

## МОРФОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ

© Харченко О.В.  
УДК 616.33 – 006 : 616 – 07

### КОМПЛЕКСНА ДІАГНОСТИКА ВИРАЗКОВО-ІНФІЛЬТРАТИВНОГО РАКУ ШЛУНКА\*

Харченко О.В.

Полтавський національний педагогічний університет імені В.Г.Короленка, м. Полтава

*Комплексная диагностика, проведенная при помощи гистологического метода с определением митотического режима, иммуногистохимического маркера Ki-67 (клон MIB-1) и маркера генотипирования ISSR-PCR показала изменения эпителия слизистой оболочки желудка характерные для неоплазии слизистой оболочки желудка у пациентов с язвенно-инfiltrативным раком желудка. Экспансия маркера генотипирования ISSR-PCR свидетельствует о его высокой чувствительности и информативности. Существует корреляционная связь между показателями гистологического, иммуногистохимического и показателями генотипирования при помощи реакции ISSR-PCR. Коэффициент корреляции Пирсона  $r_{xy}$  между показателями митотического режима, пролиферативной активности эпителия слизистой оболочки желудка маркера Ki-67 и показателями генотипирования эпителия слизистой оболочки желудка составляет соответственно 0,197, 0,607 и 0,881, что свидетельствует о существовании соответственно умеренной и значительной по тесноте связи между показателями. Общий результат свидетельствует о существовании статистически достоверной зависимости с вероятностью 0,99.*

**Ключевые слова:** митотический режим, маркер Ki-67, генотипирование.

#### Вступ

Основною причиною смерті в розвинутих країнах поряд із смертністю від серцево-судинних процесів і їх ускладнень є смертність від злоякісних пухлин. Рак шлунка щороку вражає 750 – 870 тис. чоловік в світі, на його частку припадає 10% від летальних випадків, обумовлених пухлинною патологією. В Україні в 2009р. рак шлунка займав 3-є (9,0%) місце в структурі онкопатології чоловіків і 6-е (5,6%) місце у жінок; в структурі онкосмертності він посідає 2-ге (11,8 і 9,3%) місце в обох групах [5, 10].

Передумовами розвитку раку шлунка з хронічної виразки шлунка прийнято вважати досліджувані в навколишній її слизовій оболонці змінення типу хронічного гастриту, що супроводжується дисрегенераторними процесами з утворенням дисплазій епітелію [1, 3, 6]. Останні, особливо тяжкого ступеня, часто бувають маркером існування поблизу ракової пухлини [11].

Складними для діагностики є виразково-інфільтративні раки шлунка. Вказана форма раку на ранніх стадіях може симулювати звичайну виразку, це утруднює її диференційну діагностику з останньою [4, 6]. Виразкова ракова пухлина шлунка може, як і звичайна виразка загоюватись. Але загоювання знову змінюється на виразкування і такі цикли можуть повторюватись неодноразово. Через те, що рак шлунка розвивається порівняно повільно такі цикли можуть повторюватись неодноразово [6, 12].

Метою даного дослідження є комплексна діагностика передпухлинних змін в слизовій оболонці шлунка та виявлення раку шлунка за допомогою гістологічного, імуногістохімічного та молекулярно-біологічного методів.

#### Матеріал та методи досліджень

В роботу покладено результати дослідження 50 спостережень виразково-інфільтративного раку шлунка. Оперативно видалені шлунки досліджені з метою виявлення морфологічних особливостей стану слизової оболонки шлунка.

Отримані зразки слизової оболонки шлунка досліджували загальногістологічним методом за стандартними схемами, що включає фіксацію тканини в нейтральному формаліні. Матеріал обробляли у парафіновій заливці. Зрізи забарвлювали гематоксиліном-еозином і пікрофуксином за ван-Гізеном.

Імуногістохімічне виявлення проліферації епітелію слизової оболонки шлунка проводили за допомогою маркеру Ki-67 на депарафінованих зрізах товщиною 4-5 мм., із попередньою демаскіруванням антигену в цитратному буфері (pH 6,0) у мікрохвильовій печі протягом 10 хв. В якості первинних антитіл використовували моноклональні антитіла до Ki-67 (клон MIB-1). Інкубацію з первинними антитілами проводили протягом 18 годин. Ідентифікація реакції проводилась за допомогою хромогену 3,3'-діамінобензидин тетрагліориду (DAB, Dako Cytomation). Зрізи контрастували за допомогою гематоксиліна-еозина.

