

**В.Р.Скорик**

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

**Ключові слова:**  
гастроінтестинальні стромальні пухлини, діагностика, потенціал злоякісності, імуногістохімія.

*Надійшла:*  
30.07.2015  
*Прийнята:*  
12.09.2015

УДК616.33/.34-006.6-076-091.8-037

## **ВИЗНАЧЕННЯ ДІАГНОСТИЧНОГО ТА ПРОГНОСТИЧНОГО ЗНАЧЕННЯ ПУХЛИНО-СПЕЦИФІЧНИХ МАРКЕРІВ (CD117, DOG1, CD34, PDGFR- $\alpha$ ), ПОКАЗНИКІВ М'ЯЗОВОЇ (SMA, MSA, ДЕСМІН) ТА ЛПОГЕННОЇ (S100) ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ, ЕКСПРЕСІЇ КІ-67, P16, P21 У ГАСТРОІНТЕСТИНАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ ПУХЛИНАХ**

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

**Реферат.** Сьогодні проблема верифікації діагнозу найбільш частих новоутворень шлунково-кишкового тракту - гастроінтестинальних стромальних пухлин і визначення їх потенціалу злоякісності залишається актуальною. Мета: визначення взаємозв'язків між клініко-морфологічними і імуногістохімічними (DOG1, CD34, PDGFR- $\alpha$ , SMA, MSA, десмін, S100, Кі-67, p16, p21) критеріями. Виявлена достовірна залежність між низкою критеріїв. Наявність процентного переважання деяких показників при відсутності достовірної зв'язку аргументує подальше вивчення цього питання.

**Morphologia.** – 2015. – Т. 9, № 3. – С. 74-82.

© В.Р.Скорик, 2015

✉ Val\_Y@ua.fm

**Skoryk V.R. Diagnostic and prognostic value of tumorspecific markers (CD117, DOG1, CD34, PDGFR- $\alpha$ ), indicators of muscle (SMA, MSA, desmin) and fat (S100) differentiation, expression of Ki-67, p16, p21 in gastrointestinal stromal tumors.**

**ABSTRACT. Background.** Verification of gastrointestinal stromal tumors and determination of their malignancy potential remain still relevant. **Objective.** To identify relationships between clinical, histological and immunomorphological (CD117, DOG1, CD34, PDGFR- $\alpha$ , SMA, MSA, desmin, S100, Ki-67, p16, p21) characteristics of gastrointestinal stromal tumors. **Methods.** Our study included 50 gastrointestinal stromal tumors, which were divided into subgroups according to clinical (localization), morphological (histological features, morphological variation, the number of mitosis) characteristics depending on the presence of the expression of above mentioned markers. Statistical analysis of data included nonparametric tests. **Results.** Expression of CD117, DOG1, CD34, PDGFR- $\alpha$ , SMA, desmin, p16, p21 was specified in 94%, 90%, 76%, 61,1%, 24%, 50%, 46,6%, and 47% of cases, respectively. MSA, S100 positive tumors were revealed in 4% and 8% of all cases, and did not let us to divide them into subgroups. The one third of all cases had high expression of Ki-67. **Conclusion.** Ki-67 is a useful marker for determination of malignancy potential of GIST and significantly correlated with the number of mitosis and cellularity. Ki-67 expression is associated with the presence of p16 staining, it indicates the possibility of using these markers to define malignancy potential of GIST. Markers (CD117, DOG1, CD34, PDGFR $\alpha$ , SMA, p21) did not have prognostic value and were unrelated. There was relationship between the presence of PDGFR $\alpha$  staining and character of CD117 expression. CD117, DOG1 were highly sensitive markers, CD34, PDGFR $\alpha$  were useful markers during verification of GIST, but were less sensitive. Markers SMA, desmin, MSA, S100 are important for the diagnostic process.

**Key words:** gastrointestinal stromal tumor, diagnostic, malignancy potential, immunohistochemistry.

### **Citation:**

Skoryk VR. [Diagnostic and prognostic value of tumorspecific markers (CD117, DOG1, CD34, PDGFR- $\alpha$ ), indicators of muscle (SMA, MSA, desmin) and fat (S100) differentiation, expression of Ki-67, p16, p21 in gastrointestinal stromal tumors]. *Morphologia.* 2015;9(3):74-82. Ukrainian.

### **Вступ**

Гастроінтестинальні стромальні пухлини (ГІСП) вважаються найпоширенішими мезенхі-

мальними новоутвореннями шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Проте близько 5% цих пухлин не пов'язані із стінкою травної трубки, тобто

розташовані екстрагастроінтестинально (еГІСП) [1, 2]. Вважається, що частіше ГІСП розвиваються із клітин-пейсмеркерів ШКТ – клітин Кахала та їх попередників у зв'язку з точковою мутацією протоонкогенів c-Kit чи PDGFR- $\alpha$ , які є взаємовиключними у ГІСП до лікування [3]. На даний час виникають деякі труднощі під час верифікації ГІСП та визначення їх злоякісного потенціалу. Важкість діагностики пов'язана з наявністю гістологічної схожості з багатьма м'якотканинними новоутвореннями, серед яких основними вважаються пухлини міогенного та ліпогенного походження. Тому є необхідним використання додатково імуногістохімічного дослідження, під час оцінки результатів якого також виникають труднощі через відсутність у деяких випадках забарвлення діагностичними маркерами та наявності реакції маркерів, що мають виключати діагноз ГІСП. Також відомо, що ГІСП можуть мати поведінку як доброякісних, так і злоякісних новоутворень [1]. Не дивлячись, на те, що створено таблиці визначення ризику злоякісності ГІСП, це питання досі залишається відкритим [4]. Точна верифікація діагнозу та визначення потенціалу злоякісності має принципове значення, з одного боку, через наявність доведено ефективної таргетної терапії ГІСП інгібіторами протеїнкінази, що значно покращує прогноз пацієнта, а з іншого – різними об'ємами оперативного лікування, а отже наявністю можливості збереження гідного рівня якості життя та трудової активності хворих.

