



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
"CAROL DAVILA" BUCUREȘTI  
ȘCOALA DOCTORALĂ  
GASTROENTEROLOGIE

FACTORI DE PREDICȚIE AI LEZIUNILOR  
PREMALIGNE AVANSATE GASTRICE ȘI  
AI CANCERULUI GASTRIC  
- REZUMAT -

Conducător de doctorat:

Prof. Dr. Cristian GHEORGHE

Student-doctorand:

Bogdan COTRUȚĂ

**CUPRINS TEZĂ DOCTORAT**

INTRODUCERE	1
<b>I. PARTEA GENERALĂ</b>	<b>7</b>
1. CANCERUL GASTRIC – DATE GENERALE	8
1.1. Epidemiologie	8
1.2. Clasificarea generală a cancerului gastric	11
Cancerul gastric sporadic	11
Cancerul gastric cu debut precoce	11
Cancerul gastric asociat bontului gastric	11
Cancerul gastric ereditar difuz	12
1.3. Clasificarea histopatologică a cancerului gastric	12
Diferențe ale carcinoamelor gastrice de tip intestinal versus difuz	12
Clasificarea OMS a cancerelor gastrice	13
2. FACTORI DE RISC AI CANCERULUI GASTRIC	16
2.1. Factori de risc legați de stilul de viață	16
Obiceiurile alimentare	16
Fumatul și consumul de alcool	17
Obezitatea	18
Statusul socioeconomic	18
2.2. Factori genetici și ereditari	18
2.3. Infecția cu <i>Helicobacter pylori</i>	21
2.4. Gastrita atrofica și metaplazia intestinală	23
2.5. Displazia gastrică	26
2.6. Alte leziuni premaligne gastrice	27
Anemia pernicioasă – gastrita atrofică autoimună	27
Polipii gastrici	28

3.	DIAGNOSTICUL ȘI MANAGEMENTUL GRUPURILOR DE RISC PENTRU DEZVOLTAREA CANCERULUI GASTRIC	30
3.1.	Evaluarea prin metode invazive	30
	Endoscopia digestivă	30
	Evaluarea histopatologică	33
3.2.	Evaluarea prin metode non-invazive – biomarkeri utilizați pentru decelarea grupurilor de risc pentru dezvoltarea cancerului gastric	37
	Pepsinogenul I și II	37
	Gastrina-17	38
	Familia factorilor trifoizi	39
3.3.	Strategii de prevenție	42
	Eradicarea infecției <i>H.pylori</i>	42
	Chemoprevenția cancerului gastric	43
	Modificarea stilului de viață	44
	Screeningul endoscopic	45
	Screeningul prin biomarkeri al grupurilor de risc crescut pentru cancerul gastric	46
<b>II.</b>	<b>CONTRIBUȚII PERSONALE</b>	48
4.	IMBUNATAȚIREA INDEXULUI INTER-OBSERVATOR AL EVALUĂRII LEZIUNILOR ATROFICE GASTRICE PRIN ORIENTAREA FRAGMENTELOR BIOPSICE UTILIZÂND FILTRE DE CELULOZĂ	49
4.1.	Introducere	49
4.2.	Obiectivele studiului	50
4.3.	Material și metode	51
4.4.	Rezultate	55
4.5.	Discuții	71
4.6.	Concluzii	76
5.	MODELE DE PREDICȚIE PENTRU ATROFIA GASTRICĂ AVANSATĂ ȘI CANCERUL GASTRIC UTILIZÂND EXPRESIA SEROLOGICĂ A FAMILIEI DE FACTORI TRIFOIZI, FACTORI	77

EPIDEMIOLOGICI ȘI FACTORI DE RISC LEGAȚI DE STILUL DE  
VIAȚĂ

5.1.	Introducere	77
5.2.	Obiectivele studiului	78
5.3.	Material și metode	78
5.4.	Rezultate	82
5.5.	Discuții	116
6.	CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE	124
6.1.	Concluzii	124
6.2.	Contribuții personale	126
	LISTĂ ABREVIERI	128
	BIBLIOGRAFIE	130
	ANEXE	
	Anexa 1 Clasificarea TNM a cancerului gastric și clasele de prognostic	145
	Anexa 2 Lista lucrărilor publicate	146

## 1. PROBLEMA FUNDAMENTALĂ:

Cancerul gastric (CG) reprezintă o boală malignă asociată cu factori predispozanți de mediu, stil de viață și genetici. Acesta reprezintă una dintre cele mai frecvente cauze de cancer la nivel global, fiind considerată a treia cauză de deces prin cancer la ambele sexe [1,2]. Deși incidența CG a scăzut la nivel global, frecvența acestuia este încă ridicată în anumite regiuni, precum Estul Asiei, America de Sud, Europa de Est și Portugalia [1-3]. Conform GLOBOCAN, rata incidenței standardizate cu vârsta pentru CG în România este de până la 13 cazuri la 100000 locuitori [2]. Unul din factorii majori responsabili pentru această variabilitate geografică este foarte probabil prevalența înaltă a infecției cu *Helicobacter Pylori* (*H. pylori*) [4,5]. *H. pylori* se estimează a fi prevalent în aproximativ 50% din populația globului, cu variabilitate în funcție de zona geografică [6].

Problema majoră a acestei patologii reprezentate de CG este dată de faptul că simptomele se instalează tardiv în evoluția bolii. Din acest motiv, majoritatea CG nu sunt descoperite în stadii precoce, ceea ce rezidă într-o rată de supraviețuire la 5 ani de sub 20-30% în marea majoritate a regiunilor [7]. Atunci când boala este limitată la nivel mucozal gastric, rata de supraviețuire la 5 ani este de aproximativ 95%. Din acest motiv decelarea grupurilor de risc pentru dezvoltarea CG și urmărirea atentă a acestora este o prioritate în vederea creșterii detecției precoce și implicit a scăderii mortalității și morbidității secundare acestei patologii. În Japonia, datorită eficacității programelor de screening în masă, ratele de supraviețuire la 5 ani raportate în stadiile I și II pentru CG sunt de până la 70% [8,9]. Prevenția primară a CG include modificarea stilului de viață, tratamentul anti *H. pylori*, chemoprevenția și screeningul pentru decelarea precoce a bolii.

Atrofia mucoasei gastrice este definită ca “pierderea glandelor normale”. Această definiție include practic două fenotipuri ale transformării atrofice: diminuarea sau dispariția completă a glandelor normale ce sunt înlocuite de țesut fibrotic prin expansiunea laminei propria sau înlocuirea glandelor native cu glande de tip metaplazic cu funcții noi – așa numita atrofie metaplazică secundară metaplaziei intestinale și/sau metaplaziei pseudo-pilorice [10].

În 1991, un consens internațional (sistemul Sydney) încerca să standardizeze evaluarea histologică a bolilor inflamatorii gastrice [11,12]. Filozofia “descriptivă” din spatele sistemului Sydney a fost recent înlocuită de o nouă abordare a raportării histologice a gastritei [10]. Noul format de diagnostic ia în calcul și stratificarea riscului de CG asociat extensiei și severității atrofiei gastrice. Noile ghiduri de management ale leziunilor premaligne gastrice (MAPS – Management of precancerous conditions and lesions în the stomach), chiar dacă accentuează importanța severității și extensiei leziunilor în definirea

riscului de CG, recomandă doar evaluarea topografică a acestora prin prelevarea de 4 biopsii din antrul și corpul gastric [13].

Au fost propuse două sisteme de stadializare: OLGA și OLGIM (Operative Link on Gastritis Assessment / Gastric Intestinal Metaplasia Assessment). Ambele se bazează pe o scală vizuală și împart modificările atrofile în cinci stadii care sunt asociate progresiv (de la 0 – fără modificări, până la IV – modificări severe și extinse la nivel antral și al porțiunii verticale gastrice). Primul sistem de stadializare a fost propus în 2005 de un grup internațional de histopatologi și gastroenterologi (OLGA) [14]. Conform sistemului de stadializare OLGA, stratificarea gastritei rezultă din combinarea scorului atrofiei evaluată la nivel antral și al unghiului gastric cu cel rezultat din evaluarea porțiunii verticale [15]. Stadiile indică practic probabilitatea individuală de a dezvolta CG, marea majoritate a acestora fiind asociate cu stadiile avansate III și IV [16]. Deoarece concordanța inter-observator a scorificării metaplaziei intestinale a fost considerată superioară celei a scorificării atrofiei, un sistem de stadializare alternativ a fost propus ulterior (OLGIM) [17]. Acesta are la bază algoritmul similar al OLGA însă ia în calcul doar evaluarea extensiei și severității metaplaziei intestinale. Există discuții la ora actuală legate de faptul că sistemul OLGIM este inclus în sistemul OLGA, iar prin concentrarea doar asupra metaplaziei intestinale, în anumite situații se produce o retrogradare a stadiilor OLGA avansate ce implicit poate conduce la ratarea anumitor subiecți aflați la risc crescut pentru dezvoltarea CG [17-19]. Oricum, ambele sisteme de stadializare stratifică subiecții în clase de risc, stadiile OLGA/OLGIM III și IV fiind considerate clase de risc crescut ce necesită supraveghere.

Atrofia mucozală gastrică și metaplazia intestinală reprezintă terenul care conferă un risc înalt pentru dezvoltarea displaziei și CG de tip intestinal [20-22]. Din acest motiv atrofia gastrică și metaplazia intestinală sunt considerate afecțiuni premaligne. Majoritatea CG de tip intestinal se dezvoltă din mucoasă de tip atrofic. Acest lucru denotă faptul că evaluarea atrofiei mucozale gastrice este un pas crucial în definirea și identificarea grupelor de risc pentru CG [23, 24]. Aproape invariabil CG este asociat stadiilor de atrofie gastrică severă. Riscul de cancer asociat stadiilor OLGA 0, I sau II, chiar dacă nu este nul, este extrem de mic, în timp ce pentru stadiile avansate III/IV (atrofie extensivă atât la nivel antral cât și în porțiunea verticală) riscul este crescut [25]. Astfel, urmărirea timp de 12 ani a unei cohorte de 93 subiecți cu variate stadii ale atrofiei gastrice conform clasificării OLGA a demonstrat faptul că stadiile avansate III/IV reprezintă grupul țintă pentru supraveghere endoscopică, aceștia fiind la risc pentru dezvoltarea displaziei și a CG [16].

Endoscopia digestivă superioară cu evaluarea histopatologică a mucoasei gastrice s-a dovedit a fi o metodă excelentă pentru investigarea subiecților cu risc crescut de CG, fiind de altfel considerată “gold-standardul” pentru diagnosticul gastritei atrofice și metaplaziei intestinale [26]. Dezavantajele majore ale endoscopiei digestive sunt date de invazivitate, costuri și volumul ridicat de muncă, ceea ce o face din punct de vedere practic inadecvată pentru screeningul în masă al populației [27]. Din acest motiv decelarea grupurilor de risc crescut pentru CG prin metode neinvazive și accesibile pentru screeningul în masă este mandatorie.

Multiple studii au fost conduse în diferite zone și populații până în prezent având ca scop principal evaluarea nivelelor serice de pepsinogen I și II (PG I / II) [28-42]. Într-o meta-analiză publicată în 2004 de Dinis-Ribeiro și colaboratorii [43], care combină datele din 42 studii ce au inclus 27 studii populaționale (296.553 pacienți) și 15 studii pe populație selectată (4385 pacienți), s-a studiat cel mai bun cut-off de diagnostic al PG pentru diagnosticul de displazie. O combinație între nivelul  $PGI < 50 \text{ ng/mL}$  și un raport  $PGI/PGII < 3$  a oferit cele mai bune rezultate, cu o sensibilitate de 65%, o specificitate de 74-85% și o valoare predictivă negativă de peste 95%.

Atrofia glandelor antrale conduce la pierderea celulelor G antrale și, drept consecință, scade capacitatea antrului de a sintetiza și secreta gastrina-17 amidată (G-17) la nivel circulator [44]. Un panel de teste serologice (GastroPanel, Biohit HealthCare) ce include PG seric (I/II), G-17 și anticorpi serici anti *H. pylori* a fost propus ca test serologic de screening pentru pacienții dispeptici. În populațiile cu prevalență scăzută a atrofiei gastrice, valoarea predictivă negativă (VPN) a acestui panel serologic pentru identificarea atrofiei gastrice este de aproximativ 97% (95% CI = 95-99%) [45]. În 2014, un studiu multicentric ce a avut ca scop testarea acurateții GastroPanel în evaluarea gastritei atrofice, a demonstrat o valoare acceptabilă a VPN de 92% (95% CI=86%-98%), însă a eșuat în a identifica 5 din 10 subiecți cu atrofi gastrică (sensibilitate = 50%) din cei 85 de subiecți incluși în studiu [46].

Familia de factori trifoizi (TFF) reprezintă un grup de trei peptide (TFF 1, 2 și 3) termostabile și rezistente la protează ce sunt secretate în special de către celulele secretante de mucus de la nivelul tractului gastro-intestinal, având la acest nivel un rol esențial în menținerea integrității împotriva agresiunilor mucozale [47, 48]. Peptidele trifoide sunt distribuite în numeroase țesuturi în cadrul organismelor sănătoase precum: sistem nervos central, rinichi, ficat, pancreas, tractul respirator și glandele salivare, însă de departe cea mai importantă expresie este la nivelul tractului gastrointestinal [49, 50]. TFF1 este predominant exprimat la nivelul celulelor foveolare gastrice și la nivelul celulelor epiteliale de suprafață la

nivelul întregului stomac. Este detectat și în partea superioară a ductelor glandelor Brunner atât la șoareci cât și la oameni [51,52]. TFF2 (polipeptid spasmolitic) este exprimat predominant în celulele epiteliale din profunzimea glandelor gastrice atât la nivelul corpului cât și la nivel antral, în celulele secretante de mucus ale glandelor gastrice și la nivelul glandelor Brunner duodenale [53,54]. Metaplazia ce exprimă polipeptidul spasmolitic (SPEM) reprezintă o linie fenotipică caracterizată prin prezența de celule pozitive pentru TFF2 la nivelul corpului gastric [55]. SPEM este frecvent observată în mucoasa gastrică ce inconjoară CG, TFF2 fiind pozitiv în 58% din CG precoce [56,57]. TFF3 este predominant exprimat la nivelul celulelor goblet de la nivelul intestinului subțire și colonului, nefiind exprimat în ficat, pancreas sau stomacul normal [58, 59]. TFF3 este de asemenea exprimat în metaplazia intestinală de la nivelul stomacului [60]. În ultimii ani, expresia serologică a TFF, și în special a TFF3, a fost studiată la subiecții cu CG, aceste peptide dovedindu-se a fi biomarkeri serologici promițători în detecția grupurilor de risc pentru CG și a CG [59-62].

