

М. А. Шишкін

Сравнительная иммуногистохимическая характеристика пролиферации и апоптоза колоректальной аденокарциномы

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

Ключевые слова: новообразования кишечника, аденокарцинома, толстый кишечник, прямая кишка, пролиферация, апоптоз, онкосупрессорный протеин p53, каспаза-3.

Колоректальный рак представляет собой актуальную проблему в системе мирового здравоохранения, что связано с высокими показателями заболеваемости и смертности.

Цель работы – сравнить уровни экспрессии иммуногистохимических маркеров пролиферации и апоптоза раковыми клетками, а также клетками, формирующими микроокружение колоректальной аденокарциномы; изучить корреляции между уровнями пролиферации, апоптоза и клинико-морфологическими характеристиками колоректальной аденокарциномы.

Материалы и методы. Проведено комплексное патогистологическое исследование операционного материала 30 больных, прооперированных по поводу аденокарциномы дистальных отделов толстого кишечника I–IV клинических стадий.

Результаты. Установлено, что опухолевые клетки колоректальной аденокарциномы характеризуются средним уровнем пролиферации, средним уровнем экспрессии p53 и низким уровнем апоптоза, в то время как клетки микроокружения данной опухоли – низкими уровнями пролиферации, экспрессии p53 и апоптоза. Выявлены прямые сильные корреляционные связи между показателями пролиферации и апоптоза раковых клеток, а также аналогичными показателями клеток микроокружения опухоли. Выявлены прямые корреляционные связи средней силы между уровнями экспрессии p53 клетками паренхимы и стромы колоректальной аденокарциномы, уровнями экспрессии p53 клетками паренхимы и Ki-67 клетками стромы опухоли, уровнем экспрессии p53 клетками паренхимы и степенью гистологической дифференцировки опухоли. Кроме того, выявлены обратные сильные корреляционные связи между показателями экспрессии Ki-67 и каспазы-3 раковыми клетками и клетками микроокружения колоректальной аденокарциномы.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о тесной ассоциации процессов пролиферации и апоптоза опухолевых клеток и клеток микроокружения колоректальной аденокарциномы. Получены данные, свидетельствующие о взаимосвязи процессов накопления мутантного белка p53 в клетках паренхимы и стромы опухоли, а также о том, что накопление p53 в раковых клетках ассоциировано с возрастанием пролиферативной активности опухолевого микроокружения и со снижением степени дифференцировки колоректальной аденокарциномы. Кроме того, получены данные, свидетельствующие о том, что с возрастанием пролиферативной активности клеток паренхимы и стромы колоректальной аденокарциномы снижается их апоптотическая активность.

Патология. – 2016. – №3 (38). – С. 65–72

Порівняльна імуногістохімічна характеристика проліферації та апоптозу колоректальної аденокарциноми

М. А. Шишкін

Колоректальний рак є актуальною проблемою в системі світової охорони здоров'я, що пов'язана з високими показниками захворюваності та смертності.

Мета роботи – порівняти рівні експресії імуногістохімічних маркерів проліферації та апоптозу раковими клітинами, а також клітинами, що формують мікрооточення колоректальної аденокарциноми; дослідити кореляції між рівнями проліферації, апоптозу та клініко-морфологічними характеристиками колоректальної аденокарциноми.

Матеріали та методи. Здійснили комплексне патогістологічне дослідження операційного матеріалу 30 хворих, які прооперовані з приводу аденокарциноми дистальних відділів товстої кишки I–IV клінічних стадій.

Результати. Встановлено, що пухлинні клітини колоректальної аденокарциноми характеризуються середнім рівнем проліферації, середнім рівнем експресії p53 та низьким рівнем апоптозу, тоді як клітини мікрооточення цієї пухлини – низькими рівнями проліферації, експресії p53 та апоптозу. Виявлена наявність прямих сильних кореляційних зв'язків між показниками проліферації та апоптозу ракових клітин, а також аналогічними показниками клітин мікрооточення пухлини. Виявили прямі кореляційні зв'язки середньої сили між рівнями експресії p53 клітинами паренхіми та стромы колоректальної аденокарциноми, рівнями експресії p53 клітинами паренхіми та Ki-67 клітинами стромы пухлини, рівнем експресії p53 клітинами паренхіми та ступенем гістологічного диференціювання пухлини. Крім того, виявили зворотні сильні кореляційні зв'язки між показниками експресії Ki-67 і каспази-3 пухлинними клітинами та клітинами мікрооточення колоректальної аденокарциноми.

Висновки. Дані, що отримали, свідчать про асоціацію процесів проліферації та апоптозу пухлинних клітин і клітин, що формують мікрооточення колоректальної аденокарциноми. Отримали дані, що свідчать про взаємозв'язок процесів накопичення мутантного протеїну p53 у клітинах паренхіми і стромы пухлини, а також стосовно того, що накопичення p53 в пухлинних клітинах асоційовано зі зростанням проліферативної активності пухлинного мікрооточення та зі зниженням ступеня диференціювання колоректальної аденокарциноми. Крім того, отримали дані щодо асоціації зростання проліферативної активності клітин паренхіми та стромы колоректальної аденокарциноми зі зниженням їхньої апоптотичної активності.

Ключові слова: новоутворення кишечника, аденокарцинома, товстий кишечник, пряма кишка, проліферація, апоптоз, онкосупресорний протеїн p53, каспаза-3.

Патология. – 2016. – №3 (38). – С. 65–72

Comparative immunohistochemical study of proliferation and apoptosis in colorectal adenocarcinoma

M. A. Shyshkin

Colorectal cancer is the actual problem in the global health care system, which is associated with high rates of morbidity and mortality.