## Мета

Визначити характер зв'язків між клінічними (локалізація), гістологічними (морфологічний варіант будови, клітинний поліморфізм, кількість мітозів, гістологічні особливості) та імунофенотипом (експресія маркерів CD117, DOG1, CD34, PDGFR- $\alpha$ , SMA, MSA, десмін, S100, p16, p21, Ki-67) характеристиками ГІСП.

## Матеріали та методи

В нашому дослідженні було вивчено 50 зразків новоутворень різних пацієнтів, які були отримані шляхом біопсії та оперативного втручання та підлягали імуногістохімічному дослідженню в морфологічному відділі лікувально-діагностичного центру ООО «Аптеки медичної академії», м. Дніпропетровськ протягом 2013-2015 років. У всіх досліджуваних новоутвореннях діагноз ГІСП було підтверджено, спираючись на затверджені BOO3 критерії: морфологічні та імуногістохімічні [1]. Частка жінок з верифікованим діагнозом ГІСП склала 52% (26 випадків), частка чоловіків – 48% (24 випадка). Середній вік хворих склав  $55,8 \pm 1,97$  років, мода та медіана 57,5 та 57 років відповідно. Вивчені зразки було розділено на підгрупи за наведеними у таблиці клініко-морфологічними критеріями (таб.1), в яких вивчався характер експресії імуногістохімічних маркерів CD117, DOG1, CD34, PDGFR- $\alpha$ , SMA, MSA, десмін, S100, p16, p21, Ki-67. Морфологічні характеристики було підтверджено незалежно один від одного двома досвідченими морфологами.

Таблиця 1

Розподіл ГІСП за клініко-морфологічними критеріями

Критерії поділу	Кількість випадків (n)	%
<b>Локалізація</b>		
шлунок	30	60%
тонка кишка	9	18%
товста кишка	6	12%
еГІСП	5	10%
<b>Морфологічний тип будови</b>		
веретеноподібний варіант	26	52%
змішаний варіант	17	34%
епітеліоїдний варіант	7	14%
<b>Гістологічні особливості</b>		
<b>перинуклеарні вакуолі</b>	<b>21</b>	<b>42%</b>
<b>кількість мітозів</b>		
менше 2 на 50 п/зр	31	62%
від 3 до 5 на 50 п/зр	10	20%
більше 5 на 50 п/зр	9	18%
<b>гігантські, багатоядерні клітини</b>	<b>13</b>	<b>26%</b>
<b>дистрофічні зміни строми (склероз, гіаліноз, звапнування)</b>	<b>45</b>	<b>90%</b>
міксоматоз	10	20%
клітинність	9	18%
осередки некрозу	6	12%
<b>виражений клітинний поліморфізм</b>	<b>6</b>	<b>12%</b>

Імуногістохімічне дослідження проводилось згідно протоколів компанії ThermoScientific (США): для фарбування зрізів завтовшки 4мкм використовували систему візуалізації Quanto та DABChromogen. Позитивною реакцією вважалось коричневе мембранне та/чи цитоплазматичне фокальне та/чи дифузне забарвлення більше 5% клітин ГПСП при збільшенні 200x для маркерів CD117 Ab-1 (поліклон (пк), ThermoScientific (TS), розведення (р.) 1:200), S100 Ab-1 (клон (к.). 4C4.9, TS, р. 1:500), CD34 Ab-1 (к. QBEnd/10, TS, р. 1:500), DOG1 (к. sp31, TS, р. 1:100), SMA (к. ab-1, TS, р. 1:500), MSA Ab-4 (к. HNF-35, TS, р. 1:100), PDGFR- $\alpha$  (пк, TS, р. 1:50), десмін (пк, TS, р. 1:100), ядерна реакція з первинними антитілами Ki-67 (клон sp6, TS, р. 1:150), p21 Ab-3 (к. DCS-60.2, TS, р. 1:100) та цитоплазматична і ядерна реакція для p16 (DAKO, р. 1:50). Для маркерів p16 та p21 позитивною реакцією вважалось забарвлення більше 10% клітин новоутворення [1, 5]. Під час визначення потенціалу злоякісності ми спирались на відносно доступний та зазначений у класифікації пухлин ШКТ ВООЗ критерій – експресію Ki-67 [1]: як низький потенціал злоякісності трактувалось забарвлення менше 5% клітин ГПСП, помірний – від 6 до 10%, високий – більше 10%.

Обробка статистичних даних була проведена за допомогою описової статистики (середня арифметична, мода, медіана), критерію Хі-квадрат, коефіцієнту рангової кореляції Спірмена, що розраховувались у програмі SPSSStatistcsv. 17.0.

## Результати та їх обговорення

Найбільш частою локалізацією ГПСП у нашому дослідженні став шлунок – 58% (29 випадків), на другому місці - тонка кишка – 16% (8 зразків), зі стінкою товстою кишки пухлини були пов'язані у 6 випадках (12%), поза травною трубкою знаходились у 5 випадках (10%). Порівняно з даними FletcherD.M., 2013 [3] розподіл частоти розташування ГПСП відносно співпадає, незначні розбіжності складають: більше випадків у тонкій кишці та менше у товстій. Також є різниця зі статистикою гістологічного типу будови, а саме: веретеноподібний варіант складає близько 70%, 20% - епітеліоїдний, та лише 10% - змішаний [1, 2]. Тоді як ми отримали: 52% (26 із 50)- веретеноподібний, 34% (17 із 50) - змішаний та 14% (7 із 50)- епітеліоїдний (таб.1). Можливо, такі результати можна пояснити наявністю в нашому дослідженні значної частки операційного матеріалу, що дало можливість оцінити різні зони однієї пухлини. Це могло змінити визначення епітеліоїдного чи веретеноподібного варіанту на змішаний. Серед гістологічних особливостей найчастіше зустрічались дистрофічні зміни стромы (склероз, гіаліноз, званування) – у 45 випадках (90%), а виражений поліморфізм визначався лише у 6% пухлин (3 випадка), що може свідчити про діагностичну корисність цих показників (таб.1). Отримані дані в результаті розподілу досліджуваних новоутворень на підгрупи за морфологічними критеріями та експресією Ki-67 представлені у таблиці 2.

