

О.М. Грабовий, С.А. Антонюк, Є.А. Воробей

Мітотична активність і вміст нуклеїнових кислот у ядрах клітин епітеліальних пухлин товстої кишки

Національний інститут раку, м. Київ

Ключові слова: епітеліальні пухлини товстої кишки, Ki-67, нуклеїнові кислоти.

Використання показників вмісту ДНК у ядрах пухлинних клітин і мітотичного індексу як незалежних факторів для встановлення ступеня злоякісності епітеліальних пухлин товстої кишки не правомірне. Серед епітеліальних пухлин товстої кишки виділяють пухлини, що мають протилежні вектори формування клітинного спектра. Перший характеризується зменшенням мітотичної активності, а другий – її збільшенням на фоні росту вмісту ДНК у клітинах. Серед епітеліальних пухлин товстої кишки розрізняють ті, в яких зростання середнього вмісту ДНК у ядрах клітин відбувається за рахунок високої проліферативної активності (велика частина клітин, у яких відбувається синтез ДНК), і ті пухлини, у яких цей показник зумовлений більшим вмістом у спектрі поліплоїдних клітин.

Митотическая активность и содержание нуклеиновых кислот в ядрах клеток эпителиальных опухолей толстой кишки

А.Н. Грабовой, С.А. Антонюк, Е.А. Воробей

Использование показателей содержания ДНК в ядрах опухолевых клеток и митотического индекса как независимых факторов для определения степени злокачественности эпителиальных опухолей толстой кишки не правомерно. Среди эпителиальных опухолей толстой кишки выделяют опухоли, имеющие противоположные векторы формирования клеточного спектра. Первый характеризуется снижением митотической активности, а второй – ее увеличением на фоне роста содержания ДНК в клетках. Среди эпителиальных опухолей толстой кишки выделяют те, в которых нарастание среднего содержания ДНК в ядрах клеток происходит за счет высокой пролиферативной активности (большая доля клеток, в которых происходит синтез ДНК), и те, в которых этот показатель обусловлен большей долей в спектре полиплоидных клеток.

Ключевые слова: эпителиальные опухоли толстой кишки, Ki-67, нуклеиновые кислоты.**Патология.** – 2013. – №2 (28). – С. 13–16

Mitotic activity and nucleic acids content in the cells' nuclei of epithelial colon tumors

A.N. Grabovoy, S.A. Antoniuk, E.A. Vorobey

Colon epithelial tumor (CET) malignancy grade determination cannot fully rely on the tumor cells' nuclei DNA content and mitotic index as independent factors. The opposite vectors of the cellular spectrum can distinguish CET. The first one is characterized by the decrease in mitotic activity, and the second, contrariwise, by its increase, with increased cells' DNA content. CET can be divided into those in which there is an increase in the average cells' nuclei DNA content due to high proliferative activity (a large proportion of cells in which DNA synthesis occurs), and those in which this component is increased due to an increase of the cells proportion in the polyploid cells' spectrum.

Key words: colon epithelial tumor, Ki-67, nucleic acids**Pathologia.** 2013; №2 (28): 13–16

Блок Ki-67 сьогодні є загальновизнаним маркером клітинної проліферації. Оскільки неконтрольована мітотична активність є типовою властивістю пухлин, визначення цього протеїну широко використовується в онкології, а частка Ki-67-позитивних пухлинних клітин (Ki-67 індекс мічення (ІМ)) часто корелює з клінічним перебігом раку [9].