Aim. To compare the expression levels of immunohistochemical markers of proliferation and apoptosis in the colorectal tumor cells and the colorectal tumor-associated stroma; to study the correlations between the proliferation levels, apoptosis levels and clinicopathological parameters of colorectal adenocarcinoma.

Materials and methods. The surgical material of 30 patients with distal colon adenocarcinoma (I-IV clinical stages) was analyzed using pathohistological and immunohistochemical methods.

Results. It was established that colorectal tumor cells are characterized by the medium proliferation level, the medium p53 expression level and the low apoptosis level, just as colorectal tumor-associated stroma is characterized by the low proliferation, p53 expression and apoptosis levels. The direct strong correlations between the proliferation and apoptosis levels in the tumor cells, and also between the proliferation and apoptosis levels in the tumor-associated stroma were revealed. The direct medium correlations between the p53 expression levels in the tumor cells and the tumor-associated stroma, between the p53 expression level in the tumor cells and the Ki-67 expression level in the tumor-associated stroma, and also between the p53 expression level in the tumor cells and the degree of histological differentiation of the tumor were revealed. Moreover, the reverse strong correlations between the Ki-67 expression levels and the caspase-3 expression levels in the tumor cells and the tumor-associated stroma were revealed.

Conclusions. These data indicate the tight association between proliferative and apoptosis processes in the colorectal tumor cells and the colorectal tumor-associated stroma. The interconnections between the p53 accumulation in the tumor cells and the colorectal tumor-associated stroma, the p53 accumulation in the tumor cells and the increase of proliferative activity of the colorectal tumor-associated stroma, and also between the p53 accumulation in the tumor cells and the degree of histological differentiation of the tumor were established. Furthermore, it was revealed that increase of proliferative activity of colorectal adenocarcinoma is associated with decrease apoptotic activity of the tumor.

Key words: *Intestinal Neoplasms, Adenocarcinoma, Colon, Rectum, Cell Proliferation, Apoptosis, Tumor Suppressor Protein P53, Caspase-3.*

Pathologia 2016; №3 (38): 65–72

Колоректальный рак (КРР) – актуальная проблема в системе мирового здравоохранения, что связано с высокими показателями заболеваемости и смертности. КРР является третьей по распространённости злокачественной опухолью среди мужчин и второй среди женщин, в 2012 году в мире было выявлено 1,4 миллиона случаев КРР и 693 900 случаев смерти, связанных с заболеванием [1].

Пролиферация и апоптоз – основополагающие процессы, обеспечивающие поддержание тканевого гомеостаза, удаление повреждённых клеток, формирование новых клеточных поколений [2]. Процессы пролиферации клеток, а также запрограммированной их гибели тесно взаимосвязаны, именно поддержание баланса между формированием новых и ликвидацией старых (повреждённых) клеток гарантирует нормальную структуру, следовательно, и функцию ткани, органа [3].

Неопластический процесс развивается на фоне усиленной клеточной пролиферации, опосредованной активацией генов-промоторов онкогенеза и инактивацией генов-онкосупрессоров, а также на фоне возникновения мутаций в генах, контролирующих апоптоз. Три названных варианта молекулярно-генетических аномалий – обязательный компонент формирования любой опухоли [2]. В течение последнего десятилетия было проведено немало исследований, посвящённых вопросам иммуногистохимической характеристики пролиферации и апоптоза в различных опухолях, а также прогностической ценности отдельных маркеров. В ряде исследований было показано, что инвазивный рак молочной железы [4,5], инвазивная аденокарцинома эндометрия [6,7] характеризуются более высокими уровнями экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki-67, а также

большой склонностью к накоплению мутантного белка p53 в сравнении с неинвазивными вариантами данных опухолей. Большинство злокачественных опухолей характеризуются низким уровнем экспрессии маркера апоптотической дегградации каспазы-3 [2], но при этом имеются исключения. Были изучены варианты рака молочной железы [8], а также плоскоклеточного рака ротовой полости [9], отличающиеся высоким уровнем экспрессии каспазы-3. Примечательно, что данные карциномы считаются прогностически более неблагоприятными в сравнении с аналогичными опухолями, характеризующимися низким уровнем экспрессии маркера апоптотической дегградации.

Современные литературные данные, касающиеся особенностей иммуногистохимической экспрессии маркеров пролиферации и апоптоза в клетках КРР, вариабельны. Считается, что для раковых клеток колоректальной аденокарциномы характерен преимущественно средний и высокий уровень экспрессии Ki-67, а также низкий уровень экспрессии каспазы-3 [10–14]. Данные, касающиеся уровня экспрессии маркера мутантного белка p53 в раковых клетках колоректальной аденокарциномы, варьируют в широком диапазоне [15]. При этом вопрос об экспрессии вышеназванных маркеров клетками, формирующими опухолевое микроокружение, является менее изученным, сведения, имеющиеся на данный момент, отрывочны [16] и не позволяют провести комплексную оценку активности процессов пролиферации и апоптоза в клетках колоректальной аденокарциномы.

Кроме того, прогностическая ценность иммуногистохимических маркеров пролиферации и апоптоза для больных колоректальным раком вызывает активные

дискуссии. Касательно маркера клеточной пролиферации Ki-67 имеются данные, свидетельствующие как о его прогностической ценности в качестве маркера благоприятного прогноза [10], так и о его прогностической ценности в качестве маркера неблагоприятного прогноза для жизни больных [11,12]. Более того, имеются также сведения о том, что маркер Ki-67 не может расцениваться в качестве прогностического фактора [13,17]. Аналогичного рода противоречия имеются и в работах, посвящённых прогностической ценности маркеров p53, каспазы-3. В основе иммуногистохимического прогнозирования течения болезни должны лежать чёткие представления о закономерностях экспрессии маркеров пролиферации и апоптоза в конкретной опухоли. Приведённые данные свидетельствуют об актуальности изучения вопроса сравнительной иммуногистохимической характеристики пролиферации и апоптоза колоректальной аденокарциномы.