În cadrul lucrării sunt prezentate două studii. Primul abordează problema îmbunătățirii indexului inter-observator în evaluarea atrofiei gastrice prin orientarea fragmentelor biopsice utilizând filtre de celuloză. Cel de-al doilea studiu analizează expresia serologică a factorilor trifoizi la subiecții cu atrofie gastrică severă, OLGA risc înalt, CG și lot control. În plus, luând în considerare factori epidemiologici, de stil de viață și expresia serologică a TFF, au fost elaborate modele de predicție ale OLGA risc înalt și CG.



## **2. IMBUNĂTĂȚIREA INDEXULUI INTER-OBSERVATOR AL EVALUĂRII LEZIUNILOR ATROFICE GASTRICE PRIN ORIENTAREA FRAGMENTELOR BIOPSICE UTILIZÂND FILTRE DE CELULOZĂ**

### **2.1.INTRODUCERE:**

Gastrita secundară infecției *H.pylori* este de departe cea mai frecventă patologie ce conduce la dezvoltarea inflamației mucozale cronice și CG. Conform cascadei Corea, triggerul este reprezentat de infecția cu *H.pylori*, care în anumite condiții, conduce la inflamație, urmată de atrofie a mucoasei gastrice cu metaplazie intestinală, displazie și în final adenocarcinom invaziv [63].

Pentru evaluarea histopatologică de rutină, clasificarea Sydney, cu varianta actualizată Houston, a fost dezvoltată pentru a descrie gradul, distribuția și originea gastritei atrofice [11]. Dezavantajul major al acestei clasificării este acela al lipsei unei stratificării a riscului de dezvoltare al CG. Din acest motiv, un grup internațional de experți gastroenterologi și histopatologi (OLGA) a dezvoltat și propus un sistem de stadializare ce ulterior s-a dovedit a avea și valoare prognostică legată de riscul dezvoltării CG [14]. Astfel, în funcție de severitatea și extensia atrofiei gastrice, sistemul OLGA propune cinci stadii (0-IV). Stadiile de risc III și IV reprezintă stadiile de risc înalt pentru dezvoltarea CG, acești subiecți fiind de altfel și grupul ce ar trebui urmărit pe termen lung. Inițial, două studii de validare au scos în evidență faptul că OLGA oferă informații clinice relevante pentru identificarea subpopulațiilor cu risc crescut pentru dezvoltarea CG, acestea fiind potențial eligibile pentru supraveghere [64, 65]. Recent, Rugge și colaboratorii [16] au descris o cohortă de subiecți cu leziuni premaligne gastrice urmărită timp de 12 ani. Doi subiecți cu stadii OLGA III/IV au dezvoltat neoplazie gastrică ( $p=0.001$ ;  $RR = 18.56$ ). Sistemul OLGA este bazat pe evaluarea severității și extensia atrofiei. În literatură indexul de concordanță inter-observator pentru evaluarea atrofiei gastrice este scăzut [66]. Din acest motiv Capelle și colab [17] au introdus un sistem modificat bazat pe analiza metaplaziei intestinale, denumit OLGIM (operative link for gastric intestinal metaplasia), cu index de concordanță inter-observator înalt. Motivul pentru care a fost propus acest sistem alternativ este dat de faptul ca metaplazia intestinală este foarte ușor de recunoscut și evaluat histopatologic. Totuși, deoarece sistemul OLGIM ia în calcul doar metaplazia intestinală sensibilitatea sa în depistarea subiecților cu risc crescut pentru dezvoltarea CG poate fi afectată. Astfel, s-a notat faptul că în anumite situații stadiile OLGA cu risc înalt sunt retrogradate la stadii cu risc mai mic OLGIM. Mai mult, există situații în care CG este asociat unor stadii cu risc scăzut

OLGIM [18]. Ideea studiului de față pornește de la prezumția conform căreia neorientarea fragmentelor biopsice gastrice reprezintă principala problemă în dificultatea unei evaluări corecte a atrofiei gastrice.

## 2.2.OBIECTIVELE STUDIULUI:

Obiectivul principal al studiului a fost de a analiza concordanța inter-observator a clasificărilor OLGA/OLGIM în situația utilizării fragmentelor biopsice gastrice orientate prin fixare pe filtre de celuloză comparativ cu utilizarea fragmentelor biopsice neorientate.

Obiectivele secundare au fost reprezentate de:

- determinarea factorilor epidemiologici asociați cu stadiile cu risc înalt OLGA/OLGIM;
- stabilirea concordanței stadiilor de risc OLGA cu stadiile de risc OLGIM;
- analiza calității secțiunilor histologice în fragmentele biopsice orientate versus neorientate;

## 2.3.MATERIAL ȘI METODEDE:

În prima parte a studiului au fost analizați 87 de subiecți cu vârsta de peste 18 ani, cu simptome dispeptice adresați pentru examen endoscopic digestiv superior, care au semnat consimțământul informat al studiului și care nu au îndeplinit nici unul din criteriile de excludere.

Criteriile de excludere au fost reprezentate de:

- Subiecți cu intervenții chirurgicale la nivel esofagian și gastric;
- Subiecți cu sângerare digestivă activă
- Examinare endoscopică necorespunzătoare (resturi alimentare etc.);
- Nerespectarea protocolului de biopsiere OLGA/OLGIM
- Asocierea de comorbidități importante (insuficiență cardiacă severă, ciroză hepatică decompensată etc.)

Pe baza unui chestionar standardizat s-au colectat date epidemiologice și de stil de viață. Examenul endoscopic s-a efectuat cu sedare profundă cu Propofol intravenos sau cu sedare superficială cu Midazolam intravenos și Xilocaină 10% local. Echipamentul endoscopic utilizat a fost Olympus® CV Evis Exera II 180 (procesor video) cu tuburi endoscopice Olympus® GIF-H180 (Olympus Medical System Corp, Tokyo, Japonia). După examinarea atentă a mucoasei esofagiene, gastrice și duodenale s-au prelevat biopsii conform protocolului OLGA/OLGIM: un fragment de pe mica curbura a antrului gastric, un fragment

de pe marea curbură a antrului gastric, un fragment de la nivelul unghiului gastric, un fragment de pe fața anterioară a porțiunii verticale gastrice și un fragment de pe fața posterioară a porțiunii verticale gastrice. Fragmentele biopsice au fost fixate pe filtre de celuloză (Endokit<sup>®</sup>, BioOptica SpA, Milano, Italia) cu baza pe filtru direct din pensa și partea mucozală superficială în sus. Acestea au fost așezate în ordine unul după altul pe câte un filtru de celuloză, notându-se cu rigurozitate numărul fragmentului și aria din care a fost prelevat (Ex. F1 orientat antru mică curbura, F2 orientat antru mare curbură etc.) pentru a putea fi reperat de către anatomopatolog. Au fost prelevate fragmente biopsice suplimentare dacă au existat leziuni la nivel eso-gastro-duodenal și au fost etichetate și dispuse în flacoane separate. După fixare, fragmentele biopsice au fost fixate în formalină 10% și dispuse în flacoane separate în funcție de zona din care au fost prelevate. După fixarea la parafină, au fost obținute minimum șase secțiuni histologice cu grosime de 4 μm. Ulterior au fost efectuate colorații cu Hematoxilină-Eosina, Giemsa și PAS.

Examinarea histopatologică a fost efectuată independent de doi histopatologi (M.D. și G.B.) ce nu au avut acces la descrierea endoscopică a cazurilor analizate. Fiecare a analizat separat stadiile OLGA sau OLGIM. Pentru evaluarea concordanței între observatori s-a utilizat testul kappa statistic pentru utilizatori multipli. Concordanța inter-observator a fost considerată scăzută dacă indexul Kappa a avut o valoare sub 0.4, moderată dacă indexul Kappa a fost cuprins între 0.4 și 0.75 și excelentă dacă valoarea indexului Kappa a fost peste 0.75.

Pentru confirmarea rezultatelor obținute din punct de vedere ale indexului de concordanță inter-observator, s-a efectuat analiza unui al doilea lot de 35 subiecți cu simptome dispeptice adresați pentru examen endoscopic digestiv superior (12 bărbați și 23 femei cu vârsta medie de  $67 \pm 8.34$  ani). De această dată au fost analizate 350 fragmente biopsice gastrice rezultate din două seturi de biopsii prelevate după protocolul OLGA/OLGIM: 175 fragmente orientate utilizând filtre de celuloză și 175 fragmente biopsice gastrice neorientate. Subiecții care nu au fost de acord și nu au semnat formularul de consimțământ informat, cei cu sângerarea activă în timpul examinării, cu cancer gastric sau cu comorbidități importante asociate, au fost excluși de la înrolare.

De această dată au fost prelevate două serii de biopsii conform protocolului OLGA/OLGIM: o serie de biopsii orientate și o serie de biopsii neorientate. Astfel, au fost prelevate de la fiecare subiect un minim de 10 fragmente biopsice: 5 orientate și 5 neorientate. Inițial au fost prelevate fragmentele orientate: un fragment de pe mica curbură a antrului gastric, un

fragment de pe marea curbură a antrului gastric, un fragment de la nivelul unghiului gastric mica curbură, un fragment de pe fața anterioară a porțiunii verticale gastrice și un fragment de pe fața posterioară a porțiunii verticale gastrice. Acestea au fost fixate în ordine și etichetate pentru identificare utilizând filtre de nitroceluloza. În aceeași sesiune, de la același subiect, a fost prelevat un set similar de fragmente biopsice ce însă nu au fost orientate și au fost dispuse în flacoane separate pentru identificare direct din pensa de biopsie în soluția de formalină 10%. Acestea au fost prelevate la 5 mm stânga față de zona de unde au fost prelevate fragmentele biopsice orientate din seria inițială. De asemenea au fost prelevate fragmente biopsice suplimentare din orice leziune decelată suplimentar, fragmente ce au fost etichetate în flacoane separate. Analiza rezultatelor histopatologice a fragmentelor prelevate din leziunile suplimentare nu a făcut obiectul studiului de față.

Cel mai sever scor histopatologic OLGA/OLGIM a fost considerat pentru rezultatul final. Stadiile OLGA/OLGIM 0, I și II au fost considerate stadii cu risc scăzut, iar stadiile OLGA/OLGIM III și IV au fost considerate stadii cu risc crescut. Fragmentele biopsice au fost analizate independent de doi anatomopatologi (GB și MD) în două sesiuni distincte pentru fragmentele orientate și neorientate. Anatomopatologii nu au avut acces în timpul examinării la datele clinice, biologice și endoscopice ale subiecților. Calitatea fragmentelor biopsice a fost definită de identificarea laminei propria mucozale. Dacă lamina propria mucozală a fost identificată, fragmentul a fost considerat a avea o calitate bună. Indexul de concordanță inter-observator a fost calculat utilizând testul Kappa pentru concordanța inter-observator. În plus, a fost calculată concordanța inter-observator pentru scorul de risc înalt/risc scăzut pentru atrofie și metaplazie intestinală la nivel antral și al porțiunii verticale gastrice. Scorul de risc scăzut / risc înalt pentru atrofie și metaplazie intestinală la nivelul celor două regiuni gastrice a fost definit conform scalei vizuale a sistemului Sydney (Houston-updated) [11]. Testul Chi-square a fost utilizat pentru analiza calității fragmentelor biopsice în seriile orientate versus neorientate. O valoare  $p < 0.05$  (two-sided) a fost considerată semnificativă statistic.

Studiul a fost aprobat de Comisia de Etică a Institutului Clinic Fundeni (Nr. Reg. 3898/2013). Toți subiecții înrolați au semnat consimțământul informat pentru participare la studiu.

## 2.4. REZULTATE:

Analiza lotului inițial:

În lotul inițial au fost înrolați 87 subiecți (42 bărbați și 45 femei) cu vârsta medie de  $57 \pm 15.8$  ani.

În 52.8% din cazuri subiecții au fost încadrați în stadiul OLGA 0. Stadiile I și II OLGA au fost reprezentate de 23%, respectiv 13.8% din cazuri. Stadiile cu risc înalt, OLGA III și IV au reprezentat 9.2%, respectiv 1.2% din cazuri. Pentru stadiile OLGIM distribuția cazurilor a fost astfel: 68.9% stadiul OLGIM 0, 18.4% stadiul OLGIM I, 9.2% stadiul OLGIM II, 3.5% stadiul OLGIM III. Nu au fost decelate cazuri aparținând stadiului OLGIM IV. Se poate remarca în acest fel o retrogradare a stadiilor OLGA atunci când este luată în calcul doar metaplazia intestinală. Două cazuri încadrate în stadiul de risc înalt OLGA III au fost retrogradate în clasa de risc scăzut OLGIM I, iar alte 4 cazuri încadrate în stadii de risc înalt OLGA au fost retrogradate la stadii de risc scăzut OLGIM. În plus, un caz de CG încadrat în stadiul de risc înalt OLGA s-a regăsit într-un stadiu de risc scăzut OLGIM

Vârsta peste 50 ani ( $p=0.029$ ), istoricul personal de boală malignă ( $p=0.013$ ) și cancerul gastric ( $p=0.014$ ) au fost asociate semnificativ statistic cu stadiile OLGA cu risc înalt (Tabel 2.1).