Епітеліальні пухлини товстої кишки (ЕПТК) також стали предметом прискіпливого дослідження на предмет проліферативної активності та її зв'язку зі злоякісністю та прогнозом розвитку хвороби. Але результати таких досліджень виявились неоднозначними. Ряд авторів зазначають, що високий ІМ Ki-67 є несприятливою ознакою при визначенні злоякісності пухлини, схильності її до метастазування та загалом щодо прогнозу хвороби [10,14,18,20,25,26–27]. Інші дослідники не визнають можливість використання мітотичної активності як незалежного критерію щодо оцінки властивостей пухлини і прогнозу хвороби [17,24]. Частина учених пов'язують високий ІМ Ki-67 зі сприятливішим онкологічним прогнозом [4,19,21,23]. У деяких працях ви-

сока проліферативна активність асоціюється з кращою сприйнятливістю пухлин до терапії [7,15,23,27]. Деякі автори доводять, що висока експресія Ki-67 пов'язана зі збільшенням безрецидивної виживаності хворих на рак товстої кишки, які отримали курс ад'ювантної терапії [8]. Саме ця невизначеність питання обґрунтовує доцільність пошуку зв'язків між експресією Ki-67 та іншими маркерами, що характеризують ті чи інші властивості клітин ЕПТК [14,27].

На наш погляд, доцільний розгляд мітотичної активності у комплексі з кількістю ДНК у ядрах клітин ЕПТК, оскільки ці показники є ланками єдиного процесу. Збільшення вмісту ДНК у ядрах клітин ЕПТК є типовим явищем [1,5,11], що пов'язане з хромосомною нестабільністю, яка реалізується в поліплоїдії та анеуплоїдії [11]. На сьогодні отримано велику кількість даних, що показують зв'язок між змінами геному при ЕПТК і характером перебігу захворювання [12,16]. Проведено багато досліджень із метою виявлення зв'язку між вмістом ДНК (плоїдністю) у ядрах пухлинних клітин і гістологічним типом пухлини і, передусім, з її злоякісним потенціалом [1,12,22].

Отже, отримані дані щодо кількості ДНК у ядрах клітин і мітотичної активності в ЕПТК стали підґрунтям для формування уявлення про важливість цих показників, але вони самі по собі не є абсолютними, що пов'язано з їхньою мінливістю та гетерогенністю даної групи пухлин. Зазначене є вагомим приводом до пошуку більш значущих об'єктивних показників злоякісності та прогнозу ЕПТК, які враховують зміни кількості ДНК і мітотичної активності.

Мета роботи

Встановити особливості проліферативної активності у різних за вмістом нуклеїнових кислот клітинах ЕПТК.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження виконано на матеріалі біопсій або матеріалі, вилученому при оперативному втручанні від 102 пацієнтів із ЕПТК: поліпи й аденоми (В) – 13, новоутворення з ознаками малігнізації (М) – 20, аденокарцинома G1 (G1) – 5, аденокарцинома G2 (G2) – 47, аденокарцинома G3 (G3) – 7. Гістологічне типування новоутворень виконано з використанням рутинного забарвлення.

Отриманий матеріал фіксували в забуференому 10% формаліні з рН 7,4 та ущільнювали у парафін із застосуванням гістіопроектору Histos-5 (Milestone, Italy). З парафінових блоків виготовляли зрізи 5 мкм завтовшки за допомогою мікротома Microm HM325 (Thermo Scientific, Germany). Зрізи забарвлювали гематоксиліном і еозином та азур II-еозином для загальної оцінки пухлини, галлоціанін-хромовим галуном за Ейнарсоном (рН 1,62, 37°C, 24 години) для встановлення вмісту нуклеїнових кислот (НК) у клітинах [2,3]. Для кожного випадку частину зрізів оброблено РНКазою (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany) для екстракції РНК [2]. Імуногістохімічну реакцію виконано з моноклональним мишиним антитілом проти антигену Ki-67 людини, клон МІВ-1 (Dako, Denmark) і системою детекції EnVision™ FLEX, (Dako, Denmark) відповідно до протоколу виробника й необхідних контролів.