Цель работы

Сравнить уровни экспрессии иммуногистохимических маркеров пролиферации и апоптоза в раковых клетках, а также клетках, формирующих микроокружение колоректальной аденокарциномы; изучить корреляции между уровнями пролиферации, апоптоза и клинико-морфологическими характеристиками колоректальной аденокарциномы.

Материалы и методы исследования

Проведено комплексное патогистологическое исследование операционного материала 30 больных, прооперированных по поводу аденокарциномы дистальных отделов толстого кишечника I–IV клинических стадий.

Полученные на прецизионном ротационном микротоме Microm HM 340E (Thermo Scientific, США) парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также с помощью ШИК-реакции. Окрашенные парафиновые срезы подлежали патогистологическому исследованию, в ходе которого изучалась структура опухоли, определялся её гистологический вариант, степень дифференцировки, а также показатели глубины инвазии (pT), метастатического поражения лимфатических узлов (pN), отдалённых метастазов (pM) и клинической стадии заболевания на основании действующей классификации TNM (TNM Classification of Malignant Tumours, 7th ed.) [18].

Иммуногистохимическое исследование проводилось согласно стандартной методике [19], с использованием моноклональных антител Mo a-Hu Ki-67 Antigen (Clone MIB-1, «ДАКО», Дания), Mo a-Hu p53 Protein (Clone DO-7, «ДАКО», Дания), Mo a-Hu Caspase Ab-3 (Clone 3CSP03, «Thermo Scientific», США) и системы детекции EnVision FLEX с диаминобензидином («ДАКО», США). Результаты ИГХ исследования оценивали в микроскопе AxioPlan 2 («Carl Zeiss», ФРГ), срезы фотографировали цифровой фотокамерой «Canon EOS 1000D» (Япония) в 5 полях зрения при увеличении x200.

Уровни экспрессии маркеров Ki-67 и p53 анализировали в цифровых фотоизображениях ИГХ микропре-

паратов с использованием пакета Photoshop CC (2014). При наличии в стандартизированном поле зрения менее 25 % иммунопозитивных клеток уровень экспрессии оценивался как низкий, при наличии 25–75 % иммунопозитивных клеток – как средний, а при наличии в поле зрения более 75 % иммунопозитивных клеток уровень экспрессии оценивался как высокий [20].

Экспрессию каспазы-3 опухолевыми клетками и клетками микроокружения колоректальной аденокарциномы определяли методом фотоцифровой морфометрии [21]. Уровень экспрессии маркера выражали в условных единицах оптической плотности (УЕОП), применяя четырёхуровневую градацию: 0–20 УЕОП – отсутствие экспрессии, 21–50 УЕОП – низкий уровень экспрессии, 51–100 УЕОП – умеренный уровень экспрессии, более 100 УЕОП – высокий уровень экспрессии.

Статистическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере в программе «Statistica 6.0» (StatSoft Inc., лицензия № AXXR712D833214FAN5). Вычисляли медиану (Me), нижний и верхний квартили (Q_1 ; Q_3). Сравнение проводили с помощью Т-критерия Вилкоксона, разница между изучаемыми параметрами считалась статистически значимой при $p < 0,05$. Изучение связей между исследуемыми параметрами проводили с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и их обсуждение

При иммуногистохимическом исследовании колоректальной аденокарциномы установлено, что ядерная экспрессия маркера клеточной пролиферации Ki-67 и маркера мутантного белка p53 выявляется как в опухолевых клетках, так и в клетках, формирующих опухолевое микроокружение. Ядерно-цитоплазматическая экспрессия маркера апоптотической деградации каспазы-3 также выявляется и в опухолевых клетках, и в клетках опухолевого микроокружения.

Пролиферативная активность клеток колоректальной аденокарциномы изучена в предыдущем исследовании [22]. Установлено, что раковые клетки данной опухоли характеризуются средним уровнем пролиферации (Me=41,20 % (36,62; 59,42)), в то время как клетки опухолевого микроокружения – низким (Me=5,23 % (4,72; 6,45)). Кроме того, была выявлена прямая сильная корреляционная связь между уровнями экспрессии Ki-67 опухолевыми клетками и клетками микроокружения колоректальной аденокарциномы (табл. 1), а также обратная корреляционная связь средней силы между показателем уровня экспрессии Ki-67 опухолевыми клетками и показателем глубины инвазии (pT) колоректальной аденокарциномы (табл. 2). В исследовании А. Negazy et al. (2014) также выявлена обратная корреляционная связь между уровнем пролиферативной активности и показателем pT данной опухоли [23]. Корреляционных связей между пролиферативной активностью раковых клеток, клеток стромы, степенью дифференцировки карциномы, наличием метастазов в лимфатических узлах, отдалённых метастазов и клинической стадией болезни

не было выявлено (табл. 2). В научной литературе встречаются сообщения о наличии корреляций между экспрессией маркера Ki-67 и степенью гистологической дифференцировки опухоли [17], метастатическим поражением лимфатических узлов [13,17], однако в данном исследовании указанных корреляций не выявлено.