	OLGA			OLGIM		
	LOW-RISK	HIGH-RISK	p	LOW-RISK	HIGH-RISK	p
	%	%		%	%	
Urban/Rural	67.1 / 32.9	63.6 / 36.4	NS	66.7 / 33.3	66.7 / 33.3	NS
Barbati/Femei	55.3 / 44.7	36.4 / 64.6	NS	47.6 / 42.4	66.7 / 33.3	NS
>50ani/<50ani	67.1 / 32.9	100 / 0	0.029	70.2 / 29.8	100 / 0	NS
Fumat +/-	40.8 / 59.2	63.6 / 36.4	NS	57.2 / 42.8	66.7 / 33.3	NS
H pylori +/-	51.3 / 48.7	45.5 / 54.5	NS	45.2 / 54.8	33.3 / 66.7	NS
IPP +/-	34.2 / 75.8	9.1 / 90.9	NS	32.1 / 67.9	0 / 100	NS
Istoric fam CG +/-	0 / 100	9.1 / 90.9	NS	1.2 / 98.8	0 / 100	NS
Istoric fam cancer +/-	18.4 / 81.6	36.4 / 63.6	NS	20.2 / 79.8	66.7 / 33.3	NS
Istoric personal cancer +/-	6.6 / 93.4	36.4 / 63.6	0.013	9.5 / 90.5	33.3 / 66.7	NS
Cancer gastric +/-	0 / 100	18.2 / 81.8	0.014	1.2 / 98.8	33.3 / 66.7	NS

**Tabel 2.1.** Asocierea variabilelor analizate în lotul inițial de subiecți cu stadiile de risc OLGA și OLGIM.

Concordanța inter-observator exprimată prin valoarea indexului Kappa s-a dovedit a fi moderată și excelentă pentru toate stadiile OLGA și excelentă pentru toate stadiile OLGIM. Pentru stadiul OLGA 0 s-a obținut un indice Kappa inter-observator de 0.80. Valorile au fost de 0.65 și 0.90 pentru stadiile OLGA I și II. Pentru stadiile OLGA III și IV valorile indexului Kappa au fost de 0.77, respectiv 0.65. Atunci când stadiile OLGA III și IV au fost analizate împreună (stadii cu risc înalt) valoarea indexului de concordanță inter-observator a fost excelentă (kappa = 0.90). Pentru stadiile OLGIM valorile indexului de concordanță Kappa au fost: 0.94, 0.93, 0.84 pentru stadiile OLGIM I, II și III. În această serie nu au fost subiecți încadrați în stadiul OLGA IV.

#### Analiza lotului de control:

Al doilea lot analizat a inclus 35 subiecți (12 bărbați și 23 femei) cu o vârstă medie de  $67 \pm 8.34$  ani. Au fost analizate un număr de 350 fragmente biopsice: 175 fragmente orientate și 175 fragmente neorientate.

În Tabelul 2.2 se poate urmări distribuția claselor de risc OLGA în funcție de rezultatele finale ale celor doi anatomopatologi ce au examinat independent probele. Pentru stadializarea OLGIM Histopatologul 1 a descris în seria neorientată 14 cazuri (40%) OLGIM 0, 10 cazuri (28.56%) OLGIM I, 9 cazuri (25.72%) OLGIM II, 2 cazuri (5.72%) OLGIM III. Nu au fost descrise cazuri OLGIM IV. În aceeași serie neorientată, Histopatologul 2 a descris 17 cazuri (48.56%) OLGIM 0, 9 cazuri (25.72%) OLGIM I, 7 cazuri (20%) OLGIM II, 2 cazuri (5.72%) OLGIM III. Nu au fost descrise cazuri OLGIM IV. În seria orientată de fragmente biopsice, Histopatologul 1 a descris 16 cazuri (45.71%) OLGIM 0, 7 cazuri (20%) OLGIM I, 6 cazuri (17.14%) cazuri OLGIM II, 6 cazuri (17.14%) OLGIM III. Histopatologul 2 a descris în seria orientată 16 cazuri (45.71%) OLGIM 0, 9 cazuri (25.71%) OLGIM I, 6 cazuri (17.14%) OLGIM II și 4 cazuri (11.42%) OLGIM III. Nu au fost descrise cazuri OLGIM IV în seria de biopsii orientată de nici unul din cei doi histopatologi.

Concordanța inter-observator pentru stadiile OLGA în seriile neorientate a fost slabă-moderată pentru toate stadiile. Astfel, indexul Kappa a fost de 0.13 pentru stadiul OLGA 0, 0.20 pentru stadiul OLGA I, 0.06 pentru stadiul OLGA II, 0.46 pentru stadiul OLGA III și 0.50 pentru stadiul OLGA IV. Atunci când stadiile OLGA III și IV au fost încadrate în aceeași clasă de risc înalt, indexul Kappa a fost de 0.65.

	<b>OLGA - n (%)</b>			
	Neorientat		Orientat	
	P1	P2	P1	P2
<b>OLGA 0</b>	13 (37.14)	2 (5.72)	14 (40)	10 (28.56)
<b>OLGA I</b>	9 (25.72)	12 (34.29)	10 (28.56)	12 (34.29)
<b>OLGA II</b>	7 (20)	11 (31.43)	4 (11.42)	4 (11.42)
<b>OLGA III</b>	2 (5.72)	4 (11.42)	3 (8.58)	6 (17.14)
<b>OLGA IV</b>	4 (11.42)	6 (17.14)	4 (11.42)	3 (8.58)
<b>OLGA HIGH RISK (III+IV)</b>	6 (17.14)	10 (28.56)	7 (20)	9 (25.72)

**Tabel 2.2.** Distribuția stadiilor OLGA conform examinării histopatologice; n – număr cazuri, P1 – Histopatolog 1; P2 – Histopatolog 2.

Pentru stadiile OLGIM în seriile neorientate, indexul de concordanță kappa a fost excelent pentru toate stadiile: 0.83 pentru stadiul OLGIM 0, 0.89 pentru stadiul OLGIM I, 0.88 pentru stadiul OLGIM II și 1 pentru stadiul OLGIM III.

În seriile orientate s-a notat o concordanță inter-observator moderat-excelentă în toate stadiile OLGA și excelentă în stadiile OLGIM. Pentru stadiile OLGA orientate, valorile indexului Kappa au fost: 0.62 pentru stadiul OLGA 0, 0.70 pentru stadiul OLGA I, 0.61 pentru stadiul OLGA II, 0.62 pentru stadiul OLGA III și 0.77 pentru stadiul OLGA IV. Pentru stadiile OLGA III și IV luate împreună în același stadiu de risc înalt, valoarea Kappa a fost de 0.88.

Concordanța inter-observator în seriile orientate OLGIM a fost de asemenea excelentă pentru toate stadiile: 0.83 pentru stadiul OLGIM 0, 0.88 pentru stadiul OLGIM I, 0.70 pentru stadiul OLGIM II, 0.83 pentru stadiul OLGIM III. Centralizarea valorilor indexului Kappa pentru toate stadiile OLGA/OLGIM în seriile orientate și neorientate este prezentată în Tabelul 2.3.

A fost analizată și concordanța inter-observator pentru atrofiie și metaplazie intestinală pentru porțiuni anatomice diferite ale stomacului: antru și porțiune verticală. La nivelul antrului gastric, indexul Kappa pentru atrofia cu risc scăzut a fost de 0.45 în seriile

neorientate și 0.70 în seriile orientate. Pentru atrofia cu risc înalt valorile au fost de 0.45 în seriile orientate și 0.70 în seriile neorientate. La nivelul corpului gastric, valorile indexului Kappa pentru atrofia cu risc scăzut au fost de 0.70 în seriile neorientate și 1 în seriile orientate. Pentru atrofia cu risc înalt, la nivelul corpului gastric, aceste valori au fost de 0.70 pentru seriile neorientate și 1 pentru seriile orientate.

Pentru metaplazia intestinală, concordanța inter-observator a fost excelentă atât la nivel antral cât și la nivel corporeal gastric pentru ambele grupe de risc. Indexul Kappa a fost de 0.76 la nivel antral și 0.86 la nivel corporeal serie orientată, risc scăzut și 0.83, respectiv 1 pentru antru și corp gastric serie neorientată, risc scăzut. Pentru metaplazia intestinală cu risc înalt, valorile indexului Kappa au fost în seriile orientate de 0.76 și 0.86 în antru și corpul gastric, iar în seriile neorientate de 0.83 și 1 pentru antrul și corpul gastric.

	<b>Kappa index</b>	<b>Kappa index</b>		<b>Kappa index</b>	<b>Kappa</b>
	<b>Orientat</b>	<b>Neorientat</b>		<b>Orientat</b>	<b>index</b>
					<b>Neorientat</b>
<b>OLGA 0</b>	0.62	0.13	<b>OLGIM 0</b>	0.83	0.83
<b>OLGA I</b>	0.70	0.20	<b>OLGIM I</b>	0.88	0.89
<b>OLGA II</b>	0.61	0.06	<b>OLGIM II</b>	0.70	0.88
<b>OLGA III</b>	0.62	0.46	<b>OLGIM III</b>	0.83	1
<b>OLGA IV</b>	0.77	0.50	<b>OLGIM IV</b>	-	-
<b>OLGA</b>	0.88	0.65	<b>OLGIM HIGH</b>	0.83	1
<b>HIGH RISK</b>			<b>RISK (III+IV)</b>		
<b>(III+IV)</b>					

**Tabel 2.3.** Valorile indexului Kappa pentru stadiile OLGA/OLGIM în seriile orientate și neorientate

Identificarea lamina propriei mucozale a fost considerată reper pentru fragmentele biopsice de bună calitate. Aceasta a fost identificată în 167 din cele 175 fragmente biopsice orientate (95.43%) și în 156 din cele 175 fragmente biopsice neorientate (89.14%). Această diferență a fost semnificativă statistic, valoarea p fiind de 0.0275.



## 2.5.DISCUȚII:

Analiza lotului inițial al studiului a decelat o concordanță inter-observator substanțială (moderată și excelentă) pentru toate stadiile OLGA (index kappa – OLGA 0 = 0.80; OLGA I = 0.65; OLGA II = 0.90; OLGA III = 0.77; OLGA IV = 0.65 și OLGA risc înalt (III+IV) = 0.90). Pentru stadiile OLGIM concordanța inter-observator a fost excelentă pentru toate stadiile (index kappa cuprins între 0.84 și 0.94). Trebuie menționat faptul că atunci când a fost analizată doar metaplazia intestinală s-a notat o retrogradare a stadiilor cu risc înalt OLGA la stadii cu risc scăzut OLGIM. Mai mult, în unul din stadiile retrogradata OLGIM cu risc scăzut s-a notat prezența CG. Stadiile cu risc înalt OLGA au fost asociate semnificativ statistic cu vârsta peste 50 ani ( $p=0.029$ ), istoricul personal de cancer, cu excepția CG ( $p=0.013$ ) și cu CG ( $p=0.014$ ). Asocierea atrofiei gastrice avansate cu riscul de CG este deja bine cunoscută, datele fiind discutate în detaliu în cadrul lucrării în extenso. Nici un caz de CG nu a fost decelat în rândul stadiilor cu risc scăzut OLGA. Riscul de a primi un diagnostic de cancer variază de-a lungul vieții. Riscul cumulativ pentru toate cancerele crește cu vârsta, până la 70 ani, apoi descrește ușor [384]. Asocierea vârstei cu atrofia extinsă (stadii risc înalt OLGA) poate fi legată de acumularea unor serii de factori de risc alături de cascada de evenimente inițiate de infecția cu *H.pylori*, urmată de inflamația cronică și atrofia mucozală, această succesiune de evenimente fiind un proces cronic, de lungă durată. Asocierea cu un istoric de boală malignă nu este un lucru foarte clar, însă se poate presupune că în aceste situații pot exista predispoziții genetice sau factori de risc comun pentru patologii neoplazice diferite.

Pentru a confirma rezultatele legate de concordanța inter-observator pentru atrofia gastrică, a fost analizat un al doilea lot de 35 subiecți de la care au fost prelevate două serii de biopsii gastrice, din aceleași arii gastrice, orientate și neorientate. A fost observată o îmbunătățire dramatică a concordanței inter-observator în seriile orientate pentru evaluarea atrofiei gastrice. Pentru metaplazia intestinală, concordanța inter-observator a fost înaltă pentru ambele serii de biopsii gastrice, orientate și neorientate. Astfel, în seriile orientate s-a obținut o concordanță inter-observator moderată-înaltă (index kappa cuprins între 0.61 și 0.77) comparativ cu seriile neorientate în care concordanța inter-observator a fost slabă (index kappa cuprins între 0.06 și 0.50). Cea mai importantă îmbunătățire a fost observată pentru stadiile OLGA cu risc scăzut (0/I/II). Acest lucru poate fi explicat prin faptul că pentru evaluarea corectă a densității glandulare și mai ales a raportului deschideri glandulare/glande, este necesară o secțiune perpendiculară ce cuprinde întreaga mucoasă. Dacă atrofia este

prezentă, orientarea corespunzătoare a fragmentelor biopsice este esențială în definirea severității acestora (exemplu > 60%) [286].

Stadializarea OLGA este bazată pe combinarea rezultatelor obținute din analiza modificărilor de tip atrofic în cele două regiuni gastrice: antrul și porțiunea verticală. În fiecare regiune atrofia este cuantificată pe baza unei scale cu patru grade (0 – lipsa atrofiei, 1 – atrofie ușoară, 2 – atrofie moderată, 3 – atrofie severă) conform scalei vizuale analogice a sistemului actualizat Sydney (Houston) [11]. În seria noastră am observat cea mai importantă îmbunătățire a concordanței inter-observator prin orientarea fragmentelor biopsice la nivelul porțiunii antrale gastrice (de la 0.45 în seriile neorientate la 0.70 în seriile orientate). Acest lucru ar putea fi explicat de tipul arhitectural diferit al glandelor specifice celor două regiuni gastrice. La nivel antral, glandele sunt ramificate și sunt distribuite lobular având deschiderea în orificiile glandulare de suprafață (pits). La nivel oxintic, corporeal, glandele sunt drepte, tubulare având o dispunere paralelă [67]. Din acest motiv, evaluarea densității glandulare la nivel antral este mult mai subiectivă decât la nivel corporeal gastric.