Отримані препарати вивчали та фотографували за допомогою мікроскопа Nikon Eclipse 80i з камерою DS-5SMc/L2 (збільшення мікроскопа ×400, 1280×960 пікселів RGB) за стандартизованих умов, зображення опрацьовано із застосуванням системи аналізу ImageJ 1,46. На зображеннях із препаратів, забарвлених галлоціанін-хромовим галуном у 60 клітинах кожної пухлини, визначали площу перетину ядра клітини й інтегративну оптичну щільність ядра клітини, а також розраховували вміст у ньому сумарної кількості нуклеїнових кислот і ДНК. Кількість РНК розраховували як різницю між кількістю НК і ДНК. Для оцінки вмісту НК у ядрах пухлинних клітин за одиницю використали їхній вміст у ядрах лімфоцитів. Клітини кожної пухлини ранжували за вмістом ДНК у ядрі. Отриману послідовність поділили на ранги із кроком, що дорівнював середньому вмісту ДНК у ядрах лімфоцитів: P1 – до 1, P2 – 1–2, P3 – 2–3 тощо. Для кожного рангу розраховували середні значення досліджуваних параметрів. Для кожної пухлини при забарвленні на сумарні НК і для виявлення експресії Ki-67 клітини ранжували за розмірами ядра відповідно

до середніх значень, визначених на препаратах, де виявлялась ДНК. У межах кожного рангу визначали відносну кількість клітин, середні значення площі ядер, вмісту в них НК, ДНК, РНК і ІМ Ki-67. Отримані кількісні дані опрацьовували стандартними статистичними методами.

Результати та їх обговорення

Спостереження засвідчили, що проліферативна активність серед різних за ступенем анаплазії ЕПТК має двофазний характер: у сегменті В-М-G1 зменшується (31,1±1,02, 28,9±0,77 і 16,5±1,02 відповідно), а в G1-G2-G3 лінійно зростає (16,5±1,02, 34,5±0,58 і 51,6±2,34) (рис. 1). Рівень кореляції вказує на відсутність прямої залежності між рівнем дедиференціювання й ІМ (r=0,58). Середні значення вмісту ДНК у ядрах клітин дослідженого ряду пухлин коливається від 1,86 (G3) до 2,43 (М) з тенденцією до зменшення у послідовності від М до G3 (рис. 1). При цьому визначено статистично достовірну відмінність між М і В (p<0,05 за критеріями Стьюдента і Фішера), а між іншими типами, що межують, відмінності не достовірні (p>0,05). Кореляція між ступенем дедиференціювання і середнім вмістом ДНК у ядрах пухлин становить -0,69, але у межах між М і G3 індекс кореляції між цими параметрами дорівнює -0,98, що вказує на їхню пряму залежність.

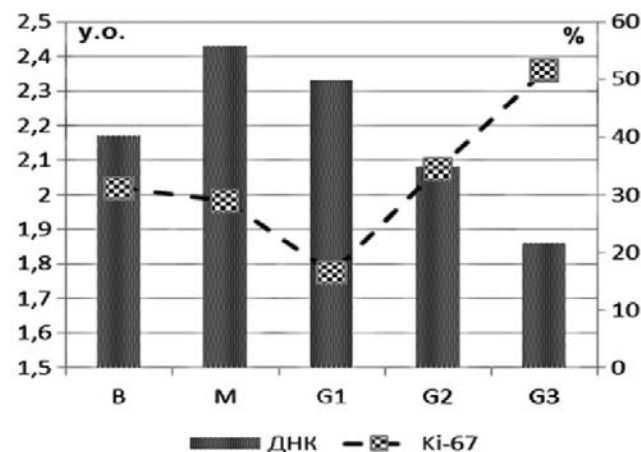


Рис. 1. Середній вміст ДНК (у.о.) у ядрах клітин ЕПТК та їх відсоток (%), що експресує Ki-67 (В – поліпи й аденоми, М – аденоми з ознаками малігнізації, Gx – карциноми відповідного ступеня анаплазії).

За середнім вмістом ДНК у ядрах клітин серед ЕПТК розрізняють три підгрупи: диплоїдні (D – середній вміст ДНК у ядрах до 1,2), проміжні між ди- і тетраплоїдними (D+ – середній вміст ДНК у ядрах від 1,2 до 2,5), гіперплоїдні (T+ – середній вміст ДНК понад 2,5) (рис. 2). Виявилось, що кожна з груп пухлин (за ступенем анаплазії) включає всі три визначені підгрупи (рис. 2).