\* Цитування при атестації кадрів: Харченко О.В.. Комплексна діагностика виразково-інфільтративного раку шлунка // Проблеми екології і медицини. – 2014. – Т. 18, № 1-2. – С. 56 –58

Паралельно проводили дослідження слизової оболонки шлунка за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Застосовували ISSR-PCR метод з використанням ISSR – праймеру S2, який має структуру: (AGC)<sub>n</sub>G [7, 8, 9, 13].

Ампліфікацію проводили в 25 мкл реакційної суміші. ДНК додавали в кількості 10 – 20 нг на реакцію. Температура відпалу праймера становила 57°C, синтез фрагментів ДНК проходила в 30 циклах ампліфікації [8].

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили в 2%-му горизонтальному агарозному гелі (Вагофор, Латвія).

Візуалізацію електрофореграм проводили на транслюмінаторі в ультрафіолетовому світлі довжиною хвилі 365 нм з наступним фотографуванням.

Визначення розмірів ампліконів виконували за допомогою маркера молекулярної маси 1000вр DNA-Ladder, рUC 19 DNA/Msp I («Fermentas», Литва)[8, 13].

Для оцінки вираження порушень мітозу використовували визначення мітотичного режиму за прийнятою методикою. Підрахунок мітозів проводили під імерсійним збільшенням мікроскопу в 100 полях зору. Визначали мітотичний індекс (МІ) – кількість мітозів на 1000 клітин, визначених у промілях(‰), кількість мітозів які знаходяться в метафазі в процентах(%), кількість патологічних мітозів в процентах(%) [2].

Результати імуногістохімічних реакцій оцінювали шляхом підрахунку відсотка позитивних клітин із різною інтенсивністю, яку оцінювали візуально. Аналізували 800–1000 епітеліальних клітин в кожному випадку. Проліферативний потенціал (індекс проліферації) визначали при підрахунку кількості клітин, що експресують Ki-67. При ІМ (індекс мітки) Ki-67<10,0% – низька, ІМ Ki-67≥30,0% – висока проліферативна активність.

Достовірність різниці середніх порівнюваних показників оцінювали за критеріями (t) Стюдента. Різниця між порівнюваними величинами вважалась значимою, як що допустима помилка (p) була менша за 0,05.

Кількісна оцінка кореляційного зв'язку оцінювалась за значеннями коефіцієнтів кореляції у межах від -1 до +1. Від'ємні значення коефіцієнтів указують на зворотний зв'язок, додатні – на прямий. Нульове значення може свідчити про відсутність зв'язку. Інтенсивність зв'язку (слабкий зв'язок – помірний – суттєвий – сильний) оцінювали за абсолютним значенням коефіцієнтів кореляції.

### Результати та їх обговорення

У пацієнтів, хворих на виразково-інфільтративний рак шлунка, що розвинувся на фоні виражених форм хронічного атрофічного і атрофічно-гіперпластичного гастриту в слизовій оболонці шлунка навколо пухлини, пілоричного відділу і малої кривизни достовірної різниці показника мітотичного індексу (МІ) не знайдено (рис. 1).

Показник мітотичного індексу в тілі (Т) шлунка(15,5±4,2‰) був достовірно нижче (p<0,05) ніж на ділянці навколо пухлини(НП)(33,1±11,8‰), пілоричному(П) відділі (27,5±5,8‰) і на малій кривизні(МК)(25,5±3,9‰) (рис. 1).

Між показниками кількості мітозів метафазі в пілоричному відділі (51,5±3,3%), на малій кривиз-

ні(51,9±2,2%) та навколо пухлини(56,9±5,8%) достовірної різниці не знайдено (p>0,05).

