

О. М. Грабовий<sup>1</sup>, С. А. Антонюк<sup>1</sup>, В. П. Сільченко<sup>2</sup>, Є. А. Воробей<sup>1</sup>, Т. М. Савчин<sup>1</sup>

## Питомий вміст ДНК у ядрах клітин і клітинна гетерогенність аденокарцином товстої кишки

<sup>1</sup>Національний інституту раку, м. Київ,

<sup>2</sup>Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика, м. Київ

**Ключові слова:** аденокарцинома товстої кишки, ДНК, клітинна гетерогенність.

Визначення властивостей і тонких механізмів патогенезу є безпосередньою умовою підвищення ефективності боротьби з раком, у тому числі товстої кишки. З метою оцінювання гетерогенності клітинного складу аденокарцином товстої кишки за питомим вмістом ДНК у ядрах клітин на матеріалі 141 біопсії або вилученому під час оперативного втручання здійснили дослідження за допомогою гістологічних, гістохімічних, морфо- та денсіометричного, математичних методів. Встановили, що в аденокарциномах товстої кишки з підвищенням ступеня дедиференціювання (G) відбувається збільшення відносної частки клітин з ядрами, які найбільше відповідають функціонально активним, і навпаки. Це свідчить, що клітинна гетерогенність аденокарцином товстої кишки є не лінійною, а функцією, що наближається до параболічної.

### Удельное содержание ДНК в ядрах клеток и клеточная гетерогенность аденокарцином толстой кишки

А. Н. Грабовой, С. А. Антонюк, В. П. Сильченко, Е. А. Воробей, Т. М. Савчин

Определение свойств и тонких механизмов патогенеза является непосредственным условием повышения эффективности борьбы с раком, в том числе толстой кишки. С целью оценить гетерогенность клеточного состава аденокарцином толстой кишки по удельному содержанию ДНК в ядрах клеток на материале 141 биопсий или взятом в ходе оперативного вмешательства провели исследование с помощью гистологических, гистохимических, морфо- и денситометрического, математических методов. Установлено, что в аденокарциномах толстой кишки по мере роста степени дедифференцировки (G) происходит увеличение относительной доли клеток с ядрами, которые наиболее соответствуют функционально активным, и наоборот. Это свидетельствует, что клеточная гетерогенность аденокарцином толстой кишки является не линейной, а функцией, приближающейся к параболической.

**Ключевые слова:** аденокарцинома толстой кишки, ДНК, клеточная гетерогенность.

**Патология.** – 2015. – №1 (33). – С. 44–47

### Specific cell's nuclei DNA content and cellular heterogeneity of colon adenocarcinoma

A. N. Grabovoy, S. A. Antoniuk, V. P. Silchenko, E. A. Vorobiei, T. M. Savchin

Definition of properties and fine pathogenesis mechanisms is a direct condition for improving the effectiveness of the fight against cancer, including colon cancer.

Aim. In order to assess the cellular composition heterogeneity of colon adenocarcinoma (AC) on the specific DNA content in the cells' nuclei 141 biopsies were studied using histological, histochemical, morphological, densitometric and mathematical methods.

Methods and results. It was established that in AC with grade increase (G) there is an increase in the relative proportion of cells with nuclei which are most appropriate for functional activity and vice versa.

Conclusion. This suggests that AC cellular heterogeneity is not linear, and the function approximates to the parabolic one.

**Key words:** Large Intestine, Adenocarcinoma, DNA, Genetic Heterogeneity.

**Pathologia.** 2015; №1 (33): 44–47

Зміни кількості ДНК у ядрах клітин аденокарцином товстої кишки (АК) є типовим явищем, яке пов'язане передусім із хромосомною нестабільністю, котра реалізується в поліплоїдії та анеуплоїдії [1,5,7,9]. Виконано багато досліджень щодо виявлення зв'язку між вмістом ДНК (плоїдністю) в ядрах пухлинних клітин і гістологічним типом пухлини і передусім з її злоякісним потенціалом [1,9]. Дані щодо кількості ДНК у ядрах клітин і прогнозу при колоректальному раку дали підґрунтя для формування уявлення про важливість цього показника, який не є абсолютним, що пов'язано з мінливістю цього явища [7,9].

