

© Голотюк В.В.

УДК: 616-08+615.28+616.351+616-006

Голотюк В.В.

ДВНЗ "Івано-Франківський національний медичний університет" (вул. Галицька, 2, м.Івано-Франківськ, 76018, Україна)

МАРКЕР МІТОТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПУХЛИННИХ КЛІТИН Ki-67 В ОЦІНЦІ ЕФЕКТИВНОСТІ НЕОАД'ЮВАНТНОЇ ХІМІОПРОМЕНЕВОЇ ТЕРАПІЇ У ХВОРИХ НА РАК ПРЯМОЇ КИШКИ

Резюме. Метою дослідження було визначити особливості експресії білка Ki-67 в тканині раку прямої кишки (РПК) в залежності від клініко-патологічних характеристик пухлини і встановити можливий взаємозв'язок маркера з результатами неoad'ювантної хіміопроменевої терапії (НХПТ). У 18 хворих з РПК I-III стадій імуногістохімічно визначали експресію Ki-67 у біопсійному та операційному матеріалі до і після НХПТ. Встановлено, що до початку лікування рівень Ki-67 у низькодиференційованих пухлинах був достовірно вищим, ніж у високодиференційованих, складаючи, відповідно, $52,65 \pm 4,48$ ум.од. і $38,01 \pm 2,94$ ум.од. ($p < 0,001$). Під впливом НХПТ рівень експресії Ki-67 в інтактній кишці зменшувався незначно. Проте, в локусах пухлинної паренхіми у порівнянні з даними до лікування (в середньому $46,08 \pm 3,14$ ум.од.) експресія Ki-67 різко знижувалась до $32,45 \pm 1,19$ ум.од. ($p < 0,001$), обернено корелюючи при цьому зі ступенем лікувального патоморфозу. Таким чином, негативний взаємозв'язок між експресією Ki-67 після НХПТ та рівнем відповіді на застосоване лікування свідчить про доцільність визначення Ki-67 для моніторингу ефективності ХПТ на етапах комбінованого і комплексного лікування хворих на РПК. Високий показник експресії Ki-67 у пухлині до лікування, притаманний низькодиференційованим РПК, відповідає високому рівню злякисного потенціалу пухлини.

Ключові слова: карцинома прямої кишки, проліферативна активність, лікувальний патоморфоз, хіміопроменева терапія.

Вступ

Виникнення та прогресування будь-якої пухлини, у тому числі раку прямої кишки (РПК), є результатом порушення балансу в системі контролю життєвого циклу клітин. Це стосується дисбалансу рівнів клітинної проліферації та загибелі клітин з формуванням стійкої неконтрольованої мітотичної активності [Cartron et al., 2003; Hector, Prehn, 2009]. Загально визнаним маркером клітинної проліферації є Ki-67 - негістонний білок, який міститься в ядрах на етапах поділу клітин. Доступна в науковій періодиці інформація щодо можливості використання Ki-67 в якості незалежного критерію оцінки властивостей РПК і прогнозування перебігу хвороби залишається неоднозначною. Більшість авторів низький рівень експресії Ki-67 спостерігали у пухлинах зі сприятливим клінічним перебігом, тоді як з високими значеннями Ki-67 асоціювали агресивний фенотип колоректального раку (КРР) [Nuh et al., 2010; Menezes et al., 2010]. Підвищену експресію Ki-67 характеризують як біологічну ознаку, що сприяє розвитку місцевих рецидивів і віддалених метастазів навіть у клінічно сприятливих випадках на ранніх стадіях КРР [Menezes et al., 2010; Losi et al., 2006]. З іншого боку, є роботи, в яких обґрунтовують недоцільність застосування Ki-67 для оцінки властивостей КРР, в тому числі і ступеня злякисності пухлин [Грабовий та ін., 2013]. Окремі автори вказують, що висока експресія Ki-67 пов'язана з більш сприятливим онкологічним прогнозом [Maksimovic, Jakovljevic, 2007] та збільшенням показників виживання хворих на КРР, які отримали курс ад'ювантної терапії [Fluge et al., 2009]. Оглядові роботи останніх років стосовно можливості застосування Ki-67 на етапах комплексного лікування хворих на РПК з предиктивною метою свідчать, що наявні на сьогодні дані є неоднозначними і потребують уточнення та доповнення [Kuremsky

et al., 2009; Spolverato et al., 2011], а дослідження в цьому напрямку є перспективними.

