

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2014
УДК: 616.33-006-008.9-092.18

**ЗНАЧЕНИЕ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕЙ ЖЕЛУДКА**

И.С. Шпонька, А.В. Пославская, В.Р. Яковенко

ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины»,
г. Днепропетровск, Украина

Статья посвящена проблеме диагностики злокачественных новообразований желудка, анализу расхождения диагнозов после применения рутинного морфологического исследования и иммуногистохимического метода с применением моноклональных антител, оценке пролиферативной активности различных групп опухолей этой локализации. Неверные первичные диагнозы были выявлены в 33 из 62 случаев (53,2%), исследованных нами групп опухолей желудка. Определение индекса пролиферации является крайне важным для выявления потенциала злокачественности гастроинтестинальных стромальных опухолей и степени дифференцировки нейроэндокринных раков.

Ключевые слова: опухоли желудка, иммуногистохимия, дифференциальная диагностика, прогноз.

Опухоли желудка (ОЖ), являющиеся одними из наиболее распространенных новообразований населения Восточной Европы, включают в себя широкий спектр различных по гистогенезу опухолей, чей прогноз зависит от генерализации процесса, правильно поставленного диагноза и подобранного лечения [3, 4, 5, 6, 8, 10]. Существуют многочисленные гистологические классификации ОЖ, но ни одна не является достаточно удовлетворительной в плане прогноза на первичном этапе диагностики. Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) позволяет значительно повысить диагностическую и экономическую эффективность исследования опухолей человека [2], особенно анапластических со стертой морфологической картиной, а определение пролиферативной активности приобретает особое значение в диагностике различных групп ОЖ [2, 4].

Материалы и методы

Для исследования был отобран материал 62 пациентов (36 женщин и 26 мужчин) в возрасте от 24 до 78 лет (средний возраст

59±3, медиана 61), которые на протяжении 2012-2013 гг. обращались с целью уточнения патогистологического диагноза ОЖ для проведения дополнительного ИГХ исследования на базе морфологического отдела Диагностического центра Медицинской Академии г. Днепропетровска. Использовались формалин-фиксированные и парафин-залитые экземпляры биопсийного материала. Перечень первичных моноклональных антител (TermoScientific, США) для ИГХ (табл. 1). Для идентификации реакций использовалась система визуализации Quanto (TermoScientific, США), хромоген DAB.

Индекс пролиферации (ИП) определялся процентом опухолевых клеток с Ki-67-позитивной реакцией. Интенсивность цитоплазматической, ядерно-цитоплазматической и мембранной реакций оценивалась как слабая (+), умеренная (++) , сильная (+++). Статистическая обработка данных проводилась в программе SPSS Statistica 17.0. Сравнение средних значений осуществлялось по критерию Стьюдента. Значимой считалась связь при $p < 0,05$.

Таблица 1

Первичные моноклональные антитела

Первичные антитела	Клон (разведение)	Локализация специфической реакции
Cytokeratin, Pan	AE1/AE3(1:200)	Цитоплазма
Cytokeratin 7 (CK7)	OV-TL 12/30 (1:100)	Цитоплазма
Ki-67	SP6 (1:200)	Ядро
S100	4C4.9 (1:700)	Ядерно-цитоплазматическая
Vimentin	V9 (1:250)	Цитоплазма
CD34	QBEnd 10 (1:100)	Мембрана, цитоплазма
CD20	L26 (1:500)	Мембрана, цитоплазма
CD79a	SP18 (1:500)	Мембрана, цитоплазма
CD3	SP7 (1:500)	Цитоплазма
CD117	ab-1 (1:200)	Цитоплазма, мембрана
DOG1	SP31 (1:100)	Цитоплазма, мембрана
Chromogranin A	LK2H10 (1:100)	Цитоплазма, мембрана
Synaptophysin	SYPO2 (1:300)	Цитоплазма, мембрана

Результаты и их обсуждение

Согласно классификации ВОЗ все диагностируемые нами ОЖ были разделены на две группы (1) эпителиальные и (2) неэпителиальные [5, 10].