Таблиця 2

Поділ досліджуваних зразків ГПСП за групами, n, %

Морфологічний варіант	Перинуклеарні вакуолі		Мітотична активність			Гістологічні особливості				Ki-67		
	+	'	низька <sup>2</sup>	помірна <sup>3</sup>	висока <sup>4</sup>	гігантські, багатоядерні клітини	міксомагоз	клітинність	осередки некрозу	низька	помірна	висока
Верет. (n=26)	11, 42,3%	15, 57,7%	15, 57,7%	7, 26,9%	4, 15,4%	6, 23,1%	3, 11,5%	7, 26,9%	3, 11,5%	11, 42,3%	9, 34,6%	6, 23,1%
Зміш. (n=17)	7, 41,1%	10, 58,9%	12, 70,6%	1, 5,9%	4, 23,5%	5, 29,4%	5, 29,4%	2, 11,8%	2, 11,8%	2, 11,8%	8, 47%	7, 41,1%
Епіт. (n=7)	3, 42,8%	4, 57,1%	4, 57,1%	2, 28,6%	1, 14,3%	2, 28,6%	2, 28,6%	0, -	1, 14,2%	1, 14,3%	5, 71,4%	1, 14,3%
Разом (n=50)	21, 42%	29, 58%	31, 62%	10, 20%	9, 18%	13, 26%	10, 20%	9, 18%	6, 12%	14, 28%	22, 44%	14, 28%
p <sup>1</sup>	0,996		0,552			0,907	0,381	0,205	0,632	0,113		

Примітки: <sup>1</sup> – різниця вірогідна при  $p < 0,05$ ; <sup>2</sup> – менше 2 мітозів на 50 полів зору, збільшення  $\times 400$ ; <sup>3</sup> – від 2 до 5 мітозів на 50 полів зору, збільшення  $\times 400$ ; <sup>4</sup> – більше 5 мітозів на 50 полів зору, збільшення  $\times 400$ .

*Визначення прогностичного значення Ki-67.* На даний час головними з критеріїв визначення потенціалу злоякісності ГІСП вважаються кількість мітозів на 50 п/зору, локалізація та розмір новоутворення, проте залишаються випадки ГІСП з невизначеним потенціалом, спираючись на ці критерії [4]. В нашому дослідженні виявлено статистично достовірний прямий помірної сили зв'язок між кількістю мітозів та експресією Ki-67:  $p=0$ ,  $p<0,01$ ,  $r=0,67$ : серед 14 випадків із 50 з високим значенням Ki-67 – 64,9% (9 із 14) з високою мітотичною активністю, а з 14 випадків із 50 з низьким значенням Ki-67 – 13 (із 14, 92,6%) з загальною кількістю мітозів менше двох (таб.1, 2). Також треба зазначити, що є випадки з низькою та помірною мітотичною активністю, в яких визначається високий Ki-67, проте не навпаки. Ці дані наочно демонструють більшу чутливість імуногістохімічного показника порівняно з гістологічним та аргументують необхідність його використання під час визначення потенціалу злоякісності ГІСП. Є результати досліджень, що підтверджують наші результати [6, 7].

Щодо взаємозв'язків між локалізацією та експресією показника проліферативної активності: нами встановлено статистично достовірну залежність між ними ( $p<0,05$ ,  $r=-0,36$ ). Частка ГІСП шлунку та тонкої кишки практично однакова у групах з різною (низькою, помірною, високою) проліферативною активністю та складає 50% (7 із 14), 63,6% (14 із 22), 64,3% (9 із 14) та 21,4% (3 із 14), 22,7% (5 із 22), 7,1% (1 із 14) відповідно (таб.1, 2). Тоді як еГІСП займає третю частину у групі з високою експресією Ki-67 (4 із 14 випадків, 28,6%), складає 4,6% (1 із 22) групи з помірним показником проліферативної активності та відсутній - у групі з низьким. Такі результати суперечать даним Fletcher D.M. [3]: не визначено залежності між цими показниками, та ГІСП тонкої кишки і еГІСП асоціюються з гіршим прогнозом.

*Визначення діагностичного та прогностичного значення гістологічних особливостей ГІСП.* Гістологічні особливості ГІСП, які були обрані для дослідження, спираючись на рекомендації ВООЗ та критерії визначення злоякісності мезенхімальних новоутворень, були проаналізовані нами стосовно їх діагностичного та прогностичного значення.

Перинуклеарні вакуолі, що утворюються у препаратах ГІСП під час етапів фіксації та проводки новоутворення визначались майже в половині випадків (21 із 50, 42%) (таб.1). Статистично достовірно їх наявність не залежить від визначення інших морфологічних критеріїв, серед яких гістологічний тип будови ( $p=0,996$ ,  $p>0,05$ ), кількість мітозів ( $p=0,388$ ,  $p>0,05$ ), та експресії Ki-67 ( $p=0,933$ ,  $p>0,05$ ), а отже не має прогностичного значення. Проте значний відсоток ГІСП з наявністю перинуклеарних вакуолей свідчить

про корисність їх використання під час верифікації даного діагнозу.

