

ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК И ЕЕ БИОЛОГИЧЕСКОЕ И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ В ОНКОЛОГИИ

Оценивать пролиферативной активности раковых клеток необходимо не только для биологической характеристики опухолей, но и для селективного лечения и определения прогноза. Пролиферативная активность опухолевых клеток рака изучается иммуногистохимическим окрашиванием с помощью моноклональных антител Ki-67 и PCNA. Антиген Ki-67 экспрессирует во всех фазах (G1, S, G2 и M) клеточного цикла, кроме G0, а PCNA – в G1, S и G2 фазах. Индекс пролиферативной активности дифференцированных форм рака щитовидной железы значительно ниже, чем при раках других органов, таких как молочная железа, легкие, желудок и прямая кишка.

Ключевые слова: пролиферативная активность, иммуногистохимия, рак и щитовидная железа.

Assessment of the proliferative activity of cancer cells is necessary not only for the biologic characterization of the tumor, but also for the selection of treatment and evaluation of prognosis. Proliferative activity of tumor cells of carcinomas studies by immunohistochemical staining using monoclonal antibody Ki-67 and PCNA. Antigen Ki-67 expresses during all phases (G1, S, G2 and M) of the cell cycle but not in quiescent G0 cells, and PCNA – in G1, S and G2 phases. The proliferative activity for differentiated thyroid carcinomas was much lower than for carcinomas of other organs, such as breast, lung, stomach and colon.

Key words: proliferative activity, immunohistochemistry, carcinoma and thyroid.

Изучение прогностических факторов в онкологии весьма актуально. Это связано с тем, что прогностические факторы при раке часто являются более значимыми в плане исхода заболевания, нежели терапевтический эффект [1]. Одним из перспективных направлений исследований в данной области является иммуногистохимическое изучение пролиферативной активности (ПА) опухолевых клеток различных злокачественных новообразований.

В связи с ухудшением экологической обстановки в республике Беларусь (авария на Чернобыльской АЭС) в стране достоверно увеличилось число больных, страдающих опухолевыми и опухолеподобными заболеваниями щитовидной железы (ЩЖ), основную роль в диагностике которых играют морфологические методы. Несмотря на то, что опухоли ЩЖ давно и интенсивно изучаются, до настоящего времени остается не изученным многие вопросы по данной проблеме. Во многом это связано с недостаточным знанием фундаментальных аспектов опухолевого роста. Использование в гистологической диагностике опухолевых и опухолеподобных заболеваний ЩЖ иммуногистохимии с определением ПА тиреоидного эпителия может оказаться весьма важным в их дифференциальной диагностике.

Рак ЩЖ составляет 1,3% от всех злокачественных опухолей и до 20% от выявляемой узловой тиреоидной патологии [2].

Иммуногистохимические методы исследования

Иммуногистохимия – это один из методов исследования биологических объектов, изучаемых под микроскопом. Иммуногистохимические методы были предложены сравнительно недавно (Coons et al., 1941, 1945), но особенно бурное развитие ее наблюдается с начала 80-х годов с момента широкого внедрения моноклональных антител [7]. За последние 10-15 лет достигнуты большие успехи в изучении иммуногистохимических факторов, отражающих разные стороны и уровни функционирования опухолевой клетки, и дающих возможность определить прогноз течения опухолевого заболевания [8]. Иммуногистохимия имеет своей целью установление локализации антигенов в определенных компонентах тканей, типах клеток и клеточных структурах с помощью специфических антител, т.е. иммуногистохимические реакции перенесены на предметное стекло морфолога [7]. Применение иммуногистохимии значительно расширило возможности морфологии, как и в изучении этиологии, патогенеза патологических процессов, так и в рутинной диагностической практике [4]. Методы иммуногистохимии широко используются во всех областях биологических наук. Этими методами определяются различные компоненты тканей (in situ) посредством специфической реакции антиген-антитело, которое метится красителями, видимыми при микроскопическом исследовании. Возможность проведения реакции обеспечивается за счет наличия антигена в клетках или межклеточном веществе и готовыми антителами. Имеется большое количество антител, выявляющих экспрессию тех или иных белков, связанных с определенными органами, тканями, типами клеток и их ПА [7].