Достовірні зміни ІМ у визначених за вмістом ДНК групах клітин спостерігають при переході від пухлин М до G1. Ці зміни проявляються різким зменшенням мітотичної активності серед клітин G1T+ (рис. 2). Зростання загальної мітотичної активності у ряду пухлин G1-G2-G3 характеризується її відносним зростанням серед клітин підгрупи D і, особливо, T+ (рис. 2).

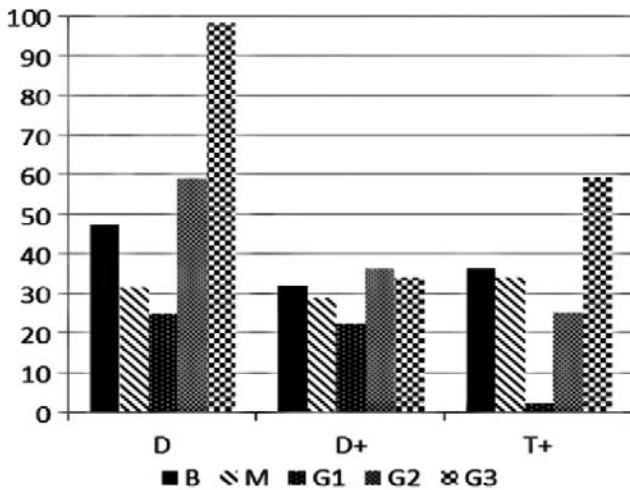


Рис. 2. Мітотична активність (ІМ Ki-67 – %) у ЕПТК із різним середнім вмістом ДНК у ядрах (В – поліпи й аденоми, М – аденоми з ознаками малігнізації, Gx – карциноми різного ступеня анаплазії; D – диплоїдні, D+ – проміжні між ди- й тетраплоїдними, T+ – тетра- й гіперплоїдні пухлини).

Клітини ЕПТК за вмістом ДНК можуть бути поділені на ранги від P1 до P10, але більшість середніх значень досліджуваних параметрів, починаючи з P6, є статистично недостовірними ($p > 0,05$) і не можуть бути використані для подальшого статистичного аналізу, а тому їх об'єднали в один ранг P6+ (рис. 3). У пухлинах В на тлі майже лінійного зменшення у спектрі відносної кількості клітин зі зростанням вмісту ДНК (за рангами) визначено два піки ІМ серед ди- і гіперплоїдних клітин. За наявності ознак малігнізації у новоутвореннях мітотична активність зміщується у бік рангів P1-P2. У високо диференційованих карциномах визначено одночасне збільшення відносної кількості поліплоїдних клітин і відносне зростання у цій частці клітинного спектра мітотичної активності. У пухлин G2 і G3 клітинний спектр за вмістом ДНК дуже схожий і характеризується зсувом у бік диплоїдних клітин. Розподіл мітотичної активності між рангами у цих пухлинах принципово відрізняється. У карциномах G2 відбувається майже лінійне зменшення ІМ зі зростанням вмісту ДНК у ядрах. Мітотична активність у пухлинах G3, крім у цілому вищих показників,

характеризується двома піками у рангах P1 і P3 (рис. 3)

Оцінка кореляції між середніми значеннями вмісту ДНК у ядрах клітин і середньою мітотичною активністю в ЕПТК не виявила прямої залежності. Проте оцінка цього показника в кожній окремо взятій пухлині засвідчила, що він коливається у межах від +1 до -1. При цьому 2/3–1/2 пухлин В, М, G1, а також домінуюча частина пухлин G2 і G3 мають від'ємний знак індексу кореляції, а інші – позитивний.

Вміст РНК у ядрах пухлинних клітин виявив зворотну залежність від вмісту ДНК. Тобто зі зростанням вмісту ДНК відбувається зменшення її відносного вмісту. Ми не виявили достовірних залежностей цих змін від ступеня анаплазії пухлин та мітотичної активності у них.

