

МАРКЕРЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В РАКОВЫХ ОПУХОЛЯХ ГОРТАНИ

*С.В. Петров, Р.Н. Кулагин, Д.Э. Цыплаков, О.В. Нефедов,
В.В. Савельев, А.Р. Уткузов, Н.Т. Райхлин*

*Клинический онкологический диспансер (главврач — канд. мед. наук Р.Ш. Хасанов) МЗ РТ,
кафедра патологической анатомии (зав. — проф. Н.И. Шамсутдинов) Казанского
государственного медицинского университета, ГСМО "Онкология"
(генер. директор. — Ф.М. Хайруллин), г. Казань, НИИ клинической онкологии РОНЦ РАМН
(директор — чл.-корр. РАМН, проф. М.И. Давыдов), г. Москва*

Одним из ключевых клинико-морфологических параметров раковой опухоли, наряду с инвазивностью, степенью анаплазии, васкуляризацией, апоптозом, считается интенсивность пролиферации в клетках новообразования [12, 21]. Рост пролиферативной активности раковых клеток в конечном счете ведет к появлению мультиклональных субпопуляций и к увеличению шансов того, что некоторые из них приобретут способность к метастазированию [27]. Имеются различные подходы в оценке интенсивности клеточного цикла в опухолях. Традиционными методами являются подсчет митотического индекса, индекса включения тимидина [22] и проточная цитометрия, выявляющие клетки, находящиеся в фазе синтеза клеточного цикла. Достаточно новый подход к исследованию кинетики клетки — это простое серебрение белка, ассоциированного с ядрышковым организатором (AgNOR) [20].

В последние годы для изучения пролиферативных процессов в опухоли используется иммуногистохимический анализ молекул, играющих важную роль в клеточном цикле [5]. К ним относятся белки Ki-67, MPM-2, PCNA, ряд циклинов и др. Гибридомные технологии позволили получить моноклональные антитела, выявляющие эти молекулы в парафиновых и криостатных срезах различных опухолей человека. PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen — антиген ядер пролиферирующих клеток), ядерный белок с молекулярной массой 36 кДа, является вспомогательным полипептидом дельта ДНК-полимеразы [9]. PCNA был впервые выделен Miyachi [17] из сыворотки пациентов с системной красной волчанкой. Содержание PCNA в ядрах повышается в S-G2-фазах клеточного цикла и отсутствует в фазе G₀.

Другой ядерный антиген Ki-67 экспрессируется во всех активных фазах цикла [7] и быстро разрушается по его окончании [8]. Как и PCNA, этот антиген выявляется при иммуногистохимическом исследовании в ядрах пролиферирующих клеток и отсутствует в покоящихся клеточных элементах нормальных тканей. Антитела к другому маркеру — белку MPM-2 — окрашивают цитоплазму клеток, находящихся в фазе митоза. MPM-2 антиген синтезируется в течение интерфазы и фосфорилируется в M-фазе.

В ряде опухолей человека найдена корреляция между количеством клеток, окрашенных PCNA, Ki-67 (индекс Ki-67 или PCNA) и степенью гистопатологической дифференцировки. Увеличение индекса PCNA прямо коррелирует с частотой метастазирования опухоли в регионарные лимфатические узлы [26].

Индекс мечения PCNA используется для прогноза ответа на лучевую и химиотерапию. Лучший ответ на облучение отмечен у больных с высоким индексом PCNA в раковых опухолях шейки матки [19] и гортани [18]. Tsuji T. и соавт. [24] обнаружили снижение экспрессии PCNA после химиотерапии ротоглоточного рака, что позволило им оценивать ответ раковых клеток на антибластомные препараты последовательным измерением индекса PCNA. В то же время работ, касающихся пролиферативной активности клеток рака гортани, в литературе недостаточно, и их результаты противоречивы [4]. Корреляция между индексом PCNA и гистопатологической дифференцировкой опухоли показана рядом авторов [12, 14], хотя в исследованиях других подобная закономерность не обнаружена [18, 21].

Целью нашего исследования являлось изучение закономерностей пролифера-

тивных процессов, происходящих в клетках рака гортани.