Методы изучения ПА опухолевых клеток в онкоморфологии

Делению клеток предшествует редупликация их хромосомного аппарата, синтез ДНК. Весь клеточный цикл состоит из 4 отрезков времени: собственно митоза (M), пресинтетического (G1), синтетического (S) и постсинтетического (G2). Клетки, находящиеся как бы вне цикла (G0) не делятся. В нормальных тканях и большинстве медленно пролиферирующих новообразований с низким грейдом приблизительно 85% популяции клеток находятся в фазах G0 и G1, остальное 15% клеток – в S-, G2- и M-фазах клеточного цикла [21].

В клетках опухолей происходят сложные генетические изменения, приводящие к нарушению темпа пролиферации клеток [19]. Степень ПА опухолевых клеток можно изучать путем выявления пролиферирующих клеток разными методами (таб. 1) [21].

Таблица 1 Методы выявления пролиферирующих клеток

Методы	Обнаруживаемые фазы клеточного цикла
Подсчет митозов	M
³ H Thymidine uptake	S
BrdU labelling	S
Flow cytometry	S
Image analysis	S
Ki-67	G ₁ , S, G ₂ , M (часть)
PCNA	G ₁ , S, G ₂
P105	G ₁ , S, G ₂ , M
AgNOR	S, G ₂ , M (часть)
Cyclin A	S
Cyclin B	S(часть), G ₂ , M (часть)
Cyclin D	G ₁ (часть)
Cyclin E	G ₁ (часть), S(часть)

На протяжении десятилетий репродукцию опухолевых клеток исследовали с помощью подсчета митозов. В световом микроскопе при рутинных окрасках можно выявить только митозы клеточного цикла, что соответствует М-фазе, а это является лишь коротким отрезком от общего времени цикла. Например, относительная длительность М-фазы опухолевых клеток рака молочной железы составляет лишь 5,04% от общего времени клеточного цикла [10].

В 70–80-е годы в онкоморфологии использовались инкорпоративные методы изучения клеточного деления, основанные на принципе поглощения делящимися клетками меченых метаболитов, участвующих в синтезе ДНК, – тимидина, меченного тритием, или бромодиоксиуридина (БДУР, BrdU) с их последующей радиоавтографической или иммуногистохимической детекцией [5]. Однако в последнее время разработаны новые, более информативные методические подходы для определения особенностей пролиферации клеток опухолей. В настоящее время чаще используется метод иммуногистохимического выявления в ядрах опухолевых клеток белков, принимающих участие в процессе клеточного деления, – белка Ki-67 (Mib-1), ?-деоксирибонуклеазы (?-ДНКазы) и антигена ядер пролиферирующих клеток PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Метод исследования ПА с использованием антител к ?-ДНКазы не нашел широкого применения ввиду отсутствия «коммерческих» антител [5].

Иммуногистохимическое изучение ПА с помощью маркеров PCNA и Ki-67 Несмотря на некоторые неясные вопросы о приуроченности PCNA к определенным фазам митотического цикла и на возможность его участия в репарации ДНК, он нашел широкое применение в онкоморфологии. Использование PCNA сопровождается окрашиванием слишком большого количества клеток, не соответствующего пролиферативным потенциалам ткани [8] и может стать причиной переоценки степени ПА опухоли [21]. PCNA – это дополнительный белок фермента ?-ДНКазы (кофактор ДНК полимеразы) с молекулярной массой 36 кДа, который играет ключевую роль в процессе редупликации ДНК через активацию вышеупомянутого фермента. Экспрессия PCNA начинает выявляться в ядре делящейся клетки в фазе G₁, достигает максимума в фазе S и постепенно снижается к концу фазы G₂ [5, 21].

Оптимальным и более специфическим пролиферативным маркером для широкого использования в патологоанатомической практике является Ki-67 [2, 8, 10]. Антиген Ki-67, впервые описан Gerdes и соав. в 1983 г., состоит из 2 полипептидных цепей с молекулярной массой 345 и 395 кДа. Это основная часть нуклеарного матрикса в течение интерфазы, ассоциирующаяся с хромосомами фазы митоза [19]. Ki-67 является димерной молекулой, имеющей тесную связь с 10-й хромосомой, конкретная роль этого протеина в процессе клеточного деления до сих пор неизвестна [5]. Экспрессия Ki-67 позволяет выделить опухолевые клетки, находящиеся в активной фазе клеточного цикла на всем его протяжении (G1-, S-, G2- и M-фазы), кроме G0-периода [19, 21].