Наші спостереження [2] показали: середній вміст ДНК у ядрах пухлинних клітин виявляється найбільшим у поліпах та аденомах з осередками малігнізації (фактично аденокарциноми G1). В АК із підвищенням ступеня

дедиференціювання (G) відзначили його зменшення, як і зменшення виразності гетерогенності клітинного складу пухлин за цією ознакою. Крім того, привернула увагу доволі значна варіабельність оптичної щільності ядер пухлинних клітин при визначенні в них вмісту ДНК, що дало змогу припустити можливість використання цього показника для оцінювання клітинного складу АК.

#### Мета роботи

Оцінити гетерогенність клітинного складу аденокарцином товстої кишки за питомим вмістом ДНК у ядрах клітин.

#### Матеріали і методи дослідження

Дослідження виконані на матеріалі 141 біопсій або вилученому при оперативному втручанні від пацієнтів з АК і доброякісними новоутвореннями: 11 – контроль, умовно нормальна кишка (К), поліпи та аденоми (В) –

16; АК G1 (G1) – 28; АК G2 (G2) – 73; АК G3 (G3) – 13. Гістологічне типування пухлин здійснили з використанням рутинного забарвлення.

Матеріал фіксували в забуференому 10% формаліні з рН 7,4 та ущільнювали у парафін із застосуванням гістопроектора Histos-5 (Milestone, Italy). З парафінових блоків виготовляли зрізи завтовшки 5 мкм за допомогою мікротома Microm HM325 (Thermo Scientific, Germany). Зрізи забарвлювали гематоксилином для загального оцінювання пухлини, галоціанін-хромовим галуном за Ейнарсоном (рН 1,62, 37°C, 24 год) для виявлення вмісту нуклеїнових кислот (НК) [3,4]. Для кожного випадку частину зрізів обробляли РНКазою (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany) для екстракції РНК [3].

Препарати вивчали та фотографували за допомогою мікроскопа Nikon Eclipse 80i з камерою DS-5SMc/L2 за стандартизованих умов, а зображення (збільшення мікроскопа  $\times 400$ ,  $1280 \times 960$  пікселів RGB) опрацьовували із застосуванням системи аналізу ImageJ 1,46. На зображеннях із препаратів, забарвлених галоціанін-хромовим галуном, у 30 клітинах кожної пухлини визначали площу перетину ядра клітини, питому та інтегративну оптичну щільність ядра клітини, розраховували вміст у ньому кількості ДНК. Для визначення останнього як одиницю обрали вміст ДНК у ядрах лімфоцитів [2]. Клітини кожної пухлини ранжували за вмістом ДНК в ядрі. Отриману послідовність ділили на ранги із кроком, що дорівнював середньому вмісту ДНК у ядрах лімфоцитів: R1 – до 1, R2 – 1–2, R3 – 2–3 і т.д. Враховуючи, що клітини з рангом P5 і більше становили менше ніж 5%, а більшість середніх значень їхніх параметрів, які визначали, мали  $p > 0,05$ , їх зводили в один ранг P6+. За середнім вмістом ДНК у ядрах клітини пухлин поділили на 3 підгрупи: D – середній вміст ДНК у ядрах до 1,2, D+ – середній вміст ДНК у ядрах від 1,2 до 2,5, T+ – середній вміст ДНК понад 2,5 [1,2].

Статистичний аналіз виконали з використанням програмного забезпечення IBM SPSS Statistics 22. Для кореляційного аналізу застосували метод рангової кореляції за Спірманом, оскільки більшість величин не відповідали нормальному закону розподілу, що визначили за допомогою одновибіркового тесту Колмогорова – Смірнова. Для порівняння вибірок використовували Н-критерій Крускала – Уоллеса та U-критерій Манна – Уїтні. Для досліджених пухлин (130) здійснили аналіз виживаності за Каплан – Мейером з використанням лог-ранк тесту для оцінювання вірогідної різниці у групах із різною виживаністю. Для регресійного аналізу використовували метод Кокса.