Отже, поява ознак малігнізації в ЕПТК супроводжується збільшенням середнього вмісту ДНК у їхніх ядрах. Підвищення рівня анаплазії, навпаки, супроводжується зменшенням цього показника. Враховуючи, що серед усіх типів ЕПТК за ступенем диференціювання (В, М, G1, G2, G3) є пухлини з різним вмістом ДНК, що відповідає ди-, тетра- або поліплоїдному, то плоїдність не може бути використана як самостійний показник для уточнення стадії розвитку пухлини, як це пропонують автори [1]. Різноспрямованість змін мітотичної активності (зменшення, а потім зростання) при пухлинній прогресії, значні діапазони її коливань та їхнє перекриття в ЕПТК не дають можливості з високим ступенем достовірності використовувати ІМ при визначенні злоякісного потенціалу конкретної пухлини (крім випадків із крайніми значеннями).

Серед ЕПТК можна виділити пухлини, що мають протилежні вектори формування клітинного спектра. Перший характеризується зменшенням мітотичної активності, а другий – її зростанням на фоні збільшення вмісту ДНК у пухлинних клітинах.

Зазначене знаходить відображення у тому, що серед ЕПТК розрізняють ті, в яких зростання середнього вмісту ДНК у ядрах клітин відбувається за рахунок високої проліферативної активності (велика частина клітин, у яких відбувається синтез ДНК), і ті пухлини, в яких цей показник зумовлений збільшенням у спектрі частки поліплоїдних клітин.

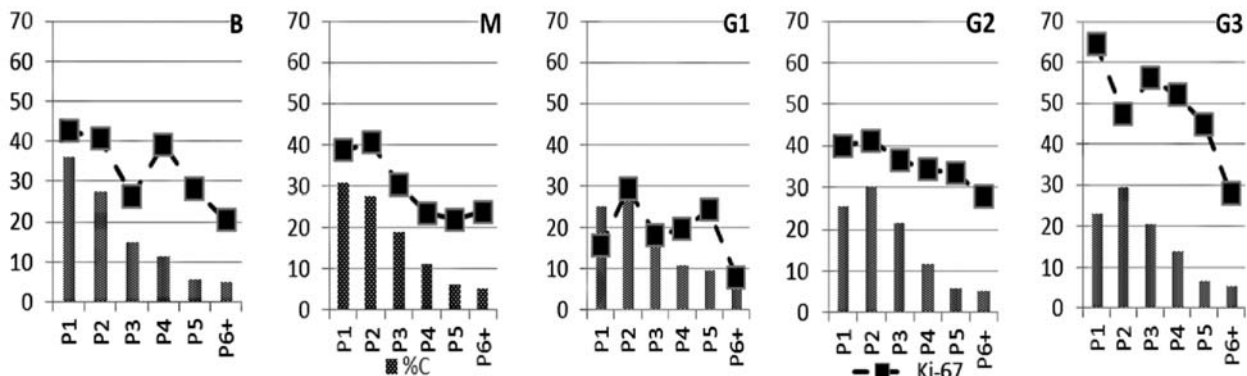


Рис. 3. Відносний вміст (%) клітин різних рангів за вмістом ДНК і мітотична активність в ЕПТК (В – поліпи й аденоми, М – новоутворення з ознаками малігнізації, Gx – карциноми відповідного ступеня анаплазії; Ki-67 – % мічених ядер. Pх – ранги за вмістом ДНК).

Гетерогенність ЕПТК за вмістом ДНК/проліферативною активністю є показниками різноманітності властивостей і життєздатності пухлинних клітин, що певним чином пов'язується з різними патогенетичними механізмами їх виникнення [6,13]. Комплексна оцінка цих параметрів може стати додатковим інформативним критерієм гістологічного визначення потенції розвитку ЕПТК.

Висновки

Використання показників вмісту ДНК у ядрах пухлинних клітин і мітотичного індексу як незалежних факторів для визначення ступеня злоскісності ЕПТК неправомірне.

