

*Л.А. Налескина**Л.Б. Забарко**Л.З. Полищук**Г.П. Олійниченко**Л.М. Захарцева**Н.Н. Глущенко*

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина

Киевская городская онкологическая больница, Киев, Украина

Ключевые слова:

колоректальный рак, клинко-генеалогическое исследование, белок p53, антиген ядер пролиферирующих клеток (PCNA).

КЛИНИКО-ГЕНЕАЛОГИЧЕСКАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА У ЛИЦ КИЕВСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Резюме. По результатам клинко-генеалогического и генетико-математического методов исследования определен вклад наследственных факторов в развитие колоректального рака у 328 больных, проживающих в г. Киеве. У 53 из них изучены особенности экспрессии белка p53 и PCNA в аденоматозных, аденопапиллярных полипах, аденокарциномах толстой кишки с учетом морфологической степени злокачественности новообразований и отягощенности родословных по онкопатологии. Установлено, что в общей предрасположенности к возникновению колоректального рака решающая роль принадлежит генетическому компоненту ($74,8 \pm 4,8\%$). Выявлено, что уровень экспрессии белка p53 и PCNA в новообразованиях толстой кишки обусловлен не только морфологической степенью их злокачественности, но и особенностями отягощенности родословных больных по онкопатологии.

ВВЕДЕНИЕ

Результаты эпидемиологических исследований свидетельствуют о том, что за последние 20 лет во многих экономически развитых странах мира отмечается значительный рост заболеваемости колоректальным раком [1–3]. Не вызывает сомнений тот факт, что в патогенезе заболевания немаловажное значение имеет наличие в семейном анамнезе полипов, полипоза или рака толстой кишки [4, 5]. Вместе с тем, относительное значение наследственных факторов и неблагоприятного воздействия окружающей среды в развитии этой формы онкопатологии окончательно не определено.

Согласно данным доступной литературы, существует прямая связь между колоректальным канцерогенезом и структурно-функциональными перестройками в отдельных хромосомах и генах, регулирующих пролиферацию и дифференцировку клеток [6]. В большинстве опухолей толстой кишки определяются мутации многих генов, а поскольку развитие колоректального рака представляет собой многоступенчатый процесс, генетический мутационный каскад может включаться на разных этапах эволюции новообразования. С учетом современных представлений молекулярной генетики установлено, что механизмы опухолеобразования в толстой кишке не одинаковы для всех форм неоплазий, и хотя в их основе лежит мутация генов, рассматривают два возможных пути возникновения колоректального рака [7]. Один из них связан с мутацией генов, исправляющих ошибочное удвоение ДНК, второй — характеризуется мутацией генов-супрес-

соров, среди которых важное значение имеют ген p53 и его продукт — белок p53, осуществляющий регуляцию процессов деления клеток и контролирующей стабильность генома.

Цель исследования состояла в изучении вклада наследственных факторов в общую предрасположенность к возникновению колоректального рака у больных киевской популяции и выяснении особенностей экспрессии белка p53 и антигена ядер пролиферирующих клеток (PCNA) в сопоставлении с другими показателями пролиферативной активности клеток в полипах и раке толстой кишки с учетом морфологической степени злокачественности опухолей и отягощенности родословных больных по онкопатологии.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использован комплексный подход с применением клинко-генеалогического, генетико-математического и иммуногистохимического методов. Материалом клинко-генеалогического и генетико-математического исследования служили данные о 328 больных с колоректальным раком, проживающих в г. Киеве (166 женщин и 162 мужчины), а также сведения о 1854 родственниках пробандов первой степени родства и их заболеваниях. Генетико-математический анализ осуществлен на основании пакета программ, разработанных в лаборатории генетики Научного центра психического здоровья АМН России.