Дистрофічні зміни строми пухлини (склероз, гіаліноз, звапнування) зустрічались майже у всіх випадках: 45 із 50 (90%) (таб.1), що свідчить про діагностичну корисність даного критерію. Проте його визначення не пов'язано з наявністю інших морфологічних показників (мітотична активність ( $p=0,438$ ,  $p>0,05$ ), гістологічний тип будови ( $p=0,708$ ,  $p>0,05$ ) чи експресією Ki-67 ( $p=0,361$ ,  $p>0,05$ ), що свідчить про відсутність прогностичного значення цього критерію.

Міксоматоз строми визначався у 10 випадках ГІСП (20%) (таб.1). Не зважаючи на те, що його наявність в м'якотканинних новоутвореннях вважається показником злоякісності, в нашому дослідженні не визначено залежності від кількості мітозів ( $p=0,539$ ,  $p>0,05$ ) чи показника проліферативної активності ( $p=0,268$ ,  $p>0,05$ ). Хоча в літературі є дані про визначення такого зв'язку, що може бути пов'язано з недостатньою кількістю випадків в дослідженнях чи різними методиками оцінювання гістологічних критеріїв [6]. Також не підтверджена залежність від морфологічного типу будови ( $p=0,381$ ,  $p>0,05$ ) (таб. 2), хоча в два рази частіше міксоматозні зміни зустрічаються у епітеліоїдному та змішаному варіантах порівняно з веретеноподібним (28,6% та 29,4% проти 11,5% відповідно). Щодо діагностичного значення: визначення міксоматозу строми у невеликому відсотку ГІСП може бути використано в якості не характерного показника для цих новоутворень.

Гігантські та багатоядерні клітини у досліджуваних нами фрагментах ГІСП зустрічались у 13 випадках (26%) (таб.1). Вважається, що такі зміни будови клітини виникають в результаті порушення етапів мітозу та є одним із шляхів уникнення клітиною смерті після припинення її циклу в точках перевірки між S, G<sub>1</sub> та G<sub>2</sub> фазами. Не дивлячись на це, статистично достовірного зв'язку з кількістю мітозів ( $p=0,728$ ,  $p>0,05$ ), експресією Ki-67 ( $p=0,354$ ,  $p>0,05$ ) не визначено. Також не виявлено залежності від типу морфологічної будови ( $p=0,907$ ,  $p>0,05$ ) (таб. 2), хоча згідно даних Miattien M., 2006 [8] гігантські клітини визначаються, переважно, у епітеліоїдному варіанті.

Гіперхромні ядра пухлинних клітин зустрічались лише у 2 зразках ГІСП (4%). Недостатня кількість випадків не дозволяє визначити наявність залежності від інших характеристик. Проте обидва випадки мають високу мітотичну активність (11 та 13 мітозів на 50 п/зору) та високий показник проліферативної активності (21%, 27%), що може вказувати на необхідність урахування цього показника при визначенні злоякісного потенціалу ГІСП.

Ще одним загально прийнятим показником злоякісності мезенхімальних новоутворень вва-

жається наявність «географічних» осередків некрозу. Вони визначались у 6 досліджуваних зразках ГІСП (12%) (таб.1), три з яких мали низьку мітотичну активність та показник проліферативної активності. Відсутність залежності також підтверджено статистично:  $p=0,707, p>0,05$  та  $p=0,752, p>0,05$  відповідно.

Визначення клітинності також вважається показником злоякісного потенціалу мезенхімальних новоутворень. Частка досліджуваних ГІСП з наявністю цього показника склала 18% (9 випадків) (табл.1). Серед них: 44,4% (4 із 9) та 66,7% (6 із 9) мали високі мітотичну активність та показник проліферативної активності відповідно.

Проте достовірну пряму залежність слабкої сили визначено між наявністю клітинності та високою експресією Ki-67 ( $p=0,017, p<0,05, r=0,28$ ), тоді як зв'язок з мітотичною активністю не підтвердився ( $p=0,54, p>0,05$ ), що також співпадає з даними інших досліджень [6].

Визначення діагностичного та прогностичного значення експресії імуногістохімічних маркерів (CD117, DOG1, CD34, SMA, MSA, S100, десмін). Розподіл на групи за критеріями наявності та характеру експресії імуногістохімічних маркерів дозволив отримати дані, наведені у таблиці 3.

Таблиця 3  
Поділ досліджуваних зразків ГІСП за імуноморфологічними характеристиками, n, %

CD117	SMA		DOG1		CD34		Десмін						
	-	+	-	+	-	+	-	+					
	(в ч/ клітин)		(в ч/ клітин)		(в ч/ клітин)		(в ч/ клітин)						
- (n=3)	3, 100%	0, -	0, -	0, -	2, 66,7%	1, 33,3%	0, -	0, -	3, 100%	2, 66,7%	0, -	1, 33,3%	
+	(в ч/ клітин)												
(n=20)	17, 85%	1, 5%	2, 10%	3, 15%	8, 40%	9, 45%	4, 20%	6, 30%	10, 50%	7, 35%	10, 50%	3, 15%	
+	(n=27)	18, 66,7%	7, 25,9%	2, 7,4%	2, 7,4%	3, 11,1%	22, 81,5%	8, 29,7%	4, 14,8%	15, 55,5%	16, 59,2%	9, 33,4%	2, 7,4%
Разом (n=50)	38	8	4	5	13	32	12	10	28	25	19	6	
p*		0,313			0,055			0,384			0,259		

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

На групи ми не розподілили S100 позитивні (+) та MSA+ випадки, через їх незначну кількість: 4 випадки (із 50, 8%) та 2 зразки (із 50, 2%) відповідно, а отже не змогли визначити наявність зв'язків з іншими критеріями. Проте така низька експресія може свідчити про високу корисність цих показників у діагностичному пошуку під час верифікації діагнозу ГІСП. Відсутність забарвлення цими маркерами у більшості випадків ГІСП підтверджено наявністю «внутрішнього контролю»: забарвлення м'язової тканини (для MSA) та визначення суспендоцитів (для S100) (рис. 1).

