

І. С. Шпонька, В. Р. Яковенко

Визначення маркерів м'язової диференціації SMA та MSA у CD117-позитивних та CD117-негативних гастроінтестинальних стромальних пухлинах із різним злоякісним потенціалом

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

Ключові слова: гастроінтестинальні стромальні пухлини, MSA, SMA, потенціал злоякісності.

Гастроінтестинальні стромальні пухлини потребують ретельної диференційної діагностики із гладком'язовими новоутвореннями (доброякісними і злоякісними) шлунково-кишкового тракту. З метою визначення залежностей між клінічними (вік, локалізація первинної пухлини) та морфологічними (гістологічний варіант будови, характер експресії маркерів гістогенезу CD117 та проліферативної активності Ki-67) характеристиками гастроінтестинальних стромальних пухлин та експресією маркерів м'язової диференціації у 47 випадках вивчали характер забарвлення SMA, MSA (імуногістохімічний метод). Встановили, що MSA-позитивні гастроінтестинальні стромальні пухлини виявляють у 6,4%. Розподіл SMA-позитивних випадків у групах із різними клініко-морфологічними характеристиками схожий. У нашому дослідженні не виявили прогностичного значення маркера SMA ($p > 0,05$), хоча зразки з високими показниками маркера Ki-67 частіше виявляють серед SMA-позитивних пухлин.

Определение маркеров мышечной дифференцировки SMA и MSA в CD117-позитивных и CD117-негативных гастроинтестинальных стромальных опухолях с различным злокачественным потенциалом

І. С. Шпонька, В. Р. Яковенко

Гастроинтестинальные стромальные опухоли требуют проведения тщательной дифференциальной диагностики с гладкомышечными новообразованиями желудочно-кишечного тракта. С целью определения зависимостей между клиническими (возраст, локализация первичной опухоли) и морфологическими (гистологический тип строения, характер экспрессии маркеров гистогенеза CD117 и пролиферативной активности Ki-67) характеристиками гастроинтестинальных стромальных опухолей и экспрессией маркеров мышечной дифференцировки в 47 случаях изучали характер окраски SMA, MSA (иммуногистохимический метод). Установлено, что MSA-положительные гастроинтестинальные стромальные опухоли отмечают в 6,4%. Распределение SMA-позитивных случаев в группах с различными клинико-морфологическими характеристиками похоже. В нашем исследовании не установили прогностического значения маркера SMA ($p > 0,05$), хотя образцы с высокими показателями маркера Ki-67 чаще отмечают среди SMA-позитивных случаев.

Ключевые слова: гастроинтестинальные стромальные опухоли, MSA, SMA, потенциал злокачественности.**Патология.** – 2014. – №2 (31). – С. 38–41

Determination of muscle differentiation markers SMA and MSA in CD117-positive and CD117-negative gastrointestinal stromal tumors of different malignant potential

I. S. Shpon'ka, V. R. Yakovenko

Aim. To determinate the muscle differentiation markers SMA and MSA in CD117-positive and CD117-negative gastrointestinal stromal tumors of different malignant potential.

Methods and results. Gastrointestinal stromal tumors (GIST) require a thorough differential diagnosis with smooth muscle tumors (benign and malignant) of the gastrointestinal tract. In order to determine the relationships between the clinical (age, localization of the primary tumor) and morphological (histological type of structure, expression of markers of histogenesis - CD117 and proliferative activity - Ki-67) characteristics of GIST and expression of markers of muscle differentiation we studied character of coloring SMA, MSA in the 47 cases (immunohistochemical method).

Conclusion. It was established, that MSA-positive GIST were found in 6.4%. Distribution of SMA-positive cases in groups with different clinical and morphological characteristics is similar. In our study, we found no prognostic value of the marker SMA, although samples with high levels of expression of marker Ki-67 are more common among SMA-positive cases ($p > 0.05$).

