

УДК: 616.345-006.04-018.1:574.936.32

© Грабовий О. М., Антонюк С. А., Воробей Є. А., 2013

ВМІСТ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ У ЯДРАХ КЛІТИН ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ ПУХЛИН ТОВСТОЇ КИШКИ**Грабовий О. М., Антонюк С. А., Воробей Є. А.***Національний інститут раку***Грабовий О. М., Антонюк С. А., Воробей Є. А.** Вміст нуклеїнових кислот у ядрах клітин епітеліальних пухлин товстої кишки // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 1. – С. 73-76.

Проведені дослідження показали, що для визначення (уточнення) ступеня анаплазії епітеліальних пухлин товстої кишки (ЕПТК) самостійне застосування рівня плоїдності та клітинного спектру не є правомірним. Вміст ДНК у ядрах ЕПТК (плоїдність) та клітинний склад можуть бути важливою складовою визначення властивостей пухлини і прогнозу її розвитку. Зменшення вмісту РНК у ядрах клітин ЕПТК може бути використане як непрямий показник ступеня життєздатності клітин та виділення їх морфо-функціональних типів здатних до подальшого розвитку. Низькодиференційовані ЕПТК (G3) відрізняються від більш диференційованих меншим рівнем клітинної гетерогенності, що свідчить про домінування в них клону(ів) зі стабільним геномом та ефективними системами життєзабезпечення.

Ключові слова: епітеліальні пухлини товстої кишки, нуклеїнові кислоти, плоїдність.**Грабовой А.Н., Антониук С. А., Воробей Е.А.** Содержание нуклеиновых кислот в ядрах клеток эпителиальных опухолей толстой кишки // Украинский морфологический альманах. – 2013. – Том 11, № 1. – С. 73-76.

Проведенные исследования показали, что для определения (уточнения) степени анаплазии эпителиальных опухолей толстой кишки (ЭПТК) самостоятельное использование уровня плоидности и клеточного спектра неправомерно. Содержание ДНК в ядрах ЭПТК (плоидность) и клеточный состав могут быть важной составляющей определения свойств опухоли и прогноза ее развития. Уменьшение содержания РНК в ядрах клеток ЭПТК может быть использовано как косвенный показатель степени жизнеспособности клеток и выделения их морфо-функциональных типов способных к дальнейшему развитию. Низкодифференцированные ЭПТК (G3) отличаются от более дифференцированных уменьшением уровня клеточной гетерогенности, что свидетельствует о доминировании в них клон(ов) со стабильным геномом и эффективными системами жизнеобеспечения.

Ключевые слова: эпителиальные опухоли толстой кишки, нуклеиновые кислоты, плоидность.**Grabovoy A.N., Antoniuk S.A., Vorobey E.A.** Nucleic acids contents in the colon epithelial tumor cells nuclei // Украинский морфологический альманах. – 2013. – Том 11, № 1. – С. 73-76.

The carried out studies have shown, that the determination (specification) of the colon epithelial tumor anaplasia degree cannot fully rely on self-facilitated use of the ploidy level and cellular spectrum. The DNA contents in the colon epithelial tumor nuclei (ploidy) and the cellular composition may constitute an important integral part of the tumor characteristic determination and predict its further development. Reduction in the RNA contents in the colon epithelial tumor cell may be used as an appropriate indirect measure of the cell viability grade and singling out of their morphofunctional types, capable of further development. Poorly differentiated colon epithelial tumor (G3) differentiates itself among others, more differentiated ones, by a reduction of cellular heterogeneity level, what gives evidence of clone's dominance with a stable gene and efficient life support systems in them.

Key words: colon epithelial tumor, nucleic acids, ploidy.