Metaplazia intestinală este foarte ușor de evaluat deoarece celulele goblet pot fi recunoscute cu ușurință după un antrenament minim. Totuși, pentru o corectă evaluare a atrofiei mucozale în ansamblu, histopatologul are nevoie de preparate cu întreaga secțiune mucozală perpendiculară pe lamina propria mucozală. Acest lucru poate fi dificil de obținut, în general fiind pur hazard, atunci când fragmentele biopsice nu sunt orientate după prelevare.

Prin orientare, histotehnicianul va ști cum să orienteze blocul de parafină astfel încât să efectueze tăierea la microtom a secțiunilor histologice perpendicular pe lamina propria mucozală. În acest fel, se pot obține cu ușurință fragmente ale întregii secțiuni mucozale perpendiculare pe lamina propria mucozală. În studiul nostru, lamina propria mucozală a putut fi identificată în 95.43% din speciunile biopsice orientate, comparativ cu 89.14% în seriile neorientate. Această diferență s-a dovedit a avea semnificație statistică ( $p=0.0275$ ).

Din nefericire, orientarea fragmentelor biopsice nu este o practică uzuală. În centrul nostru, orientarea fragmentelor biopsice prelevate în timpul examinărilor endoscopice nu este de asemenea o practică uzuală. Principala doleanță a personalului implicat în procedura endoscopică este legată de timpul dedicat procedurii. În realitate, această problemă este falsă, utilizarea filtrelor de nitroceluloză pentru orientarea fragmentelor biopsice prelevate endoscopic fiind ușor de efectuat. Mai mult, cel puțin pentru evaluarea mucoasei gastrice și a intestinului subțire, aduce informații suplimentare valoroase pentru histopatolog [67]. Fragmentul biopsic este fixat cu ușurință de asistentul de endoscopie din pensa de biopsie

direct pe filtrul de nitroceluloză cu baza pe filtru și partea luminală spre exterior. Filtrul este conceput astfel încât fragmentele biopsice să adere și să rămână stabile în timpul întregului proces de preparare a secțiunilor histologice. Procesarea țesutului, după fixare, nu va influența astfel orientarea specimenului biopsic. Pe o singură bandă de filtru pot fi poziționate în linie până la zece fragmente biopsice. După procesare, histotehnicianul include filtrul cu fragmentele biopsice în parafină rotindul cu 90 grade. Primul fragment biopsic este recunoscut cu ușurință deoarece capătul proximal al filtrului este ascuțit, fiind astfel conceput pentru acest lucru. Nu este necesară o dimensiune minimă a fragmentului biopsic pentru a putea fi orientat utilizând această metodă. Cu cât fragmentul biopsic este mai mare, cu atât va fi mai mare probabilitatea de a obține specimene cu mai multe straturi histologice pentru examinare: mucoasa, lamina propria cu componentele sale specifice, musculara mucoasei și ideal submucoasa. Utilizarea filtrelor de nitroceluloză ca și metodă de orientare a fragmentelor biopsice prelevate endoscopic nu prelungește timpul de lucru în laboratorul de histopatologie. Dimpotrivă, timpul de procesare este scurtat deoarece histotehnicianul va prepara de obicei o singură bandă de filtru nitrocelulozic cu toate fragmentele biopsice așezate în ordine pe aceasta. Acest lucru va conduce la scurtarea timpului de includere, tăiere și colorare. Costurile sunt de asemenea reduse prin diminuarea numărului de blocuri de parafină utilizate de obicei la unul singur.

### 3. MODELE DE PREDICȚIE PENTRU ATROFIA GASTRICĂ AVANSATĂ ȘI CANCERUL GASTRIC UTILIZÂND EXPRESIA SEROLOGICĂ A FAMILIEI DE FACTORI TRIFOIZI, FACTORI EPIDEMIOLOGICI ȘI FACTORI DE RISC LEGAȚI DE STILUL DE VIAȚĂ

#### 3.1. INTRODUCERE:

La subiecții cu mucoasă gastrică normală riscul de dezvoltare al CG este neesențial [44]. Infecția cu *H.pylori* reprezintă un carcinogen de grup I pentru populația umană [68]. Gastrita asociată infecției cu *H.pylori* reprezintă de departe cea mai frecventă patologie inflamatorie cronică ce conduce la o anumită proporție de subiecți la atrofi gastrică, displazie și eventual CG [69]. Tipul histopatologic de CG frecvent asociat cu suita de evenimente descrise anterior este cel intestinal [70]. Riscul este cel mai mare la subiecții cu atrofi gastrică severă și extinsă [16]. Din acest motiv, ghidurile curente recomandă urmărirea regulată a subiecților cu gastrită atrofică extinsă la nivel antral și corporeal [13]. Endoscopia digestivă superioară reprezintă o metodă excelentă de diagnostic însă prezintă dezavantaje legate de gestionarea unui număr mare de subiecți, volum de muncă crescut și costuri. Astfel, selectarea unei populații țintă cu risc crescut pentru dezvoltarea CG utilizând o metodă non-invazivă ar reprezenta o strategie rezonabilă.

Până în prezent au fost conduse numeroase studii la nivel mondial ce au corelat nivelele serice ale PG cu modificările histopatologice ale mucoasei gastrice [71-73]. În Japonia dozarea serologică a PG a fost introdusă ca metodă de screening populațională [9]. Din păcate, studiile sunt greu de generalizat din cauza diferențelor nivelelor de PG, a odds ratio și a limitărilor date de sensibilitate și valoarea predictivă pozitivă [13].

Familia de factori trifoizi reprezintă un grup de trei peptide proteazo-rezistente secretate în special de celulele secretante de mucus de la nivelul tractului gastrointestinal. Rolul principal al TFF este de a menține și proteja integritatea suprafeței mucozale [48]. TFF1 este exprimat în principal de celulele secretante de mucus de la nivelul glandelor fundice gastrice și antrale [48]. TFF2 este exprimat la nivelul celulelor corporeale glandulare de la nivelul corpului gastric și de celulele bazale ale glandelor pilorice antrale [60]. TFF3 este exprimat în special în citoplasma celulelor goblet ale intestinului subțire și colonului [74]. În ultimii ani dozarea nivelelor serice ale TFF au arătat rezultate promițătoare în predicția CG atât ca teste individuale cât și în combinație cu dozarea serologică a PG [60-62].

### 3.2.OBIECTIVELE STUDIULUI:

Obiectivul principal al studiului a fost reprezentat de elaborarea unor modele de predicție ale CG și atrofiei gastrice severe (OLGA III/IV) utilizând nivelele serice ale TFF, datele epidemiologice și factori de risc legați de stilul de viață.

Obiectivele secundare au fost reprezentate de:

- Analiza nivelelor serice ale TFF la diferitele categorii de subiecți – OLGA risc crescut (III/IV), CG și subiecți control;
- Analiza factorilor epidemiologici și corelarea cu diferitele categorii de subiecți – OLGA risc crescut, CG și subiecți control;
- Analiza factorilor legați de stilul de viață și corelarea acestora cu clasele de risc crescut OLGA și CG;
- Crearea unei bănci serologice ce va putea fi utilizată în studii viitoare de profil.

### 3.3.MATERIAL ȘI METODEDE:

Au fost incluși în studiu 81 subiecți (44 bărbați / 37 femei, vârstă medie 58.5±14.7 ani) cu sindrom dispeptic adresați pentru examen endoscopic digestiv superior în perioada Martie 2015-Mai 2016 în cadrul Centrului de Gastroenterologie și Hepatologie, Institut Clinic Fundeni. Au fost incluși în studiu doar subiecții ce au citit și semnat formularul de consimțământ informat al studiului.

Criteriile de excludere au fost reprezentate de:

- Comorbidități asociate severe (insuficiență cardiacă severă, disfuncție hepatică severă, disfuncție renală severă);
- Tulburări severe ale coagulării: INR > 3; trombocite < 30.000/mmc;
- Sângerare digestivă activă
- Subiecți ce nu au acceptat și nu au semnat consimțământul informat.

Pe baza datelor clinice, endoscopice și histopatologice au fost definite următoarele grupuri de studiu din cadrul lotului inițial:

- Grupul de studiu OLGA risc înalt (22 subiecți)
- Grupul de control pentru OLGA risc înalt reprezentat de subiecții OLGA 0 (aparent sănătoși, cu mucoasă gastrică normală fără atrofi, fără CG – 31 subiecți)
- Grupul de studiu CG (22 subiecți)
- Grupul de control pentru CG reprezentat de subiecții OLGA 0, I și II fără CG (51 subiecți)

Inițial, au fost colectate date epidemiologice și legate de factori de risc utilizând un chestionar dedicat. Astfel au fost colectate legate de:

- Vârstă, cu subcategorie de vârstă peste 50, 60 și 70 ani;
- Mediu de viață – urban / rural
- Sex
- Indice de masă corporeală
- Nivel educațional (studii elementare (0-8 clase); studii medii (liceu, școală profesională); studii superioare (colegiu, facultate));
- Categorie socio-profesională
- Status fumator actual sau fost și numărul de pachete an (0-10 pachete an; 11-20 pachete an, peste 20 pachete an);
- Consum alcool: ocazional (sub o unitate pe zi), moderat (maxim 1-2 unități pe zi); frecvent/cronic (peste 2 unități pe zi). O unitate de alcool a fost considerată echivalentul a 250 ml bere standard sau 75 ml vin sau 25 ml de bautură spirtoasă standard;
- Nivelul de activitate fizică (mișcare de tip cardio în sesiuni de minim 30 minute) – rar (maxim odată pe săptămână), moderat (1-2 ori pe săptămână), frecvent (minim 3 ori pe săptămână));
- Consum de carne roșie (rar (maxim 2 ori pe săptămână), frecvent (3-4 ori pe săptămână), frecvent (6-7 zile pe săptămână));
- Consum carne procesată (rar (maxim 2 ori pe săptămână), frecvent (3-4 ori pe săptămână), frecvent (6-7 zile pe săptămână));
- Consum vegetale (rar (maxim 2 ori pe săptămână), frecvent (3-4 ori pe săptămână), frecvent (6-7 zile pe săptămână));
- Sursa de apă pentru consum zilnic (apa imbuteliată, apă potabilă sursă robinet, fântână / puț verificat; fântână / puț neverificat);
- Consum AINS, inclusiv aspirina în doză antiagregantă (ocazional (maxim 1-2 zile pe săptămână), frecvent (3-4 zile pe săptămână), zilnic (6-7 zile pe săptămână));
- Istoric personal de boala malignă (digestiv, extradigestiv);
- Istoric familial de boală malignă (digestiv, extradigestiv);
- Alte antecedente personale patologice;
- Tratament cu IPP (ultimele 6 luni);
- Infecție *H.pylori* (actuală sau în trecut);
- Tratament al infecției cu *H.pylori*.

Ulterior completării chestionarului s-a efectuat examinarea endoscopică cu sedare superficială (Midazolam iv și Xilină local) sau profundă (Propofol iv). Examinarea endoscopică a fost efectuată cu echipament Pentax® EPKi-7010 (procesor video) cu tuburi EG 29-i10 (Pentax Medical, Hoya Company, Tokyo, Japonia). Biopsiile au fost prelevate pentru stadializarea atrofiei gastrice și pentru leziunile suplimentare decelate. Protocolul utilizat pentru stadializarea atrofiei gastrice a fost protocolul de biopsiere OLGA [67]. Pe baza rezultatelor histopatologice au fost definite grupurile de studiu enumerate mai sus.

S-a recoltat sânge tuturor subiecților, iar serul rezultat a fost depozitat la  $-80^{\circ}\text{C}$  până în momentul analizei. Nivelele serice ale TFF1, TFF2 și TFF3 au fost determinate utilizând tehnica ELISA de tip sandwich utilizând kituri comerciale MyBiosource® (SanDiego, SUA). Protocolul utilizat a fost conform indicațiilor producătorului.

Variabilele calitative au fost analizate utilizând testul chi-square sau Fisher exact în funcție de situație. Variabilele semnificative conform analizei univariate au fost evaluate ca factori de risc independenți prin regresie logistică. Predictorii independenți rezultați au fost incluși într-un model de predicție prin regresie logistică pentru gastrita atrofică cu risc înalt și CG. Curbele ROC și AUROC au fost calculate pentru determinarea puterii predictive a modelelor. Valorile cut-off ale TFF au fost calculate pe baza AUROC. O valoare p mai mică decât 0.05 (two-sided) a fost considerată semnificativ statistică. Analiza statistică a fost efectuată utilizând softul statistic NCSS v11.0.

Studiul a fost aprobat de către Comitetul de Etică în Cercetare Științifică al Institutului Clinic Fundeni (Nr Reg 3898 din 10/02/2015). Toți participanții la studiu au semnat consimțământul informat de participare la studiu.

### 3.4.REZULTATE:

Au fost incluși în cadrul studiului 81 subiecți cu vârstă medie  $58.5 \pm 14.7$  ani (44 bărbați / 37 femei). După evaluarea clinică, epidemiologică, endoscopică și histopatologică au fost definite două grupuri de studiu pentru elaborarea modelelor de predicție OLGA risc înalt și CG. Astfel, primul grup de studiu a inclus lotul OLGA risc înalt și lotul de control OLGA alcătuit din subiecți grup OLGA 0, fără CG. Cel de-al doilea grup de studiu a inclus lotul CG și lotul de control pentru CG format din subiecți OLGA 0,I,II fără CG.

#### Elaborarea modelului de predicție OLGA risc înalt:

Caracteristicile de bază ale loturilor OLGA risc înalt / OLGA control și CG / control se regăsesc în Tabelul 3.1. Vârsta medie a lotului OLGA risc înalt ( $n=22$  subiecți) a fost de  $67.8 \pm 8.6$  ani cu un raport masculin / feminin de 0.8. Pentru lotul control OLGA s-a notat o

vârstă medie de 49.3±14.7 ani cu un raport masculin / feminin de 1.2. Valorile medii ale TFF1 în cele două loturi au fost de 1.31±0.69 ng/ml pentru OLGA risc înalt, respectiv de 1.46±0.71 ng/ml pentru lotul control. Pentru TFF2 valorile medii au fost de 66.83±4.76 pg/ml pentru lotul OLGA risc înalt, respectiv 43.56±1.22 pg/ml pentru lotul control. Pentru TFF3 valorile medii au fost de 83.63±3.22 pg/ml pentru lotul OLGA risc înalt, respectiv de 76.94±3.66 pg/ml.