Метою дослідження було визначити особливості експресії білка Ki-67 у тканині РПК в залежності від клініко-патологічних характеристик пухлини і встановити можливий взаємозв'язок маркера з безпосередніми результатами неoad'ювантної хіміопроменевої терапії (НХПТ).

Матеріали та методи

Обстежено 18 хворих на РПК, які перебували на лікуванні в Івано-Франківському клінічному онкологічному диспансері, з них 12 із II стадією (T3-4N0M0) і 6 - із III стадією (T2-4N1-2M0) захворювання. Вік хворих склав $62,3 \pm 2,04$ роки. У всіх хворих була верифікована аденокарцинома I-III ступенів диференціювання. Діагностично заохворювання і наявність метастазів встановлювали відповідно до вимог доказової медицини (в ході відповідних клініко-інструментальних обстежень, морфологічно).

Дослідження виконували відповідно до принципів проведення біомедичних досліджень за участю людей, викладених в Гельсінській декларації Всесвітньої медичної асоціації. Всі хворі отримали курс НХПТ на фоні хіміорадіомодифікації препаратом тегафура з розрахунку 800 мг на добу за 2 прийоми per os (зранку і увечері) хворим масою до 70 кг або 1200 мг за 3 прийоми хворим масою більше 70 кг щодня упродовж усього курсу ПТ (13 сеансів фракціями по 3 Грей до сумарної вогнищевої дози 36-39 Грей на ділянку пухлини) з наступним хірургічним лікуванням через 4-6 тижнів.

Об'єктом дослідження були фрагменти інтактної кишки на відстані 3 см від краю пухлини і взірці РПК, отримані під час біопсії на етапі до початку лікування хворих і з операційного матеріалу. Для патогістологіч-