Кроме клинко-генеалогического у больных проводили иммуногистохимическое исследование

экспрессии белка p53 и PCNA, признанного маркером клеточной пролиферации [8, 9]. Эта часть исследования выполнена на парафиновых срезах новообразований, удаленных у 18 больных с аденоматозными, аденопапиллярными полипами и 35 — с аденокарциномами толстой кишки I–III степени морфологической злокачественности. Для определения уровня экспрессии белка p53 в качестве первичных моноклональных антител (мкАТ) использованы ДАКО-p53 (клон ДО-7) «Dakopatts» (Дания), для оценки активности PCNA применяли мкАТ ДАКО-PCNA (клон PC-10) «Dakopatts» (Дания). Результаты определения экспрессии белка p53 оценивали по проценту положительно реагирующих клеток на 300 проанализированных клеток, PCNA — при анализе 2000 клеток.

При изучении митотического режима учитывали соотношение фаз митоза, количество патологических митозов и форм патологии деления, а также вычисляли митотический индекс (МИ), выраженный в промилле.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам клинко-генеалогического исследования 328 родословных больных с колоректальным раком у 151 из 1854 родственников пробандов первой степени родства выявлено 209 злокачественных опухолей, что свидетельствует о наличии у некоторых родственников первично-множественных опухолей.

Анализ спектра онкопатологии у родственников, состоящих в первой степени родства с больным колоректальным раком, показал, что чаще всего (в 47,8% случаев) у лиц обоего пола выявляли злокачественные опухоли пищеварительного тракта. Среди этих новообразований преобладали рак толстой кишки и рак желудка. Отмечено частое сочетание рака толстой кишки, других органов пищеварительного тракта и рака тела матки, что свидетельствует о наличии в таких родословных семейного ракового синдрома I типа. В значительном количестве случаев также выявляли рак легкого, реже — рак молочной железы. Обращает на себя внимание тот факт, что злокачественные новообразования чаще определяли у матерей, чем у отцов пробандов, а также то, что почти у 2% детей к моменту обследования родителей уже были диагностированы злокачественные опухоли, в основном колоректальный рак и рак молочной железы.

В соответствии с генетико-математической оценкой данных клинко-генеалогического исследования с использованием сегрегационного и генетико-дисперсионного методов установлено, что колоректальный рак является мультифакториальным заболеванием. В общей предрасположенности к возникновению этой формы онкопатологии решающую роль играют генетические факторы, доля которых при компонентном разложении общей фенотипической дисперсии составляет $74,8 \pm 4,8\%$.

При иммуногистохимическом определении экспрессии белка p53 в аденоматозных и аденопапиллярных полипах толстой кишки окрашивание ядер клеток слизистой оболочки толстой кишки наблюдали только в 5 случаях (при полипах аденопапиллярного типа с признаками дисплазии тяжелой степени). Количество p53-положительных клеток в этих наблюдениях не превышало 45%. У одного больного и у 2 его родственников была отмечена склонность к полипозу, который, согласно спектру накопления патологии, расценен как синдром Пейтца – Егерса.

Результаты анализа особенностей экспрессии белка p53 в эпителии толстой кишки, пораженной раком, свидетельствовали о том, что положительная реакция определялась не во всех наблюдениях и не во всех железистых структурах и клетках в пределах новообразования (рис. 1, 2). Белковый продукт мутантного гена p53 выявлен в ядрах опухолевых клеток у 22 из 35 больных раком толстой кишки, в 13 случаях результаты иммуногистохими-

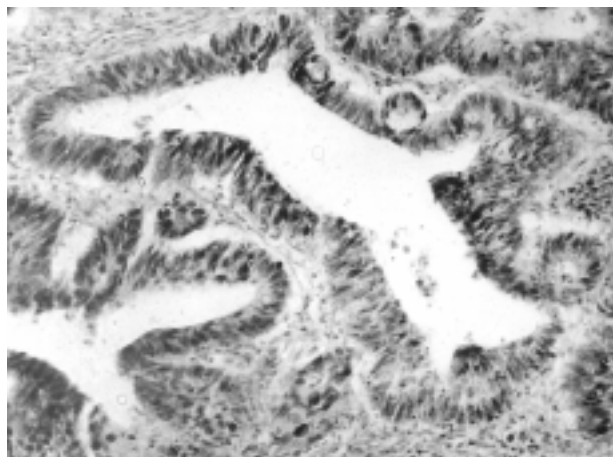


Рис. 1. Умереннодифференцированная аденокарцинома, II степень морфологической злокачественности. Неравномерное распределение p53-положительных клеток в пределах железы. Иммунопероксидазный АВС-метод, х320