В группе (1): 19 случаев недифференцированных раков желудка (НРЖ), 9 аденокарцином желудка (АЖ), 4 карциноида (высокодифференцированного

нейроэндокринного рака (НЭР) и 5 низкодифференцированных НЭР. В группу (2) ОЖ были отнесены: 13 гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО), 11 лимфом (в том числе 1 лимфома Беркитта) и 1 липосаркома. Первичные диагнозы ОЖ после стандартной окраски гематоксилин-эозин (Г-Э) представлены в таблице 2.

Таблица 2

Совпадение первичных патогистологических диагнозов опухолей желудка и после проведения ИГХ

Первичный патогистологический диагноз	n (%)	Совпадение диагнозов после проведения ИГХ, n (%)
1. Карцинома	28 (45,2%)	19 из 28 (67,9%)
2. ГИСТ	7 (11,3 %)	7 из 7 (100%)
3. Лимфома	5 (8,0%)	3 из 5 (60%)
4. Лейомиома	4 (6,4%)	0 из 4 (0%)
5. Карциноид	3 (4,9%)	0 из 3 (0%)
6. Гиперплазиогенный полип	3 (4,9%)	0 из 3 (0%)
7. Неврилеммома	1 (1,6%)	0 из 1 (0%)
8. ?	11 (17,7%)	-

Примечание: в группу карцином после ИГХ вошли АЖ, НРЖ, НЭР

Согласно Laurén's классификации аденокарциномы относятся к «intestinal» типу карцином желудка [5,6,10] и представляют собой большую часть наблюдений злокачественных новообразований этой локализации. В нашем исследовании выявлены 7 АЖ низкой и 2 – умеренной степени дифференциации (в 5 случаях был предположен НРЖ, 2 – ?, 1 – лимфо-

ма и 1 – карциноид, что и послужило поводом для ИГХ). Все они показали позитивную реакцию на Cytokeratin, Pan (рис. 1 А), негативную на Vimentin и хотя бы частично окрашивались СК7. ИП колебался в пределах 28% – 54% (среднее значение 34±2%, медиана 36%) (рис. 1 Б).

Оказалось, что сложность для диагностики представили случаи АЖ с

обильной лимфоидной стромой, симулирующие лимфому, и плохо изготовленные препараты. Тонкие срезы с Cytokeratin, Pan четко демонстрируют тубулярные или папиллярные структуры АЖ (рис. 1 А), что позволяет обнаружить «intestinal» тип, вместо «diffuse» типа НРЖ, выставленного при окраске Г-Е.

Анализ 19 случаев НРЖ показал широкое разнообразие морфологических «diffuse» типов: 4 перстневидноклеточных, где более 50% клеток ОЖ содержали в своей цитоплазме вакуоли с муцином (рис. 1 В), 2 случая редких крупноклеточных НРЖ с массивной нейтрофильной инфильтрацией (Fletcher Ch. (2013) ссылается на 5 подобных случаев, и связывает этот феномен с выработкой опухолевыми клетками ИИ-8 и с лучшим прогнозом, особенно у женщин [5]), 3 медуллярных НРЖ с лимфоидной инфильтрацией, 6 мелкоклеточных НРЖ с выраженной стромой, 4 – крупноклеточных НРЖ с эозинофильной цитоплазмой атипичных клеток и агрессивным инфильтративным ростом. Несмотря на сложность диагностики, первично в 14 (73,7%) случаях был выставлен НРЖ (остальные в 2 – ?, 1 – лимфома, 1 – лейомиома и 1 – гастрит, вероятно из-за скудности материала). Все случаи НРЖ, как и АЖ имели фенотип Cytokeratin, Pan «+» (рис. 1 В), Vimentin «-» и хоть частично СК7 «+». ИП варьировал от 21% до 68% (среднее значение $38\pm 4\%$, медиана 37%) (рис. 1 Г).

Таким образом, при наличии злокачественной ОЖ, наиболее частым предположительным диагнозом становится НРЖ (и хотя в 73,7% этот диагноз был оправдан, в 13 случаях наших наблюдений после ИГХ диагноз НРЖ удалось либо опровергнуть, либо найти направление дифференцировки клеток, например, НЭР или АЖ).