### Результати та їх обговорення

Клітинний склад (спектр) пухлин, які дослідили, визначили за вмістом ДНК у ядрах їхніх клітин. Він виявляє помірний ступінь залежності від ступеня анаплазії. З підвищенням середнього значення плоідності пухлини відбувається зміщення її клітинного спектра до зростання відносної кількості клітин зі збільшеним вмістом ДНК у ядрах [2]. Спостерігали зменшення

середнього вмісту ДНК у ядрах АК із підвищенням ступеня дедиференціювання (G).

Поділ клітин на групи з умовно нормальними ядрами (Nn) й ті, ядра яких перебувають у стані пікнозу (Np) чи зазнали хроматолізу (Nl), здійснили за критеріями середньої оптичної щільності, площі перетину ядра та вмістом у ньому ДНК. Для кожного R на основі загальної вибірки вираховували середні значення площі перетину ядра та кількості ДНК. На підставі цього обраховували індекс нормальності ядра ( $N_i$ ):

$$N_i = \frac{NDNA_i \cdot NArea_R}{NDNA_R \cdot NArea_i}, \quad (1)$$

- де  $N_i$  – індекс нормальності ядра клітини;
- $NDNA_i$  – вміст ДНК у ядрі клітини;
- $NDNA_R$  – середній вміст ДНК у ранзі R, до якого належить клітина;
- $NArea_i$  – площа перетину ядра клітини;
- $NArea_R$  – середнє значення площі перетину ядра в ранзі R, до якого належить клітина.

Значення  $N_i$ , що відповідали б нормальним ядрам, обрані напівемпіричним шляхом і встановлені у межах  $1,0 \pm 0,2$ . Для вибірки клітин (для кожного випадку окремо) з нормальними показниками  $N_i$  обраховували середнє значення оптичної щільності ядра, середньоквадратичне відхилення, на основі цього – мінімальне та максимальне значення. Отже, це дало змогу розширити можливості  $N_i$ . До групи клітин Nn включені ті, середня оптична щільність ядер яких лежала у межах між мінімумом і максимумом (обраховували на попередньому етапі дослідження). Ядра з щільністю понад нормальний діапазон (вище максимуму) – до групи Np (зазнали пікнозу – велика оптична щільність водночас із низькими показниками площі перетину). Клітини з ядрами, які мали оптичну щільність нижче мінімального значення визначеного діапазону, класифіковані як Nl (зазнали хроматолізу) (рис. 1). На основі результатів для кожної пухлини розраховували частки Nn, Np, Nl клітин.

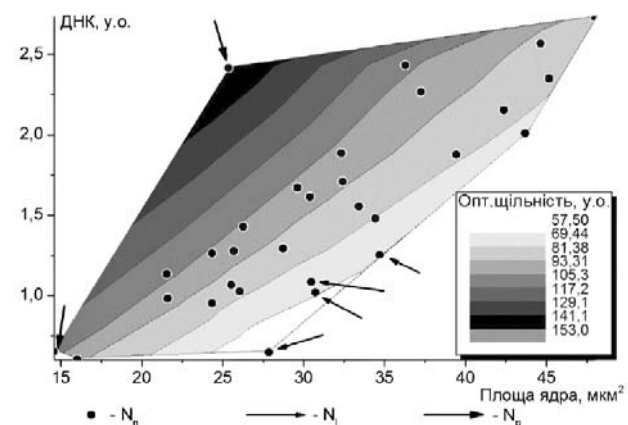


Рис. 1. Розподіл клітин аденокарцином товстої кишки у координатах кількості ДНК (у.о.), площі (мкм²) і середньої оптичної щільності ядра (у.о.).

Аналіз клітинного складу пухлин різного ступеня дедиференціювання показав збільшення відсотка клітин з умовно нормальними ядрами (Nn) із підвищенням анаплазії ( $p < 0,01$ ) (рис. 2).