Експресія маркеру мутації c-Kit CD117 визначалась у 94% ГІСП (47 із 50 випадків), що свідчить про високу чутливість даного показника. Проте у 6% пухлин не можливо встановити даний діагноз, спираючись лише на позитивну реакцію CD117. Достовірної залежності між характером експресії CD117 та клініко-

морфологічними показниками (локалізація:  $p=0,286, p>0,05$ , морфологічний варіант:  $p=0,426, p>0,05$ , мітотична активність:  $p=0,154, p>0,05$ ) і маркером проліферативної активності Ki-67 ( $p=0,137, p>0,05$ ) не визначено, що свідчить про відсутність впливу позитивної реакції CD117 на злоякісний потенціал ГІСП.

Експресія первинного антитіла DOG1, також відомого як білка аноктаміну 1, визначалась у 45 випадках ГІСП (90%), що є показником досить високої чутливості даного маркеру, та є трохи нижчою порівняно зі світовими даними – близько 95% [9]. Також у нашому дослідженні у всіх CD117 негативних (-) випадках ГІСП визначалось забарвлення DOG1, що відіграло одну з ключових ролей під час встановлення діагнозу. Але це не виключає наявності 3-5% ГІСП з негативним статусом за обома маркерами у практиці, як свідчать головні спеціалісти у проблематиці ГІСП [3,9,10], що підтверджують і наші дані,

засвідчуючи відсутність статистично достовірної залежності між експресіями цих маркерів ( $p=0,055$ ,  $p>0,05$ ) (таб.3). Також визначено відсутність зв'язку між характером забарвлення DOG1 та клінічними (локалізація:  $p=0,362$ ,  $p>0,05$ ), гістологічними (морфологічний варіант:  $p=0,542$ ,  $p>0,05$ , мітотична активність:  $p=0,685$ ,

$p>0,05$ ) та імуногістохімічними показниками (CD34:  $p=0,356$ ,  $p>0,05$ , SMA:  $p=1,0$ ,  $p>0,05$ , десмін:  $p=1,0$ ,  $p>0,05$ ). Про відсутність прогностичного значення забарвлення DOG1 у ГІСП свідчить визначення статистично недостовірного зв'язку з експресією Ki-67:  $p=0,574$ ,  $p>0,05$ .

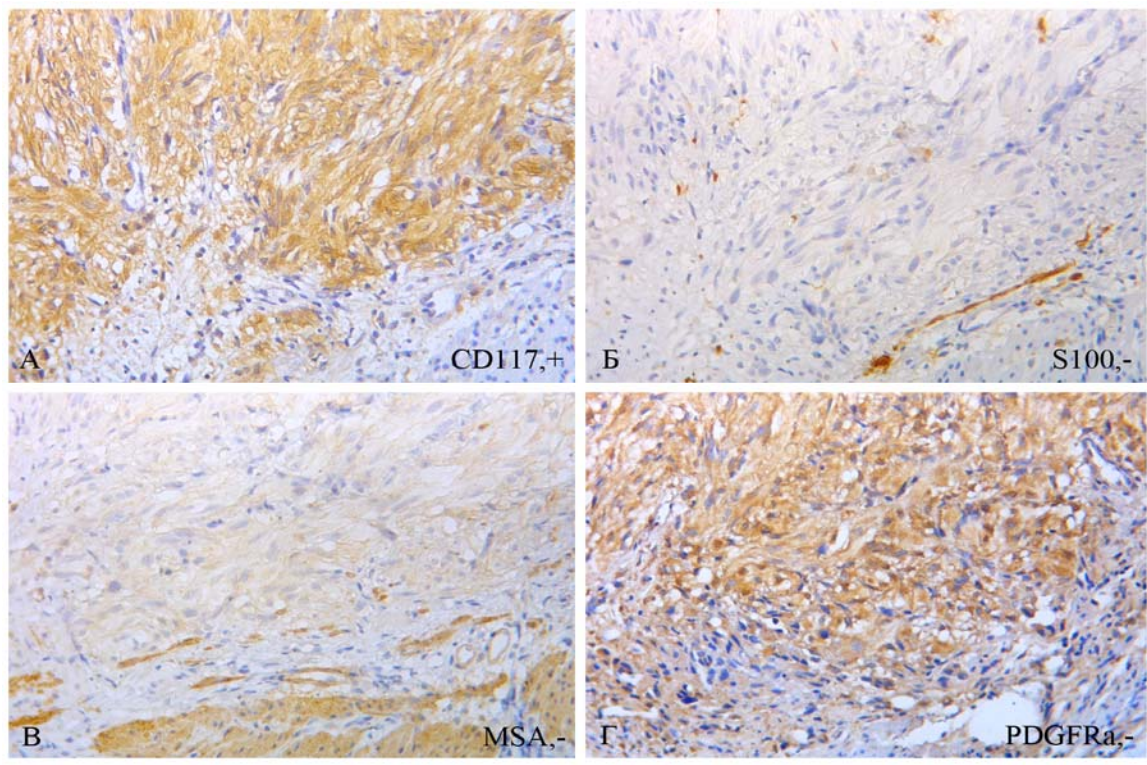


Рис. 1. Гастроінтестинальна стромальна пухлина. А. Цитоплазматичне та мембранне забарвлення у пухлинних клітинах маркером CD117. Б. Негативна цитоплазматична та мембранна реакція пухлинних клітин з маркером S100. В. Негативна цитоплазматична та мембранна реакція пухлинних клітин з маркером MSA. Г. Цитоплазматичне та мембранне забарвлення у пухлинних клітинах маркером PDGFR $\alpha$ . ІГХ метод, додаткове забарвлення гематоксином Майєра.  $\times 400$ .