	<b>Cancer gastric (n=22)</b>	<b>Lot control (subiecți OLGA 0,I,II fără CG) (n=51)</b>	<b>OLGA risc înalt (III/IV) (n=22)</b>	<b>Control OLGA 0 (n=31)</b>
Vârsta (ani, medie ± dev standard)	67.8±7.9	53.7±14.4	67.8±8.6	49.3±14.7
Raport Bărbați / Femei	3.4	0.8	1.4	1.2
<b>Tip histopatologic</b>				
<b>Tip intestinal</b>	13 (59.1%)			
<b>Tip difuz</b>	9 (40.9 %)			
<b>Stadiul CG</b>				
<b>Precoce</b>	6 (27.2%)			
<b>Avansat</b>	16 (72.8%)			
<b>Statusul infecției <i>H. pylori</i></b>				
<b><i>H. pylori</i> pozitiv la diagnostic</b>	7 (31.8%)	21 (35.5%)	5 (22.7%)	17 (28.8%)
<b>Istoric de infecție <i>H.pylori</i> în trecut</b>	1 (4.5%)	15 (25.4%)	3 (13.6%)	4 (6.7%)
	Cancer gastric (n=22)	Lot control (subiecți OLGA 0,I,II fără CG) (n=51)	OLGA risc înalt (III/IV) (n=22)	Control OLGA 0 (n=31)
<b>TFF1 (ng/ml)</b>	1.41±0.71	1.44±0.76	1.31±0.69	1.46±0.71
<b>TFF2 (pg/ml)</b>	45.68±1.69	52.26±6.91	66.83±4.76	43.56±1.22
<b>TFF3 (pg/ml)</b>	102.27±3.12	76.93±2.15	83.63±3.22	76.94±3.66

**Tabel 3.1.** Caracteristicile de bază și nivelele serice TFF pentru subiecții cu cancer gastric, OLGA risc înalt și loturile de control.



Analiza univariată a decelat variabilele asociate semnificativ statistic cu grupul OLGA risc înalt. Acestea au fost reprezentate de: vârsta peste 60 ani ( $p=0.00065$ ), consumul frecvent de carne roșie ( $p=0.01953$ ), consumul cronic de AINS ca factor protector ( $p=0.04074$ ) și expresia seroloigică a TFF2 peste 46.1 pg/mL ( $p=0.02725$ ). În Tabelul 3.2 sunt centralizate toate variabilele studiate în analiza univariată.

**Tabel 3.2.** Variabilele asociate cu grupul OLGA risc-înalt – analiză univariată

	OLGA Risc înalt (n=22)	OLGA Control (n=31)	p
<b>Sex masculin</b>	13 (59.1%)	17 (54.8%)	0.75826
<b>Vârstă &gt; 60 ani</b>	<b>18 (81.8%)</b>	<b>10 (32.3%)</b>	<b>0.00065</b>
<b>Urban</b>	16 (72.7%)	28 (90.3%)	0.13964
<b>Studii superioare</b>	11 (50%)	17 (54.8%)	0.72806
<b>Fumat peste 20 pachete an</b>	8 (36.4%)	5 (16.1%)	0.09160
<b>Consum zilnic alcool</b>	5 (22.7%)	4 (12.9%)	0.46368
<b>Sedentarism</b>	9 (40.9%)	16 (51.6%)	0.57805
<b>Consum frecvent carne roșie</b>	<b>10 (45.4%)</b>	<b>5 (16.1%)</b>	<b>0.01953</b>
<b>Consum frecvent carne procesată</b>	8 (36.4%)	10 (32.3%)	0.75582
<b>Consum scăzut de vegetale proaspete</b>	4 (18.2%)	4 (12.9%)	0.70478
<b>Consum cronic AINS</b>	<b>1 (4.5%)</b>	<b>7 (22.6%)</b>	<b>0.04074</b>
<b>Istoric personal cancer (altul decât stomac)</b>	1 (4.6%)	2 (6.6%)	0.76731
<b>Istoric familial CG</b>	2 (9.1%)	3 (9.7%)	0.94262
<b>H pylori prezentă</b>	5 (22.7%)	7 (22.6%)	0.98997
<b>TFF1 &gt; 1.34 ng/mL</b>	13 (59.1%)	13 (41.9%)	0.21832
<b>TFF2 &gt; 46.1 pg/mL</b>	<b>5 (22.7%)</b>	<b>1 (3.2%)</b>	<b>0.02725</b>
<b>TFF3 &gt; 80 pg/mL</b>	10 (45.4%)	15 (48.4%)	0.83310

O valoare  $p < 0.05$  a fost considerată semnificativă statistic (two-sided)

Pe baza rezultatelor analizei univariate au fost selectate variabilele ce au fost incluse în analiza multivariată pentru determinarea factorilor independenți de predicție ai OLGA risc înalt și pentru elaborarea prin regresie logistică a modelului de predicție OLGA risc înalt. Au fost incluși în analiza multivariată valorile TFF2 peste 46.1 pg/ml, vârsta peste 60 ani, consumul frecvent de carne roșie și consumul cronic de AINS. Factorii independenți de predicție pe baza cărora s-a elaborat modelul de predicție al OLGA risc înalt au fost: consumul cronic de AINS (OR = 0.09, 95%,  $p = 0.04$ ), vârsta peste 60 ani (OR = 44.26,  $p = 0.0007$ ) și valoarea TFF2 peste 46.1 pg/ml (OR = 53.78,  $p = 0.009$ ).

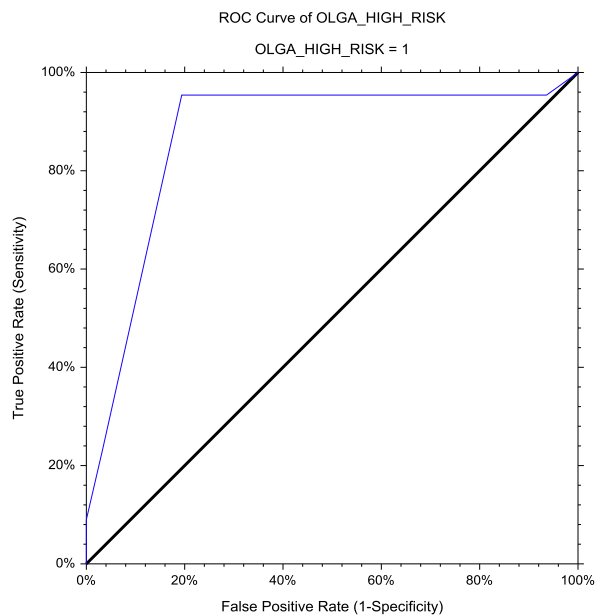
Modelul elaborat prin regresie logistică a fost:

$$\text{MODEL OLGA RISC ÎNALT (XB)} = 1 - 2.52 - 2.33(\text{AINS CRONIC}) + 3.98(\text{TFF2} > 46.1) + 3.79(\text{VÂRSTA} \geq 60)$$

Pentru calcularea probabilității se folosește ecuația următoare:

$$\text{Prob}(Y = \text{group}) = 1 / (1 + \text{Exp}(-XB))$$

Pentru o valoare cutoff de 0.25 sensibilitatea și specificitatea pentru predicția OLGA risc înalt au fost de 80.64%, respectiv 95.45% cu o valoare AUROC de 0.87023 (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Curba ROC pentru modelul de predicție al OLGA risc înalt; AUROC = 0.87023; cutoff = 0.25, Sensibilitate 80.64%, Specificitate 95.45%;

Elaborarea modelului de predicție CG:

În Tabelul 3.1 pot fi urmărite caracteristicile de bază ale lotului CG și control pentru CG. Vârsta medie a lotului CG (n=22 subiecți) a fost de 67.8±7.9 ani, raportul bărbați/femei fiind de 3.4. Au fost descrise 13 cazuri, reprezentând 59.1%, de carcinom de tip intestinal și 9 cazuri, reprezentând 40.9%, de carcinom difuz. Doar 6 cazuri (27.2%) au putut fi încadrate drept CG precoce. Astfel, peste 70% din cazurile de CG decelate au fost în stadiu avansat în momentul diagnosticului. În 31.8% din cazuri a fost decelată prezența infecției *H.pylori*, iar în 4.5% din cazuri s-a putut documenta istoricul de infecție în trecut. Lotul control reprezentat de subiecți OLGA 0, I și II fără CG a avut o vârstă medie de 53.7±14.4 ani. Raportul bărbați / femei în lotul control a fost de 0.8. Valorile medii ale TFF1 au fost de 1.41±0.71 ng/ml în lotul CG, respectiv 1.44±0.76 ng/ml în lotul control. Pentru TFF2 au fost decelate valori medii serologice de 45.68±1.69 pg/ml în lotul CG și de 52.26±6.91 pg/ml în lotul control. Valorile medii ale TFF3 au fost de 102.27 ±3.12 pg/ml în lotul CG și de 76.93±2.15 pg/ml în lotul control.

Analiza univariată a decelat variabilele asociate semnificativ statistic cu CG. Acestea au fost: sexul masculin (p=0.01126), vârsta peste 60 ani (p=0.00093), mediul rural de viață (p=0.01513), fumatul peste 20 pachete an (p=0.00097), consumul cronic de carne roșie (p=0.01670), consumul cronic de carne procesată (p=0.00964), consumul cronic AINS ca factor protector (p=0.02968) și valori ale TFF3 peste 80 pg/mL (p=0.04757). În tabelul 3.3 sunt centralizate datele obținute din analiza univariată a variabilelor analizate în cele două grupuri CG și control.

**Table 3.3.** Variabilele asociate cu grupul CG – analiză univariată

	CG (n=22)	Control (n=51)	Valoare p
<b>Sex masculin</b>	17 (77.3%)	23 (45.1%)	0.01126
<b>Vârsta &gt; 60 ani</b>	18 (81.8%)	20 (39.2%)	0.00093
<b>Mediul urban</b>	11 (50%)	40 (78.4%)	0.01513
<b>Studii superioare</b>	8 (36.4%)	24 (47.1%)	0.39809
<b>Istoric fumator</b>	15 (68.2%)	27 (52.9%)	0.22674
<b>Fumator actual</b>	3 (13.6%)	15 (29.4%)	0.23688
<b>Fumat &gt; 20 pachete an</b>	11 (50%)	7 (13.7%)	0.00097
<b>Consum cronic</b>	7 (31.8%)	6 (11.8%)	0.05144

<b>alcool</b>			
<b>Sedentarism</b>	8 (36.4%)	23 (45.1%)	0.48846
<b>Consum cronic carne roșie</b>	19 (86.4%)	29 (56.9%)	0.01670
<b>Consum cronic carne procesată</b>	12 (54.6%)	12 (23.5%)	0.00964
<b>Consum scăzut vegetale</b>	3 (13.6%)	5 (9.8%)	0.69051
<b>Apă de băut din surse neverificate</b>	8 (36.4%)	11 (21.6%)	0.18620
<b>Consum cronic AINS</b>	0 (0%)	10 (19.6%)	0.02698
<b>Istoric personal de cancer (altul decât stomacul)</b>	1 (4.6%)	2 (3.9%)	1.00000
<b>Istoric familial cancer gastric</b>	2 (9.1%)	7 (13.7%)	0.71432
<b>Diabetes</b>	4 (18.2%)	4 (6.8%)	0.12604
<b>Infectie H pylori la diagnostic</b>	7 (31.8%)	13 (25.5%)	0.57804
<b>TFF1 &gt; 1.34 ng/mL</b>	13 (59.1%)	25 (49.1%)	0.42933
<b>TFF2 &gt; 46.1 pg/mL</b>	4 (18.2%)	4 (7.8%)	0.23191
<b>TFF3 &gt; 80 pg/mL</b>	14 (63.6%)	21 (39%)	0.04757
<b>Valoarea p&lt;0.05 a fost considerată semnificativă statistic</b>			

Analiza univariată a lotului CG a stat la baza selectării variabilelor ce au fost incluse în analiza multivariată pentru determinarea factorilor independenți de predicție ai CG și pentru elaborarea prin regresie logistică a modelului de predicție al CG. Au fost incluși în analiza multivariată valorile peste 80 pg/mL ale TFF3, sexul masculin, vârsta peste 60 ani, consumul cronic de carne roșie, consumul cronic de carne procesată, consumul cronic alcool, consumul cronic AINS, fumatul peste 20 pachete an și mediul urban de viață. Factorii independenți de predicție pe baza cărora s-a elaborat modelul de predicție CG au fost: nivelul TFF3 peste 80 pg/mL (OR = 6.61, 95% CI [0.49-3.28], p = 0.00295), fumatul peste 20

pachete an (OR = 12.17, 95% CI [2.89-51.17], p = 0.00015) și consumul cronic de carne roșie (OR = 3.53, 95% CI [1.06-11.73], p = 0.03805).