Key words: Gastrointestinal Stromal Tumors, MSA, SMA, Neoplasms.**Pathologia.** 2014; №2 (31): 38–41

Гастроінтестинальні стромальні пухлини (ГІСП) є мезенхімальними новоутвореннями шлунково-кишкового тракту, значно рідше екстрагастроінтестинальної локалізації [1]. За результатами популяційних досліджень [2] виділяють такі групи ГІСП: доброякісні з невизначеним потенціалом злоякісності та злоякісні, що затверджено у класифікації пухлин ШКТ BOOЗ [3]. Випадки, що належали до злоякісних, як і інші саркоми, показали резистентність до лікування, їх визначали менше ніж у 10% пацієнтів із клінічною відповіддю на

звичайні методи хіміо- та променевої терапії [4]. Після введення в практичну онкологію препаратів таргетної терапії (імантиніб і його аналоги) серед пацієнтів з операбельним первинним новоутворенням десятирічний безрецидивний період вийшов на рівень 46–80% [5]. Вважається, що ГІСП виникають із клітин Кахала – пейсмеркерів шлунково-кишкового тракту – чи їх стовбурових клітин-попередників, які можуть диференціюватись у гладком'язові клітини при порушенні Kit-сигналізації. Ці дані пояснюють наявність морфологічної

схожості ГІСП (клітини організовані у пучки з різними напрямками, мають веретеноподібну форму з багатою цитоплазмою, центрально розташоване видовжене ядро з притупленими кінцями, іноді перинуклеарні вакуолі) з іншими злоякісними мезенхімальними новоутвореннями (наприклад, лейоміосаркоми тощо) та аргументує необхідність ретельної диференційної діагностики [6,7]. За даними найбільше визнаних дослідників ГІСП С. Д. Fletcher і М. Miettinen, експресію імуногістохімічних маркерів SMA (який виявляє α -актин гладкий) та MSA (який виявляє α та γ ізоформи мікрофіламенту актину, включаючи усі три типи α -актину: гладкий, серцевий і скелетний) можна знайти у 25–40% випадків досліджуваних пухлин [8,9].

Мета роботи

Оцінити наявність взаємозв'язків між клініко-морфологічними та імуноморфологічними характеристиками гастроінтестинальних стромальних пухлин (вік, локалізація, гістологічний тип будови, показник проліферативної активності за маркером Ki-67, експресія специфічного діагностичного маркера CD117 та маркерів гладком'язової диференціації SMA та MSA).

Матеріали і методи дослідження

Вивчили 47 випадків біопсійного й операційного матеріалу пухлин, верифікованих як ГІСП. Діагноз встановлювали шляхом гістологічного та імуногістохімічного дослідження на базі морфологічного відділу діагностичного центру медичної академії (м. Дніпропетровськ) протягом 2012–2014 рр., спираючись на рекомендації ВООЗ щодо пухлин ШКТ [3]. Фрагментів новоутворень, що належали жінкам, було 23 (48,9%), чоловікам – 24 (51,1%). Гістологічний тип зразків ГІСП визначали два досвідчені морфологи незалежно один від одного.

Технологія імуногістохімічного дослідження відповідає протоколам компанії ThermoScientific (США). Система візуалізації – Quanto та DAB Chromogen, ThermoScientific (США), наносили на зрізи 4 мкм завтовшки. Реакції оцінювали напівкількісним методом, тобто дифузне чи фокальне коричневе мембранне, цитоплазматичне та «dot-like» забарвлення різного ступеня інтенсивності (для маркера CD117 (клон ab-1, ThermoScientific, розведення 1:200), SMA (клон ab-1,

ThermoScientific, розведення 1:500), MSA Ab-4 (клон HNF-35, ThermoScientific, розведення 1:100), що розцінювали як позитивну чи частково позитивну (в частині пухлинних клітин) реакцію. Для первинного антитіла Ki-67 (клон sp6, ThermoScientific, розведення 1:150) появу хромогену в ядрі оцінювали двоє досвідчених морфологів незалежно один від одного.

Маркер проліферативної активності Ki-67 зі стандартизованою схемою оцінювання (дані класифікації ВООЗ пухлин ШКТ) і відносною доступністю у практичній медицині обрано як критерій потенціалу злоякісності: низький – менше ніж 5% забарвлених пухлинних клітин не менше ніж у 10 полях зору при збільшенні $\times 200$, 6–10% – помірний, більше як 10% – високий [3].

Статистично дані опрацьовували у програмі SPSS Statistica 17.0 за допомогою точного тесту Фішера.

Дослідження здійснене у рамках науково-дослідної роботи «Патогістологічна та імуногістохімічна характеристики гастроінтестинальних стромальних пухлин» (номер державної реєстрації 00112U006965).