Значение ПА опухолевых клеток в онкоморфологии

В современной онкоморфологии ведется поиск критериев, позволяющих верифицировать степень гистологической и биологической злокачественности с максимальной объективностью. Учитывая, что ПА опухолей человека коррелирует со степенью их гистологической и биологической злокачественности, в последние годы интенсивно изучают диагностические возможности методов, с помощью которых определяют в опухоли число делящихся клеток [5], т.е. индекс ПА новообразования.

Пролиферативная активность опухолевых клеток представляет собой «фракцию роста» новообразования, т.е. клетки, активно синтезирующие ДНК и находящиеся в разных фазах (G1-, S-, G2- или M-фаза) клеточного цикла.

В настоящее время не подвергается сомнению необходимость изучения ПА опухолевых клеток для определения течения и прогноза злокачественных новообразований [8]. Пролиферативная активность является ведущим фактором, как в механизме злокачественной трансформации клеток, так и в биологическом поведении уже возникших опухолей [22]. Пролиферативная активность опухоли является одной из наиболее важных характеристик ее фенотипа, в значительной степени определяющей скорость роста новообразования, способность его к метастазированию, к ответу на лечебные мероприятия и исход онкологического заболевания [10]. Многие факторы, влияющие на течение и исход онкологических заболеваний, свое патогенетическое действие на опухоль опосредуют через изменение ПА [8]. Оценивать ПА раковых клеток необходимо не только для биологической характеристики опухолей, но и для селективного лечения и определения прогноза [22], поскольку ПА отражает индивидуальные свойства опухоли.

С помощью различных маркеров ПА проведено огромное количество исследований, посвященных изучению пролиферации опухолевых клеток разнообразных типов новообразования. Хотя индекс ПА в различных опухолях имеет разные значения (таб. 2), но все исследователи пришли к единому выводу, что ПА опухолевых клеток является независимым прогностическим признаком, определяющим неблагоприятность клинического течения и прогноза заболевания.

таблица 2 Индекса ПА опухолевых клеток в различных опухолях

Форма опухоли [литература]	количество случаев	маркер ПА	индекс ПА%
Рак молочной железы [14]	8	Ki-67	28,33 ± 5,86
Рак легких [14]	8	Ki-67	36,58 ± 9,08
Рак желудка [14]	5	Ki-67	56,12 ± 7,58
Рак толстой кишки [14]	8	Ki-67	33,68 ± 4,45
Рак почек [24]	87	PCNA	36,8 ± 21,7
	87	Ki-67	20,9 ± 19,7
	87	AgNOR	4,7 ± 0,19
Злокачественная астрокитомы [18]	50	Ki-67	19,7 ± 11,4
Рак желчного пузыря [16]	13	PCNA	86 ± 13,8
		Ki-67	68 ± 10,2

Было выявлено, что индекс ПА может быть использован для определения прогноза опухолей, так как ПА в злокачественных опухолях выше, чем в доброкачественных, а также в низкодифференцированных опухолях выше, чем в высокодифференцированных. Например, ПА рака молочной железы в 5 раз выше, чем в доброкачественных образованиях, и достоверно увеличивается в рецидивных опухолях, а также по мере нарастания степени гистологической злокачественности новообразования [3, 10].

Установлено, что ПА также, может служить маркером для дифференциальной диагностики некоторых опухолей определенной локализации особенно в центральной нервной системе. По мнению А.Г. Коршунова и соавт. [5] иммуногистохимическое изучение ПА может быть успешно использовано для дифференциальной диагностики доброкачественных и анапластических астроцитов, особенно в биоптатах малого объема.