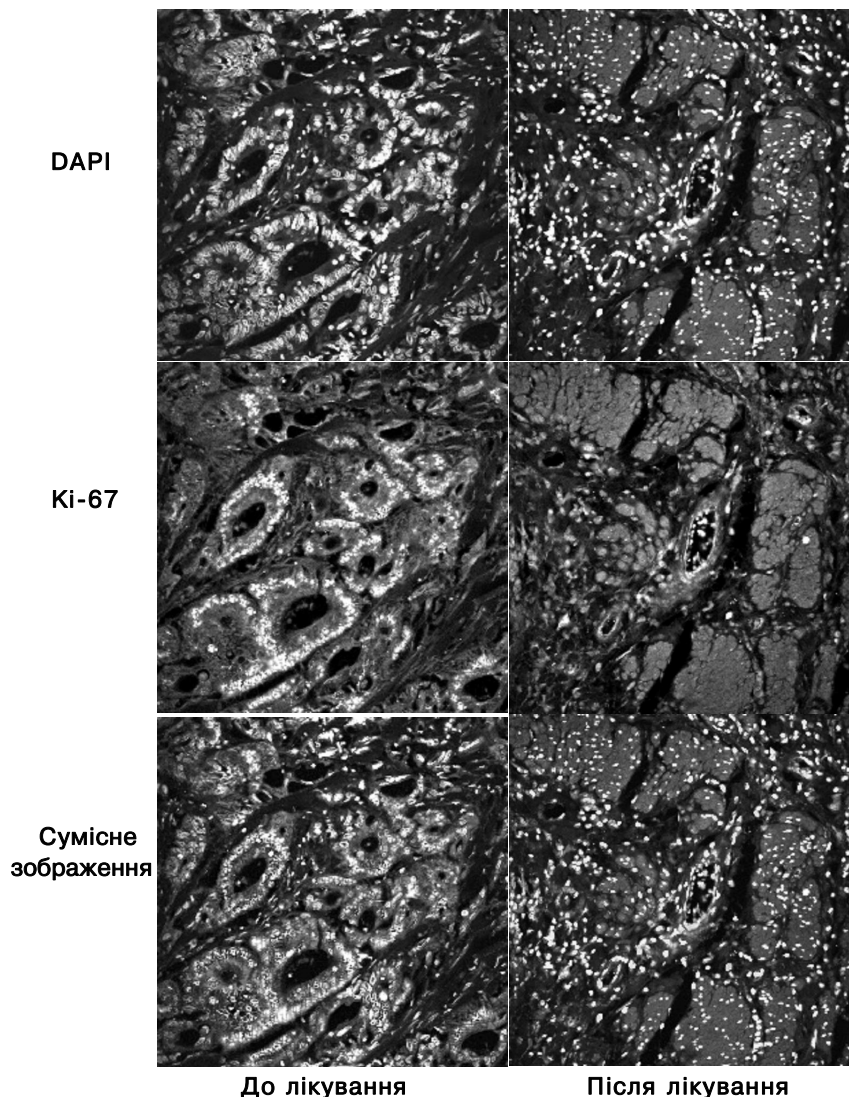


Рис. 1. Експресія Ki-67 в аденокарциномі прямої кишки до- і після курсу променевої терапії. $\times 200$.

Примітка: DAPI - візуалізація ядер, Ki-67 - імуносигнал Ki-67 у тканині пухлини.

ного дослідження операційного матеріалу РПК вирізали по одній тканинній пластинці з периферичної, проміжної та центральної зон пухлини, після чого з них готували парафінові блоки. Виготовляли гістологічні зрізи на трьох рівнях блоку - верхньому, середньому та нижньому; аналізували по 9 зрізів у кожного оперованого хворого. Серійні парафінові зрізи товщиною 4-5 мкм забарвлювали гематоксиліном і еозином і досліджували на мікроскопі Leica DME (Німеччина) при збільшеннях $\times 40$, $\times 100$, $\times 200$ та $\times 400$. Ступінь лікувального патоморфозу оцінювали за Г.О.Лавніковою. Для імуногістохімічного визначення маркера Ki-67 в якості первинних антитіл використовували анти-Ki-67 (Santa Cruz, CA, USA, розведення 1:200), в якості вторинних флуоресцеїнівмісних антитіл - Alexa Fluor 546 (Invitrogen, USA, розведення 1:500). Імунопозитивні тканини досліджували з використанням лазерного конфокального ска-

нуючого мікроскопа Zeiss LSM 510 з олійно-імерсійним об'єктивом 40X/1.4NA. На кожному зрізі фотографували 5 випадково вибраних полів. Аналіз інтенсивності імуносигналу визначали з використанням програмного забезпечення ImageJ 1.48.

Варіаційно-статистичний аналіз проводили за допомогою програми Statistica v.6.1, різницю між показниками вважали достовірною при $p \leq 0,05$.

Результати. Обговорення

В тканині інтактної слизової оболонки прямої кишки до лікування середній рівень експресії Ki-67 у полях зору становив $33,2 \pm 2,61$ ум.од., причому експресія маркера була найбільш вираженою в ділянках залозистого кишкового епітелію. Ki-67-позитивні епітеліальні клітини локалізувалися на всьому протязі кишкових крипт з незначним переважанням експресії в базальних їх відділах порівняно з люмінальними. По периметру крипт експресія Ki-67 в епітеліоцитах була рівномірною. У сполучнотканинній стромі інтактної слизової оболонки експресія Ki-67 була мінімальною. Через 4-6 тижнів після НХПТ у слизовій оболонці експресія Ki-67 в епітеліоцитах була нерівномірною по окружності крипт та дещо меншої інтенсивності, ніж на момент первинного обстеження хворих ($29,7 \pm 3,61$ ум.од., $p > 0,05$), у тому числі в епітелії базальних відділів крипт. У власній пластинці слизової оболонки виявляли поодинокі Ki-67 позитивні клітини.