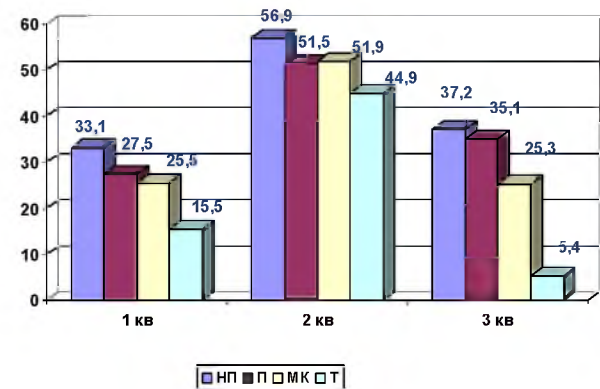


Рис. 1. Мітотичний режим епітелію слизової оболонки шлунка хворих на виразково-інфільтративний рак шлунка. 1 кв – мітотичний індекс(‰). 2 кв – кількість мітозів у метафазі(%). 3 кв – кількість патологічних мітозів(%).

В тілі шлунка кількість мітозів в метафазі(44,9±2,8%) була достовірно нижчою(p<0,01) ніж на ділянці навколо пухлини(56,9±5,8%) та в інших регіонах слизової оболонки шлунка.

Досліджені патологічні мітози (рис. 1), відзначались достовірним зниженням (p<0,001) в тілі шлунка (5,4±1,1%) відносно ділянки навколо пухлини (37,2±3,5%), пілоричного відділу (35,1±2,7%) та малої кривизни (25,3±3,3%), а також відмічена достовірна різниця між пілоричним відділом (35,1±2,7%) і малою кривизною(25,3±3,3%) (p<0,05).

За допомогою маркера Ki-67(клон MIB-1) виявлена висока проліферативна активність епітелію слизової оболонки шлунка з індексом мітки >30,0% (рис.2).

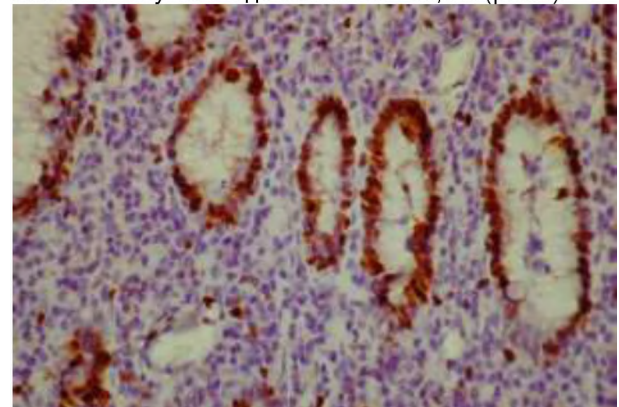


Рис.2. Висока проліферативна активність в епітелії ямок із дисплазією на фоні хронічного гастриту. Маркер Ki-67(клон MIB-1).

Спостерігається залежність між показниками кількості патологічних мітозів, мітозів на стадії метафазі, мітотичного індексу з вираженням проліферативної активності епітелію слизової оболонки в різних топографо-анатомічних відділах шлунка.

В тілі шлунка де, в порівнянні з іншими регіонами, показники мітотичного режиму нижчі, достовірно рідше виявляється виражена проліферативна активність епітелію з дисплазією слизової оболонки шлунка (p<0,001).

Зростання кількості патологічних мітозів, мітотичного індексу, та мітозів на стадії метафазі в пілоричному відділі, на малій кривизні і навколо пухлини корелює із збільшенням проліферативної активності

епітелію слизової оболонки шлунка з індексом мітки  $\geq 30,0\%$ .