Согласно современным литературным данным, клетки колоректальной аденокарциномы в большинстве случаев характеризуются средним или же высоким уровнем экспрессии Ki-67 [10–14], что совпадает с полученными данными, а также позволяет отнести колоректальную аденокарциному к активно пролиферирующим опухолям. При этом вопрос о прогностической ценности определения уровня пролиферации колоректального рака остаётся спорным. По данным М. Claudio et al. (2012) [11], R. Najib et al. (2014) [12], высокий уровень экспрессии Ki-67 клетками колоректальной аденокарциномы является прогностически неблагоприятным фактором. Авторами была выявлена ассоциация между высокой пролиферативной активностью опухоли и низкими показателями выживаемости больных. N. Melling et al. (2016) [10] в своём исследовании пришли к диаметрально противоположному выводу: высокий уровень экспрессии Ki-67 клетками колоректальной аденокарциномы ассоциирован с благоприятным прогнозом для жизни пациентов. Кроме того, в научной литературе

встречаются сообщения о том, что маркер клеточной пролиферации Ki-67 не может рассматриваться в качестве независимого прогностического фактора [13,17].

Медиана экспрессии мутантного белка p53 опухолевыми клетками колоректальной аденокарциномы составила 39,67 (15,69; 83,75), а медиана экспрессии данного белка клетками опухолевого микроокружения – 0,03 (0,00; 2,57). Разница между медианами экспрессии p53 в опухолевых клетках и клетках стромы колоректальной аденокарциномы статистически значима ($p < 0,05$). Таким образом, установлено, что опухолевые клетки колоректальной аденокарциномы характеризуются средним уровнем экспрессии мутантного p53, а клетки стромы данной опухоли – крайне низким уровнем экспрессии маркера.

При проведении корреляционного анализа выявлена прямая корреляционная связь средней силы между уровнями экспрессии мутантного белка p53 раковыми клетками и клетками опухолевого микроокружения (табл. 1), что свидетельствует об ассоциации процессов накопления мутантного белка p53 в ядрах раковых клеток и клеток опухолевого микроокружения. Кроме того, была выявлена прямая средней силы корреляционная связь между степенью гистологической дифференцировки колоректальной аденокарциномы (G) и экспрессией опухолевыми клетками белка p53 (табл. 2), свидетель-

Таблица 1

Изучение корреляционных связей между экспрессией маркеров Ki-67, p53, caspase-3 клетками колоректальной аденокарциномы

	Ki-67 в опухолевых клетках	Ki-67 в клетках опухолевого микроокружения	p53 в опухолевых клетках	p53 в клетках опухолевого микроокружения	Caspase-3 в опухолевых клетках	Caspase-3 в клетках опухолевого микроокружения
Ki-67 в опухолевых клетках	1,00	0,85*	0,34	0,34	-0,70*	-0,60*
Ki-67 в клетках опухолевого микроокружения	0,85*	1,00	0,50*	0,18	-0,73*	-0,64*
p53 в опухолевых клетках	0,34	0,50*	1,00	0,54*	-0,28	-0,14
p53 в клетках опухолевого микроокружения	0,34	0,18	0,54*	1,00	-0,13	-0,00
Caspase-3 в опухолевых клетках	-0,70*	-0,74*	-0,28	-0,13	1,00	0,78*
Caspase-3 в клетках опухолевого микроокружения	-0,60*	-0,64*	-0,14	-0,00	0,78*	1,00

Примечание: * – наличие корреляционной связи.

Таблица 2

Изучение корреляционных связей между экспрессией маркеров Ki-67, p53, caspase-3 клетками колоректальной аденокарциномы и клинико-морфологическими характеристиками опухоли

	G	pT	pN	pM	stage
Ki-67 в опухолевых клетках	-0,29	-0,41*	0,01	-0,14	-0,23
Ki-67 в клетках опухолевого микроокружения	-0,08	-0,17	0,05	-0,02	-0,03
p53 в опухолевых клетках	0,36*	0,15	0,27	-0,18	0,17
p53 в клетках опухолевого микроокружения	0,16	-0,16	0,03	-0,27	-0,15
Caspase-3 в опухолевых клетках	0,31	0,29	0,10	0,26	0,29
Caspase-3 в клетках опухолевого микроокружения	0,17	0,28	0,08	0,33	0,31

Примечание: * – наличие корреляционной связи.

ствующая, что умеренно- (G2) и низкодифференцированные (G3) карциномы отличаются большей склонностью к накоплению мутантного белка p53 в сравнении с высокодифференцированными (G1) опухолями. В научной литературе найдены данные о наличии обратной корреляционной связи между экспрессией p53 клетками колоректальной карциномы и степенью гистологической дифференцировки опухоли: S. Gurzu et al. (2007) сообщали о том, что высокодифференцированные карциномы отличаются большим уровнем экспрессии p53 [17]. В более поздних исследованиях S. Mogoanta et al. (2014) [13], L. Streba et al. (2015) [14] сообщалось о том, что корреляция между уровнем экспрессии p53 и показателем G колоректальной аденокарциномы отсутствует.

Корреляционных связей между экспрессией p53 опухолевыми клетками, клетками стромы опухоли, глубиной её инвазии, наличием метастазов в лимфатических узлах, отдалённых метастазов и клинической стадией болезни выявлено не было. В литературе встречаются сообщения о наличии корреляций между экспрессией p53 клетками колоректальной аденокарциномы и глубиной инвазии опухоли (pT) [17], между экспрессией маркера и поражением лимфатических узлов (pN) [23], однако в результате проведённого исследования факт наличия данных связей не подтвержден.