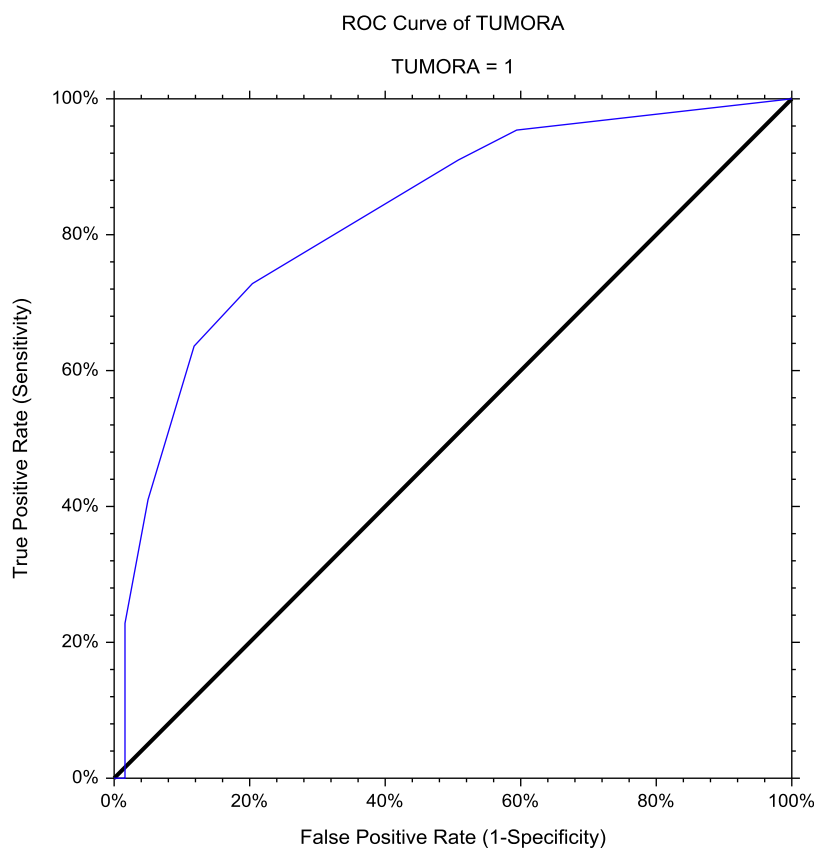
Modelul elaborat prin regresie logistică pe baza variabilelor independente a fost:

$$\text{MODEL CG (XB)} = 1 - 2.18 + 1.26 * (\text{carne roșie}) + 2.49 * (\text{fumat:20 pach an}) + 1.88 * (\text{TFF3} > 80 \text{pg/mL})$$

Pentru calcularea probabilității se folosește ecuația de mai jos:

$$\text{Prob (Y=group)} = 1 / (1 + \text{Exp}(-\text{XB}))$$

Pentru o valoare cutoff de 0.55 sensibilitatea și specificitatea pentru predicția CG sunt de 79.6%, respectiv 72.7% cu o valoare AUROC de 0.83012 (Figura 3.2).



**Figura 3.2.** Curba ROC pentru modelul de predicție al CG; AUROC = 0.83012; cutoff = 0.55, Sensibilitate 79.6%, Specificitate 72.7%;

### 3.5. DISCUȚII:

De-a lungul timpului mai multe teste non-invazive au fost utilizate pentru predicția stadiilor avansate ale atrofiei gastrice și CG. Totuși, un biomarker ideal cu valori ale sensibilității și specificității suficient de mari pentru a fi utilizat pe scară largă, nu a fost decelat până în prezent.

Familia factorilor trifoizi cuprinde trei peptide rezistente la temperatură și la acțiunea proteazelor cărora li se atribuie un rol esențial în protecția mucozală împotriva agresiunilor externe [75]. TFF1 și TFF2 sunt exprimate în special de mucoasa gastrică, iar TFF3 este exprimat de celulele goblet ale intestinului subțire și colonului [76-78]. Expresia acestor peptide a fost decelată în multe cancere. Astfel, expresia ectopică a TFF1 a fost descrisă în cancere precum cel de esofag, stomac, plămân, sân, pancreas, colon, ovar, prostată și vezică urinară [79]. TFF2 a fost detectat în multe țesuturi tumorale precum cancerele gastrointestinale, mamare sau pancreatice, iar TFF3 în special în CG [79].

În studiul de față au fost studiate expresiile serologice ale TFF la subiecții cu atrofie gastrică extinsă fără CG (stadii OLGA III/IV), subiecți cu CG și subiecți control. Prin combinarea factorilor epidemiologici și de stil de viață s-a încercat elaborarea unor modele de predicție utilizând regresia logistică pentru predicția atrofiei gastrice extinse / severe (OLGA III/IV) și CG. Deși expresia TFF și valorarea lor de predicție a CG și atrofiei gastrice a fost studiată în studiile Asiatice [60-62], combinarea acestor biomarkeri cu factori epidemiologici și de stil de viață în modele de predicție nu a mai fost efectuată, după cunoștința noastră. În prima parte a studiului a fost analizată expresia TFF și factorii epidemiologici și de stil de viață la subiecții cu atrofie gastrică extinsă și severă (OLGA III/IV) și a fost elaborat un model de predicție pentru stadiile OLGA risc înalt III și IV. Utilizarea curbelor ROC a decelat valorile optime cut-off pentru TFF. Valorile cutoff pentru TFF1, TFF2 și TFF3 au fost de 1.34 ng/mL, 46.1 pg/mL și 80 pg/mL. Doar pentru TFF2 s-a notat o expresie serologică cu semnificație statistică pentru grupul OLGA risc înalt. Astfel, valorile medii ale TFF2 pentru grupul OLGA risc înalt a fost de  $66.83 \pm 1.22$  pg/mL față de  $43.56 \pm 1.22$  la grupul control ( $p = 0.02725$ ). Valori mai mari decât valoarea cut-off de 46.1 pg/mL au fost decelate la 22.7% din subiecții OLGA risc înalt față de doar 3.2% la subiecții control. Acest lucru ar putea fi explicat prin asocierea metaplaziei intestinale ce exprima polipeptidul spasmodic (SPEM), ce este considerată a fi sursa suplimentară a expresiei TFF2 la nivel gastric. SPEM, ce în mod caracteristic se dezvoltă la nivelul corpului și fornixului gastric, prezintă caracteristici similare cu metaplazia pseudopilorică și este puternic asociată cu infecția cronică cu *H.pylori* și adenocarcinomul gastric. Din acest motiv este suspectată a avea un rol

în progresia către CG, lucrurile nefiind foarte clare în prezent [80]. Pentru valorile TFF1 nu s-a notat o diferență semnificativă în expresia serologică în cele două grupuri. Astfel, pentru grupul OLGA risc înalt s-a decelat o valoare medie a TFF1 de  $1.31 \pm 0.69$  ng/mL față de  $1.46 \pm 0.71$  ng/mL pentru grupul control ( $p = 0.21832$ ). Nivele ușor crescute ale TFF1 la subiecții cu atrofie gastrică față de subiecții control au fost descrise de Huang și colab [74] fără a avea însă semnificație statistică. Pentru TFF3 au fost decelate valori medii mai mari în grupul OLGA risc înalt comparativ cu grupul control ( $83.63 \pm 3.22$  pg/mL versus  $76.94 \pm 3.66$  pg/mL) fără a avea însă semnificație statistică. Astfel, valori mai mari decât valoarea cut-off de 80 pg/mL, au fost decelate în 45.4% din cazuri pentru grupul OLGA risc înalt față de 48.4% din cazuri pentru grupul control ( $p=0.83310$ ).

Pentru elaborarea unui model de predicție al OLGA risc înalt au fost studiați alături de expresia TFF, factori epidemiologici și de stil de viață în cele două grupuri. În analiza univariată variabilele asociate cu grupul OLGA risc înalt au fost reprezentate de vârsta peste 60 ani (81.8% vs 32.3%,  $p=0.00065$ ), consumul frecvent de carne roșie (45.4% vs 16.1%,  $p=0.01953$ ), consumul cronic de AINS (4.5% vs 22.6%,  $p=0.04074$ ) și valoarea TFF2 mai mare de 46.1 pg/mL (22.7% vs 3.2%,  $p=0.02725$ ). Este evident faptul că nu toți subiecții cu atrofie gastrică progresează către displazie severă și CG. Mecanismele de progresie către forme severe ale atrofiei gastrice și eventual către displazie și CG nu sunt pe deplin elucidate. Este evident că acest proces în cascadă este un proces de lungă durată, ceea ce ar putea explica asocierea vârstei înaintate cu stadiile avansate de atrofie gastrică. În plus, procesul de transformare displazică și carcinogeneză gastrică are la baza un mecanism complex în care sunt implicați multipli factori legați de tulpina infectantă *H.pylori*, factori genetici, factori epidemiologici și factori legați de stilul de viață. Consumul constant de carne roșie supune mucoasa gastrică la agresiunea constantă a radicalilor N-nitroso rezultați prin reacția oxidului nitric cu hemoglobina și mioglobina din aceste produse [81]. Rolul protectiv al AINS pentru progresia către atrofie gastrică avansată nu este clar. AINS se presupune că inhibă carcinogeneza prin rol anti-angiogenetic și pro-apoptotic [82]. Cu toate acestea, într-un studiu ce a analizat administrarea cronică de etodolac s-a notat efectul protectiv al acestuia pentru CG, însă nu s-a decelat un efect asupra gastritei atrofice [83]. Tot din analiza univariată s-a notat asocierea în procente mai mari cu grupul risc înalt OLGA al mediului rural de viață (27.3% vs 9.7%), sexului masculin (59.1% vs 54.8%), fumatului peste 20 pachete an (36.4% vs 16.1%), consumului frecvent de carne procesată (36.4% vs 32.3%) și a consumului scăzut de vegetale proaspete (18.2% vs 12,9%), însă fără semnificație statistică.

Factorii de predicție independenți rezultați din analiza multivariată au fost reprezentați de: vârsta peste 60 ani (OR 39.52, 95%CI[3.78-412.17],  $p=0.00211$ ), valoarea TFF2 peste 46.1 pg/ml (OR 85.22, 95%CI[3.22-252.02],  $p=0.00779$ ) și consumul cronic AINS (OR=0.079, 95%CI[0.0059-1.0683],  $p=0.04613$ ). Practic, valoarea TFF2 și consumul de carne roșie sunt considerați factori de risc independenți pentru OLGA risc înalt, iar consumul cronic AINS, este considerat factor de protecție împotriva OLGA risc înalt. Utilizând acești factori de predicție independenți a fost elaborat un model de predicție cu AUROC = 0.87023 (cut-off 0.25, Sensibilitate 80.64%, Specificitate 95.45%). Acest model poate selecta subiecții considerați cu posibil risc de atrofie extinsă pentru evaluare suplimentară prin examen endoscopic și carografiere histopatologică a mucoasei gastrice. Este posibil ca în viitor prin creșterea numărului de subiecți analizați să se definească și alți factori de predicție independenți ce ar putea crește acuratețea modelului de predicție. De asemenea este necesar un lot de validare pentru acest model, acest lucru fiind subiectul unui studiu viitor.

A doua parte a studiului a cuprins evaluarea expresiei serologice a TFF la subiecții cu CG și grupul control și elaborarea unui model de predicție al CG luând în calcul factori epidemiologici, de stil de viață și expresia TFF. Valorile medii ale TFF1 în grupul CG au fost de  $1.41 \pm 0.71$  ng/mL față de  $1.44 \pm 0.76$  ng/mL în grupul control, diferențele nevând semnificație ( $p=0.42590$ ). De asemenea pentru TFF2 valorile medii nu au prezentat semnificație statistică, deși s-a remarcat un nivel mediu mai mare în grupul control față de CG (grup control –  $52.26 \pm 6.91$  pg/mL vs grup CG –  $45.68 \pm 1.69$  pg/mL,  $p=0.46039$ ). Pentru TFF3 s-a notat o diferență cu semnificație statistică a valorilor medii în grupul CG față de grupul control. Astfel, valorile medii ale TFF3 în grupul CG au fost de 102.27 pg/mL față de  $76.93 \pm 2.15$  pg/mL în grupul control ( $p=0.04757$ , 63.6% subiecți CG cu valori peste cut-off 80 pg/mL, 39% subiecți cu valori peste cut-off 80 pg/mL). Datele legate de expresia TFF3 sunt concordante cu datele din literatură, spre deosebire de cele legate de TFF1 și TFF2 unde datele sunt diferite în funcție de studiu. Astfel, în primul studiu publicat ce a analizat expresia TFF la subiecții cu CG (192 subiecți cu CG și 1254 subiecți control), Kaise și colab [73] au decelat valori medii serologice mai mari pentru TFF1,2 și 3 la subiecții cu CG față de grupul control. Pentru TFF1 au fost decelate valori medii de  $2.8 \pm 1.9$  ng/mL la subiecții cu CG față de  $1.1 \pm 1.3$  ng/mL la subiecții control ( $p<0.0001$ ). Pentru TFF2 au fost decelate valori medii de  $5.3 \pm 3.1$  ng/mL la subiecții cu CG față de  $3.2 \pm 1.9$  ng/mL la subiecții control ( $p<0.0001$ ). Nivelele medii ale TFF3 decelate au fost de  $9.6 \pm 6.7$  ng/mL la subiecții cu CG față de  $5.5 \pm 3.1$  ng/mL la subiecții control ( $p<0.0001$ ). S-a notat de asemenea o sensibilitate superioară a TFF3 singur sau în combinație cu nivelele PG pentru predicția CG față de PG singur. Sensibilitatea



TFF3 a fost mai mare atât pentru CG de tip difuz cât și pentru CG de tip intestinal, valorile fiind mai mari pentru CG de tip intestinal decât pentru cel de tip difuz. Problema majoră a fost legată de specificitate care indiferent de modalitatea de utilizare (TFF3 singur sau în combinație cu PG) nu a depășit 80%. Atunci când a fost luată în calcul o valoare cut-off de 7 ng/mL sensibilitatea TFF3 în detecția CG a fost de 91.7%, însă cu o specificitate de 66%. Trebuie menționat faptul ca infecția *H.pylori* nu a influențat semnificativ nivelele serologice ale TFF. În studiul nostru nu s-au putut trage concluzii pertinente legate de infecția *H.pylori* deoarece nu am avut acces la date serologice privind nivelele de anticopri ale *H.pylori*. Într-un alt studiu japonez [72], un cut-off de 1.0 ng/mL al TFF1 a avut o sensibilitate de 87.7% și o specificitate de 95.6% în predicția infecției *H.pylori* (AUROC 0.95, OR 141.3). Pentru TFF2 și TFF3 nu s-a notat o influențare a nivelelor serice legată de infecția *H.pylori*. În plus, s-a notat o valoare predictivă mai bună a tuturor TFF pentru CG față de PG sau raportul PGI/II. Nivelele TFF1 și TFF2 au fost mai mici la subiecții cu CG diferențiat față de nivelele serologice la subiecții cu CG nediferențiat. Pentru TFF3 nu s-au notat diferențe între tipurile histopatologice de CG. În acest studiu s-au măsurat nivelele TFF3 și la un lot de subiecși cu cancer pancreatic și s-a notat prezența unui nivel serologic semnificativ mai mare față de subiecții control ( $17.1 \pm 13 \text{ ng/mL}$  vs  $2.72 \pm 0.80 \text{ ng/mL}$ ). Într-un alt studiu, de această dată din China [74], ce a inclus 72 subiecți cu CG, 61 subiecți cu gastriă cronică atrofică, 27 subiecți cu gastrită cronică non-atrofică și 37 subiecți control, AUROC pentru predicția CG pentru TFF1, TFF2, TFF3 și PGI/II au fost de 0.67 (95% CI [0.56-0.77]), 0.74 (95% CI [0.65-0.83]), 0.81 (95% CI [0.72-0.89]), respectiv 0.78 (95% CI [0.69-0.87]).