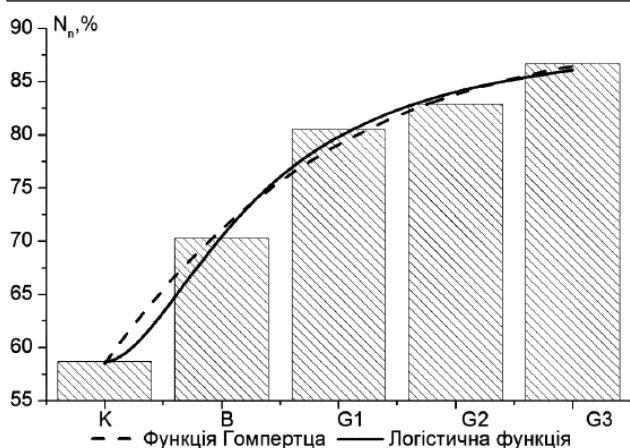


Рис. 2. Збільшення частки клітин в аденокарциномі товстої кишки з умовно нормальними ядрами (Nn) із підвищенням ступеня дедиференціювання. Столпчики гістограми – емпірично визначена частка Nn клітин у пухлині.

Примітки: К – контроль, В – доброякісні новоутворення, G1-G2-G3 – АК відповідного грейда.

Це збільшення відбувається за логістичним законом ( $R^2=0,98$ ), що найкраще описується функцією Гомпертца ( $R^2=0,99$ ), тобто швидкість зростання частки Nn клітин (приріст) є різною в різні моменти захворювання (за умови посилення анаплазії з часом існування пухлини), що нагадує криву росту популяції. Крім того, логістичний закон передбачає існування певного межового значення щільності популяції, до якого прямує логістична крива. У нашому випадку його значення становить 89,7%. Після його досягнення приріст популяції, теоретично, не відбувається, і крива виходить на плато. Точніше розуміння перебігу хвороби (від її ініціації та в періоди між стадіями розвитку) дасть можливість детально вивчити властивості кривої та детальніше описувати в математичній формі основні моменти перебігу захворювання, прогнозувати їхні наслідки.

Щодо частки Np клітин спостерігали зворотну залежність: частка таких клітин у пухлині знижується зі збільшенням G ( $p<0,01$ ) (рис. 3). Таке зниження відбувається експоненційно ( $R^2=0,99$ ).

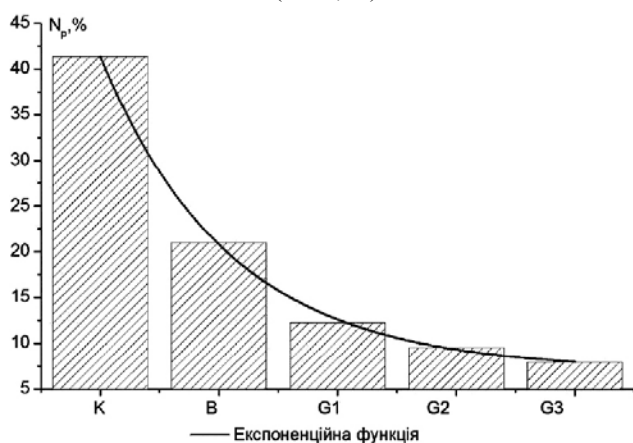


Рис. 3. Експоненційне зниження відсотка клітин з ядрами, що зазнали пікнозу (Np) у складі аденокарциноми товстої кишки зі збільшенням G. Столпчики гістограми – емпірично визначена частка Np клітин у пухлині.

Примітки: К – контроль, В – доброякісні новоутворення, G1-G2-G3 – АК відповідного грейда.

Під час оцінювання N1 клітин у складі пухлин не виявили закономірностей змін їхньої кількості, що дає змогу розглядати їх появу як випадкове явище.

Аналіз клітинного складу у групах пухлин із різною середньою плоїдністю показав наявність вірогідної різниці між значеннями Nn зі збільшенням тканинної анаплазії пухлини для D+ ( $p<0,01$ ) і показниками Np ( $p<0,01$ ). Так, спостерігали підвищення Nn і зниження Np зі збільшенням G. Однак таку закономірність не визначили для диплоїдних пухлин (D), де статистично вірогідних результатів не отримали. Це можна пояснити високою ізоморфністю пухлинних клітин цієї групи. Для групи T+, де спостерігали виражену клітинну анізоморфію, також не отримали вірогідної різниці між різними G, хоча у групі простежується виразна тенденція до збільшення Nn і зниження Np.