Согласно современным литературным данным, мутации гена TP53, кодирующего белок p53, встречаются в 40–50 % случаев спорадического колоректального рака, при этом активность экспрессии мутантного белка p53 в каждой отдельно взятой опухоли варьирует в широком диапазоне [15]. В результате исследования установлено, что опухолевые клетки колоректальной аденокарциномы характеризуются средним уровнем экспрессии p53 ($Me=39,67$ (15,69; 83,75)). Вопрос о прогностической ценности исследования уровня экспрессии данного маркера остаётся открытым, при этом большинство современных исследований свидетельствует о том, что высокий уровень экспрессии мутантного p53 является прогностически неблагоприятным признаком, ассоциирован с низкими показателями выживаемости пациентов и может расцениваться в качестве независимого прогностического фактора [11, 13].

Медиана экспрессии маркера апоптотической деградации каспазы-3 опухолевыми клетками колоректальной аденокарциномы составила 28,72 (15,64; 76,71), в то время как медиана экспрессии данного маркера клетками опухолевого микроокружения – 37,78 (26,27; 54,60). Разница между указанными показателями экспрессии не является статистически значимой ($p>0,05$). Следовательно, установлено: опухолевые клетки, а также клетки микроокружения колоректальной аденокарциномы характеризуются низким уровнем экспрессии маркера апоптотической деградации каспазы-3, что согласуется с общими представлениями об апоптотической активности злокачественных новообразований [2].

При проведении корреляционного анализа была выявлена прямая сильная корреляционная связь между

уровнями экспрессии каспазы-3 раковыми клетками и клетками, формирующими микроокружение (табл. 1), свидетельствующая о тесной ассоциации апоптотической активности клеток паренхимы и стромы опухоли. Корреляционных связей между экспрессией маркера апоптотической деградации опухолевыми клетками, клетками стромы опухоли, глубиной её инвазии, наличием метастазов в лимфатических узлах, отдалённых метастазов, клинической стадией болезни, а также степенью гистологической дифференцировки колоректальной аденокарциномы не выявлено. Полученные нами данные согласуются с литературными, ведь в большинстве современных исследований описывается низкий уровень экспрессии каспазы-3 клетками колоректальной аденокарциномы, а также отсутствие корреляций между экспрессией данного маркера и клинико-морфологическими характеристиками опухоли [24]. Исключение составило исследование J. Alcaide et al. (2013), в котором сообщалось о том, что метастатическая колоректальная аденокарцинома отличается значимо большей апоптотической активностью [25].

Вопрос о прогностической ценности маркера апоптотической деградации каспазы-3 для больных колоректальной аденокарциномой активно обсуждается в современной научной литературе, причём результаты проводимых исследований существенно отличаются. Так, J. Alcaide et al. (2013) [25], L. Flanagan et al. (2016) [24] сообщали о том, что каспаза-3 может быть использована в качестве прогностического маркера, а высокий уровень экспрессии фермента апоптотической деградации ассоциирован с плохим прогнозом для жизни больных колоректальной аденокарциномой. P. Noble et al. (2015) [16] в своём исследовании пришли к иному выводу: высокий уровень экспрессии каспазы-3 клетками колоректальной аденокарциномы ассоциирован с благоприятным прогнозом для жизни пациентов. Более того, в указанном исследовании изучалась апоптотическая активность не только опухолевых клеток, но и клеток, формирующих микроокружение колоректальной аденокарциномы. Ассоциация высокого уровня экспрессии каспазы-3 с благоприятным прогнозом была установлена как для раковых клеток, так и для клеток, формирующих микроокружение опухоли [16].

Изучены корреляционные связи между уровнями экспрессии маркеров пролиферации, белка p53 и апоптоза в структурных элементах колоректальной карциномы. Выявлена прямая корреляционная связь средней силы между уровнем экспрессии p53 в раковых клетках и уровнем экспрессии Ki-67 клетками опухолевого микроокружения колоректальной аденокарциномы (табл. 1), свидетельствующая о взаимосвязи между аккумуляцией мутантного p53 в раковых клетках и пролиферацией клеток опухолевого микроокружения. Согласно литературным данным, корреляционная связь между уровнями экспрессии Ki-67 и p53 раковыми клетками колоректальной аденокарциномы отсутствует [17], при этом вопрос о наличии корреляционной связи между

экспрессией данных маркеров клетками паренхимы и стромы опухоли остается не освещенным.

Кроме того, выявлено наличие обратной сильной корреляционной связи между уровнями экспрессии Ki-67 и каспазы-3 опухолевыми клетками колоректальной аденокарциномы (табл. 1), уровнями экспрессии каспазы-3 раковыми клетками и Ki-67 клетками стромы опухоли (табл. 1), а также обратной корреляционной связи средней силы между уровнями экспрессии указанных маркеров клетками опухолевого микроокружения колоректальной аденокарциномы (табл. 1), уровнями экспрессии Ki-67 раковыми клетками и каспазы-3 клетками стромы опухоли (табл. 1). Полученные данные свидетельствуют о тесной ассоциации процессов пролиферации и апоптоза клеток, формирующих паренхиму и строму колоректальной аденокарциномы. L. Flanagan et al. (2016) сообщали об отсутствии корреляций между уровнями экспрессии Ki-67 и каспазы-3 опухолевыми клетками колоректального рака [24], в то время как вопрос о наличии корреляционных связей между уровнями экспрессии данных маркеров клетками паренхимы и стромы опухоли не освещен в современной литературе.

Статистически значимой корреляционной связи между уровнями экспрессии мутантного белка p53 и каспазы-3 опухолевыми клетками и клетками микроокружения колоректальной аденокарциномы не выявлено, что согласуется с современными литературными данными. P. Noble et al. (2015) изучали экспрессию данных маркеров не только в опухолевых клетках, но и в клетках, формирующих микроокружение карциномы [16]. В результате также было установлено, что апоптотическая активность клеток опухоли не коррелирует с активностью накопления мутантного белка p53.