Материалом для иммуногистохимического исследования служили криостатные и парафиновые срезы 66 плоскоклеточных раков и нормальный эпителий гортани, не пораженный опухолью (см. табл.). Использовались следующие моноклональные антитела: 1) клон PC10 (DAKO) к антигену ядер пролиферирующих клеток (PCNA); 2) MKAT клон Ki-67 (DAKO); 3) клон MPM-2 (DAKO). Индекс пролиферации подсчитывали с использованием морфометрической окулярной сетки в 20 полях зрения, при этом учитывали 500 клеток [1]. Мы считали ядра позитивно окрашенными при реакции любой интенсивности. Статистическую обработку производили с помощью критерия Вилкоксона—Манна—Уитни. В качестве системы визуализации при-

кого эпителия [3]. Использовали анти-тела к цитокератинам № 1, 2, 5, 8, 9, 10, 11, 14, 18, 19, антигену G36-19 корнеодесмосом эпидермиса, антигену D40-10 кератогиалиновых гранул, F-711 и F-105 к филлагрину и профиллагрину (любезно предоставлены проф. G. Segre; Тулузский университет, Франция).

Метастазы в регионарные лимфатические узлы были выявлены в 16 (24,2%) случаях, в то время как гематогенные метастазы не обнаружили. Комбинированное лечение (облучение + операция) перенесли 34 (51,5%) пациента.

В нормальной слизистой оболочке гортани на PCNA и Ki-67 окрашивались ядра базальных клеток как многослойного, так и многорядного эпителиев. В целом, индексы мечения PCNA и Ki-67 оказались идентичными. Антиген MPM-2 в нормальном эпителии не был обнаружен. Средний индекс PCNA для исследуемых раковых опухолей составил $62,5 \pm 2,8\%$, а индекс Ki-67 — $45,7 \pm 3,7\%$. В высокодифференцированных опухолях (степень дифференцировки G1) PCNA- и Ki-67-позитивные ядра опухолевых клеток определялись по периферии опухолевых гнезд и вокруг “раковых жемчужин” (см. рис.). Белок MPM-2 выявлен в цитоплазме опухолевых клеток, находившихся по периферии раковых гнезд.

В низкодифференцированных раковых опухолях (степень дифференцировки G3) PCNA- и Ki-67-позитивные ядра имели место как по периферии, так и в центре раковых гнезд. Маркер M-фазы клеточного цикла MPM-2 был обнаружен в цитоплазме большинства опухолевых клеток в 8 из 15 наблюдений.

В высокодифференцированных раковых опухолях индекс PCNA составил в среднем $60,9 \pm 4,0\%$, в низкодифференцированных — $65,4 \pm 1,9\%$ ($P > 0,05$), индекс Ki-67 — $50,5 \pm 4,5\%$ и $56 \pm 10,2\%$ соответственно ($P < 0,05$).

В ряде низкодифференцированных раковых опухолей нами были выявлены цитокератины №№ 1, 10, характерные для ороговевающего многослойного плоского эпителия. В этой группе опухолей индекс пролиферации составил $66,2 \pm 1,33\%$ и соответствовал таковому во всей серии G3 опухолей.

При анализе пролиферации клеток умеренно дифференцированных раковых опухолей обнаружена позитивная ядерная реакция на PCNA и Ki-67 не только по периферии, но и ближе к центру

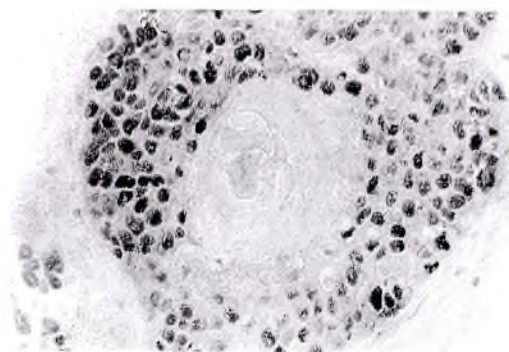
Распределение больных по полу, возрасту и локализации новообразований

| | Число пациентов | |
|-------------------------------------|-----------------|------|
| | абс. | % |
| Пол | | |
| мужчины | 65 | 98,5 |
| женщины | 1 | 1,5 |
| Возраст | | |
| < 40 | 3 | 4,6 |
| < 60 | 37 | 56 |
| > 60 | 26 | 39,4 |
| Клиническая стадия | | |
| II стадия | 23 | 34,5 |
| III стадия | 28 | 42,5 |
| IV стадия | 15 | 23 |
| Гистопатологическая дифференцировка | | |
| G1 | 27 | 41 |
| G2 | 17 | 25,8 |
| G3 | 22 | 33,2 |
| Локализация в полости гортани | | |
| над связками | 14 | 21 |
| голосовые связки | 8 | 12 |
| подсвязочное пространство | 3 | 5 |
| трансларингеально* | 41 | 62 |

Примечание. * Опухоль занимает два и более отдела в полости гортани.