Аналіз виживаності за методом Каплана – Мейєра не виявив її прямого зв'язку з показниками питомої оптичної щільності ядер за вмістом ДНК і клітинним складом пухлини за цією ознакою.

Отже, дослідження показали, що з підвищенням ступеня дедиференціювання АК відбувається збільшення відносної частки клітин з ядрами, що найбільш відповідають функціонально активним, а відносна кількість клітин, ядра яких не відповідають критеріям життєздатності, зменшується. Це збігається з характером змін клітинного спектра АК за вмістом ДНК у ядрах пухлинних клітин, коли в АК G3, у порівнянні з більш диференційованими, він звужується [2]. Наведене є прямим відображенням концепції клональної еволюції пухлин [6, 10] і показує поступове набуття домінування в АК клону(ів) з ефективними системами життєзабезпечення і, можливо, зі стабілізованим геномом. З цих позицій клітинну гетерогенність [8] АК треба розглядати як не лінійну, а параболічну функцію. Відповідно, на певному етапі розвитку (пухлинної прогресії) виразність гетерогенності досягає максимуму. Паралельно клональна еволюція отримує максимум субстрату для реалізації відбору, і зі складу пухлини елімінуються нежиттєздатні морфофункціональні типи пухлин. Поряд з тим із клітинного різноманіття виділяються такі, що, маючи спотворений генотип (забезпечує високу проліферативну активність зі збереженням систем життєзабезпечення та втратою специфічних функцій інтегрування у тканинні комплекси), є основою для виникнення стійких клонів, які здатні до необмеженого існування.

### Висновки

В аденокарциномах товстої кишки з підвищенням ступеня дедиференціювання (G) відбувається збільшення відносної частки клітин з ядрами, що найбільше відповідають функціонально активним і навпаки.

Елімінація нежиттєздатних морфофункціональних типів пухлинних клітин в аденокарциномах товстої кишки відбувається одночасно зі зростанням ступеня її клітинної гетерогенності. Досягнення рівноваги між цими процесами є періодом, після якого в пухлині починає зменшуватися рівень клітинної гетерогенності. Відповідно, клітинна гетерогенність аденокарцином є не лінійною, а функцією, що наближається до параболічної.

### Список літератури

1. Автандилов Г.Г. Диагностическая медицинская плоидометрия / Г.Г. Автандилов. – М. : Медицина, 2006. – 192 с.
2. Грабовий О.М. Вміст нуклеїнових кислот у ядрах клітин епітеліальних пухлин товстої кишки / О.М. Грабовий, С.А. Антонюк, Є.А. Воробей // Український морфологічний альманах. – 2013. – №1. – С. 73–76.
3. Лупа Х. Основы гистохимии : пер. с нем. / Х. Лупа. – М. : Мир, 1980. – 344 с.
4. Ташке К. Введение в количественную цито-гистологическую морфологию : пер. с рум. / К. Ташке. – М. : Изд. Акад. Соц. Респ. Румынии, 1980. – 192 с.
5. Davoli T. The Causes and Consequences of Polyploidy in Normal Development and Cancer / T. Davoli, T. de Lange // *Ann. Rev Cell Dev. Biol.* – 2011. – Vol. 27. – P. 585–610.
6. Greaves M. Clonal evolution in cancer / M. Greaves, C.C. Malley // *Nature.* – 2012. – Vol. 481. – №7381. – P. 306–313.
7. Holland A. Losing balance: the origin and impact of aneuploidy in cancer / A. Holland, D. Cleveland // *EMBO.* – 2012. – Vol. 13. – P. 501–514.
8. Cancer heterogeneity—a multifaceted view / F.D.S.E. Melo, L. Vermeulen, E. Fessler, J.P. Medema // *EMBO reports.* – 2013. – Vol. 14(8). – P. 686–695.
9. Effects of Chromosomal Polyploidy on Survival of Colon Cancer Cells / S. Park, E. Choi, Y. Jang et al. // *Korean J. Gastroenterol.* – 2011. – Vol. 57(3). – P. 150–157.
10. Visvader J.E. Cells of origin in cancer / J.E. Visvader // *Nature.* – 2011. – Vol. 469(7330). – P. 314–322.