Иммунофенотип и ИП не могут служить дифференциальными критериями в диагностике АЖ и НРЖ, необходимо основываться на структурных особенностях «diffuse» типов, которые чаще всего представлены разобщенными клетка-

ми, потерявшими гомотипическую межклеточную адгезию (редукция экспрессии E-кадгерина) [2, 3, 4,5,10], что приводит к значительной инфильтрации с проникновением опухоли через все слои желудочной стенки и хорошо выявляется при окрашивании Cytokeratin, Pan.

Группа НЭР высокой (5 случаев) и низкой (4 случая) степени дифференциации отличались от других карцином дополнительными положительными реакциями на маркеры нейроэндокринной дифференцировки Chromogranin A + и/или Synaptophysin + с не всегда равномерным окрашиванием Cytokeratin, Pan (рис. 1 Д). Для карциноидов ИП насчитывал от 2 до 18% (среднее значение $8\pm 1\%$, медиана 4%) (рис. 1 Е), для низкодифференцированных НЭР – от 32% до 74% (среднее значение $53\pm 4\%$, медиана 53%).

Таким образом, наиболее типичный фенотип НЭР желудка Cytokeratin, Pan «+» (рис. 1 Д), Chromogranin A «+» и/или Synaptophysin «+», Vimentin «-». Экспрессия СК7 имела непостоянный характер (только в 2 карциноидах из 9 (22,2%) всех НЭР была позитивная реакция). ИП отражает степень дифференциации НЭР и является надёжным прогностическим фактором [8, 9].

Безусловно, наибольшей по численности группой неэпителиальных ОЖ стали ГИСО (13 случаев), диагностика которых требует ИГХ из-за наличия таргетной терапии (в случае CD117 «+» опухолей). Среди них можно выделить 2 морфологических варианта: веретенноклеточный (ВВ), $n=7$, из веретеновидных клеток с удлинёнными ядрами и эозинофильной цитоплазмой, которая может содержать одну парануклеарную вакуоль (рис. 2 А), и эпителиоидный (ЭВ), $n=6$, состоящий из круглых вакуолизированных клеток, собранных гнездами, что напоминает «эпителиоидную» картину (рис. 2 Б). Клеточный плеоморфизм в обоих вариантах был непосредственно связан с высоким злокачественным потенциалом (ИП более 5%) [5,6,7], таких наблюдений оказалось 4 из 13 (30,8%) (рис. 2 Д). В общем, ИП коле-