меняли стрептавидин-биотиновый метод в наборе LSAB+ (DAKO); пероксидазу проявляли раствором диаминобензидина или аминэтилкарбазола.

Гистологическую дифференцировку оценивали по стандартным критериям [2], а также с помощью иммуногистохимического окрашивания на маркеры степени зрелости многослойного плос-



Окрашивание ядер клеток высокодифференцированного рака с помощью антител к PCNA выявляет участки опухоли с активной клеточной пролиферацией. Центральная часть ракового гнезда не окрашена.

Антитела PC10, LSAB-метод, хромоген-диаминабензидин. $\times 400$.

опухолевых гнезд ($61,2 \pm 1,4\%$ и $62,9 \pm 1,3\%$ соответственно). Клетки, реагирующие на белок MPM-2, лежали беспорядочно по всем опухолевым пластам, причем в каждом четвертом случае окрашивалось до 60% клеток.

Для второй клинической стадии плоскоклеточного рака индекс PCNA составлял $59,3 \pm 3,3\%$, для третьей — $63,7 \pm 2,5\%$ и четвертой — $64,6 \pm 2,7\%$. Достоверные различия были отмечены при сравнении II и IV стадий ($P < 0,01$), II и III стадий ($P < 0,05$). Индекс Ki-67 у больных во II клинической стадии был равен $64,4 \pm 0,5\%$, в III — $43,4 \pm 4,7\%$ и в IV — $62,7 \pm 3,7\%$. Наименьший индекс обнаружен в III стадии, и при его сравнении с индексами II и IV стадий обнаружены достоверные различия ($P < 0,05$ и $P < 0,001$ соответственно).

Несмотря на то что у леченных больных индекс PCNA был выше ($65,6 \pm 9,1\%$), чем у больных, не получавших радиотерапию ($63,8\% \pm 1,9$), различий между ними не обнаружено ($P > 0,05$). Напротив, индекс Ki-67 различался ($P < 0,02$), среднее его значение у леченных больных составляло $35,0 \pm 6,7\%$, а у нелеченных — $56,8 \pm 3,7\%$.

У больных с метастазами в шейные лимфатические узлы индекс PCNA в первичной опухоли был равен $65,7 \pm 0,8\%$, без метастазов — $63,3 \pm 2,8\%$ ($P > 0,05$). Индекс Ki-67 в надсвязочных опухолях составлял $54,6 \pm 6,6\%$, в опухолях связочного пространства — $58,8 \pm 8,9\%$ ($P > 0,05$).

В результате анализа 66 случаев плоскоклеточного рака гортани нами показано, что позитивная реакция на PCNA и Ki-67 определялась во всех изученных

опухолях в виде диффузной и/или зернистой окраски ядер. В плоскоклеточных раковых опухолях некоторыми авторами описана неспецифическая цитоплазматическая окраска на Ki-67 [14, 28], которую мы не учитывали.

Нами показано, что в центре гнезд высокодифференцированного рака ядра клеток обычно негативны. Подобные находки ранее были обнаружены в ороговевающих раковых опухолях головы и шеи и раке шейки матки [12, 25]. В низкодифференцированных раковых опухолях число позитивных клеток, как правило, увеличивалось, причем оба маркера имели тенденцию к окрашиванию клеток по периферии опухолевых гнезд. Подобный феномен был описан Kearsley и соавт. [12], которые считали, что периферические клетки являются пролиферирующими менее зрелыми клеточными элементами, предшественниками более дифференцированных клеток центральной части опухолевого пласта. В наших случаях PCNA-позитивных клеток было существенно больше, нежели клеток, окрашенных на Ki-67. Это соответствует биохимическим данным о более длинном по сравнению с Ki-67 периоде полужизни белка PCNA [11]. К тому же PCNA ассоциирован с процессами репарации ДНК и может экспрессироваться тогда, когда синтез ДНК не происходит [15]. Уровень PCNA зависит не только от синтеза ДНК, но и от активности ряда факторов роста [6] и некоторых онкогенов [16]. Несмотря на эти данные, большинство авторов считают PCNA вполне надежным маркером клеточной пролиферации в раковых опухолях.