### References

1. Avtandilov, G. G. (2006). *Diagnosticheskaya medicinskaya ploidometriya [Diagnostic medical ploidyometry]*. Moscow: Medicina. [in Russian].
2. Hrabovyi, O.M., Antoniuk, S. A., Vorobiei, Ye. A. (2013). Vmist nukleinovyykh kyslot u yadrakh klityn epitelialnykh pukhlyn tovstoi kyshky [Nucleic acids contents in the colon epithelial tumor cells nuclei]. *Ukrainskyi morfologichnyi almanakh*, 11(1), 73–76. [in Ukrainian].
3. Lupa, Kh. (1980) *Osnovy khistokhimii [Basic histochemistry]*. Moscow: Myr. [in Russian].
4. Tashke, K. (1980). *Vvedenie v kolichestvennyuyu cito-gistologicheskuyu morfologiyu. [Introduction to quantitative cytological morphology]*. Moscow. [in Russian].
5. Davoli, T., & de Lange, T. (2011). The Causes and Consequences of Polyploidy in Normal Development and Cancer. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, 27, 585–610. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154234.
6. Greaves, M., & Malley, C. C. (2012) Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381), 306–313. doi: 10.1038/nature10762.
7. Holland, A., & Cleveland, D. (2012) Losing balance: the origin and impact of aneuploidy in cancer. *EMBO*, 13, 501–514. doi: 10.1038/embor.2012.55.
8. Melo, F. D. S. E., Vermeulen, L., Fessler, E., & Medema, J. P. (2013) Cancer heterogeneity – a multifaceted view. *EMBO*, 14(8), 686–695. doi: 10.1038/embor.2013.92.
9. Park, S., Choi, E., Jang, Y., Hong, S. H., Kim, I. H., & Chang, D. K. (2011). Effects of Chromosomal Polyploidy on Survival of Colon Cancer Cells. *Korean J. Gastroenterol.*, 57(3), 150–157. doi: 10.4166/2011.57.3.150.
10. Visvader, J. E. (2011) Cells of origin in cancer. *Nature*, 469(7330), 314–322. doi: 10.1038/nature09781.

### Відомості про авторів:

Грабовий О.М., д. мед. н., професор, зав. науково-дослідного відділу патологічної анатомії, Національний інститут раку, E-mail: agrabovoy@yandex.ru.

Антонюк С.А., м.н.с. н.-д. відділу патологічної анатомії, Національний інститут раку.

Сільченко В.П., д. мед. н., професор, зав. каф. патологічної та топографічної анатомії, Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика.

Воробей Є.А., ст. лаборант з вищою освітою н.-д. відділу патологічної анатомії, Національний інститут раку.

Савчин Т.М., дипломант н.-д. відділу патологічної анатомії, Національний інститут раку.

### Сведения об авторах:

Грабовой А.Н., д. мед. н., профессор, зав. научно-исследовательским отделом патологической анатомии, Национальный институт рака, E-mail: agrabovoy@yandex.ru.

Антонюк С.А., м.н.с. н.-и. отдела патологической анатомии, Национальный институт рака.

Сильченко В.П., д. мед. н., профессор, зав. каф. патологической и топографической анатомии, Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л. Шупика.

Воробей Е.А., ст. лаборант с высшим образованием н.-и. отдела патологической анатомии, Национальный институт рака.

Савчин Т.М., дипломант н.-и. отдела патологической анатомии, Национальный институт рака.

### Information about authors:

Grabovoy A.N., MD, PhD, DScM, Professor, Head of The Research Department of Anatomical Pathology, Ukrainian National Cancer Institute, E-mail: agrabovoy@yandex.ru.

Antoniuk S.A., MD, Researcher of The Research Department of Anatomical Pathology, Ukrainian National Cancer Institute.

Silchenko V.P., MD, PhD, DScM, Professor, Head of the Department of Pathologic and Topographic Anatomy, Shupik National Medical Academy of Postgraduate Education.

Vorobiei E.A., Senior researcher assistant of The Research Department of Anatomical Pathology, Ukrainian National Cancer Institute.

Savchin T.M., Writer of a university degree thesis of The Research Department of Anatomical Pathology, Ukrainian National Cancer Institute.

Надійшла в редакцію 27.03.2015 р.