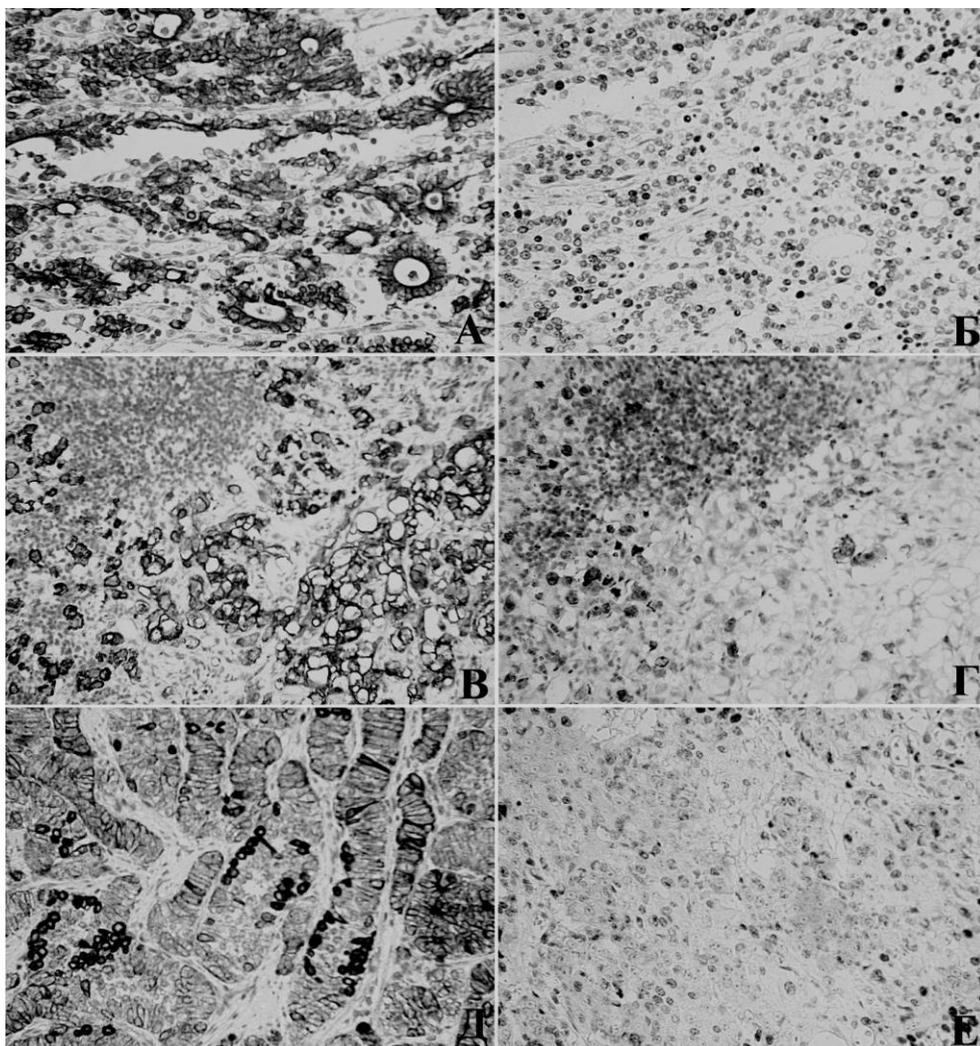


Рис. 1. А. Умереннодифференцированная АЖ, сильная (+++) реакция с Cytokeratin, Pan ($\times 400$). Б. ИП на уровне 48% ($\times 400$). В. Перстневидноклеточный НРЖ, сильная (+++) реакция с Cytokeratin, Pan ($\times 400$). Г. ИП на уровне 32% ($\times 400$). Д. НЭР желудка, неравномерное окрашивание Cytokeratin, Pan ($\times 400$). Е. ИП на уровне 11% ($\times 400$)

бался в пределах 2% – 16% (среднее значение $7\pm 2\%$, медиана 5%). Позитивная реакция CD117 определилась в 11 из 13 (84,6%) ГИСО (рис. 2 В).

В остальных случаях диагноз удалось поставить благодаря экспрессии не менее специфичного маркера DOG1 (позитивная реакция в 12 из 13 (92,3%) наблюдений (рис. 2 Г). Также 11 из 13

(84,6%) ГИСО окрашивались CD34 (рис. 2 Е), и только 1 из 13 (7,7%) – S100, что совпадает с данными других исследователей [4, 5, 7, 8, 10].

При оценке первичных диагнозов, оказалось, что из 13 ГИСО большая часть ($n=7$) была диагностирована верно, остальные: 3 – лейомиомы, 1 – неврилемма, 1 – рак и 1 – ?