Щодо експресії маркеру CD34, який вважається позитивним у близько 70% ГІСП, в нашому дослідженні він визначався у 76% новоутворень (38 із 50 випадків) (таб.3). Можливо, це пов'язано з досить великою часткою ГІСП шлунка та товстої кишки (таб.1), де у переважній більшості випадків визначається експресія CD34 [2] та свідчить про діагностичну цінність даного маркеру, аргументуючи необхідність його використання під час верифікації діагнозу ГІСП. Проте достовірної залежності не виявлено між наявністю та характером експресії CD34 та клінічними (локалізація:  $p=0,793$ ,  $p>0,05$ ), гістологічними (морфологічний варіант:  $p=0,866$ ,  $p>0,05$ , мітотична активність:  $p=0,678$ ,  $p>0,05$ ) та імуногістохімічними показниками (CD117:  $p=0,384$ ,  $p>0,05$ , DOG1:  $p=0,356$ ,  $p>0,05$ , SMA:  $p=1,0$ ,  $p>0,05$ , десмін:  $p=0,659$ ,  $p>0,05$ , Ki-67:  $p=0,743$ ,  $p>0,05$ ). Частка CD34+ ГІСП свідчить про відносно високу чутливість даного маркеру, а отже

діагностичну корисність його позитивної реакції, а відсутність залежності між експресіями CD34 та Ki-67 – про неможливість використання CD34 для визначення потенціалу злоякісності ГІСП.

SMA + випадки склали 24% досліджуваних пухлин (12 із 50) (таб.3), що менше порівняно з більшістю даних: близько 40% ГІСП мають забарвлення цим маркером [2, 3]. Ці результати свідчать про низьку чутливість позитивної реакції даного маркеру до ГІСП. Статистично достовірної залежності між наявністю та характером експресії SMA та досліджуваними клініко-морфологічними характеристиками не визначено (локалізація:  $p=0,455$ ,  $p>0,05$ ), морфологічний варіант:  $p=0,463$ ,  $p>0,05$ , мітотична активність:  $p=0,072$ ,  $p>0,05$ ). Відмічалась відсутність експресії даного маркеру в випадках чи зонах одного випадка забарвлених CD34. Можливо, це пов'язано з тим, що CD34 є маркером клітин-попередників м'яких тканин, в тому числі і м'язо-

вої, експресія якого зменшується протягом диференціювання клітини [11]. Таким чином, при наявності SMA забарвлення CD34 може виключатися. Проте достовірної залежності між характером забарвлення SMA та іншими імуногістологічними показниками не виявлено (CD117:  $p=0,313$ ,  $p>0,05$ , DOG1:  $p=1,0$ ,  $p>0,05$ , десмін:  $p=0,876$ ,  $p>0,05$ ), в тому числі і Ki-67:  $p=0,297$ ,  $p>0,05$ . Отже можна стверджувати відсутність прогностичного значення SMA.

Позитивну реакцію з маркером м'язової диференціації десміном ми визначили у половині випадків (таб.3), що значно відрізняється від основоположних даних, згідно яких цей маркер забарвлює клітини ГІСП дуже рідко (менше 5%) [1, 3]. Не дивлячись на високий відсоток позитивних зразків, ми не визначили достовірних зале-

жностей між експресією десміну та іншими клініко-морфологічними критеріями (локалізація:  $p=0,544$ ,  $p>0,05$ ), морфологічний варіант:  $p=0,236$ ,  $p>0,05$ , мітотична активність:  $p=0,555$ ,  $p>0,05$ ) та імуногістохімічними показниками (CD117:  $p=0,279$ ,  $p>0,05$ , DOG1:  $p=1,0$ ,  $p>0,05$ , SMA:  $p=0,876$ ,  $p>0,05$ , Ki-67:  $p=0,157$ ,  $p>0,05$ ).

Визначення діагностичного та прогностичного значення імуногістохімічних показників порушення клітинного циклу p16, p21 та мутації гену PDGFR. У 18 випадках ГІСП ми оцінювали взаємовідносини між експресією маркерів p16, p21, PDGFR- $\alpha$  та клініко-морфологічними показниками: локалізація первинного новоутворення, кількістю мітозів, забарвлення CD117, DOG1, SMA, CD34 та Ki-67. Отримані дані наведені у таблиці 4.

Таблиця 4  
Розподіл випадків ГІСП з різною експресією імуногістохімічних маркерів p16, p21, PDGFR- $\alpha$