Имуногистохимическое исследование ПА опухолей ЩЖ

Пролиферативную активность опухолевых клеток можно принимать как индикатор их биологического поведения в опухолях ЩЖ [13]. Позитивная иммуногистохимическая реакция прослеживается в различных структурах опухолей: в папиллярных, фолликулярных, солидных, но наиболее высока ПА, как правило, в зонах инвазивного и многофокусного роста опухоли, которые в основном представлены солидными участками. В таких локусах можно насчитывать от 10 до 20, а в некоторых случаях и до 30 иммунопозитивных ядер в одном поле зрения при 20 кратном увеличении микроскопа [2]. В норме фолликулярные клетки ткани ЩЖ, вступившие в клеточный цикл, крайне редки и не однородны в отношении ростовых потенциалов, отчего и циклы клеточного деления чаще отмечаются в доброкачественных и злокачественных опухолях [2]. При этом ПА зависит от степени дифференцировки опухоли и ее агрессивности. Различными авторами публикуются схожие данные, свидетельствующие о низкой ПА при дифференцированных формах рака ЩЖ, а при недифференцированных отмечается значительное увеличение ПА. Наибольшее число исследований в опухолях ЩЖ посвящено изучению экспрессии Ki-67 (таблица 3).

Таблица 3 Индекс ПА опухолевых клеток в различных опухолях ЩЖ

Форма опухоли [литература]	количество случаев	маркер ПА	индекс ПА%
Фолликулярная аденома	4	Ki-67	> 1
Фолликулярный рак	6		35
Папиллярный рак	4		> 1
Медуллярный рак [5]	3		5
Оксифильная фолликулярная аденома	12	Ki-67	1,59
Оксифильные раки [9]	20		6,26
Фолликулярная аденома	43	Ki-67	1,38 ± 0,20
Фолликулярный рак	14		3,18 ± 0,17
Папиллярный рак	94		1,83 ± 0,17
Медуллярный рак	8		1,17 ± 0,24
Анапластический рак [14]	11		32,67 ± 5,75
Фолликулярная аденома	7	PCNA	2,0 ± 0,9
Фолликулярный рак	3		3,6 ± 1,3
Папиллярный рак [22]	24		4,9 ± 1,7
Фолликулярная аденома	12	Ki-67	1,29 ± 0,29
Фолликулярный рак	19		3,00 ± 0,17
Папиллярный рак	209		1,51 ± 0,21
Медуллярный рак	4		0,63 ± 0,13
Анапластический рак [15]	1		62,5
Фолликулярная аденома	13	PCNA	3,6 ± 1,9
Фолликулярный рак	9		2,9 ± 1,2
Папиллярный рак	12		4,4 ± 1,5
Анапластический рак [23]	12		38,7 ± 3,9
Анапластический рак [12]	27	Ki-67	57,6 ± 3,8

Индекс ПА дифференцированных форм рака ЩЖ значительно ниже (2,00%), чем при раках других органов, таких как молочная железа, легкие, желудок и прямая кишка (44,67%) [14]. Сведения о значении индекса ПА опухолевых клеток ЩЖ в литературе немногочисленны и порой противоречивы. Мнения авторов в отношении клинико-морфологической значимости ПА рака ЩЖ расходятся. Одни авторы [6, 13, 22, 23] указывают на прогностическое и диагностическое значение ПА опухолевых клеток рака ЩЖ, в то время как другие [9, 14, 20, 25] опровергают подобную точку зрения.

T.Shimizu и соавт. [22] утверждают что, степень проявления индекса ПА отражает действительное клиническое поведение опухолей ЩЖ. C.Herrmann и соавт. [13] считают что, при фолликулярном и папиллярном раках увеличение ПА коррелирует с гистологическим грейдом. Изучение ПА при фолликулярном, папиллярном и анапластическом раках показали, что чем ниже степень дифференцировки, тем больше ПА опухолевых клеток. Анализ ПА опухолевых клеток показывает, что ее можно использовать как морфологический критерий для дифференциальной диагностики опухолей ЩЖ, утверждают авторы [13]. E.Almudevar и соавт. указывают на значение ПА в дифференциальной диагностике фолликулярной аденомы и фолликулярного рака, при этом повышение индекса ПА свидетельствует в пользу малигнизации аденом [11]. М.А.Пальцев и соавт. [6] также утверждают, что злокачественные новообразования ЩЖ отличаются от доброкачественных более высоким индексом ПА.