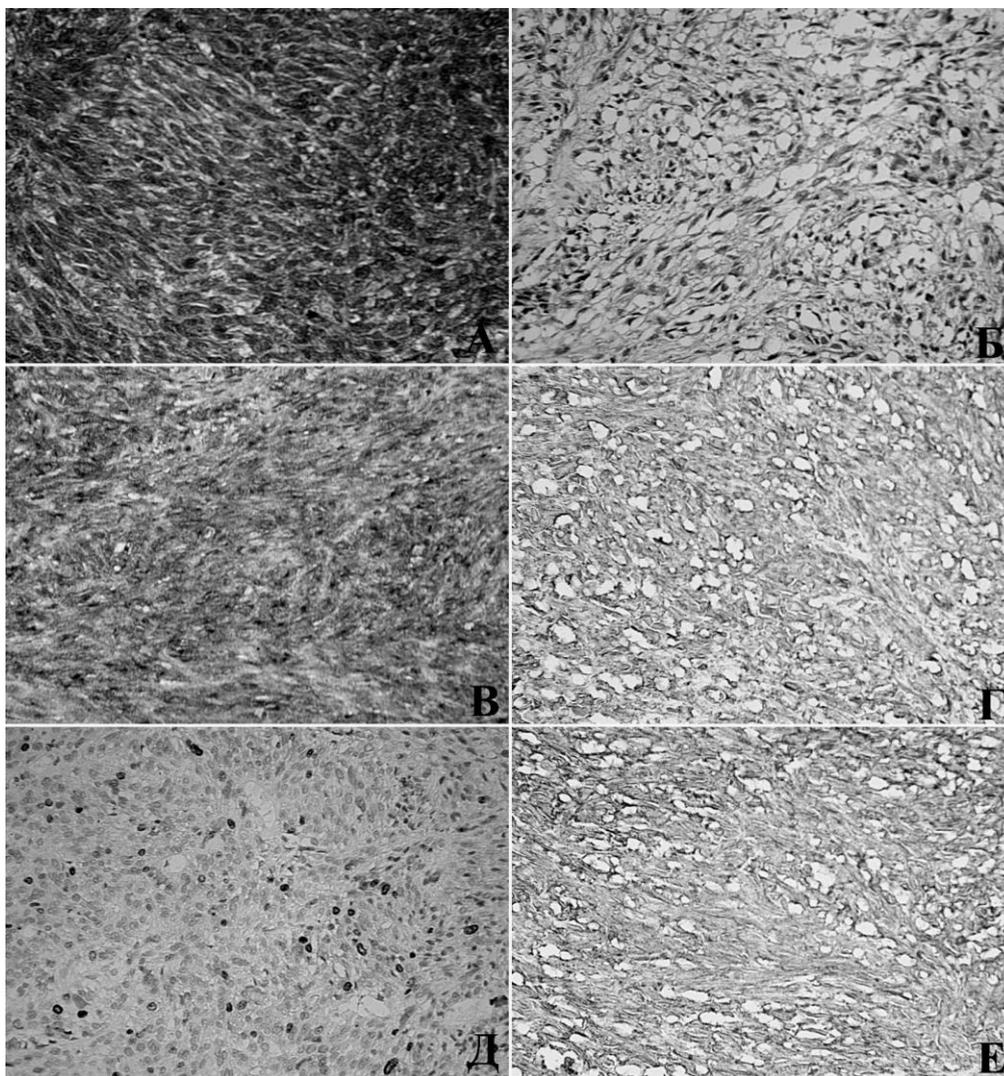


Рис. 2. ГИСО. А. ВВ, окраска Г-Е (×400). Б. ЭВ, окраска Г-Е (×400). В. ВВ, сильная (+++) реакция с CD117 (×400). Г. ЭВ, умеренная (++) реакция с DOG1 (×400). Д. ВВ, ИП на уровне 16% (высокий злокачественный потенциал) (×400). Е. ЭВ, умеренная (++) реакция с CD34 (×400)

Таким образом, фенотип ГИСО желудка CD117 «+/-», DOG1 «+/-», CD34 «+/-», а ИП отражает злокачественный потенциал.

Следующая большая группа неэпителиальных ОЖ – это лимфомы (11 наблюдений). Прежде всего, нужно отметить их крайне высокую пролифератив-

ную активность (среднее значение ИП $75 \pm 3\%$, медиана 81%), исключение составил 1 случай мальтомы, где ИП был всего 23%. Его можно отнести скорее к лимфоэпителиальным поражениям с необходимостью антихеликобактерной терапии и наблюдением в динамике. Остальные случаи были представлены 9 диффузны-

ми В-клеточными крупноклеточными лимфомами, для фенотипа которых характерна экспрессия пан-В-клеточных антигенов CD20, CD79a в светлых опухолевых клетках по типу «центроцитов» с негативной экспрессией Т-клеточного антигена CD3, и одной лимфомой Беркитта с экспрессией тех же антигенов, но специфической морфологией напоминающей «звездное небо». Интересно, что только 3 из 11 (27,3%) первичных диагнозов были верны (4 – раки, 4 – ?).

Степень зрелости и злокачественности MALT лимфом желудка обсуждается в литературе, склоняясь к благоприятному прогнозу при своевременной антихеликобактерной терапии [1, 4,5]. Но также говорят о наиболее частой трансформации MALT лимфом именно в диффузную В-клеточную крупноклеточную лимфому [1, 10], что и подтвердилось в нашем исследовании. Агрессивность исследуемых нами образцов подтверждается высокой пролиферативной активностью и глубокой проницательностью (поражение подслизистой в 10 ОЖ).