Серед ЕПТК розрізняють пухлини, що мають протилежні вектори формування клітинного спектра. Перший характеризується зменшенням мітотичної активності, а другий – її зростанням на фоні збільшення вмісту ДНК у пухлинних клітинах.

Серед ЕПТК розрізняють ті, в яких зростання середнього вмісту ДНК у ядрах клітин відбувається за рахунок високої проліферативної активності (велика частина клітин, у яких відбувається синтез ДНК), і ті пухлини, в яких цей показник зумовлений збільшенням у спектрі частки поліплоїдних клітин.

Комплексна оцінка ЕПТК за вмістом ДНК і рівнем проліферативної активності може стати додатковими високо інформативним критерієм гістологічного визначення здатності розвитку ЕПТК.

Список літератури

1. Автандилов Г.Г. Диагностическая медицинская плоидометрия / Автандилов Г.Г. – М.: Медицина, 2006. – 192 с.
2. Луна Х. Основы гистохимии / Луна Х.; пер. с нем. – М.: Мир, 1980. – 344 с.
3. Ташке К. Введение в количественную цито-гистологическую морфологию. / Ташке К.; пер. с рум. – М.: Изд. Акад. Соц. Респ. Румынии, 1980. – 192 с.
4. Allegra C.J. Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study / Allegra C.J., Paik S., Colangelo L.H. // J Clin Oncol. – 2003. – V. 21 (2). – P. 241–250.
5. Compton C.C. Prognostic Factors in Colorectal Cancer / Compton C. C., Fielding L. P., Burgart L., [et al.] // Arch Pathol Lab Med. – 2000. – V. 124. – P. 979–994.
6. Davoli T. The Causes and Consequences of Polyploidy in Normal Development and Cancer / Davoli T., de Lange T. // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. – 2011. – V. 27. – P. 585–610.
7. Franco L. Expression of p53 and Ki-67 as prognostic factors for survival of men with colorectal cancer / Franco Lumachi, Rocco Orlando, Filippo Marino, Giordano B. Chiara, Stefano M.M. Basso // Anticancer Research. – 2012. – V. 32 (9). – P. 3965–3967.
8. Fluge O. Expression of EZH3 and Ki-67 in colorectal cancer and associations with treatment response and prognosis / Fluge O., Gravdal K., Carlsen E., et al. // Br J Cancer. – 2009. – V. 101 (8). – P. 1282–1289.
9. Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies / Gerdes J. // Semin. Cancer Biol. – 1990. – V. 1 (3). – P. 199–206.
10. Guzicska-Ustymowicz K. Correlation between proliferation markers: PCNA, Ki-67, MCM-2 and antiapoptotic protein Bcl-2 in colorectal cancer / Guzicska-Ustymowicz K., Prczynicz A., Kemon A., [et al.] // Anticancer Res. – 2009. – V. 29