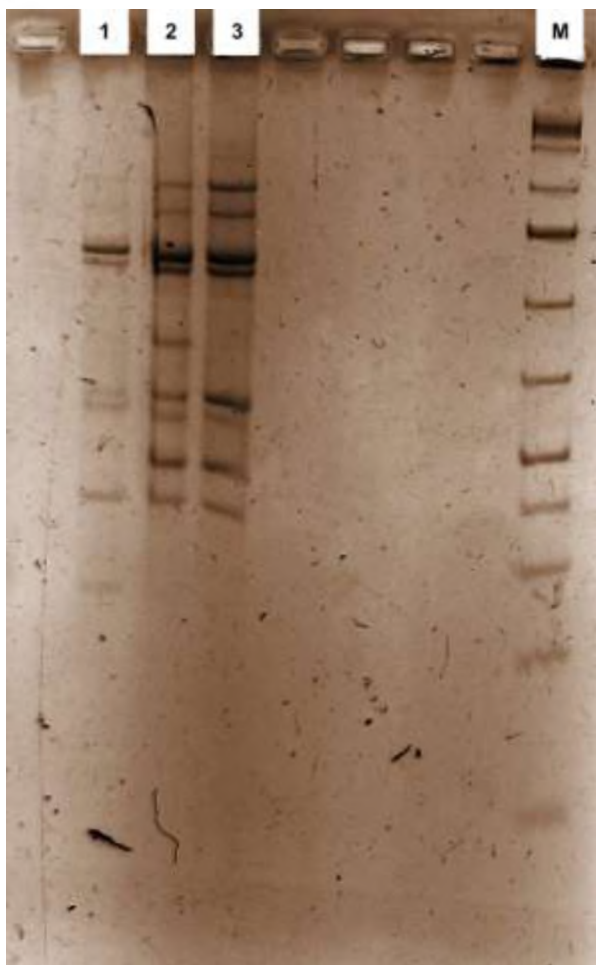


Рис. 3. Електрофореграми продуктів ампліфікату зразків ДНК слизової оболонки шлунка хворих на виразково-інфільтративний рак шлунка: 1, 2, 3 – ДНК-профілі відповідають маркеру пухлини; М – маркер розміру фрагментів ДНК.

Генотипування епітелію слизової оболонки шлунка пацієнтів хворих на виразково-інфільтративний рак шлунка виявило досить стабільні ДНК-профілі представлені експансією фрагментів розміром 520 та 620 п.н. (пар нуклеотидів) в усіх спостереженнях (рис. 3) і мали повну відмінність від профілю маркеру норми.

Із збільшенням показників мітотичного режиму збільшується проліферативна активність покривно-ямкового епітелію і епітелію залоз. В тілі шлунка, де показники мітотичного режиму найменші в порівнянні з іншими регіонами шлунка, достовірно рідше ( $p < 0,001$ ) виявляється проліферативна активність епітелію і зазначена індексом мітки  $< 10,0\%$ .

Зважаючи на те, що у всіх спостереженнях, за результатами генотипування, були одержані ДНК-профілі де була явна експансія фрагментів розміром від 520 до 620 п.н. їх можна вважати за маркер наявності в пацієнта пухлини.

Між показниками мітотичного режиму слизової оболонки шлунка, вираженням проліферативної активності дисплазії епітелію слизової оболонки шлунка за маркером Ki-67 хворих на виразково-інфільтративний рак шлунка та показниками генотипування епітелію слизової оболонки коефіцієнт кореляції Пірсона  $r_{xy}$  склав відповідно 0,197, 0,607 та 0,881, що свідчить

про існування відповідно слабкого, значного та сильного за тіснотою зв'язку. Коефіцієнт детермінації  $D = r_{xy}^2$  дорівнював відповідно 0,039, 0,369 та 0,776. Критичне значення коефіцієнта кореляції з вірогідністю 0,95 дорівнює 0,2732. Критичне значення коефіцієнта кореляції з вірогідністю 0,99 дорівнює 0,3511. Порівняння коефіцієнта кореляції  $r_{xy}$  з критичним значенням  $r_{cr}$  для значущості 0,95 відповідало відповідно  $r_{xy} < r_{cr}$  та  $r_{xy} > r_{cr}$ . Порівняння коефіцієнта кореляції  $r_{xy}$  з критичним значенням  $r_{cr}$  для значущості 0,99 відповідало відповідно  $r_{xy} < r_{cr}$  та  $r_{xy} > r_{cr}$ . Коефіцієнт коваріації склав відповідно 0,389, 3,442 та 0,859. Між показниками мітотичного режиму, проліферативної активності дисплазії епітелію та показниками генотипування слизової оболонки шлунка виявлена статистично достовірна залежність з ймовірністю 0,99.

### Висновки

За допомогою гістологічного методу встановлено, що при виразково-інфільтративному раку шлунка виявлені високі показники мітотичного режиму епітелію слизової оболонки.

Тенденція зростання показників мітотичного режиму у відділах шлунка відбувається в напрямку  $T \rightarrow MK \rightarrow P \rightarrow NP$ .