Зміни кількості ДНК у ядрах клітин епітеліальних пухлин товстої кишки (ЕПТК) є типовим явищем [1, 4, 7]. Воно пов'язане з геномною нестабільністю, яка реалізується в поліплоїдії та анеуплоїдії [7]. На сьогодні отримано значну кількість даних, що показують зв'язок між змінами геному при ЕПТК та характером перебігу захворювання [8, 10]. Проведено багато досліджень з метою виявлення зв'язку між вмістом ДНК (плоїдністю) у ядрах пухлинних клітин та гістологічним типом пухлини і, перш за все з її злоякісним потенціалом [1, 8, 11]. Отримані дані щодо кількості ДНК у ядрах клітин та прогнозу при колоректальному раку, дали підґрунтя для формування уявлення про важливість цього показника, але який сам по собі не є абсолютним, що пов'язано з мінливістю даного явища. Це стало приводом до пошуку більш достовірних об'єктивних показників злоякісності та прогнозу ЕПТК, які враховують зміни кількості ДНК [4, 5, 10].

Отже, на сьогодні склалася ситуація, коли встановилася досить стійка впевненість у важливості оцінки вмісту ДНК у клітинах ЕПТК для визначення її злоякісності та прогнозу розвитку, але конкретних критеріїв, які з високою достовірністю показують її зв'язок зі ступенем злоякісності пухлини та прогнозом її розвитку не визначені.

Мета роботи – встановити зв'язок між вмістом нуклеїнових кислот та ступенем диференціювання

епітеліальних пухлин товстої кишки та визначити критерії, що можуть бути використані для оцінки їхньої злоякісності та прогнозу розвитку.

Об'єкт та методи дослідження. Дослідження були проведені на матеріалі біопсії або вилученому при оперативному втручанні від 130 пацієнтів з ЕПТК: поліпи та аденоми (В) – 16; новоутворення з ознаками малігнізації (М) – 22, аденокарцинома G1 (G1) – 6; аденокарцинома G2 (G2) – 75; аденокарцинома G3 (G3) – 11. Гістологічне типування новоутворень було проведено з використанням рутинного (гематоксилін і еозин) забарвлення.

Отриманий матеріал фіксували в забуференому 10% формаліні з рН 7,4 та ущільнювали у парафін зі застосуванням гістіопроектора Histos-5 (Milestone, Italy). З отриманих блоків виготовлялися гістологічні зрізи товщиною 5 мікрометрів за допомогою мікротома Microm HM325 (Thermo Scientific, Germany). Зрізи забарвлювалися гематоксиліном і еозином та азур П–еозином для загальної оцінки пухлини, галлоціанін-хромовим галуном за Ейнарсоном (рН 1,62, 37°C, 24 години) для виявлення вмісту нуклеїнових кислот (НК) у клітинах [2, 3]. Для кожного випадку частину зрізів обробляли РНКазою (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany) для екстракції РНК [2]. Отримані препарати вивчали на фотографували за допомогою мікроскопа Nikon Eclipse 80i з камерою DS-5SMC/L2 за стандартних умов.

На отриманих зображеннях з препаратів забарвлених галлоціанін-хромовим галуном (збільшення мікроскопа x400, 1280x960 пікселів RGB) у 60 клітинах кожної пухлини за допомогою системи аналізу зображення ImageJ 1,46 визначали: площу перетину ядра клітини (Narea), питому оптичну щільність ядра клітини (NDM), інтегративну оптичну щільність ядра клітини (NintDen), а також розраховували об'єм ядра (NV) та вміст у ньому сумарної кількості нуклеїнових кислот (NHK) і ДНК (NDHK) за формулами:

$$NV = * 3/4 * Narea^2 * \sqrt{(Narea/\pi)} \quad (1)$$

$$NHK(NDHK) = NintDen * 3/4 * Narea * \sqrt{(Narea/\pi)} \quad (2)$$

У якості вихідної точки відліку для оцінки вмісту НК у ядрах пухлинних клітин використали показники прийняті за одиницю, притаманні ядрам лімфоцитів (2с), що знаходилися у стромі пухлин. Клітини кожної окремої пухлини були ранжировані за вмістом ДНК в ядрі. Отримана послідовність була поділена на ранги з кроком, що дорівнював середньому вмісту ДНК у ядрах лімфоцитів: P1 – до 1, P2 – 1-2, P3 – 2-3, і так далі. Клітини кожної окремої пухлини при забарвленні на НК були ранжировані за Narea/NV. Отримана послідовність була поділена на ранги за середніми значеннями Narea/NV, які були визначені для рангів за вмістом ДНК. У межах кожного рангу визначали абсолютну кількість клітин, середні значення Narea, NintDen, NV, NDHK чи NHK. Вміст РНК у ядрах клітин визначався як різниця між NHK і NDHK для кожної пари рангів. Отримані цифрові дані оброблялися стандартними статистичними методами.