- (8). – P. 3049–3052.
11. Hadjihannas M.V. Aberrant Wnt/ β -catenin signaling can induce chromosomal instability in colon cancer / Hadjihannas M.V., Bröckner M., Jerchow B., [et al.] // PNAS. – 2006. – V. 103 (28). – P. 10747–10752.
12. Hixon C. Flow cytometry in colon cancer: does flow cytometric cell cycle analysis help predict for short-term recurrence in patients with colorectal carcinoma? / Hixon C., Furlong J., Silbergleit A. // J Natl Med Assoc. – 1995. – V. 87 (11). – P. 803–806.
13. Holland A.J. Losing balance: the origin and impact of aneuploidy in cancer. / Holland A.J., Cleveland D.W. // EMBO. – 2012. – V. 13 (6). – P. 501–514.
14. Huh J.W. Expression of p16, p53, and Ki-67 in colorectal adenocarcinoma: a study of 356 surgically resected cases / Huh J.W., Lee J.H., Kim H.R. // Hepatogastroenterology. – 2010. – V. 57 (101). – P. 734–740.
15. Jiang S.M. Correlation of VEGF and Ki67 expression with sensitivity to neoadjuvant chemoradiation in rectal adenocarcinoma / Jiang S.M., Wang R.B., Yu J.M., [et al.] // Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. – 2008. – V. 30 (8). – P. 602–605.
16. Søreide K. Microsatellite instability and DNA ploidy in colorectal cancer / Søreide K., Slewa A., Stokkeland P.J., van Diermen B., Janssen E.A., Søreide J.A., Baak J.P., Kørner H. // Cancer. – 2009. – V. 115 (2). – P. 271–282.
17. Kubota Y. Ki-67-determined growth fraction versus standard staging and grading parameters in colorectal carcinoma. A multivariate analysis / Kubota Y., Petras R.E., Easley K.A., [et al.] // Cancer. – 1992. – V. 70 (11). – P. 2602–2609.
18. Lin M.X. Expression and significance of Bmi-1 and Ki67 in colorectal carcinoma tissues / Lin M.X., Wen Z.F., Feng Z.Y. // Ai Zheng. – 2008. – V. 27 (12). – P. 1321–1326.
19. Maksimovic S. Immunohistochemical markers (PCNA, Ki-67 and P53) in patients with colon cancer / Maksimovic S., Jakovljevic B // Annals of Oncology. – 2007. – V. 18 (9). – P. 168–172.
20. Menezes H.L. Analysis of the immunohistochemical expressions of p53, bcl-2 and Ki-67 in colorectal adenocarcinoma and their correlations with the prognostic factors / Menezes H.L., Juc M.J., Gomes E.G., [et al.] // Arq. Gastroenterol. – 2010. – V. 47 (2). – P. 141–147.
21. Palmqvist R. Low tumour cell proliferation at the invasive margin is associated with a poor prognosis in Duke's stage B colorectal cancer / Palmqvist R., Sellberg P., Sellberg E., Tavelin B., Rutegerd J., Stenling R. // Br J Cancer. – 1999. – V. 79. – P. 577–581.
22. Park S.U. Effects of Chromosomal Polyploidy on Survival of Colon Cancer Cells / Park S.U., Choi E.S., Jang Y.S., [et al.] // Korean J Gastroenterol. – 2011. – V. 57 (3). – P. 150–157.
23. Salminen E. Increased proliferation activity measured by immunoreactive Ki67 is associated with survival improvement in rectal/recto sigmoid cancer / Salminen E., Palmu S., Vahlberg T., [et al.] // World J Gastroenterol. – 2005. – V. 11 (21). – P. 3245–3249.
24. Ueda Y. Biological predictors of survival in stage II colorectal cancer / Yoshitake Ueda, Kazuhiro Yasuda, [et al.] // Molecular and Clinical Oncology – 2013. – V. 1 (4) – P. 643–648.
25. Valera V.A. Prognostic groups in colorectal carcinoma patients based on tumor cell proliferation and classification and regression tree (CART) survival analysis / Valera V.A., Walter B.A., Yokoyama N., [et al.] // Ann Surg Oncol. – 2007. – V. 14 (1). – P. 34–40.
26. Weber J.C. Is a proliferation index of cancer cells a reliable prognostic factor after hepatectomy in patients with colorectal liver metastases? / Weber J.C., Nakano H., Bachellier P., [et al.] // Am J Surg. – 2001. – V. 182 (1). – P. 81–88.
27. Zlobec I. Combined histomorphologic and immunohistochemical phenotype to predict the presence of vascular invasion in colon cancer / Zlobec I., Höller S., [et al.] // Dis Colon Rectum. – 2009. – V. 52 (6). – P. 1114–1121.

Відомості про авторів:

Грабовий О.М., д. мед. н., професор, зав. н/д відділу патологічної анатомії НІР.

Антонюк С.А., мол. науковий співробітник н/д відділення патологічної анатомії та гістології н/д відділу патологічної анатомії НІР.

Воробей Є.А., ст. лаборант н/д відділення патологічної анатомії та гістології н/д відділу патологічної анатомії НІР.

Надійшла в редакцію 28.08.2013 р.