În analiza univariată a variabilelor epidemiologice și legate de stil de viață s-a notat în lotul studiat asocierea semnificativ statistică cu CG a vârstei peste 60 ani ( $p=0.00093$ ), sexului masculin ( $p=0.01126$ ), mediului rural de viață ( $p=0.01513$ ), istoricului de fumat peste 20 pachete an ( $p=0.00097$ ), consumul cronic de carne roșie ( $p=0.01670$ ), consumul cronic de carne procesată ( $p=0.00964$ ), consumul cronic AINS ca factor protectiv ( $p=0.02698$ ) și valoarea serologică a TFF3 peste 80 pg/mL ( $p=0.04757$ ). Toți acești factori epidemiologici și de risc de viață a fost descriși în literatură a fi asociați cu riscul de CG. Aceste variabile au fost introduse în analiza multivariată pentru decelarea factorilor independenți de predicție pentru CG în vederea elaborării modelului de predicție prin regresie logică. Factorii independenți de risc pentru CG pe baza cărora s-a elaborat modelul de predicție pentru CG au fost: nivelul TFF3 peste 80 pg/mL (OR = 6.61, 95% CI [0.49-3.28],  $p = 0.00295$ ), fumatul peste 20 pachete an (OR = 12.17, 95% CI [2.89-51.17],  $p = 0.00015$ ) și consumul cronic de carne roșie (OR = 3.53, 95% CI [1.06-11.73],  $p = 0.03805$ ). Modelul elaborat prin regresie

logistică pentru predicția CG a avut o valoare AUROC de 0.83012. Valoarea cut-off a ecuației de 0.45 oferă o sensibilitate de 79% cu o specificitate de 72.7% în predicția CG. Probabil prin inrolarea mai multor subiecți, ar putea fi luate în considerare și alte variabile legate de stilul de viață ce ar putea deveni factori independenți de predicție, având în vedere asocierea puternică cu CG din analiza univariată (Ex. Vârsta peste 60 ani, sexul masculin, consumul cronic carne procesată).

Studiul de față reprezintă primul studiu realizat la nivel național ce analizează expresia serologică a TFF la subiecții cu atrofie gastrică și CG. Mai mult, după cunoștințele noastre, până în prezent, este primul studiu care asociază pentru predicția atrofiei gastrice cu risc înalt și CG expresia serologică a TFF cu factori epidemiologici și de stil de viață. Bineînțeles, aceste modele de predicție sunt departe de a fi perfecte, însă pot fi îmbunătățite în viitor. Mai mult, considerăm, ca un biomarker ideal pentru predicția CG nu există, carcinogeneza fiind un proces complex ce include multe variabile, unele cunoscute, altele încă incomplet înțelese, și din acest motiv combinarea unor markeri serologici cu factori epidemiologici și legați de stilul de viață reprezintă o abordare logică. Desigur, aplicarea modelului de predicție elaborat poate selecta o populație la risc ce necesită evaluare endoscopică, însă foarte probabil, decelarea altor factori de risc ce nu sunt incluși în modelul actual, poate extinde numărul de subiecți ce necesită urmarire (ex. vârsta, sexul masculin). Un alt punct slab al acestui studiu este legat de lipsa unui lot de validare, acest lucru fiind subiectul unui studiu viitor. În plus, în cadrul acestui studiu nu am avut date complete legate de infecția cu *H.pylori*, respectiv titrul serologic al anticorpilor anti *H.pylori* și nu a putut fi analizată cu acuratețe decât asocierea acestei infecții în momentul diagnosticului. Mai mult, nu au fost disponibile date legate de nivelele serologice ale PGI/II ce probabil ar fi adus un plus modelului elaborat. Legat de biomarkerii reprezentați de TFF, poate cea mai importantă problemă este legată de lipsa unor valori cut-off standardizate, având în vedere studiile puține ce au fost efectuate până în prezent, acestea fiind efectuate doar în regiunea Asiatică, existând în acest mod posibilitatea unor particularități fenotipice. Mai mult, în studiile efectuate până în prezent metoda de detecție serologică a acestora nu este standardizată. În anumite studii au fost folosite kituri ELISA elaborate local în scop de cercetare, în timp ce în alt studiu a fost folosit un kit standardizat comercial (ex. USCN Life Science<sup>®</sup>, Wuhan, China). În cadrul studiului nostru am utilizat kituri ELISA comerciale MyBiosource<sup>®</sup>, SanDiego, USA. Fiecare dintre metodele descrise în literatură nu prezintă aceeași anticorpi utilizați sau substanțe de calibrare. Mai mult decât atât, decelarea unor valori crescute ale TFF ar putea ascunde alte patologii asociate. Astfel, în cazul decelării unei valori crescute a TFF3, de

exemplu, fără a se decela un CG, se pune problema abordării cazului respectiv, fiind cunoscut faptul că au fost descrise asocieri cu alte cancere precum cel pancreatic, colonic sau genital. Mai mult, valori crescute ale TFF au fost descrise și în afecțiuni non-maligne, precum bolile inflamatorii intestinale sau infecția *H.pylori* [84]. Din acest motiv foarte probabil asocierea datelor epidemiologice și de stil de viață la markerii serologici pentru predicția CG pare o soluție justificată.

#### 4. CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE:

##### 4.1.CONCLUZII:

- Orientarea fragmentelor biopsice este importantă pentru îmbunătățirea indexului de concordanță inter-observator în evaluarea extensiei și severității atrofiei gastrice.
- Utilizarea filtrelor de nitroceluloză pentru orientarea fragmentelor biopsice este o metodă simplă, ce necesită un timp de învățare foarte scurt pentru personalul din laboratorul de endoscopie.
- Utilizarea filtrelor de nitroceluloză pentru orientarea fragmentelor biopsice scurtează timpul de procesare al fragmentelor în cadrul laboratorului de histotehnică prin scurtarea timpului de includere la parafină, tăiere și colorare.
- Prin orientarea fragmentelor biopsice utilizând filtre de nitroceluloză crește calitatea secțiunilor histologice obținute.
- Atunci când este luată în calcul doar metaplazia intestinală pentru evaluarea riscului de progresie către displazie sau CG se remarcă o retrogradare a stadiilor de risc înalt OLGA la stadii cu risc scăzut OLGIM. Din acest motiv, evaluarea modificărilor mucozale gastrice ar trebui să includă evaluarea în ansamblu a atrofiei mucozale.
- Expresia serologică a TFF2 se asociază cu stadiile de risc înalt OLGA, iar expresia serologică a TFF3 se asociază cu CG, însă utilizarea lor ca markeri de predicție independenți este nesatisfăcătoare.
- Vârsta peste 60 ani și valoarea TFF2 peste 46.1 pg/mL au reprezentat factori independenți de predicție ai stadiilor OLGA cu risc înalt, în timp ce consumul cronic AINS a reprezentat factor independent protectiv pentru dezvoltarea stadiilor OLGA risc înalt.
- Modelul de predicție al OLGA risc înalt utilizând variabilele independente rezultate din analiza multivariată ar putea fi folosit ca metodă minim invazivă de selecție a populației cu risc crescut de stadii avansate ale atrofiei gastrice pentru supraveghere endoscopică ulterioară (AUROC=0.87).

- Sexul masculin, vârsta peste 60 ani, mediul rural de viață, fumatul peste 20 pachete an, consumul cronic carne roșie, consumul cronic carne procesată și expresia serologica a TFF3 peste 80 pg/mL reprezintă factori de risc asociați cu CG. Consumul cronic de AINS prezintă asociere semnificativă cu lotul control.
- Factorii independenți de predicție rezultați din analiza multivariată ce au stat la baza elaborării modelului de predicție pentru CG sunt reprezentați de expresia serologica a TFF3 peste 80 pg/mL, fumatul peste 20 pachete an și consumul cronic de carne roșie.
- Modelul de predicție pentru CG elaborat prin regresie logistică utilizând variabilele independente rezultate din analiza multivariată ar putea fi utilizat pentru selecția subiecților cu risc crescut de CG în vederea evaluării endoscopice (AUROC=0.83).
- Modelele elaborate sunt perfectibile, iar dacă vor fi confirmate prin loturi de control în viitor, ar putea sta la baza unei noi abordări de screening în masă în zonele cu risc crescut de CG pentru decelarea subiecților cu risc crescut în vederea supravegherii endoscopice.

#### 4.2.CONTRIBUȚII PERSONALE:

În cadrul primului studiu s-a dovedit faptul că orientarea fragmentelor biopsice gastrice îmbunătățește dramatic concordanța inter-observator pentru aprecierea stadiilor OLGA. În literatură principala problemă a evaluării atrofiei gastrice este dată de o concordanță inter-observator nesatisfăcătoare. Acest studiu compară concordanța inter-observator a evaluării stadiilor OLGA utilizând serii de fragmente neorientate și orientate prin folosirea filtrelor de nitroceluloză. Seriile de fragmente biopsice orientate și neorientate sunt prelevate în aceeași sesiune endoscopica de la aceeași pacienți, ceea ce conferă un design unic al studiului. De altfel, după cunoștințele noastre, acest tip de studiu este primul de acest fel din țară primul din literatură ce compară serii neorientate cu serii orientate de biopsii gastrice pentru stadializarea OLGA. În acest mod se scoate în evidență importanța orientării fragmentelor biopsice gastrice pentru o apreciere corectă a atrofiei gastrice. În acest mod se clarifică una din problemele esențiale ce stă foarte probabil la baza unei concordanțe inter-observator slabe raportate în literatură pentru evaluarea atrofiei gastrice. Mai mult, s-a demonstrat ca prin orientarea fragmentelor biopsice utilizând filtre de nitroceluloză calitatea secțiunilor histopatologice obținute se îmbunătățește. Rezultatele acestui studiu, în eventualitatea confirmării viitoare ale rezultatelor în cadrul altor studii, sugerează faptul că orientarea fragmentelor biopsice gastrice ar trebui efectuată de rutină.

În cel de-al doilea studiu au fost analizate expresiile serologice ale TFF la subiecții cu stadii OLGA risc înalt și CG. În plus, au fost analizați factori epidemiologici și de stil de viață pe baza cărora au fost elaborate modele de predicție pentru stadiile OLGA risc înalt și CG. Analiza expresiei serologice a TFF la subiecții cu CG și gastrită atrofică a fost efectuată în studii Asiatice. În țara noastră, acesta este primul studiu ce analizează expresia TFF la categoriile de subiecți menționate. În plus, după cunoștința noastră, combinarea variabilelor epidemiologice și de stil de viață cu expresia serologică a TFF în vederea elaborării unor modele de predicție pentru stadiile OLGA risc înalt și CG nu a mai fost realizată. Desigur, modelele rezultate sunt departe de a fi perfecte, necesitând înrolarea mai multor subiecți și validarea cu noi loturi de subiecți în studii viitoare. În plus, metodele de detecție ale TFF prezintă o serie de probleme legate de tipurile diferite de kituri ELISA utilizate în diverse studii, de posibile particularități fenotipice ale subiecților din anumite zone geografice și nu în ultimul rând de interferența cu alte patologii ce pot sta la baza expresiei crescute ale acestor biomarkeri. Carcinogeneza gastrică are la bază un mecanism complex și din acest motiv acest gen de modele de predicție utilizând markeri serologici și variabile epidemiologice și de stil de viață pot fi un început pentru teste minim invazive de screening în masă în zonele cu risc crescut pentru CG.

**BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ:**

1. Jemal A, Bray F, Center MM et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69.
2. GLOBOCAN 2012 (IARC). Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide în 2012. Section of Cancer Surveillance. World Health Organization GLOBOCAN database. [globocan.iarc.fr](http://globocan.iarc.fr).
3. Pinheiro PS, Tyczynsky JE, Bray F et al. Cancer incidence and mortality în Portugal. *Eur J Cancer* 2003; 39: 2507-2520.
4. Pounder RE, Ng D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection în different countries. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; Suppl 2:33.
5. Sporea I, Popescu A, van Blankenstein M et al. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection în western Romania. *Rom J Gastroenterol* 2003; 12: 15-18.
6. Suerbaum S and Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 1175-1186.
7. Park YJ, von Karsa L, Herrero R. Prevention strategies for gastric cancer: a global perspective. *Clin Endosc* 2014; 47: 478-489.
8. Isobe Y, Nashimoto A, Akazawa K, et al. Gastric cancer treatment în Japan: 2008 annual report of the JGCA nationwide registry. *Gastric Cancer* 2011; 14: 301-316.
9. Hamashima C, Shibuya D, Yamazaki H, et al. The Japanese guidelines for gastric cancer screening. *Jpn J Clin Oncol* 2008; 38: 259-267.
10. Rugge M, Capelle LG, Cappelleso R, et al. Precancerous lesions în the stomach: from biology to clinical patient management. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2013;27:205-223.
11. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, et al. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney system. International workshop on the histopathology of gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 1161-1181.
12. Price AB. The Sydney system: histological division. *J Gastroenterol Hepatol* 1991; 6: 209-222.
13. Dinis-Ribeiro M, Areia M, de Vries AC et al. Management of precancerous conditions and lesions în the stomach (MAPS): guideline from the European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE), European *Helicobacter* Study Group (EHSG), European Society of Pathology (ESP), and the Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva (SPED). *Endoscopy* 2012; 44: 74-94.
14. Rugge M, Genta RM. Group O. Staging gastritis: an international proposal. *Gastroenterology* 2005; 129: 1807-1808.
15. Rugge M, Genta RM. Staging and grading of chronic gastritis. *Hum Pathol* 2005; 36: 228-233.
16. Rugge M, de Boni M, Pennelli G, et al. Gastritis OLGA-staging and gastric cancer risk: a twelve-year clinico-pathological follow-up study. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31: 1104-1011.
17. Capelle LG, de Vries AC, Haringsma J et al. The staging of gastritis with the OLGA system by using intestinal metaplasia as an accurate alternative for atrophic gastritis. *Gastrointest Endosc* 2010; 71: 1150-1158.
18. Rugge M, Fassan M, Pizzi M et al. Operative link for gastritis assessment vs. operative link on intestinal metaplasia assessment. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 4596-4661
19. den Hoed CM, Holster IL, Capelle LG, et al. Follow-up of premalignant lesions în patients at risk for progression to gastric cancer. *Endoscopy* 2013; 45: 249-256.
20. Kapadia CR. Gastric atrophy, metaplasia and dysplasia. A clinical perspective. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 29-36.
21. Fukao A, Hisamichi S, Ohsato M et al. Correlation between the prevalence of gastritis and gastric cancer în Japan. *Cancer Causes Control* 1993; 4: 17-20.
22. Genta RM. Review article: gastric atrophy and atrophic gastritis—nebulous concepts în search of a definition. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12: 17-23.
23. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns în GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136: 359-386.
24. Park YH, Kim N. Review of atrophic gastritis and intestinal metaplasia as a premalignant lesion of gastric cancer. *J Cancer Prev* 2015; 20: 25-40.
25. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 784-789.
26. Yoon H, Kim N. Diagnosis and management of high risk group for gastric cancer. *Gut and Liver* 2015; 9: 5-17.
27. Tashiro A, Sano M, Kinameri K et al. Comparing mass screening techniques for gastric cancer în Japan. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4873-4874.
28. Miki K, Morita M, Sasajima M, et al. Usefulness of gastric cancer screening using the serum pepsinogen test method. *Am J Gastroenterol* 2003;98:735-9.