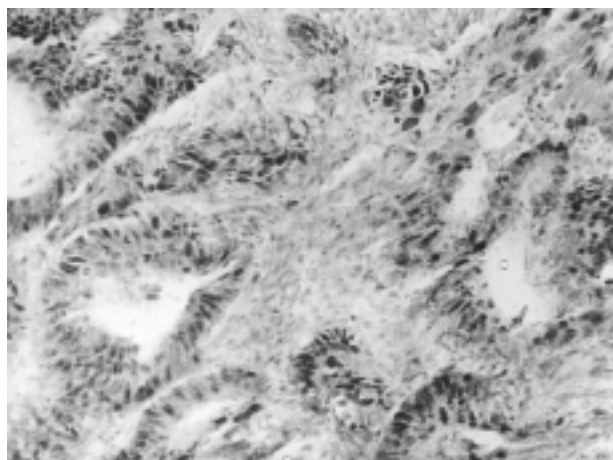


Рис. 2. Умереннодифференцированная аденокарцинома, III степень морфологической злокачественности. p53-положительная реакция определяется как в железах, так и в ядрах опухолевых клеток, расположенных вне железистых структур. Иммунопероксидазный АВС-метод, х320

ческой реакции были отрицательными. Количество p53-положительных опухолевых клеток колебалось от 25 до 89% и в среднем у больных с аденокарциномой составляло $47,3 \pm 0,68\%$. У пациентов с умеренно-дифференцированными опухолями отмечено выраженное увеличение ($p < 0,05$) количества p53-положительных опухолевых клеток по мере повышения степени злокачественности новообразований (табл. 1).

У 18 из 22 обследованных с положительной реакцией на белок p53 в опухоли выявлена отягощенность родословных по онкопатологии. Из 13 больных с отрицательной реакцией при выявлении p53 отмечено накопление злокачественных опухолей у родственников лишь 4 пациентов. Следует подчеркнуть, что спектр онкопатологии у родственников больных с экспрессией белка p53 в опухолевых клетках значительно отличался от такового в группе пациентов с негативной реакцией [10]. У большинства членов семей лиц с экспрессией белка p53 в клетках опухоли преимущественно диагностированы полипы, полипоз или рак толстой кишки, других органов пищеварения и сочетание этих новообразований и рака молочной железы, внутренних половых органов у женщин, а также рака предстательной железы — у мужчин. В 5 родословных определяли метакронно возникшие первично-множественные опухоли.

Оценка пролиферативной активности у больных с аденоматозными полипами показала, что соотношение метафаз и профаз составляет 1,04 и свидетельствует о доброкачественном характере процесса. МИ составлял $10,6 \pm 2,7\%$ с колебаниями 2,5–14,3%. Эти данные согласуются с результатами исследований, проведенных другими авторами [11]. Количество патологических митозов в среднем не превышало $4,7 \pm 0,7\%$ (табл. 2). Среди них отмечались три основные разновидности: отставание хромосом в метакинезе, К-митозы и хромосомные мосты.

В эпителии аденопапиллярных полипов метафазно-профазный индекс был повышен до 2,32. Отмечено повышение МИ — $18,7 \pm 3,1\%$ ($8,9–26,4\%$). Расширился спектр патологии митозов. Общее количество патологических митозов существенно возросло — $15,9 \pm 2,6\%$ ($p < 0,05$).