Результати та їх обговорення

Спираючись на клініко-морфологічні ознаки, зразки поділили на групи залежно від характеру експресії імуногістохімічного маркера гладком'язової диференціації SMA за такими критеріями, як вік хворих, локалізація первинної пухлини, морфологічний варіант будови, характер забарвлення маркерів CD117 та Ki-67. Кількість MSA-позитивних зразків є незначною – 3 (6,4%), не даючи змоги поділити їх на підгрупи за названими критеріями. Відомо, що SMA виявляє ізоформу α -актину, яка знаходиться у гладких м'язах, а MSA – три типи α -актину та γ -актин гладкий. Тому така виражена експресія SMA, можливо, пов'язана із наявністю перехресних реакцій з іншими ізоформами цього протеїну, який є частиною системи мікрофіламентів у всіх клітинах організму. Значно меншу кількість MSA-позитивних випадків ГІСП у порівнянні з групою SMA-позитивних, імовірно, можна пояснити більшою чутливістю маркера MSA саме до γ -актину гладкого та значно меншою наявністю останнього (за реакціями, які отримали) у клітинах ГІСП, ніж α -актину гладкого.

Дані, що отримали під час аналізу клініко-морфологічних характеристик ГІСП, наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Поділ новоутворень за клініко-морфологічними показниками, n, %

SMA	Вік			Морфологічний тип будови			Локалізація				
	<40 років	41–59 років	>60 років	Епітеліоідно-клітинний	Веретено-подібний	Змішаний	Шлунок	Тонкий кишечник	Товстий кишечник	Пряма кишка	eГІСП
+	1	3	3	1	5	1	1	4	1	-	1
(n=7)	14,3%	42,85%	42,85%	14,3%	71,4%	14,3%	14,3%	57,1%	14,3%	-	14,3%
+(у частині клітин) (n=4)	-	2	2	-	2	2	1	-	-	1	2
		50%	50%		50%	50%	25%			25%	50%
-	5	11	20	6	19	11	17	5	3	2	9
(n=36)	13,9%	30,5%	55,6%	16,7%	52,8%	30,5%	47,2%	13,9%	8,3%	5,6%	25%
Загалом (n=47)	6	16	25	7	26	14	19	9	4	3	12
	12,7%	34,1%	53,2%	14,9%	55,3%	29,8%	40,4%	19,2%	8,5%	6,4%	25,5%
p	0,168			0,229			0,525				

Примітка: різниця вірогідна при $p < 0,05$.

Поділ новоутворень за імуноморфологічними характеристиками, n, %

SMA	CD117			Ki-67		
	+	+ в частині клітин	.	низька	помірна	висока
+(n=7)	4 57,1%	2 28,6%	1 14,3%	-	3 42,9%	4 57,1%
+(в частині клітин)(n=4)	2 50%	1 25%	1 25%	-	1 25%	3 75%
-(n=36)	25 69,4%	5 13,9%	6 16,7%	12 33,4%	7 19,4%	17 47,2%
Разом(n=47)	31 65,9%	8 17,05%	8 17,05%	12 25,5%	11 23,4%	24 51,1%
p	0,172			0,347		

Примітка: різниця вірогідна при $p < 0,05$.

Усі зразки поділили на три головні групи за характером експресії маркера SMA: з позитивним статусом (зразки з над-, вираженою чи помірно вираженою, частіше дифузною експресією у мембрані та цитоплазмі більшої частини пухлинних клітин), частково-позитивні за SMA і пухлини з негативною реакцією SMA. Друга група – зразки з наявністю вираженої дифузної чи фокальної експресії, у тому числі і надекспресії, у меншій частині клітин новоутворення. Як реакцію «dot-like» розглядали слабкої інтенсивності мембранне та/чи цитоплазматичне, переважно фокальне, забарвлення та визначали як негативний статус маркера SMA. Число ГІСП із позитивним забарвленням SMA становило 23,4% від загальної кількості (11 випадків) (рис. 1, кольор. вкладка 1). Зокрема, 7 (14,9%) випадків, що мали дифузне чи фокальне мембранне забарвлення вираженої інтенсивності, 4 (8,5%) – помірної інтенсивності у частині пухлинних клітин. Але більшість зразків новоутворень ввійшла до групи з негативним статусом маркера SMA – 36 випадків (76,6%), що відповідає даним M. Miettinen і J. Lasota [1].