Выводы

1. Колоректальная аденокарцинома характеризуется средним уровнем пролиферативной активности ($Me=41,20\%$ (36,62; 59,42)) и низким уровнем апоптоза раковых клеток ($Me=28,72$ (15,64; 76,71)), а также низкими уровнями пролиферативной активности ($Me=5,23\%$ (4,72; 6,45)) и апоптоза клеток опухолевого микроокружения ($Me=37,78$ (26,27; 54,60)).

2. Опухолевые клетки колоректальной аденокарциномы характеризуются средним уровнем экспрессии мутантного белка p53 ($Me=39,67$ (15,69; 83,75)), в то время как клетки стромы данной опухоли характери-

зуются низким уровнем экспрессии маркера ($Me=0,03$ (0,00; 2,57)).

3. Наличие прямых сильных корреляционных связей между средними показателями пролиферации опухолевых клеток и низкими показателями пролиферации клеток стромы (коэффициент корреляции Спирмена = 0,85), а также между низкими показателями уровня апоптоза клеток паренхимы и стромы опухоли (коэффициент корреляции Спирмена = 0,78) свидетельствует о тесной ассоциации процессов пролиферации и апоптоза раковых клеток и клеток микроокружения колоректальной аденокарциномы.

4. Прямые корреляционные связи средней силы между средними показателями экспрессии p53 опухолевыми клетками и низкими показателями экспрессии p53 клетками микроокружения (коэффициент корреляции Спирмена = 0,50), между средними показателями экспрессии p53 опухолевыми клетками и низкими показателями экспрессии Ki-67 клетками микроокружения (коэффициент корреляции Спирмена = 0,50), между средними показателями экспрессии p53 опухолевыми клетками и степенью гистологической дифференцировки опухоли (коэффициент корреляции Спирмена = 0,36) свидетельствуют об ассоциации процессов накопления мутантного белка в клетках паренхимы и стромы опухоли, а также о том, что накопление мутантного p53 в раковых клетках ассоциировано с возрастанием пролиферативной активности опухолевого микроокружения и со снижением степени дифференцировки колоректальной аденокарциномы.

5. Наличие обратных сильных корреляционных связей между средними показателями экспрессии Ki-67 и низкими показателями экспрессии каспазы-3 опухолевыми клетками (коэффициент корреляции Спирмена = -0,70), а также клетками микроокружения опухоли (коэффициент корреляции Спирмена = -0,60), обратных сильных корреляционных связей между низкими показателями экспрессии Ki-67 клетками микроокружения и каспазы-3 опухолевыми клетками (коэффициент корреляции Спирмена = -0,74), а также клетками микроокружения опухоли (коэффициент корреляции Спирмена = -0,64) свидетельствует о том, что возрастание пролиферативной активности клеточных элементов ассоциировано со снижением апоптотической активности клеток паренхимы и стромы колоректальной аденокарциномы.

Конфликт интересов: отсутствует.

Список литературы

1. Global Cancer Statistics, 2012 / L.A. Torre, F. Bray, R.L. Siegel et al. // CA: A Cancer Journal for Clinicians. – 2015. – №65. – P. 87–108.
2. Основы патологии заболеваний по Роббинсу и Котрану / В. Кумар, А.К. Аббас, Н. Фаусто, Д.К. Астер. – М. : Логосфера, 2014. – 1392 с.
3. Fletcher C.D. Diagnostic histopathology of tumors / C.D. Fletcher. – Philadelphia : Elsevier Saunders, 2013. – 2178 pp.
4. Can Ki-67 Play a Role in Prediction of Breast Cancer Patients' Response to Neoadjuvant Chemotherapy? / J. Ingolf, M. Rus-salina, M. Simona et al. // BioMed Research International. – 2014. – Vol. 2014. – P. 71–78.
5. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry / E.C. Inwald, M. Klinkhammer-Schalke, F. Hofstädter et al. // Breast Cancer Research and Treatment. – 2013. – Vol. 139(2). – P. 539–552.
6. Туманский В.А. Сравнительная иммуногистохимическая характеристика экспрессии рецепторов эстрогена- α и прогестерона, p16 и p53, Ki-67 и каспазы-3 в инвазивной эндометриальной аденокарциноме тела матки и в пролиферативном эндометрии / В.А. Туманский, А.В. Чепец // Патология. – 2016. – №1(36). – С. 22–28.