Митотический режим эпителия слизистой оболочки толстой кишки, пораженной раком, отличался от такового в аденоматозных и аденопапиллярных полипах значительным превалированием метафаз над другими фазами митоза (метафазно-профазный индекс составлял 3,8), резким повышением частоты патологических митозов, значительно расширенным и разнообразным спектром патологических форм деления. Следует отметить, что выявляли такие формы деления (рассеивание хромосом и их фрагментов, полая метафаза, многополюсный митоз), которые в полипах не определяли. Показатель МИ у больных с аденокарциномами составлял $29,8 \pm 3,7\%$ ($11,3–41,6\%$). Количество патологических митозов в аденокарциномах достоверно ($p < 0,05$) увеличилось до $34,2 \pm 3,2\%$ по сравнению с этим показателем в эпителии слизистой оболочки аденопапиллярных полипов (см. табл. 2). Отмечен параллелизм между морфологической степенью злокачественности аденокарцином и величиной наиболее значимых показателей митотического режима — МИ и количеством патологических митозов в опухолевых клетках.

Иммуногистохимическое определение маркера ростовой фракции эпителия — антигена ядер пролиферирующих клеток — в аденоматозных полипах показало, что из 7 новообразований только в 2 отмечена слабовыраженная положительная реакция при выявлении PCNA — в 4,3 и 6,1% клеток. Среди аденопапиллярных полипов PCNA-положительные новообразования составляли преимущественное большинство. Диапазон колебаний количества PCNA-положительных клеток в отдельных наблюдениях варьировал в широких пределах — от 11,8 до 76,1% со средним значением $29,7 \pm 2,5\%$ (табл. 3). Наибольшее количество положительных клеток выявлено в 6 аденопапиллярных полипах с признаками тяжелой дисплазии (рис. 3). Сопоставление показателей митотического режима и экспрессии PCNA у больных с аденопапиллярными полипами с учетом отягощенности их родословных по онкопатологии свидетельствует о повышении пролиферативного потенциала эпителия толстой кишки у лиц с отягощенной наследственностью ($19,7 \pm 2,3\%$ и $34,6 \pm 2,7\%$) по сравнению с неотягощенной ($13,7 \pm 1,9\%$ и $16,1 \pm 1,8\%$).

Таблица 1

Экспрессия белка p53 в клетках аденокарцином толстой кишки разной степени злокачественности

Аденокарциномы разной степени дифференцировки	Морфологическая степень злокачественности опухолей	Количество опухолей	Положительная экспрессия белка p53	
			Количество положительных наблюдений	Частота p53-положительных клеток в опухоли, %*
Высокодифференцированные (n=2)	I	2	2	32,0; 39,0
Умереннодифференцированные (n=32)	I	6	4	$41,4 \pm 0,35$ (34,0–62,0)
	II	21	11	$48,7 \pm 0,59$ (25,0–89,0)
	III	5	4	$53,5 \pm 0,47$ (38,0–75,0)
Низкодифференцированные (n=1)	III	1	1	59

* Здесь и в табл. 2 и 3 в скобках приведены крайние значения исследуемого показателя.

Таблица 2

Показатели митотического режима в эпителии толстой кишки, пораженной полипами и раком

Гистологическая форма новообразований толстой кишки	Количество наблюдений	МИ, %	Метафазно-профазный индекс	Количество патологических митозов, %
Аденоматозные полипы	7	$10,6 \pm 2,7$ (2,5–14,3)	1,04	$4,7 \pm 0,7$
Аденопапиллярные полипы	11	$18,7 \pm 3,1$ (8,9–26,4)	2,32	$15,9 \pm 2,6$
Аденокарциномы	35	$29,8 \pm 3,7$ (11,3–41,6)	3,80	$34,2 \pm 3,2$