Отримані результати та їх обговорення.

Проведені дослідження показали, що за вмістом ДНК клітини ЕПТК можуть бути поділені на ранги від P1 до P10. Іноді в пухлинах зустрічалися поодинокі клітини, які за вмістом ДНК повинні були б віднесені до більш високих рангів, але мала їх кількість не дозволяла провести статистичну обробку їхніх кількісних показників. Слід також відзначити, що більшість середніх значень параметрів, що визначалися, починаючи з P6 мали $p > 0,05$, тому вони не можуть бути використані для подальшого статистичного аналізу.

Середній вміст ДНК у ядрах клітин пухлин різного ступеня неопластичної трансформації коливається від 2,0 (G3) до 2,4 (M) (Рис. 1). При цьому відмічаються статистично достовірні відмінності між M та B і G1 ($p < 0,05$ за критеріями Спюдента та Фішера), а відмінності між різними G не є достовірними ($p > 0,05$).

Ранжування пухлин за середнім вмістом ДНК у ядрах їхніх клітин дозволило поділити їх на три підгрупи: диплоїдні (D - середній вміст ДНК у ядрах до 1,2), проміжні між ди- та тетраплоїдними (D-T - 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), за винятком G3, включає всі три визначені підгрупи. При цьому спостерігаються певні тенденції змін представництва клітин різної плоїдності у пухлинах по мірі прогресії анаплазії – відбувається статистично значиме відносне зростання клітин підгрупи D-T до 72% у пухлинах у ряду від B до G3 (Рис. 2). Специфічною ознакою останньої групи пухлин стало також відсутність серед них таких, що

за вмістом ДНК у ядрах їхніх клітин мали бути віднесені до підгрупи D (Рис. 2).

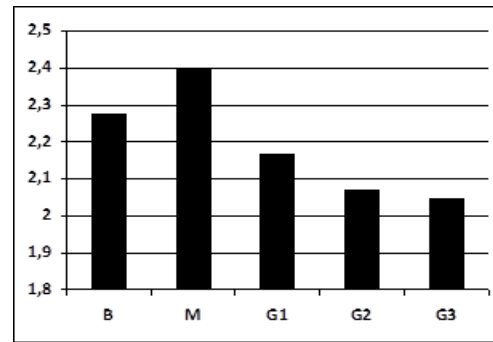


Рис. 1. Середній вміст ДНК (у.о.) у ядрах клітин ЕПТК різного ступеня анаплазії (B – аденоми, M – аденоми з ознаками малігнізації, GX – карциноми відповідного ступеня анаплазії).

Клітинний склад (спектр) ЕПТК, визначений за вмістом ДНК у їхніх клітинах, проявляє помірну ступінь залежності від ступеня анаплазії (Рис. 3). У цілому, по мірі зростання середнього значення плоїдності відбувається зміщення клітинного спектру пухлини до збільшення відносної кількості клітин зі збільшеним вмістом ДНК у ядрах.

Вміст РНК у ядрах клітин ЕПТК виявив зворотну залежність від вмісту ДНК – тобто, по мірі зростання вмісту ДНК відбувається зменшення її відносного вмісту. Ці зміни не виявили залежності від ступеня анаплазії пухлини (достовірно не відрізняються) (Рис. 4).

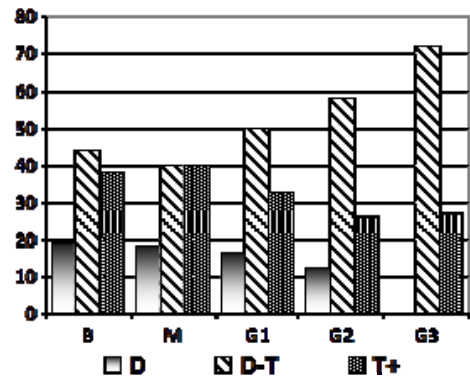


Рис. 2. Співвідношення (%) ЕПТК різного ступеня анаплазії з різним середнім вмістом ДНК у клітинах (B – аденоми, M – аденоми з ознаками малігнізації, GX – карциноми відповідного ступеня анаплазії). D - диплоїдні, D-T - проміжні між ди- та тетраплоїдними, T+ - гіперплоїдні клітини.