7. Expression and relationship of Ezh2, Runx3 and caspase-3 in endometrial adenocarcinoma / Z.L. Guo, K. Chen, X.Q. Wang, W. Hu // *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. – 2011. – Vol. 40(6). – P. 387–391.
8. Survivin and Caspase-3 Expression in Breast Cancer: Correlation with Prognostic Parameters, Proliferation, Angiogenesis, and Outcome / A. Nassar, D. Lawson, G. Cotsonis, C. Cohen. // *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. – 2008. – Vol. 16(2). – P. 113–120.
9. Constitutive Activation of Caspase-3 in Non-Apoptotic Oral Squamous Cell Carcinoma Cells / W. Heshiki, K. Tomihara, M. Yamazaki et al. // *Journal of Cancer Science & Therapy*. – 2015. – Vol. 7. – P. 75–80.
10. High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer / N. Melling, C. Kowitz, R. Simon et al. // *Journal of Clinical Pathology*. – 2016. – №69. – P. 209–14.
11. Prognostic Predictive Factors in Colorectal Adenocarcinoma with Liver Metastasis / M.J. Claudio, R.J. Ulysses, Kleber et al. // *Scientific Reports*. – 2012. – Vol. 1. – №9. – P. 56–60.
12. Ki 67 as a marker of prognosis in Morocco colorectal cancer / R. Najib, K. Daoudi, F. Hijri et al. // *Annals of Oncology*. – 2014. – №25. – P. 153–156.
13. Colorectal cancer – clinical and morphological aspects / S. Mogoanta, I. Vasile, B. Totolici et al. // *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. – 2014. – №1(55). – P. 103–110.
14. A pilot study on the role of fractal analysis in the microscopic evaluation of colorectal cancers / L. Streba, M.C. Fortofoiu, C. Popa et al. // *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. – 2015. – №1(56). – P. 191–96.
15. p53 mutations in colorectal cancer – molecular pathogenesis and pharmacological reactivation / X. Li, J. Zhou, Z. Chen, W. Chng // *World Journal of Gastroenterology*. – 2015. – №21(1). – P. 84–93.
16. High levels of cleaved caspase-3 in colorectal tumour stroma predict good survival / P. Noble, M. Vyas, A. Al-Attar et al. // *British Journal of Cancer*. – 2015. – №108. – P. 2097–2105.
17. The correlation between the immunostains for p53 and Ki67 with bcl-2 expression and classical prognostic factors / S. Gurzu, J. Jugn, T. Mezei, Z. Pavai. // *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. – 2007. – №48(2). – P. 95–99.
18. Sobin L.H. International Union Against Cancer (UICC). TNM Classification of Malignant Tumours / L.H. Sobin, M.K. Gospodarowicz, C. Wittekind. – N. Y. : Wiley-Blackwell, 2009. – 50 pp.
19. Diagnostic Immunohistochemistry / Ed. by D.J. Dabbs. – 3rd ed. – Philadelphia : Saunders/Elsevier, 2010. – 951 pp.
20. Uhlén M. The Human Protein Atlas [Электронный ресурс] / M. Uhlén // *Mathias Uhlén*. – 2015. – Режим доступа: <http://www.proteinatlas.org>.
21. Пат 99314 Україна, МПК 2015.01 G01N 21/00 G06K 9/00 Спосіб фотоцифрової морфометрії імуногістохімічних препаратів / В.О. Туманський, А.В. Євсєєв, І.С. Коваленко, М.Д. Зубко ; заявник і патентовласник Запорізький держ. мед. ун-т.; заявл. 29.12.14.; опубл. 25.05.15 // *Бюлетень*. – №10.
22. Шишкин М.А. Особенности иммуногистохимической экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki-67 в опухолевых и стромальных клетках колоректальной аденокарциномы / М.А. Шишкин // *Патологія*. – 2016. – №2(37). – С. 76–81.
23. Role of Ki-67, P53 and Bcl-2 in Advanced Colorectal Carcinoma (Histopathological and Immunohistochemical Study) / A. Hegazy, S. Daoud, I. Shawky et al. // *Academic Journal of Cancer Research*. – 2014. – №7(3). – P. 168–72.
24. Low levels of Caspase-3 predict favourable response to 5FU-based chemotherapy in advanced colorectal cancer: Caspase-3 inhibition as a therapeutic approach / L. Flanagan, M. Meyer, J. Fay et al. // *Cell Death and Disease*. – 2016. – №7. – P. 2087–2098.
25. The role and prognostic value of apoptosis in colorectal carcinoma / J. Alcaide, R. Funez, A. Rueda et al. // *BMC Clinical Pathology*. – 2013. – №13. – P. 24–31.

References

1. Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015) Global Cancer Statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65, 87–108. doi: 10.3322/caac.21262.
2. Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., & Aster, D. K. (2014) *Osnovy patologii zbolevanij po Robbinsu i Kotranu [Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease]*. Moscow: Logosfera [in Russian].
3. Fletcher, C., D. (2013) *Diagnostic histopathology of tumors*. Philadelphia: Elsevier Saunders.
4. Ingolf, J., B., Mavrova, R., Moga, S., Radosa, J., Schmidt, G., Rainer, M., B., et al. (2014) Can Ki-67 Play a Role in Prediction of Breast Cancer Patients' Response to Neoadjuvant Chemotherapy? *BioMed Research International*, 2014, 71–78. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/628217>.
5. Inwald, E. C., Klinkhammer-Schalke, M., Hofstädter, F., Zeman, F., Koller, M., Gerstenhauer, M., & Ortmann, O. (2013) Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Research and Treatment*, 139(2), 539–552. doi: 10.1007/s10549-013-2560-8.
6. Tumanskiy, V. A., & Chepets, A. V. (2016) *Sravnitel'naya immunogistokhimicheskaya kharakteristika e'kspresii receptorov e'strogena-a i progesterona, p16 i p53, Ki-67 i kaspazy-3 v invazivnoj e'ndometrioidnoj adenokarcinome tela matki i v proliferativnom e'ndometrii* [Comparative immunohistochemical characteristics of expression of estrogen receptors-alpha, progesterone receptors, p16, p53, Ki-67 and caspase 3 in invasive endometrial adenocarcinoma and normal proliferative endometrium]. *Pathologia*, 1(36), 22–28. [in Ukrainian]. doi: 10.14739/2310-1237.2016.1.72165.
7. Guo, Z. L., Chen, K., Wang, X. Q., & Hu, W. (2011). Expression and relationship of Ezh2, Runx3 and caspase-3 in endometrial adenocarcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 40(6), 387–391.
8. Nassar, A., Lawson, D., Cotsonis, G., & Cohen, C. (2008). Survivin and Caspase-3 Expression in Breast Cancer: Correlation with Prognostic Parameters, Proliferation, Angiogenesis, and Outcome. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 16(2), 113–120. doi: 10.1097/PAI.0b013e318032ea73.
9. Heshiki, W., Tomihara, K., Yamazaki, M., Arai, N., Nakamori, K., & Noguchi, M. (2015). Constitutive Activation of Caspase-3 in Non-Apoptotic Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 7, 75–80.
10. Melling, N., Kowitz, C., M., Simon, R., Bokemeyer, C., Terracciano, L., Sauter, G., et al (2016). High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 69, 209–14. doi: 10.1136/jclinpath-2015-202985.
11. Claudio, M. J., Ulysses, R. J., Kleber, Venancio, A., Vincenzo, P., Massad, E., Abraao, S., W., et al. (2012). Prognostic Predictive Factors in Colorectal Adenocarcinoma with Liver Metastasis. *Scientific Reports*, 9, 56–60.
12. Najib, R., Daoudi, K., Fatima, Z., H., Arifi, S., & Mellas, N. (2014). Ki 67 as a marker of prognosis in Morocco colorectal cancer. *Annals of Oncology*, 25, 153–156. doi: 10.1093/annonc/mdu165.195.
13. Mogoantă, S. S., Vasile, I., Totolici, B., Neamțu, C., Streba, L., Busuioc, C., J., & Mateescu, G., O. (2014). Colorectal cancer – clinical and morphological aspects. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 55, 103–110.