У зразках тканини РПК до початку НХПТ експресія Ki-67 носила виражений характер у переважній більшості клітин атипових залозоподібних структур (рис. 1). Її середній рівень склав $46,08 \pm 3,14$ ум.од., причому у випадках низького ступеня диференціювання пухлин він був достовірно вищим, ніж у високодиференційованих, складаючи відповідно $52,65 \pm 4,48$ ум.од. і $38,01 \pm 2,94$ ум.од. ($p < 0,001$). У сполучнотканинній стромі експресія Ki-67 була значно нижчою порівняно з раковим епітелієм, проте більш вираженою в осередках реактивних клітинних інфільтратів. Отримані нами дані щодо оберненої взаємозалежності рівня диференціювання РПК і показників Ki-67 у пухлині до лікування відповідають висновкам інших дослідників [Nuh et al., 2010; Menezes et al., 2010], а також узгоджуються з твердженнями Menezes H.L. зі співавторами [2010] та Losi L. зі

співавторами [2006], які характеризують підвищену експресію Ki-67 як біологічну ознаку, що сприяє розвитку місцевих рецидивів і віддалених метастазів навіть у клінічно сприятливих випадках на ранніх стадіях розвитку КРР.

На фоні курсу НХПТ інтенсивність експресії Ki-67 різко знижувалась - у середньому до $32,45 \pm 1,19$ ум.од. ($p < 0,001$) та мала нерівномірний характер розподілу серед епітеліоцитів залозоподібних структур. У частині випадків у дистрофічно змінених ракових вогнищах експресію досліджуваного маркера виявляли лише в поодиноких клітинах, у некротично зміненій раковій паренхімі експресія Ki-67 була повністю відсутня (рис. 1). У випадках III-IV ступенів лікувального патоморфозу рівень експресії Ki-67 був суттєво нижчим порівняно з патоморфозом I-II ступенів, складаючи відповідно $24,24 \pm 2,19$ ум.од. та $37,58 \pm 3,21$ ум.од. ($p < 0,001$). У ділянках вираженої десмопластичної реакції строми, особливо в осередках розростання грануляційної тканини, світіння Ki-67 виявляли в клітинах реактивного лімфоцитарно-макрофагального інфільтрату та в ендотелії судин мікроциркуляторного русла.

Список літератури

- Грабовий О.М. Мітотична активність і вміст нуклеїнових кислот у ядрах клітин епітеліальних пухлин товстої кишки /О.М.Грабовий, С.А.Антонюк, Є.А.Ворообей //Патологія.- 2013.- №2 (28).- С.13-16.
- Analysis of the immunohistochemical expressions of p53, bcl-2 and Ki-67 in colorectal adenocarcinoma and their correlations with the prognostic factors /H.L.Menezes, M.J.Juc?, E.G.Gomes [et al.] //Arq. Gastroenterol.- 2010.- Vol.47, №2.- P.141-147.
- Expression of EZH3 and Ki-67 in colorectal cancer and associations with treatment response and prognosis /O.Fluge, K.Gravdal, E.Carlsen [et al.] //Br. J. Cancer.- 2009.- Vol.101, №8.- P.1282-1289.
- Hector S. Apoptosis signaling proteins as prognostic biomarkers in colorectal cancer: a review /S.Hector, J.H.Prehn //Biochim. Biophys. Acta.- 2009.- Vol.1795, №2.- P.117-129.
- Huh J.W. Expression of p16, p53, and Ki-67 in colorectal adenocarcinoma: a study of 356 surgically resected cases /J.W.Huh, J.H.Lee, H.R.Kim //Hepatogastroenterology.- 2010.- Vol.57, №101.- P.734-740.
- Impact of proapoptotic proteins Bax and Bak in tumor progression and response to treatment /P.F.Cartron, P.Juin, L.Oliver [et al.] //Expert Rev Anticancer Ther.- 2003.- Vol.3, №4.- P.563-570.
- Kuremsky J.G. Biomarkers for response to neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer /J.G.Kuremsky, J.E.Tepper, H.L.McLeod //Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.- 2009.- Vol.74, №3.- P.673-688.
- Maksimovic S. Immunohistochemical markers (PCNA, Ki-67 and P53) in patients with colon cancer /S.Maksimovic, B.Jakovljevic //Annals of Oncology.- 2007.- Vol.18, №9.- P.168-172.
- Prognostic significance of histological features and biological parameters in stage I (pT1 and pT2) colorectal adenocarcinoma /L.Losi, G.Ponti, C.D.Gregorio [et al.] //Pathol Res Pract.- 2006.- Vol.202, №9.- P.663-670.
- Spolverato G. Predictive factors of the response of rectal cancer to neoadjuvant radiochemotherapy /G.Spolverato, S.Pucciarelli, R.Bertorelle [et al.] //Cancers (Basel).- 2011.- Vol. 3, №2.- P.2176-2194.