R. Katon и соавт. [14] считают что, иммуногистохимическое исследование с помощью антител Ki-67 предоставляет полезную информацию о пролиферативной характеристике и биологической природе заболеваний ЩЖ,

но, в практике, имеет ограничение в плане дифференциальной диагностики и прогнозирования рака ЩЖ. Авторы не выявили существенной корреляции между индексом ПА и возрастом, полом, диаметром опухоли, наличием метастазов и гистологической структурой в папиллярном раке ЩЖ у пациентов. Значительная разница индекса ПА между фолликулярным раком и солидно-трабукулярной фолликулярной аденомой не наблюдалась, хотя фолликулярный рак с широкой инвазией проявляется большей ПА, чем фолликулярный рак с минимальной инвазией [14]. С. Rigaud и соавт. [20] также считают, что между индексом ПА опухолевых клеток рака ЩЖ и гистологическим строением или pTNM не существует взаимосвязи. По мнению М.С. Третьяковы и соавт. [9] утверждение о дифференциально-диагностической ценности маркера пролиферации Ki-67 не оправдано по отношению к гюртле-клеточным опухолям. Вместе с тем количество Ki-67 позитивных онкоцитов в гюртле-клеточной карциноме положительно коррелирует с размерами опухоли, наличием некрозов, пенетрацией капсулы и клинически более агрессивным течением карцином.

Заключение

Таким образом, анализ литературных данных о значении ПА опухолевых клеток показывает, что в большинстве опухолей ПА является одним из важнейших прогностических факторов в онкологии. Повышение ее индекса свидетельствует о снижении дифференцировки опухолевых клеток и ухудшении прогноза заболевания. Вместе с тем, ПА опухолевых клеток рака ЩЖ изучена недостаточно и требует дальнейшего изучения.

Литература

1. Беккер В.Ю. //Факторы прогноза в онкологии: Пер. с англ. / Под ред. В.Е. Кратенка. –Минск: Беларусский центр научной медицинской информации, 1999. –332 с. табл., ил.
2. Богданова Т.И., Козырицкий В.Г., Тронько Н.Д.// патология щитовидной железы у детей. Атлас.// 2000. Киев «Чернобыльинтеринформ».
3. Волченко Н.Н., Завалишина Л.Э. Шимбирева И.Б., Франк Г.А. //Иммуноморфологическая характеристика первичных и рецидивных опухолей молочной железы.// Арх. пат.- 1998.- № 4, С. 4-7.
4. Гуревич Л. Е., Исаков В. А. //Использование в иммуногистохимических исследованиях метода восстановления антигенной специфичности воздействием микроволн на ткани, фиксированные формалином и заключенные в парафин.// Арх. пат.- 1999.- № 2.- С. 48-50.
5. Коршунов А.Г., Сычева Р.В. //Иммуногистохимическое изучение экспрессии антигена ядер пролиферирующих клеток в астроцитарных глиомах больших полушарий головного мозга. Арх. пат.- 1996.- №2.- С.32-37.
6. Пальцев М. А., Коган Е. А., Тунцова О. И. и др.// Морфологическая и молекулярно-генетическая характеристика рака, аденом и окружающей ткани щитовидной железы. // Арх. пат.- 1998.- № 3. -С.5-10.