14. Streba, L., ForȚofoiu, M. C., Popa, C., Ciobanu, D., Gruia, C. L., Mogoantă, S. Ș., & Streba, C. T. (2015). A pilot study on the role of fractal analysis in the microscopic evaluation of colorectal cancers. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 56, 191–96.
15. Li, X., Zhou, J., Chen, Z., & Chng, W. (2015). p53 mutations in colorectal cancer – molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World Journal of Gastroenterology*, 21(1), 84–93. doi: 10.3748/wjg.v21.i1.84.
16. Noble, P., Vyas, M., Al-Attar, A., Durrant, S., Scholefield, J., & Durrant, L. (2015). High levels of cleaved caspase-3 in colorectal tumour stroma predict good survival. *British Journal of Cancer*, 108, 2097–2105. doi: 10.1038/bjc.2013.166.
17. Gurzu, S., Jugn, J., Mezei, T., & Pava, Z. (2007). The correlation between the immunostains for p53 and Ki67 with bcl-2 expression and classical prognostic factors. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 48(2), 95–99.
18. Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2009) *International Union Against Cancer (UICC). TNM Classification of Malignant Tumours*. New York: Wiley-Blackwell.
19. Dabbs D. J. (Ed.) (2010). *Diagnostic Immunohistochemistry*. Philadelphia: Saunders/Elsevier.
20. Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., et al. (2015) *The Human Protein Atlas*. Retrieved from: <http://www.proteinatlas.org>.
21. Tumanskyi, V.O., Yevsieiev, A.V., Kovalenko, I.S., & Zubko, M.D. (patentee) (2015) *Patent 99314 Ukraina, MPK 2015.01 G01N 21/00 G06K 9/00 Sposib fototsyvrovoi morfometrii immunohistokhimichnykh preparativ* [Patent of Ukraine 99314, IPC 2015.01 G01N 21/00 G06K 9/00 The technique of digital morphometry of immunohistochemical slides]. *Biuletyn*, 10 [in Ukrainian].
22. Shyshkin, M. A. (2016) Osobennosti immunogistokhimicheskoy e'kspressii markera kletchnoy proliferatsii Ki-67 v opukholevykh i stromal'nykh kletkakh kolorektal'noj adenokarcinomy [Immunohistochemical study of Ki-67 expression in the tumor cells and the stromal cells of colorectal adenocarcinoma]. *Pathologia*, 2(37), 76–81. [in Ukrainian]. doi: 10.14739/2310-1237.2016.2.80898.
23. Hegazy, A., Daoud, S. A., Ibrahim, W. S., El-Atrebi, K., Saker, M., & Abdel-Wahab, N. (2014) Role of Ki-67, P53 and Bcl-2 in Advanced Colorectal Carcinoma (Histopathological and Immunohistochemical Study). *Academic Journal of Cancer Research*, 7(3), 168–72. doi: 10.5829/idosi.ajcr.2014.7.3.1111.
24. Flanagan, L., Meyer, M., Fay, J., Curry, S., Bacon, O., Duessmann, H., et al. (2016). Low levels of Caspase-3 predict favourable response to 5FU-based chemotherapy in advanced colorectal cancer: Caspase-3 inhibition as a therapeutic approach. *Cell Death and Disease*, 7, 2087–2098. doi: 10.1038/cddis.2016.7.
25. Alcaide, J., Funez, R., Rueda, A., Perez-Ruiz, E., Pereda, T., Rodrigo, I., et al. (2013). The role and prognostic value of apoptosis in colorectal carcinoma. *BMC Clinical Pathology*, 13, 24–31. doi: 10.1186/1472-6890-13-24.

Сведения об авторе:

Шишкин М. А., канд. мед. наук, доцент каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, Украина, E-mail: masiles@mail.ru.

Відомості про автора:

Шишкин М. А., канд. мед. наук, доцент каф. патологічної анатомії і судової медицини, Запорізький державний медичний університет, Україна, E-mail: masiles@mail.ru.

Information about author:

Shyshkin M. A., MD, PhD, Associate Professor, Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine, E-mail: masiles@mail.ru.

Надійшла до редакції 07.10.2016 р.