При виразково-інфільтративному раку шлунка генотипування слизової оболонки шлунка виявило стабільні ДНК-профілі представлені експансією ампліконів розміром 520 та 620 п.н. (пар нуклеотидів) в усіх спостереженнях. Це свідчить про їх генетичну однотипність, злякисність і можливість використовувати як маркер малігнізації.

Застосування методу ISSR-PCR дає можливість ранньої діагностики раку шлунка з матеріалу слизової оболонки.

Показники імуногістохімічного методу корелюють із гістологічним методом і показниками генотипування за реакцією ISSR-PCR. Коефіцієнт кореляції Пірсона  $r_{xy}$  між показниками мітотичного режим, проліферативної активності епітелію слизової оболонки шлунка за маркером Ki-67 і показниками генотипування епітелію слизової оболонки шлунка дорівнює відповідно 0,197, 0,607 та 0,881, що вказує на існування відповідно помірного та значного за тіснотою зв'язку між показниками з ймовірністю 0,99.

Морфологічна діагностика раку шлунка повинна базуватись на комплексній оцінці ознак, відрізняючих його дисплазії епітелію та інших змін що симулюють пухлину, співставляючи результати патогістологічних, імуногістохімічних досліджень і генотипування.

### Перспективи подальших досліджень

В подальшому комплексні дослідження планується провести на практиці з метою діагностики неопластичних змін епітелію слизової оболонки шлунка у хворих з хронічними захворюваннями шлунка.

### Література

1. Аруин Л.И. Международная классификация хронического гастрита: что следует принять и что вызывает сомнения / Л.И.Аруин, А.В.Кононов, С.И.Мозговой // Арх. пат. – 2009. – Вып.4. – С. 11 – 18.
2. Казанцева И.А. Патология митоза в опухолях человека / И.А. Казанцева – Новосибирск.: Наука, 1981. – 144 с.
3. Кононов А.В. Морфогенез атрофии слизистой оболочки желудка как основа фенотипа хронического гастрита / А.В.Кононов, С.И.Мозговой, М.В. Маркелова, А.Г.Шиманская // Арх. пат. – 2011. – Вып.3. – С. 26 – 31.

4. Марковський В.Д. Комплексна патоморфологічна диференційна діагностика передпухлинних процесів і раку шлунка / В.Д.Марковський, О.В. Харченко // Патологія. – 2012. №3. – С.15 – 18.
5. Рак в Україні, 2009 – 2010. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби // Бюл. нац. канцерреєстру України. – 2011. – Т.12., № 1. – С. 22, 37 – 38.
6. Садчиков В.Д. Хроническая язва и рак желудка / В.Д.Садчиков, А.С.Дудниченко, М.В.Садчикова // Проблеми медичної науки та освіти. – 2000. - №3. – С. 17 – 20.
7. Харченко О.В. Перспективи методу ISSR-PCR та морфологічних методів при вивченні функціонального онкогеному та фенотипу злоякісних пухлин / О.В.Харченко, В.М.Балацький, О.В.Москаленко // Вісник морфології (Reports of Morphology). – 2007. – Т.13, №1. – С. 204 – 206.
8. Харченко О.В. ISSR-PCR в дослідженні злоякісної перебудови ДНК слизової оболонки шлунка / О.В.Харченко // Сучасні проблеми патологічної анатомії: Матеріали VIII міжнародного конгресу патологів України, 21 – 23 травня 2008 р. – Полтава, 2008. – С.19.
9. Харченко О.В. Динаміка проявів фенотипу дисплазій епітелію слизової оболонки шлунка у відповідності з їх генотипом на матеріалі вивчення світлової мікроскопії та ДНК-типуювання за методом ISSR-PCR / О.В.Харченко // Вісник морфології (Reports of Morphology). – 2009. –Т. 15, №2. – С. 396 – 402.
10. Янкін А.В. Скринінг рака желудка / А.В.Янкін // Практ. Онкологія. – 2010. – №11(2). – С.96 – 101.
11. Farinati F. Early and advanced gastric cancer during Follow-up of apparently benign gastric ulcer: Significance of the presence of epithelial dysplasia / F. Farinati, F. Cardin, F. Di Mario // J.Surg.Oncol. – 1987. – Vol.36, №4. – P. 263 – 267.
12. Nagayo T. Histogenesis and precursors of human gastric cancer. Research and practice./ Nagayo T. – Berlin: Springer-Verlag. – 1988. – 190p.
13. Пат.76768 UA, МПК А61В 10/00. Спосіб діагностики інфільтративно-виразкового раку шлунка: Пат.76768 UA, МПК А61В 10/00 / О.В.Харченко (UA); В.Д.Марковський (UA); В.М.Балацький(UA). №u201209011; Заявл.23.07.2012; Опубл. 10.01.2013; Бюл.№1. -3 с.