7. Петров С.В., Коршунов А.Г., Смирнов А.В. и соавт. Иммуногистохимическая диагностика опухолей человека. (Руководство для врачей-морфологов) / Под редакцией С.В. Петрова и А.П. Киясова. Казань. 1998.
8. Пожарисский К. М., Леенман Е. Е. //Значение иммуногистохимических методик для определения характера лечения и прогноза опухолевых заболеваний.// Арх. пат.- 2000,№ 5, С. 3-11.
9. Третьякова М.С., Буссолати Дж.//О дифференциальной диагностике оксифильных (гютеле-клеточных) аденом и карцином щитовидной железы. //Арх. пат.- 2000.- №. 6. -С.14-18.
10. Упоров А.В., Семилазов В.Ф., Пожарисский К.М. //Иммуногистохимическое изучение клеток рака молочной железы с имральнойзованием разных маркеров пролиферации. //Арх. пот. 2000. №2. С.26-30.
11. Almudevar E., Puras A., De Miguel C., et al. //Aplicacion de las oncoproteinas P21ras, P53, bcl-2 y del factor de proliferacion celular Ki-67 (MIB-1) en el diagnostico de tumores tiroideos. // Anales del Sistema Sanitario de Navarra. 2000. – Vol. 23. Issue 2. P.247-255.
12. Erickson L.A., Jin L., Wollan P.C. et al.// Expression of p27kip1 and Ki-67 in benign and malignant thyroid tumors.//Mod Pathol.- 1998;11:169-74.
13. Herrmann C., Muller Cl., Schumm-Draeger P.-M. et al. //Immunohistochemical Quantification of Tumour Cell Proliferation in Different Types of Thyroid Carcinoma. //Clin. Endjcrinol.- 1993.-101- P. 23-27.
14. Katon R., Suzuki K., Hemmi A. et al. //Growth Activity in Hyperplastic and Neoplastic Human Thyroid Determined by an Immunohstochemical Staining Procedure Using Monoclonal Antibody MIB-1.// -Human Pathlogy.- 1995. -Vol. 26.- № 2.-P.139-146.
15. Kobayashi K., Fukata Sh. Yokozawa T. et al. // MIB-1 Labeling Index in Various Types of Thyroid Neoplasms. –MID-1 Labeling Index in Papillary Carcinomas of the Thyroid Represents Pathological Differentiated Types of the tumors.// Journal of Endocrinological Investigation. –1999. -Vol. 22, Suppl. to № 6, P. 70.
16. Lee C.S. // Differences in Cell Proliferation and Prognostic Significance of Proliferating Cell Nuclear Antigen and Ki-67 Antigen Immunoreactivity in In Situ and Invasive Carcinomas of the Extrahepatic Biliary Tract.// Cancer. –1996. - November 1.- Vol. 78, № 9, P. 1881-1887.
17. Maeda K., Chung Y., Onoda N. et al. //Proliferating Cell Nuclear Antigen Labeling Index of Preoperative Biopsy Specimens in Gastric Carcinoma with Special Reference to Prognosis.// Cancer.- 1994.- February 1. Vol. 73, № 3, P. 528-533.
18. Nakamura M., Konishi N., Tsunoda S. et al. //Retinoblastoma Protein Expression and MIB-1 Correlate with Survival of Patients with Malignant Astrocytoma.// Cancer.- 1997. -July 15. –Vol. 80, № 2, P. 242-249.
19. Oijen M., Medma R.H., Sloopweg P.J. et al. // Positivity of the Proliferation Marker Ki-67 in Noncycling Cells.// Am.J.Clin.Pathol.- 1998.- 110.- P. 24-31.
20. Rigaud C., Bogomoletz W.V. //Apparent Lack of Usefulness of Monoclonal Antibode Ki-67 in Thyroid Tumour Pathlogy. //Path. Res. Prct.- 1991.- 187.- P. 198-200.
21. Ross J.S.// DNA Ploidy and Cell Cycle Analysis in Pathology. //1996. IGAKU-SHOIN. NTW YORK-TOKYO. Medical Publishers, Inc.

22. Shimizu T., Usuda N., Yamanda T. et al. //Proliferative Activity of Human Thyroid Tumors Evaluated by Proliferating Cell Nuclear Antigen/Cyclin Immunohistochemical Studies.// Cancer. -1993.- Vol.71.№9.-P 2807-2811.
23. Soares P., Sobrino-Simoes M. //Proliferative Activity of Human Throid Tumors Evaluated by Proliferating Cell Nuclear Antigen/Cyclin Immunohistochemical Studies. // Cancer.- 1994.- June 1.-Vol. 73- № 11.- P. 2879-2881.
24. Tannapfel A., Hahn H.A. Katalnic A. et al. //Prognostic Value of Ploidy and Proliferation Markers in Renal cell Carcinoma.// Cancer –1996. - January 1. Vol. 77.- № 1.- P.166-71. Yoshida A., Kamma H., Asaga T. et al. //Proliferative Activity in Thyroid Tumours.// Cancer.- 1992.- Vol. 67.-№10.- P 2548-2552.