Співставлення показників вмісту ДНК, НК і розмірів ядер пухлин (Narea, NV) показали (Рис. 5), що пряма залежність між ними зберігається до рангів P4-P6 (коефіцієнт кореляції 0,96-0,98). У клітинах, що відносяться до більш високих рангів ці пропорції порушуються, а кореляція стає нижчою за значення, що вказують на пряму залежність між цими показниками. Це пов'язано як з незначною кількістю таких клітин у складі пухлин, так і значною їхньою мінливістю. Такі клітини мають ядра з площею перетину понад 50-52 мкм² і об'ємом понад 300 мкм³. Для цих клітин є характерними явища каріопікнозу або, навпаки, набряку ядра і лізису хроматину. Слід також відмітити, що каріопікноз по-

рівняно часто спостерігається і в малих клітинах, що були віднесені нами до рангу *P1*.

Таким чином, враховуючи те, що серед усіх типів ЕПТК за ступенем анаплазії (*B, M, G1, G2, G3*) входять пухлини з різним середнім вмістом ДНК (відповідають ди-, тетра- або поліплоїдному), то цей показник (плоїдність) не може бути використаний для уточнення стадії розвитку пухлини, як це пропонують ряд авторів [1].

Співвідношення клітин з різним вмістом ДНК у ядрах ЕПТК по мірі зростання анаплазії показує зміщення їхнього спектру «вправо», тобто спостерігається тенденція до збільшення кількості клітин з вмістом ДНК, який перевищує такий, що відповідає диплоїдному. Але, враховуючи варіабельність цього показника, довірчі границі кількісних значень якого у суміжних групах пухлин накладаються, використання його як критерію ступеня анаплазії конкретної пухлини не є правомірним і не може виступати самостійним прогностичним фактором [10]. Крім того, збільшення частоти ознак дегенеративних змін серед пухлинних клітин з високим вмістом ДНК (поліплоїдних), що ми спостерігали, а також данні щодо втрати поліплоїдними клітинами здатності до проліферації та їх схильність до старіння [9, 12] не дозволяє розглядати ріст плоїдності у пухлині як ознаку зростання її агресивності (злоякісності).

Різноманітність клітинного складу ЕПТК за вмістом ДНК є непрямым показником різноманітності властивостей та життєздатності пухлинних клітин. Відповідно це є достатнім приводом для включення цього критерію до комплексної оцінки властивостей пухлини. Оскільки вміст ДНК у ядрах клітин залежить не тільки від порушення механізму поділу клітини, а й від активності її синтезу, то треба розглядати у комплексі з мітотичною активністю. Тобто, плоїдність та проліферативну активність клітин доцільно розглядати як одну перемінну [4].

Зменшення відносного вмісту РНК у ядрах клітин пухлини по мірі зростання вмісту ДНК вказує на те, що додаткова ДНК не є функціонально активною. Це може виступати у якості ознаки зниження життєздатності таких клітин, що веде до старіння, апоптозу та елімінації таких морфо-функціональних типів клітин зі складу пухлини [6].

Наявність у ЕПТК клітин з плоїдністю понад 4с є свідомством геномної нестабільності та порушення механізмів мітозу [10]. Це закономірно веде до виникнення в пухлині клітин з різними генетичними наборами, що результується у різноманітності клітинних фенотипів, які можна позначити як різні морфо-функціональні типи пухлинних клітин. Серед досліджених нами ЕПТК зростання клітинної гетерогенності як за вмістом ДНК так і за морфологічними ознаками спостерігалось у ряду від *B* до *G2*. Логічно було припустити, що серед цього різноманіття клітин будуть такі, що зберегли системи життєзабезпечення, та такі в яких вони були порушені. Останнє підтверджується поширеністю ознак дегенерації серед клітин рангів *P6* і вищих, а також порівняно часті ознаки каріопікнозу серед клітин *P1*. Це вказує на те, що по мірі розвитку пухлини (пухлинної прогресії) із її складу елімуються нежиттєздатні морфо-функціональні типи пухлин.

