінка та селезінка не пальпуються.

Загальний аналіз крові: гемоглобін - 121 г/л, еритроцити - 4,4, цв.пок. - 0,9, лейкоцити - 7,4, ШЗЕ - 10 мм/год., еозинофіли - 4 % палички - 2 %, сегменти - 66 %, лімфоцити - 24 %, моноцити - 4 %, тромбоцити - 349.

Біохімічний аналіз крові: загальний білок - 78 г/л, білірубін загальний - 12,8 ммоль/л, прями - немає, лужна фосфатаза - 0,62 Е/л, АлАТ - 0,42 ммоль/л, глюкоза - 4,9 ммоль/л, амілаза - 11,9 г/л.

ФЕГДС: вогнищева атрофія СО Ш, гастропатія, бульбопатія. Дуоденогастральний рефлюкс. Уреаза тест - позитивний.

Морфологічне дослідження біоптатів СО Ш за системою OLGA. Ступінь запалення - III, стадія атрофії - III.

Цитологічне дослідження біоптатів з антрального відділу шлунка - хелікоподібна флора, середній ступінь заселення.

Рівень Ki-67 склав (56,40±5,31) од., рівень каспази-3 - (48,80±4,11) од. (p>0,05). Індекси проліферації та апоптозу суттєво не відрізняються. Висновок: у даного хворого ризик розвитку РШ не високий.

Таким чином, спосіб є ефективним та придатним до застосування в медичних закладах.

Література:

1. Аруин Л.И. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника / Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. - М.: Трида. - Х., 1998. - 496 с.

2. Бабак О.Я. Современные представления об оценке риска развития и профилактике рака желудка // Сучас. гастроентерологія. - 2009. - № 6. - с. 62-66.

3. Бабич П.Н. Применение статистических методов в практике клинических исследований / П.Н. Бабич, А.В. Чубенко, С.Н. Лапач // Український медичний часопис. - 2004. - № 2 (40). - с. 138-143.

4. Пиманов С.И., Макаренко Е.В. Хронический гастрит: достижения и проблемы последнего десятилетия // Клиническая медицина. - 2005. - № 1. - с. 54-58.

5. Філіппов Ю.А. Рак шлунка. Рання діагностика й лікування // Гастроентерологія: Міжвід. зб. - Вип. 38. - 2007. - с. 307-315.

6. di Mario F., Cavallaro L.G. Non-invasive tests in gastric disease. // Dig Liver Dis. - 2008. - Vol. 40 (7). - P. 523-530.

7. OLGA staging for gastritis: a tutorial (Review) / Rugge M, Correa P, Di Mario F, El-Omar E, Fiocca R, Geboes K, Genta RM, Graham DY, Hattori T, Malfertheiner P, Nakajima S, Sipponen P, Sung J, Weinstein W, Vieth M // Digestive and liver disease. - 2008. - Vol. 109 (1). - P. 650-658.