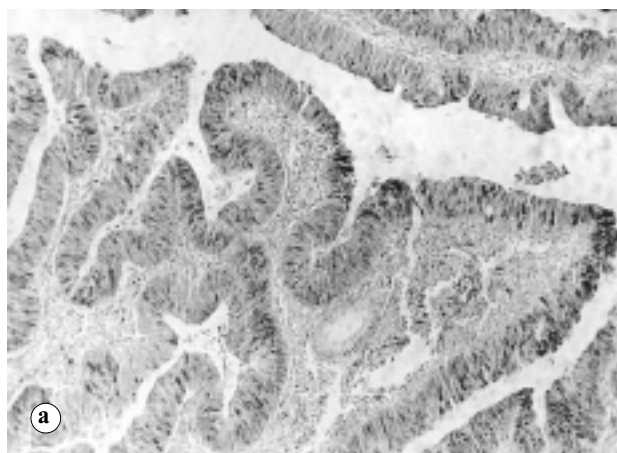


Рис. 3. Аденопапиллярный полип, тяжелая степень дисплазии. Участки папиллярного (а) и аденоматозного (б) строения. PCNA-положительные клетки неравномерно распределяются в эпителии ворсинок и в железистых структурах. Иммунопероксидазный АВС-метод, х220, 320

Иммуногистохимическое определение особенностей экспрессии PCNA в опухолевых клетках у больных раком толстой кишки показало, что положительная реакция отмечена у 26 из 35 обследованных. Степень выраженности реакции была различной. Распределение положительных клеток в пределах одной железы и новообразования в целом было неравномерным (рис. 4). Количество PCNA-положительных клеток в аденокарциномах колебалось от 25,3 до 84,6% и в среднем составляло $51,3 \pm 3,5\%$ (см. табл. 3). Отмечена прямая зависимость между количеством PCNA-положительных клеток в новообразованиях и степенью их злокачественности. Так, при I степени морфологической злокачественности

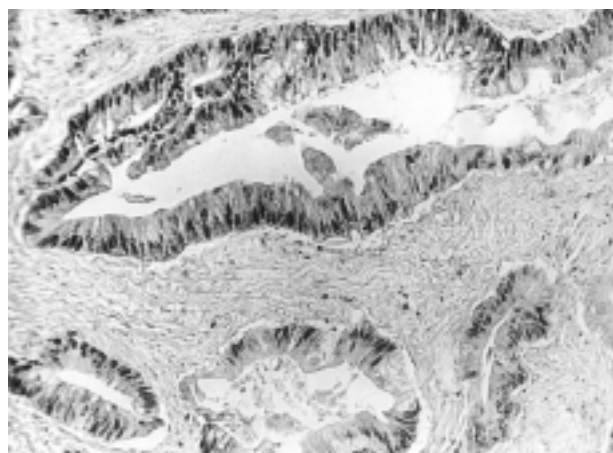


Рис. 4. Умереннодифференцированная аденокарцинома, II степень морфологической злокачественности. В пределах железистых структур определяется высокий уровень экспрессии PCNA. Иммунопероксидазный АВС-метод, х300

среднее количество таких клеток составляло $38,4 \pm 1,5\%$ (25,3–48,4%), при II — $49,7 \pm 2,3$ (29,4–63,5%), при III — $58,2 \pm 3,7$ (31,7–84,6)%. Различия между показателями статистически достоверны ($p < 0,05$).

У 18 из 26 больных раком толстой кишки с положительной иммуногистохимической реакцией на PCNA определена отягощенность родословных по онкопатологии. Следует отметить, что наиболее высокие показатели активности PCNA наблюдались у лиц с накоплением в родословных случаях рака толстой кишки или первично-множественных опухолей. Анализ соотношения положительных случаев при иммуногистохимическом определении экспрессии PCNA и белка p53 у больных колоректальным раком выявил полное совпадение положительных реакций в 84,61% наблюдений, что является убедительным свидетельством нарушения генетического контроля за процессами пролиферации.

Таким образом, на основании комплексного исследования установлено, что колоректальный рак является мультифакториальной патологией, в возникновении которой ведущая роль принадлежит генетическим факторам. Степень проявления и особенности пролиферативной активности, уровень экспрессии белка p53 и PCNA в новообразованиях толстой кишки обусловлены не только морфологической степенью их злокачественности, но и особенностями отягощенности родословных больных по онкопатологии.