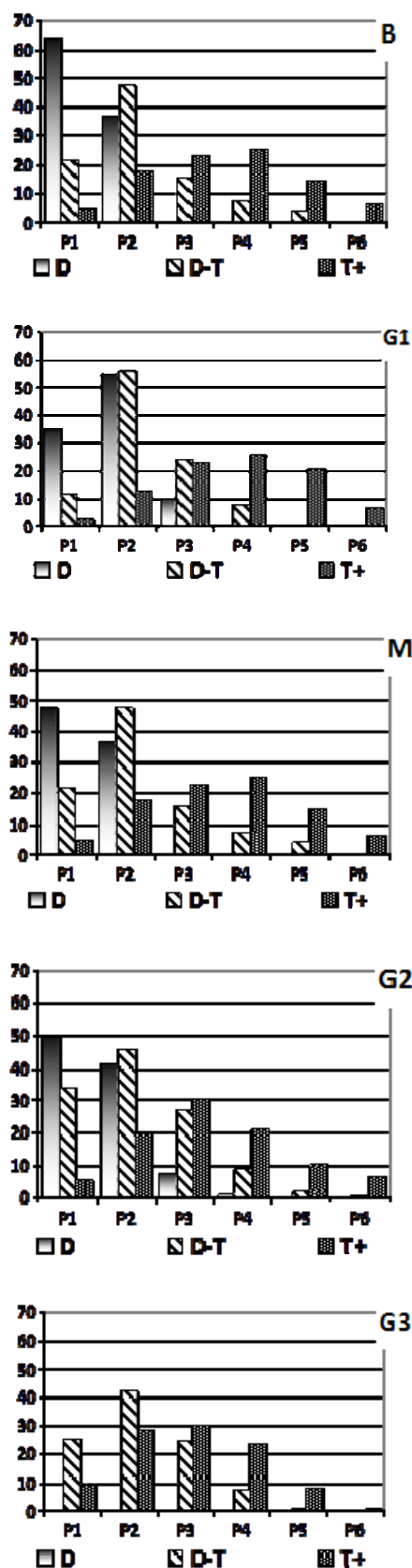


Рис. 3. Відносний вміст (%) клітин різних рангів за вмістом ДНК в ЕПТК різного рівня дедиференціювання (*B, M, G1, G2, G3*). *PX* - ранги за вмістом ДНК; *D* - диплоїдні, *D-T* - проміжні між ди- та тетраплоїдними, *T+* - гіперплоїдні клітини.

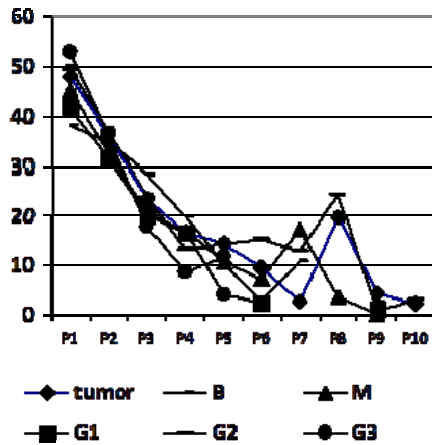


Рис. 4. Відносний вміст РНК (%) в ядрах клітин різних рангів за вмістом ДНК в ЕПТК різного рівня дедиференціювання (В, М, G1, G2, G3). РХ - ранги за вмістом ДНК; D - диплоїдні, D-T - проміжні між ди- та тетраплоїдними, T+ - гіперплоїдні клітини.