Пацієнти вікових груп від 41 до 59 років і старші за 60 років із діагнозом ГІСП із SMA-позитивним статусом становлять найбільшу частку у цій підгрупі (по 5 випадків із 11 SMA-позитивних, 45,5%), а в групі SMA-негативних більшість формують пацієнти старші за 60 років (20 випадків із 36, 55,6%), але вірогідної статистичної різниці не виявили ($p > 0,05$).

Серед SMA- позитивних і негативних ГІСП визначають переважно веретеноподібний гістологічний тип будови – 7 (63,6%) і 26 (55,3%) випадків відповідно, хоча серед досліджуваних новоутворень із частково-позитивною реакцією SMA веретеноподібний і змішаний типи мають рівні частки. Можливо, це пов'язано із незначною кількістю таких зразків. Однак можна сказати, що наявність експресії SMA не пов'язана із морфологічним типом будови ГІСП ($p > 0,05$).

Серед зразків із негативним статусом SMA більшість локалізована у шлунку – 17 (47,2%), а ГІСП з експресією SMA найчастіше траплялись у тонкому кишечнику (4 випадки, 36,4%) та екстрагастроінтестинально (3 випадки, 27,3%). Тобто загальна кількість SMA-позитивних новоутворень шлунку менша, ніж ГІСП тонкого кишечника, що не збігається із загальноприйнятою теорією розташування ГІСП [1–3], але статистично підтвердженої залежності між характером експресії SMA та локалізацією не виявили ($p > 0,05$).

Результати, які отримали під час аналізу імуногістохімічних характеристик ГІСП, наведені у таблиці 2.

Розподіл випадків із забарвленням маркером SMA за характером експресії CD117 (схема оцінювання його забарвлення тотожна схемі для SMA) і в кількісних, і в відсоткових показниках збігається із розподілом SMA-негативних ГІСП, що підтверджено статистично ($p > 0,05$).

Усі випадки з експресією первинного антитіла SMA мають показники помірної та високої проліферативної активності – 4 (36,4%) та 7 випадків (63,6%) відповідно.

Серед SMA-негативних ГІСП чверть випадків припадає на новоутворення із низьким потенціалом злякисності. Хоча в обох групах із чи без експресії SMA більша частина випадків має високий показник проліферативної активності (24 випадки, 51,1% у групі SMA-негативних пухлин). Не виявили статистичної залежності між відсутністю експресії SMA та показником проліферативної активності. Хоча є публікації, що підтверджують зв'язок між несприятливим прогнозом перебігу захворювання та втратою експресії маркерів м'язової диференціації [9].

Висновки

Аналіз відповідності клініко-морфологічних особливостей ГІСП залежно від характеру експресії ряду імуноморфологічних маркерів (SMA, MSA, CD117, Ki-67) дає можливість зробити висновки:

1. Експресія MSA трапляється у ГІСП доволі рідко, менше ніж 10%.

2. Експресія SMA наявна у 23,4% відсотках ГІСП і не залежить від локалізації первинної пухлини, віку пацієнтів у момент встановлення діагнозу ГІСП, морфологічного типу будови, наявності експресії маркера CD117, що підтверджують результати статистичного опрацювання даних ($p > 0,05$).

3. Вірогідна залежність між характером забарвлення SMA і ступенем вираженості експресії Ki-67 статистично не підтвердилась ($p > 0,05$), але виявили, що серед SMA-позитивних пухлин частіше визначають показники високої проліферативної активності, ніж у SMA-негативних (63,6% і 51,1% відповідно). У нашому дослідженні не виявили прогностичного значення маркера SMA.

Перспективи подальших досліджень полягають у продовженні пошуку критеріїв, котрі статистично вірогідно виявлять взаємозв'язок між клінічними та морфологічними даними, що обґрунтовують наведені результати.