Выражаем благодарность академику АМН Украины, чл.-кор. НАН Украины А.М. Романенко за

Таблица 3

Показатели экспрессии антигена ядер пролиферирующих клеток (PCNA) в новообразованиях толстой кишки

Гистологический тип опухоли	Количество исследованных опухолей	Положительная экспрессия PCNA	
		Количество положительных наблюдений	Частота PCNA-положительных клеток в опухоли, %
Аденоматозные полипы	7	2	4,3; 6,1
Аденопапиллярные полипы	11	9	$29,7 \pm 2,5$ (11,8–76,1)
Аденокарциномы с учетом морфологической степени злокачественности опухолей:	35	26	$51,3 \pm 3,5$ (25,3–84,6)
I	8	5	$38,4 \pm 1,5$ (25,3–48,4)
II	21	16	$49,7 \pm 2,3$ (29,4–63,5)
III	6	5	$58,2 \pm 3,7$ (31,7–84,6)

предоставленную возможность выполнить иммуногистохимическое исследование на базе возглавляемой ею лаборатории патоморфологии Института урологии и нефрологии АМН Украины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аксель ЕМ, Бармина НМ. Колоректальный рак (заболеваемость, смертность, социально-экономический ущерб). Рос онкол журн 1999; (6): 40–6.
2. Рак ободочной и прямой кишки. ВВ Кныш, ред. Москва: Медицина, 1997. 304 с.
3. Ивашкин ВТ. Колоректальный рак. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол 1999; 9: 88–95.
4. Загребин ВМ. Биологические маркеры предрака толстой кишки. Арх патол 1995; 57: 89–92.
5. Шельгин ЮА. Диагностика и лечение рака толстой кишки. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол 1997; 7: 12–9.
6. Бочков НП. Генетические основы болезней кишечника. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол 1999; 9: 7–13.
7. Комптон КК. Прогресс в изучении генетики рака ободочной кишки. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол 1998; 8: 100–6.
8. Dietrich DR. Toxicological and pathological applications of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), a novel endogenous marker for cell proliferation. Critical reviews in toxicol 1993; 23: 77–109.
9. Pich A, Ponti R, Valente G, et al. MiB1, Ki67, and PCNA scores and DNA flow cytometry in intermediate grade malignant lymphomas. J Clin Pathol 1994; 47: 18–22.
10. Налескіна ЛА, Воробйова ЛР, Хома ДІ та ін. Особливості експресії білка p53 в епітелії слизової оболонки товстої кишки, враженої поліпами та раком. Цитологія і генетика 2000; 34: 15–22.

11. Казанцева ИА. Патология митоза в опухолях человека. Новосибирск: Наука, 1981. 143 с.

CHARACTERIZATION OF COLORECTAL CANCER IN THE KYIV POPULATION IN CLINICAL/GENEALOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES

L.A. Naleskina, L.B. Zabarko, L.Z. Polishchuk,
G.P. Olijnychenko, L.M. Zakhartseva,
N.N. Glushchenko

Summary. *The contribution of hereditary factors in colorectal cancer development was investigated in the Kyiv population (328 patients) with clinicogenealogical and genetic/mathematical methods. In 53 patients, peculiarities of p53 protein and PCNA expression were studied in adenomatous/adenopapillary polyps and adenocarcinomas of colon with account for the morphological degree of tumor malignancy and oncopathology burden in the pedigrees. The genetic component was found to be the main factor in general susceptibility to colorectal cancer development (74,8±4,8%). Moreover, it was shown that the expression level of p53 protein and PCNA in colon neoplasmas depends not only on the morphological degree of malignancy but also on the peculiarities of oncopathology burden in the pedigrees.*

Key Words: colorectal cancer, clinicogenealogical investigation, p53 protein, PCNA.