		p16		p21		PDGFR- $\alpha$	
		+	-	+	-	+	-
Локалізація	шлунок (n=10)	4, 40%	6, 60%	4, 40%	6, 60%	4, 40%	6, 60%
	тонка кишка (n=4)	3, 75%	1, 25%	2, 50%	2, 50%	4, 100%	0, -
	товста кишка (n=2)	1, 50%	1, 50%	1, 50%	1, 50%	2, 100%	0, -
	еГІСП (n=2)	0, -	2, 100%	1, 50%	1, 50%	1, 50%	1, 50%
	p*	0,611		1,0		0,112	
Мітотична активність	низька (n=13)	7, 53,8%	6, 46,1%	6, 46,1%	7, 53,8%	8, 61,5%	5, 38,5%
	помірна (n=1)	0, -	1, 100%	0, -	1, 100%	1, 100%	0, -
	висока (n=4)	1, 25%	3, 75%	2, 50%	2, 50%	2, 50%	2, 50%
	Разом (n=18)	8, 44,4%	10, 55,6%	8, 44,4%	10, 55,6%	11, 61,1%	7, 38,9%
	p*	0,588		1,0		1,0	
Ki-67	низька (n=7)	1, 14,3%	6, 85,7%	3, 42,9%	4, 57,1%	3, 42,9%	4, 57,1%
	помірна (n=6)	5, 83,3%	1, 16,7%	2, 33,3%	4, 66,7%	5, 83,3%	1, 16,7%
	висока (n=5)	2, 40%	3, 60%	3, 60%	2, 40%	3, 60%	2, 40%
	p*	0,043 ( $r = 0,286$ )		0,840		0,412	
CD117	-(n=1)	0, -	1, 100%	1, 100%	0, -	1, 100%	0, -
	+(в ч/клітин) (n=3)	0, -	3, 100%	1, 33,3%	2, 66,7%	0, -	3, 100%
	+(n=14)	8, 57,1%	6, 42,9%	6, 42,9%	8, 57,1%	10, 71,4%	4, 28,6%
	p*	0,137		0,765		0,043 ( $r = -0,348$ )	
CD34	-(n=5)	1, 20%	4, 80%	4, 80%	1, 20%	4, 80%	1, 20%
	+(в ч/клітин) (n=5)	3, 60%	2, 40%	2, 40%	3, 60%	4, 80%	1, 20%
	+(n=8)	4, 50%	4, 50%	2, 25%	6, 75%	3, 37,5%	5, 62,5%
	p*	0,584		0,232		0,252	
SMA	-(n=10)	5, 50%	5, 50%	4, 40%	6, 60%	5, 50%	5, 50%
	+(в ч/клітин) (n=5)	2, 40%	3, 60%	3, 60%	2, 40%	5, 100%	0, -
	+(n=3)	1, 33,3%	2, 66,7%	1, 33,3%	2, 66,7%	1, 33,3%	2, 66,7%
	p*	1,0		0,827		0,137	
	Разом (n=18)	8, 44,4%	10, 55,6%	8, 44,4%	10, 55,6%	11, 61,1%	7, 38,9%

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

Експресія маркеру PDGFR- $\alpha$  визначалась у 61,1% (11 із 18) досліджуваних випадків ГІСП (рис. 1). Спираючись на ці дані, можна стверджувати, що цей показник не є чітким відображенням мутації однойменного гену: визначалась наявність забарвлення у CD117+ випадках, тоді як мутації протоонкогенів PDGFR та c-kit в первинних ГІСП до лікування є взаємовиключними. Також нами визначено достовірну оборотну слабку залежність між наявністю експресії PDGFR- $\alpha$  та характером забарвлення CD117 ( $p < 0,05$ ,  $r = -0,348$ ) (таб.4). Проте в інших дослідженнях не визначається зв'язок між цими показниками та заперечується думка про важливість використання цього маркеру для верифікації ГІСП. З іншого боку в дослідженні Terada T., 2010 [12] як і ми, вважає PDGFR- $\alpha$  корисним диференційним маркером. Таку різницю даних, можливо, можна пояснити з використанням реактивів різних виробників. Наявність забарвлення PDGFR- $\alpha$  у більшій половині випадків (11 із 18) свідчить про невелику специфічність, а відсутність достовірного зв'язку з клініко-морфологічними показниками та експресією Ki-67 свідчить про відсутність прогностичного значення цього маркеру.

Експресію маркерів p16 та p21, як показників порушення різних механізмів інгібування клітинного циклу в точках перевірки, ми вивчали з боку наявності прогностичного і діагностичного значень. Забарвлення маркером p16 зустрічалось у 44,4% (8 із 18) випадків. Серед всіх досліджуваних критеріїв достовірну залежність визначено лише від експресії показника проліферативної активності ( $p < 0,05$ ,  $r = 0,286$ ) (таб.4), що свідчить про можливість використання p16 як одного з критеріїв потенціалу злоякісності. Щодо другого маркеру порушення клітинного циклу p21: позитивна реакція зустрічалась у 44,4% (8 із 18), що перевищує результати інших досліджень (до 20%) [2,3]. Різницю даних можна пояснити, можливо, з недостатньою кількістю випадків в нашому дослідженні, проте наші результати співпадають з даними інших вчених на предмет відсутності залежності між експресією p21 та клініко-морфологічними критеріями ( $p > 0,05$ ) (таб.1), що свідчить про відсутність прогностичного значення цього маркеру.

#### Висновки

1. Маркер CD117 визначається у 94% досліджуваних новоутворень (47 випадків), що свідчить про його високу чутливість, проте визначається 6% ГІСП, які не можливо підтвердити цим маркером. Наявність та характер експресії достовірно статистично не залежить від гістологічних критеріїв та імуногістохімічних показників (всі  $p > 0,05$ ).

2. Експресія маркерів DOG1, CD34, десмін визначається у 90%, 76% та 50% відповідно досліджуваних зразків ГІСП. Проте не виявлено

статистично достовірної залежності між характером та наявністю забарвлення цими маркерами та досліджуваними клініко-морфологічними характеристиками та імуногістохімічними показниками (всі  $p > 0,05$ ).

3. Маркер PDGFR- $\alpha$  визначається у 61,1% досліджуваних зразків, серед яких є CD117 позитивні та негативні новоутворення, що свідчить про корисність його використання під час верифікації діагнозу ГІСП, також визначено, що у ГІСП з вираженою експресією CD117 визначається забарвлення PDGFR- $\alpha$ , а за відсутності останнього, CD117 має, переважно, помірно виражену та виражену реакцію ( $p < 0,05$ ,  $r = -0,35$ ).

4. Близько третини (14 із 50, 28%) досліджуваних випадків характеризувались високим показником маркеру проліферативної активності Ki-67, експресія якого не залежить від наявності та характеру фарбування імуногістохімічних маркерів (всі  $p > 0,05$ ).