Список літератури

- Miettinen M. Histopathology of gastrointestinal stromal tumor / M. Miettinen, J. Lasota // *Journal of surgical oncology*. – 2011. – Vol. 104. – №. 8. – P. 865–873.
- Gastrointestinal stromal tumors in Turkey: experiences from 3 centers / [F. Selcukbiricik, S. Yalçın, D. Tural et al.] // *Onkologie*. – 2012. – Vol. 36. – №. 1–2. – P. 18–24.
- World Health Organisation classificatoin of tumors. pathology and genetic of tumors of the digestive system / [S.R. Hamilton, L.A. Aaltonen, C. Capella et al.] ; editors S.R. Hamilton, L.A. Aaltonen. – Lyon : IARC Press, 2000. – 314 p.
- NCCN Task Force report: management of patients with gastrointestinal stromal tumor (GIST)-update of the NCCN clinical practice guidelines / [G.D. Demetri, R.S. Benjamin, C.D. Blanke et al.] // *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*. – 2007. – Vol. 5. – P. S1–29.
- Joensuu H. Gastrointestinal stromal tumour / H. Joensuu, P. Hohenberger, C.L. Corless // *The Lancet*. – 2013. – Vol. 382. – №. 9896. – P. 973–983.
- Odze R.D. Surgical pathology of GI tract, liver, biliary tract, and pancreas / R.D. Odze, J.R. Goldblum, J.M. Crawford. – 1st ed. – New York, 2004. – 1067 p.
- Role of Ki-67 as a prognostic factor in gastrointestinal stromal tumors / [B. Belev, I. Brčić, J. Prejac et al.] // *World journal of gastroenterology: WJG*. – 2013. – Vol. 19. – №. 4. – P. 523.
- Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach / [C.D. Fletcher, J.J. Berman, C. Corless et al.] // *International Journal of Surgical Pathology*. – 2002. – Vol. 10. – №. 2. – P. 81–89.
- Гастроинтестинальные стромальные опухоли: современная классификация, дифференциальная диагностика и факторы прогноза / [А.Г. Корнилова, Л.М. Когония, В.С. Мазурин и др.] // *Эффективная фармакотерапия*. – 2014. – № 14. – С. 20–23.
- 104(8), 865–873. doi: 10.1002/jso.21945.
- Selcukbiricik, F., Yalçın, S., Tural, D., Erdamar, S., Demir, G., Doğusoy, G., & Mandel, N. M. (2012). Gastrointestinal stromal tumors in Turkey: experiences from 3 centers.
- Hamilton, S.R., Aaltonen, L.A. (2000). *World Health Organisation classificatoin of tumors. Pathology and genetics of tumors of the digestive system*. Lyon: IARC Press.
- Demetri, G. D., Benjamin, R. S., Blanke, C. D., Blay, J. Y., Casali, P., Choi, H. & Zalcborg, J. (2007). NCCN Task Force report: management of patients with gastrointestinal stromal tumor (GIST)-update of the NCCN clinical practice guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, 5, 1–29.
- Joensuu, H., Hohenberger, P., & Corless, C. L. (2013). Gastrointestinal stromal tumour. *The Lancet*, 382(9896), 973–983. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60106-3.
- Odze, R. D., Goldblum, J. R., & Crawford, J. M. (2004). *Surgical pathology of GI tract, liver, biliary tract, and pancreas*. New York.
- Belev, B., Brčić, I., Prejac, J., Golubić, Z. A., Vrbanc, D., Božikov, J., & Razumović, J. J. (2013). Role of Ki-67 as a prognostic factor in gastrointestinal stromal tumors. *World journal of gastroenterology: WJG*, 19(4), 523. doi: 10.3748/wjg.v19.i4.523.
- Fletcher, C. D., Berman, J. J., Corless, C., Gorstein, F., Lasota, J., Longley, B. J. & Weiss, S. W. (2002). Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach. *International Journal of Surgical Pathology*, 10(2), 81–89. doi: 10.1177/106689690201000201.
- Kornilova, A. G., Kogoniya, L. M., Mazurin, V. S., Bordanov, S. V. & Okseniuk, O. S. (2014). Gastrointestinal'nye stromal'nye opukholi: sovremennaya klassifikaciya, differencial'naya diagnostika i faktory prognoza. *E'ffektivna farmakoterapiya*, 14(1), 20–23. [in Russian].

References

- Miettinen, M., & Lasota, J. (2011). Histopathology of gastrointestinal stromal tumor. *Journal of surgical oncology*,

Відомості про авторів:

Шпонька І.С., д. мед. н., професор, зав. каф. патологічної анатомії і судової медицини, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України».

Яковенко В. Р., очний аспірант каф. патологічної анатомії і судової медицини, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», E-mail: Val_Y@ua.fm.

Надійшла в редакцію 23.06. 2014 р.