29. Varis K, Kekki M, Härkönen M, Sipponen P, Samloff IM. Serum pepsinogen I and serum gastrin în the screening of atrophic pangastritis with high risk of gastric cancer. *Scand J Gastroenterol* 1991;186:117–23.
30. Broutet N, Plebani M, Sakarovitch C, and Eurohepygast Study Group. Pepsinogen A, pepsinogen C, and gastrin as markers of atrophic chronic gastritis în European dyspeptics. *Br J Cancer* 2003; 88:1239–1247.
31. Knight T, Wyatt J, Wilson A, et al. *Helicobacter pylori* gastritis and serum pepsinogen levels în a healthy population: development of a biomarker strategy for gastric atrophy în high-risk groups. *Br J Cancer* 1996; 73: 819-824.
32. Di Mario F, Moussa AM, Caruana P, et al. “Serological biopsy” în first-degree relatives of patients with gastric cancer affected by *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 1223-1227.
33. Pasechnikov VD, Chukov SZ, Kotelevets SM, et al. Possibility of non-invasive diagnosis of gastric mucosal precancerous changes. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3146-3150.
34. Korstanje A, den Hartog G, Biemond I, et al. The serological gastric biopsy: a non-endoscopic diagnostic approach în management of hte dyspeptic patient: significance for primary care based on a survey of the literature. *Scand J Gastroenterol* 2002; 236 (Suppl): 22-26.
35. Mardh E, Mardh S, Mardh B, et al. Diagnosis of gastritis by means of a combination of serological analyses. *Clin Chim Acta* 2002; 320: 17-27.
36. Kiyohira K, Yoshihara M, Ito M, et al. Serum pepsinogen concentration as a amarker of *Helicobacter pylori* infection and the histologic grade of gastritis; evaluation of gastric mucosa by serum pepsinogen levels. *J Gastroenterol* 2003; 38: 332-338.
37. Bodger K, Wyatt JI, Heatley RV. Variation în serum pepsinogen with severity and topography of *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis în dyspeptic patients referred for endoscopy. *Helicobacter* 2001; 6: 216-224.
38. Urita Y, Hike K, Torii N, et al. Serum pepsinogens as a predictor of the topography of intestinal metaplasia în patients with atrophic gastritis. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 795-801.
39. Kitahara F, Kobabyashi K, Sato T. Accuracy of screening for gastric cancer using serum pepsinogen concentrations. *Gut* 1999; 44: 693-697.
40. Di Mario F, Cavallaro LG, Moussa AM, et al. Usefulness of serum pepsinogens în *Helicobacter pylori* chronic gastritis: relationship with inflammation, activity, and density of the bacterium. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1791-1795.
41. Yanaoka K, Oka M, Yoshimura N, et al. Risk of gastric cancer în asymptomatic, middle-aged Japanese subjects based on serum pepsinogen and *Helicobacter pylori* antibody levels. *InT J Cancer* 2008; 123: 917-926.
42. de Vries AC, Haringsma J, de Vries RA, et al. Biopsy strategy for endoscopic surveillance of premalignant gastric lesions. *Helicobacter* 2010; 15: 259-264.
43. Dinis-Ribeiro M, Yamaki G, Miki K et al. Meta-analysis on the validity of pepsinogen test for gastric carcinoma, dysplasia or chronic atrophic gastritis screening. *J Med Screen* 2004; 11: 141–147.
44. Agreus L, Kuipers Ej, Kupcinskaskas L, et al. Rationale în diagnosis and screening of atrophic gastritis with stomach-specific plasma biomarkers. *Scand J Gastroenterol* 2012; 47: 136-147.
45. Väänänen H, Vauhkonen M, Helske T, et al. Non-endoscopic diagnosis of atrophic gastritis with a blood test. Correlation between gastric histology and serum levels of gastrin-17 and pepsinogen I: A multicenter study. *Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 885-891.
46. McNicholl AG, Forné M, Barrio J, et al. Accuracy of GastroPanel for the diagnosis of atrophic gastritis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2014; 26: 941-948.
47. Thim L, May FE. Structure of mammalian trefoil factors and functional insights. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2956-2973.
48. Taupin D, Podolsky DK. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 721-732.
49. Hertel SC, Chwieralski CE, Hinz M, et al. Profiling trefoil factor family (TFF) expression în the mouse: identification of an antisense TFF1-related transcript în the kidney and liver. *Peptides* 2004; 25: 755-762.
50. Hoffman W, Jagla W, Wiede A. Molecular medecine of TFF-peptides: from gut to brain. *Histol Histopathol* 2001; 16: 319-334.
51. Hanby AM, Poulson R, Singh S, et al. Spasmolytic polypeptide is a major antral peptide: distribution of the trefoil peptides human spasmolytic polypeptide and pS2 în the stomach. *Gastroenterology* 1993; 105: 1110-1116.
52. Rio MC, Bellocq JP, Daniel JY, et al. Breast cancer-associated pS2 protein: synthesis and secretion by normal stomach mucosa. *Science* 1998; 241: 705-708.

53. Jorgensen KD, Diamant N, Jorgensen KH, et al. Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): III. Pharmacology of a new porcine pancreatic polypeptide with spasmolytic and gastric acid secretion inhibitory effect. *Regul Pept* 1982; 3: 231-243.
54. Machado JC, Carneiro F, Blin N, et al. Pattern of pS2 protein expression în premalignant and malignant lesions of gastric mucosa. *Eur J Cancer Prev* 1996; 5: 169-179.
55. Luqmani Y, Bennett C, Paterson I, et al. Expression of the pS2 gene în normal, benign and neoplastic human stomach. *Int J Cancer* 1989; 44: 806-812.
56. Yamaguchi H, Goldenring JR, Kaminishi M, et al. Association of spasmolytic polypeptide expressing metaplasia (SPEM) with carcinogen administration and oxyntic atrophy în rats. *Lab Invest* 2002; 82: 1045-1052.
57. Halldorsdottir AM, Sigurdardottir M, Jonasson JG, et al. Spasmolytic polypeptide expressing metaplasia (SPEM) associated with gastric cancer în Iceland. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 431-441.
58. Podolsky DK, Lynch-Devaney K, Stow JL, et al. Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. *J Biol Chem* 1993; 268: 122-130.
59. Hauser F, Poulsom R, Chinery R, et al. hP1B, a human P-domain peptide homologous with rat intestine trefoil factor, is expressed also în the ulcer-associated cell lineage and the uterus. *PNAS* 1993; 90: 6961-6965.
60. Aikou S, Ohmoto Y, Gunji T, et al. Tests for serum levels of trefoil factor family proteins can improve gastric cancer screening. *Gastroenterology* 2011; 141: 837-845.
61. Kaise M, Miwa J, Tashiro J, et al. The combination of serum trefoil factor 3 and pepsinogen testing is a valid non-endoscopic biomarker for predicting the presence of gastric cancer: a new marker for gastric cancer risk. *J Gastroenterol* 2011; 46: 736-745.
62. Huang Z, Zhang X, Lu H, et al. Serum trefoil factor 3 is a promising non-invasive biomarker for gastric cancer screening: A monocentric cohort study în China. *BMC Gastroenterology* 2014; 14: 74-82.
63. Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1998; 48: 3554-3560.
64. Rugge M, Meggio A, Pennelli G, et al. Gastritis staging în clinical practice: the OLGA staging system. *Gut* 2007; 56: 631-636.
65. Satoh K, Osawa H, Yoshizawa M et al. Assessment of atrophic gastritis using the OLGA system. *Helicobacter* 2008; 13: 225-229.
66. el-Zimaity HM, Graham DY, al-Assi MT et al. Interobserver variation în the histopathological assessment of *Helicobacter pylori* gastritis. *Hum Pathol* 1996; 27: 35-41.
67. Rugge M, Correa P, Di Mario F, et al. OLGA staging for gastritis: A tutorial. *Dig Liv Dis* 2008; 40: 650-658.
68. International Agency for Research on Cancer, World Health Organisation. Schistosomiasis, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risk to human. *Monogr Eval Carcinog Risk Hum* 1994; 61: 218-220.
69. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64:31-49.
70. Correa P, Haenszel W, Cuello C et al. Gastric precancerous process în a high risk population: cohort follow-up. *Cancer Res* 1990; 50: 4737-4740.
71. Graham DY, Nurgalieva ZZ, El-Zimaity HM et al. Noninvasive versus histologic detection of gastric atrophy în a Hispanic population în North America. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 306-314
72. Haj-Sheykholeslami A, Rakhshani N, Amirzargar A et al. Serum pepsinogen I, pepsinogen II, and gastrin 17 în relatives of gastric cancer patients: comparative study with type and severity of gastritis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 174-179
73. Hartleb M, Wandzel P, Waluga M et al. Non-endoscopic diagnosis of multifocal atrophic gastritis; efficacy of serum gastrin-17, pepsinogens and *Helicobacter pylori* antibodies. *Acta Gastroenterol Belg* 2004; 67: 320-326
74. Madsen J, Nielsen O, Tornøe L, et al. Tissue localization of human trefoil factors 1,2, and 3. *J Histochem Cytochem* 2007; 55: 505-513.
75. Kjellek S. The trefoil factor family – small peptides with multiple functionalities. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 1350-1369.
76. Hatoh M. Trefoil factors and human gastric cancer (review). *Int J Mol Med* 2003; 12: 3-9.
77. Madsen J, Nielsen O, Tornøe L, et al. Tissue localization of human trefoil factors 1,2, and 3. *J Histochem Cytochem* 2007; 55: 505-513.
78. Ribieras S, Tomasetto C, Rio MC. The pS2/TFF1 trefoil factor, from basic research to clinical applications. *Biochim Biophys Acta* 1998; 19: F61-F67.
79. Xiao P, Ling H, Gang L, et al. Trefoil factors: Gastrointestinal-specific proteins associated with gastric cancer. *Clinica Chimica Acta* 2015; 450: 127-134.



80. Gutiérrez-González L, Wright NA. Biology of intestinal metaplasia în 2008: more than a simple phenotypic alteration. *Dig Liver Dis* 2008; 40: 510–522
81. Loh YH, Jakszyn P, Luben RN, et al. N-nitroso compounds and cancer incidence: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk Study. *Am J Clin Nutr* 2011; 93: 1053-1061
82. Sahin IH, Hassan MM, Garrett CR. Impact of non-steroidal anti-inflammatory drugs on gastrointestinal cancers: current state-of-the-science. *Cancer Lett* 2014; 345: 249-257.
83. Dai Y, Wang WH. Non-steroidal anti-inflammataory drugs în prevention of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2884-2889.
84. Samson MH. Quantitative measurments of trefoil factor family peptides: possibilities and pitfalls. *Scan J Clin Lab Invest* 2013; 73: 193-202.

**LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE:**

1. **Cotruta B**, Gheorghe C, Iacob R, Dumbrava M, Radu C, Bancila I, Becheanu G. Improved Interobserver Agreement of the OLGA Staging System Using Oriented Nitrocellulose Filters Gastric Biopsies. *Gastrointest Endosc* 2015; 81: AB572. [https://www.giejournal.org/article/S0016-5107\(15\)02088-X/pdf](https://www.giejournal.org/article/S0016-5107(15)02088-X/pdf)
2. **Cotruta B**, Becheanu G, Iacob R, Gheorghe C. The Orientation of the Gastric Biopsy Specimen for the Gastric Atrophy Assessment Is Important. *J Gastrointest Liver Dis* 2016; 25: 123-124 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27014768>
3. **Cotruta B**, Gheorghe C, Iacob R, Dumbrava M, Radu C, Bancila I, Becheanu G. The Orientation of Gastric Biopsy Samples Improves the Inter-observer Agreement of the OLGA Staging System. *J Gastrointest Liver Dis* 2017; 26: 351-356. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29253048>
4. Gheorghe C, **Cotruta B**, Becheanu G, Dumbrava M, Verban S. *Giardia duodenalis* associated with intestinal metaplasia of the stomach. *J Gastrointest Liver Dis*. 2017; 26: 221. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28922429>
5. **Cotruta B**, Iacob R, Dima S, Constantinescu I, Becheanu G, Dumbrava M, Radu C, Bancila I, Pirvulescu I, Stanciu S, Toader A, Popescu I, Gheorghe C. Prediction models for advanced gastric atrophy and gastric cancer using serological expression of trefoil factor family (TFF) peptides, epidemiologic, and lifestyle risk factors. *J Gastrointest Liver Dis*. 2018; 27: 115 (Suppl 2).