5. Між експресією Ki-67 та такими гістологічними показниками, як кількість мітозів на 50 п/зр, клітинністю, встановлено статистично достовірну пряму залежність ( $p < 0,001$ ,  $r = 0,67$  та  $p < 0,05$ ,  $r = 0,28$ ), що підтверджує необхідність використання даного маркеру під час визначення потенціалу злоякісності ГІСП.

6. Експресія маркерів, що приймають участь у регуляції клітинного циклу, p16 та p21 визначається у 44,4% (8 із 18), та не залежить від наявності досліджуваних клініко-морфологічних та імуногістохімічних показників (всі  $p > 0,05$ ). Встановлено слабкої сили залежність між наявністю експресії p16 та показником проліферативної активності ( $p < 0,05$ ,  $r = 0,286$ ), що свідчить про можливість використання p16 під час оцінювання потенціалу злоякісності ГІСП.

7. Маркери ліпогенного (S100) та м'язового (MSA) походження визначались лише у 4 (8%) та 2 (4%) випадках ГІСП відповідно, що не дозволило розподілити зразки на групи. Проте ці дані свідчать про високу значимість вищезазначених маркерів під час проведення диференційної діагностики з іншими мезенхімальними новоутвореннями.

8. Для коректної верифікації ГІСП та визначення потенціалу злоякісності необхідно використовувати комплексну оцінку гістологічних критеріїв та панелі імуногістохімічних маркерів (CD117, DOG1, PDGFR- $\alpha$ , CD34, S100, десмін, Ki-67, p16), що обґрунтовується відсутністю достатньої чутливості кожного маркеру окремо та залежності між наявністю їх експресій.

#### Перспективи подальших розробок

Необхідне продовження пошуку статистично достовірних взаємозв'язків між різними клінічними та морфологічними даними з метою покращення діагностики ГІСП та можливості достовірного визначення їх потенціалу злоякісності.



**Літературні джерела**  
**References**

1. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, authors. WHO classification of tumours of the digestive system. 4th. Lyon: IARC Press; 2010. 417 p.
2. Dabbs DJ, author. Diagnostic immunohistochemistry. 4th ed. PA: Elsevier; 2013. 960 p.
3. Fletcher C.D.M., author. Diagnostic histopathology of tumors. 4th ed. PA: Elsevier; 2013. 1148 p.
4. Odze RD, Goldblum JR, Crawford JM, authors. Surgical pathology of the GI tract, liver, biliary tract, and pancreas. PA: Elsevier Health Sciences; 2004. 1067 p.
5. Jung SH, Suh KS, Kang DY, Kang DW, Kim YB, Kim ES. Expression of DOG1, PDGFRA, and p16 in gastrointestinal stromal tumors. Gut and liver. 2011;5(2):171-180. DOI: 10.5009/gnl.2011.5.2.171. PMID: 21814597.
6. Vij M, Agrawal V, Kumar A, Pandey R. Gastrointestinal stromal tumors: a clinicopathological and immunohistochemical study of 121 cases. Indian Journal of Gastroenterology. 2010;29(6):231-236. DOI: 10.4103/0970-9371.107505. PMID: 21221881.
7. Belev B, Brčić I, Prejac J, Golubić Z A, Vrbanc D, Božikov J, Razumović JJ. Role of Ki-67 as a prognostic factor in gastrointestinal stromal tumors. World journal of gastroenterology. 2013;19(4):523. DOI:10.3748/wjg.v19.i4.523. PMID: 23382631.
8. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites. Semin Diagn Pathol. 2006;23(2):70-8. PMID: 17193820.
9. Wada T, Tanabe S, Ishido K, Higuchi K, Sasaki T, Katada C, Mikami T. DOG1 is useful for diagnosis of KIT-negative gastrointestinal stromal tumor of stomach. World journal of gastroenterology. 2013;19(47):9133. DOI: 10.3748/wjg.v19.i47.9133. PMID: 24379641.
10. Ríos-Moreno MJ, Jaramillo S, Gallardo SP, Vallejo A, Mora M, García-Escudero González-Cámpora R. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): CD117, DOG-1 and PKC $\theta$  expression. Pathology-Research and Practice. 2012;208(2):74-81. DOI: 10.1016/j.prp.2011.11.006. PMID: 22197035.
11. Nielsen JS, McNagny KM. Novel functions of the CD34 family. Journal of cell science. 2008;121(22):3683-3692. DOI: 10.1242/jcs.037507. PMID: 18987355.
12. Terada T. Gastrointestinal stromal tumor of the digestive organs: a histopathologic study of 31 cases in a single Japanese institute. International journal of clinical and experimental pathology. 2010;3(2):162. PMID: 20126584.

**Скорик В.Р. Определение диагностического и прогностического значения опухолеспецифических маркеров (CD117, DOG1, CD34, PDGFR- $\alpha$ ), показателей мышечной (SMA, MSA, десмин) и липогенной (S100) дифференцировки, экспрессии Ki-67, p16, p21 в гастроинтестинальных стромальных опухолях.**

**Реферат.** Сегодня проблема верификации диагноза наиболее частых новообразований желудочно-кишечного тракта – гастроинтестинальных стромальных опухолей, и определения их потенциала злокачественности остается актуальной. Цель: определение взаимосвязей между клинико-морфологическими и иммуногистохимическими (DOG1, CD34, PDGFR- $\alpha$ , SMA, MSA, десмин, S100, Ki-67, p16, p21) критериями. Выявлена достоверная зависимость между рядом критериев:  $p < 0,05$ . Наличие процентного преобладания некоторых показателей при отсутствии достоверной связи аргументирует дальнейшее изучение этого вопроса.

**Ключевые слова:** гастроинтестинальные стромальные опухоли, диагностика, потенциал злокачественности, иммуногистохимия.