## ENGLISH VERSION: COMPLEX DIAGNOSTICS OF ULCEROINFILTRATIVE GASTRIC CANCER\*

Kharchenko O.V.

Poltava National Pedagogical University named after V.G.Korolenko, Poltava

*Complex diagnostics, made by the histological method, specifying the mitotic regimen, immunohistochemical Ki-67 marker (MIB-1clone) and ISSR-PCR marker of genetic typing showed lesions in gastric mucosa epithelium, specific to gastric mucosa epithelium neoplasia in patients with ulceroinfiltrative gastric cancer. Expansion of ISSR-PCR marker of genetic typing indicates its high sensitivity and informativeness. There is a strong correlation between the indices of histological, immunohistochemical and indices of genetic typing, detected by the ISSR-PCR method. Between the indices of mitotic regimen, proliferative activity of gastric mucosa epithelium of Ki-67 marker and indices of genetic typing of gastric mucosa epithelium, the Pearson's correlation coefficient,  $r_{xy}$ , constitutes 0,197, 0,607 and 0,881, respectively, corresponding to the existence of moderate and considerable relationship between indices. The overall result shows statistically significant dependence with probability of 0,99.*

**Key words:** mitotic regimen, Ki-67 marker, genetic typing.

### Introduction

The main cause of death in developed countries, along with mortality from cardiovascular processes and their complications, is mortality from malignant tumors. Every year gastric cancer affects 750 – 870 thousand people in the world; it accounts for 10% from fatal outcomes, caused by neoplastic pathology. In 2009 gastric cancer in Ukraine took the 3<sup>rd</sup> (9.0%) place in the structure of male oncopathology and the 6<sup>th</sup> (5.6%) place in the female one; in the structure of oncomortality it takes the 2<sup>nd</sup> (11.8 and 9.3%) place in both groups [5, 10].

Lesions in mucosa, surrounding gastric ulcer, e.g., chronic gastritis, which are followed by dysregenerative processes with the development of epithelial dysplasia [1, 3, 6] are strongly believed to be predictors of gastric cancer development. The latter, especially the severe ones, are often identified as the marker of cancer, growing nearby [11].

Ulceroinfiltrative gastric cancers are complicated for diagnostics. At early stages this form of cancer may stimulate typical ulcer, making it difficult to make differentiated diagnostic with the latter [4, 6]. Ulcerated gastric cancer, as well as typical ulcer, may be healed. But, again, the process of healing is replaced by ulceration

and such cycles may occur repeatedly. Due to the fact that gastric ulcer develops comparatively slowly, such cycles may occur repeatedly [6, 12].

**The purpose of the research is** complex diagnostics of pretumor changes in gastric mucosa and diagnosis of gastric cancer by histological, immunohistochemical and molecular- biological methods.

### Materials and Methods

The paper considers findings of 50 examinations of ulceroinfiltrative gastric cancer. Surgically extracted stomachs have been examined with the purpose to detect morphological features of gastric mucosa condition.

The obtained samples of gastric mucosa have been studied by conventional histological method according to standard regimen, including fixation of tissue in neutral formalin. The material was processed in paraffin coating. Sections were colored in hematoxylin-eosin and picro-rosein according to Van-Gison.

Immunohistochemical detection of proliferation of gastric mucosa epithelium has been performed by Ki-67 marker on deparaffined sections of 4-5 mm thick with prior antigen damasking in citrate buffer (pH 6,0) in microwave oven during 10 min. Monoclonal antibodies have been applied to Ki-67 (MIB-1clone) as primary ones. In-

\* To cite this English version: Kharchenko O.V. Complex diagnostics of ulceroinfiltrative gastric cancer // Problemy ekologiji ta medytsyny. - 2014. - Vol 18, № 1-2. - P. 59 -62.