Липосаркома достаточно редкая ОЖ, но с характерной морфологической картиной жировой ткани. Фенотип такой мезенхимальной опухоли характеризуется Cytokeratin, Pan «-», Vimentin «+» в отличие от карцином и S100 «+». ИП единственного наблюдения составил 7%.

Выводы

ИГХ метод крайне важен для диагностики опухолей желудка, что подтверждают неверные первичные диагнозы в 33 из 62 случаев (53,2%), выставленные после рутинного гистологического окрашивания гематоксилином и эозином, во всех исследованных нами группах опухолей желудка. Индекс пролиферации является важным фактором для определения потенциала злокачественности гастроинтестинальных стромальных опухолей и степени дифференцировки нейроэндокринного рака, а также вспомогательным ориентиром трансформации лимфоэпителиального поражения слизистой желудка при хеликобактерной инфекции в диффузную В-клеточную лимфому.

Литература

1. Аруин Л.И. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника / Л.И. Аруин, Л.Л. Капуллер, В.А. Исаков. – М.: Изд-во «Триада-Х», 1998. – 496 с.
2. Виноградов И.И. Значение маркеров пролиферации и апоптоза для пограничных опухолей яичника / И.И. Виноградов // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2013. – № 3. – С. 130-136.
3. Мнихович М.В. Межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия в опухолях: современное состояние проблемы / М.В. Мнихович // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2013. – № 3. – С. 161-171.
4. Петров С.В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / С.В. Петров, Н.Т. Райхлин. – 3-е изд., доп. и перераб. – Казань: Титул, 2004. – 456 с.
5. Fletcher Christopher Diagnostic histopathology of tumors / Christopher Fletcher. – 4-th ed. – China: Elsevier Saunders, 2013. – 2156 p.
6. Wong Hannah H. Immunohistochemical features of the gastrointestinal tract tumors / Hannah H. Wong, Peiguo Chu // J. Gastrointest Oncol. – 2012. – Vol. 3, №3. – P. 262-284.
7. Miettinen M. Histopathology of gastrointestinal stromal tumor / M. Miettinen, J. Lasota // Journal of surgical oncology. – 2011. – Vol. 104, № 8. – P. 865-873.
8. Neuroendocrine carcinoma of the stomach: clinicopathological and immunohistochemical evaluation / T. Namikawa [et al.] // Med. Mol. Morphol. – 2013. – Vol. 46, № 1. – P. 34-40.
9. Neuroendocrine carcinoma of the stomach: morphologic and immunohistochemical characteristics and prognosis / M. Ishida [et al.] // Am J Surg Pathol. – 2013. – Vol. 37, № 7. – P. 949-959.
10. World Health Organization of Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System / eds.: Stanley R. Hamilton, Lauri A. Aaltonen. – Lyon, France: IARC Press, 2000. – 314 p.

**SIGNIFICANCE OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY METHOD
FOR DIAGNOSING OF STOMACH TUMORS**

I.S. Shponka, A.V. Poslavskaya, V.R. Yakovenko

The article is dedicated to the diagnosis of malignant tumors of the stomach, analyzing divergences of diagnoses after routine morphological researches and immunomorphological methods with monoclonal antibodies using, assessment of proliferative activity of different groups of tumors of this localization. Our investigation demonstrated that in the group of gastric tumors mistaken primary diagnoses were identified in 33 of 62 cases (53.2%). Proliferative score estimation is too important to determine the potential for malignancy of gastrointestinal stromal tumors and the degree of differentiation of neuroendocrine cancers.

Keywords: gastric cancer, immunohistochemistry, differential diagnosis, prognosis.

Шпонька И.С. – д.м.н., проф., зав. кафедрой патологической анатомии и судебной медицины ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», г. Днепропетровск, Украина.
E-mail: veter-1@mail.ru.

Пославская А.В. – к.м.н., доц. кафедры патологической анатомии и судебной медицины ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», г. Днепропетровск, Украина.
E-mail: alexandra.poslavskaya@gmail.com.

Яковенко В.Р. – очный аспирант кафедры патологической анатомии и судебной медицины ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», г. Днепропетровск, Украина.
E-mail: Val_Y@ua.fm.