Голотюк В.В.

МАРКЕР МИТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК KI-67 В ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЯМОЙ КИШКИ.

Резюме. Целью исследования было определить особенности экспрессии белка Ki-67 в ткани рака прямой кишки (РПК) в зависимости от клинико-патологических характеристик опухоли и установить возможную взаимосвязь маркера с результатами неoadъювантной химиолучевой терапии (НХПТ). У 18 больных РПК I-III стадий иммуногистохимически определяли экспрессию Ki-67 в биопсийном и операционном материале до- и после НХПТ. Установлено, что до начала лечения уровень Ki-67 в случаях низкокодифференцированных опухолей был достоверно выше, чем у высококодифференцированных, составляя соответственно $52,65 \pm 4,48$ усл.ед. и $38,01 \pm 2,94$ усл.ед. ($p < 0,001$). Под влиянием НХПТ уровень экспрессии Ki-67 в интактной кишке уменьшался незначительно. При этом в локусах опухолевой паренхимы по сравнению с данными до лечения (в среднем $46,08 \pm 3,14$ усл.ед.) экспрессия Ki-67 резко снижалась до $32,45 \pm 1,19$ усл.ед. ($p < 0,001$), обратно коррелируя при этом со степенью лечебного патоморфоза. Таким образом, негативная взаимосвязь между экспрессией Ki-67 после НХПТ и уровнем ответа на примененное лечение свидетельствует о целесообразности определения Ki-67 для мониторинга эффективности ХПТ на этапах комбинированного и комплексного лечения больных РПК. Высокий показатель экспрессии Ki-67 в опухоли до лечения, характерный низкокодифференцированным РПК, соответствует высокому уровню злокачественного потенциала опухоли.

Ключевые слова: карцинома прямой кишки, пролиферативная активность, лечебный патоморфоз, химиолучевая терапия.

Golotyuk V.V.

TUMOR CELLS MITOTIC ACTIVITY MARKER KI-67 IN ASSESSING THE NEOADJUVANT CHEMORADIO THERAPY EFFECTIVENESS IN PATIENTS WITH RECTAL CANCER

Summary. *The aim of the study was to determine the expression patterns of protein Ki-67 in colorectal cancer tissue depending on the pathological characteristics of the tumor and to establish the possible relationship between marker level and the results of neoadjuvant chemoradiotherapy (NCRT). Ki-67 expression indexes were determined by immunohistochemistry in the biopsy and surgical material in 18 patients with adenocarcinoma of the rectum stage I-III before and after NCRT. It was found that the pre-treatment level of Ki-67 in cases of poorly differentiated tumors was significantly higher than that of highly differentiated, accounting for respectively $52,65 \pm 4,48$ conv. units and $38,01 \pm 2,94$ conv. units ($p < 0.001$). Under the influence of NCRT the level of Ki-67 expression in the intact intestine decreased slightly. Expression of Ki-67 dramatically reduced to $32,45 \pm 1,19$ conv. units ($p < 0.001$) in the loci of residual tumor parenchyma compared with those before treatment (average level $46,08 \pm 3,14$ conv. units) and inversely correlated with the degree of therapeutic pathomorphosis. Thus, a negative correlation between the expression of Ki-67 after NCRT and the level of the response to the applied treatment suggests the feasibility of using the Ki-67 definition to monitor the effectiveness of NCRT during combined and complex treatment of patients with rectal cancer. High expression of Ki-67 in the tumor before treatment, being characteristic of poorly differentiated tumors, corresponds to the high level of the malignant potential of the tumor.*