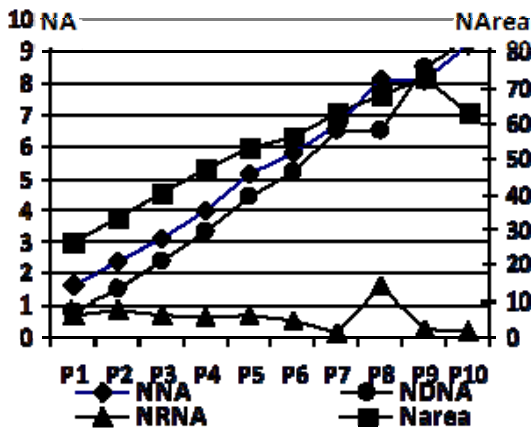


Рис. 5. Співвідношення розмірів ядра (NArea – площа, мкм²) та вміст у ньому нуклеїнових кислот (NNA – сумарний, NDNA – ДНК, NRNA – РНК) в ЕПТК.

Разом з тим, з клітинного різноманіття, виділяються такі, що маючи спотворений генотип, але який забезпечує високу проліферативну активність зі збереженням систем життєзабезпечення та втраченою специфічними функціями інтегрування у тканинні комплекси, є основою для виникнення стійких клонів, здатних до необмеженого існування. Це підтверджується тим, що у пухлинах G3 звужується спектр її клітинного складу. Переважаючими стають клітини D-T, що з урахуванням високої проліферативної активності дозволяє розглядати їх як диплоїдні, в яких відбувається синтез ДНК.

Висновки: Для визначення (уточнення) ступеня анаплазії ЕПТК самостійне застосування рівня плоїдності та клітинного спектру не є правомірним. Вміст ДНК у ядрах ЕПТК та клітинний склад можуть бути важливою складовою визначення властивостей пухлини і прогнозу її розвитку.

Зменшення відносного вмісту РНК у ядрах клітин ЕПТК може бути використане як непрямий показник ступеня життєздатності клітин та виділення їх морфо-функціональних типів здатних до подальшого розвитку.

Низькодиференційовані ЕПТК (G3) відрізняються від більш диференційованих зменшенням рівня клітинної гетерогенності, що свідчить про домінування в них клону(ів) зі стабільним геномом та ефективними системами життєзабезпечення.

Виходячи з наявності прямої залежності між вмістом нуклеїнових кислот у ядрі клітин ЕПТК та його розмірами, каріометричні показники можуть використовуватися для непрямого визначення плоїдності клітин у рутинній патогістологічній практиці без застосування складних методів забарвлення.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Автандилов Г. Г. Диагностическая медицинская плоидометрия. / Автандилов Г. Г. - М.: Медицина, 2006. – 192 с.
2. Лупа Х. Основы гистохимии. (Пер. с немец.). /Лупа Х. – М.: Мир: 1980. – 344 с.
3. Ташке К. (1980) Введение в количественную цито-гистологическую морфологию. (Пер. с рум.). / Ташке К. – М.: Из. Акад. Соц. Респ. Румынии.- 1980. – 192 с.
4. Compton C. C. Prognostic Factors in Colorectal Cancer / Compton C. C., Fielding L. P., Burgart L. J. [et al.] // Arch Pathol Lab Med. – 2000. – Vol. 124. – P. 979-994.
5. Dalton W. B. Mitotic Origins of Chromosomal Instability in Colorectal Cancer / Dalton W. B., Yang V. W. // Curr Colorectal Cancer Rep.- 2007.- V. 3(2).- P 59–64. –V. 27.- P. 585–610.
6. Davoli T., de Lange 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. Hadjihannas M. V. Aberrant Wnt/ β -catenin signaling can induce chromosomal instability in colon cancer / Hadjihannas M. V., Brückner M., Jerchow B. [et al.] // PNAS. – 2006. - Vol. 103, № 28. – P. 10747-10752.
8. 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.
9. 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.
10. Kørner H. Microsatellite instability and DNA ploidy in colorectal cancer / Kørner H. // Cancer.- 2009.- V. 115, Issue 2.- P. 271–282.
11. 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.- Vol. 57.- № 3.- P. 150-157.
12. Xu W. Induction of polyploidy by histone deacetylase inhibitor: a pathway for antitumor effects. / Xu W.; Perez G.; Ngo L. [et al.] // Cancer Research.- 2005. – V. 65, №17. – P. 7832-7839.

Надійшла 25.10.2012 р.
Рецензент: проф. В.І.Лузін