Key words: *rectal cancer, proliferative activity, therapeutic pathomorphosis, chemoradiotherapy.*

Рецензент: к. мед. н. доцент Кіндратів Е.О.

Стаття надійшла до редакції 4.05.2015 р.

Голотюк Володимир Володимирович - к. мед. н., доцент курсу онкології ДВНЗ "Івано-Франківський національний медичний університет"; golotiuk@rambler.ru

© Sulaieva O.N.

УДК: 616. 155.2: 616. 33 - 005.1

Sulaieva O.N.

Department of Histology, Cytology and Embryology, Zaporozhye State Medical University (pr. Mayakovsky, 26, Zaporozhye, 69035, Ukraine)

MECHANISMS OF PLATELET DYSFUNCTION IN PATIENTS WITH GASTRODUODENAL ULCER BLEEDING

Summary. *Platelet reactivity was estimated in 247 patients with gastric and duodenal ulcer bleeding. Platelet aggregation was measured using aggregometry with adenosine diphosphate ($5 \mu M$), epinephrine ($2.5 \mu M$), 5-hydroxytryptamine ($10 \mu M$), collagen ($1 \mu M$) and thrombin (0.05 NIH/ml). The relationship between platelet aggregation and spatial-temporal characteristics of ulcers complicated by bleeding were shown. Adrenoreactivity of platelets was associated with terms after beginning of ulcer bleeding and hemorrhage degree. The lowest platelet response to collagen and thrombin was detected in patients with active bleeding ($p < 0.001$) and unsustainable hemostasis ($p < 0.01$). Additionally to gender factor, the important determinant of unsustainable hemostasis was decrease of platelet response to thrombin and adenosine diphosphate.*

Key words: *gastric and duodenal ulcer, bleeding, hemostasis, platelets.*

Introduction

Gastric and duodenal ulcer bleeding is a common cause of hospital admission and life-threatening medical emergency [Laursen et al., 2012]. Recent studies of clinical, laboratory and endoscopic features of peptic ulcers and their complications have revealed the wide list of factors which are associated with this pathology [Bratanic A. et al., 2012]. The most widely known risk-stratification tool for gastroduodenal bleeding is the Rockall scoring system [Marmo et al., 2010]. It represents an accurate and validated predictor of rebleeding and mortality [Jensen, 2012]. This approach is perfect for short-term management of GDB, but not in development of novel strategy of treatment and prevention of ulcer bleeding. Indeed, the treatment of ulcer bleeding remains only partly successful, despite the wide use of endoscopic methods, eradication of *H. pylori* and progress in antisecretory therapy [Holster, Kuipers, 2011]. In our view, the solution may lie in development of a new approach, directed on assessment of mechanisms of hemostasis failure

rather than on detection of stigmata of bleeding. The integrative link of hemostatic system is platelets, which are the first cells activated in the place of injury, tightly related with plasma coagulation system, endothelium and connective tissue homeostasis. These blood cells have numerous receptors for different molecules, which are involved in regulation and realization of blood clotting. That is why we suggested that in vitro assessment of platelet reaction to different stimuli can be useful for understanding of hemostasis instability and establishment of pathogenetic mechanisms of unsustainable trombogenesis after bleeding.

The aim of this paper is to identify factors associated with risk of unsustainable hemostasis in patients with gastric and duodenal ulcer bleeding by in vitro assessment of platelet reactivity.

Material and methods

A cohort study was conducted in 140 patients with a diagnosis of gastroduodenal ulcer bleeding. Patients