Что касается связи индекса PCNA с клинической стадией заболевания, то нами обнаружено их различие между II и III ($P < 0,05$) и II и IV ($P < 0,01$) стадиями. Для индекса Ki-67 эти различия были выше ($P < 0,05$ и $P < 0,001$ соответственно), что согласуется с результатами одних авторов [5, 9, 10] и противоречит сообщениям других [13, 21, 23]. Известно, что рост опухоли зависит не только от пролиферации клеток, но и от степени апоптоза, васкуляризации [28], поэтому возникающие противоречия можно частично объяснить сочетанным действием этих факторов. В части низкодифференцированных (G3) раковых опухолей, даже при наличии в их клетках биохимических признаков ороговеания, сохраняется высокий уровень про-

лиферации, характерный для всей этой группы.

Наши данные подтверждают имеющиеся в литературе сведения о подавляющем действии облучения на пролиферативную активность клеток плоскоклеточного рака гортани, причем этот эффект улавливается только при анализе индекса Ki-67, но не PCNA. Мы согласны с мнением Gunzl и соавт. [10], что высокие значения индекса пролиферации в плоскоклеточных раках гортани позволяют предсказать хороший ответ на облучение этих больных. Из-за нестабильности результатов мечения опухолевых клеток с помощью антител к MPM-2 экспрессия этого антигена в плоскоклеточных раках требует дальнейшего исследования.

ВЫВОДЫ

1. В отличие от классического митотического индекса, индексы мечения Ki-67 и PCNA являются надежными и воспроизводимыми на рутинном клиническом материале показателями пролиферативной активности клеток раковых опухолей гортани. Исследование антигена Ki-67 предпочтительнее, нежели PCNA, так как более точно отражает уровень пролиферации раковых клеток.

2. Имеется обратная связь индекса пролиферации в клетках плоскоклеточного рака гортани и степени дифференцировки опухоли.

3. Обнаружена прямая корреляция индекса пролиферации клеток плоскоклеточного рака гортани с клинической стадией болезни.

4. Предоперационная лучевая терапия вызывает значительное снижение темпов пролиферации клеток плоскоклеточного рака гортани.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов А.Г. Медицинская морфометрия — М., 1990.
2. Классификация злокачественных опухолей по системе TNM (4-е издание) — М., 1989.
3. Петров С.В. Гистогенез и диагностика эпителиальных опухолей шейки матки и кожи // Автореф. дисс. ...докт. мед. наук. — М., 1994.
4. Barona de Guzman R., Martorell M.A., Basterra J. et al. // Laryngoscope. — 1993. — Vol. 103. — P. 538 — 540.
5. Begg A.C., Hofland I., Moonen I. et al. // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. — 1990. — Vol. 19. — P. 1449-1453.
6. Beserga R. // J Cell Sci. — 1991. — Vol. 98. — P. 433 — 436.

7. Brown D.C., Gatter K.C. // Histopathology. — 1990. — Vol. 17. — P. 489 — 503.
8. Bruno S., Dazykiewicz Z. // Cell Proliferat. — 1992. — Vol. 25. — P. 31 — 40.
9. Fairman M.P. // J. Cell Sci. — 1990. — Vol. 95. — P. 1 — 4.
10. Gunzl H.J., Horn H., Schecke R. et al. // Eur. J. Cancer. Part B. Oral Oncol. — 1993. — Vol. 29(B). — P. 140 — 145.
11. Hall P.A., Levison D.A., Wood A.L. et al. // J. Pathol. — 1990. — Vol. 162. — P. 285 — 294.
12. Kearsley J.H., Furlong K.L., Cooke R.A. et al. // Br. J. Cancer. — 1990. — Vol. 61. — P. 821 — 827.
13. Kram A., Domagala W. // Pol. J. Pathol. — 1996. — Vol. 47. — P. 183 — 187.
14. Lorz M., Meyer-Breiling E., Bettinger R. // Eur. Arch. Otorhinolaryngol. — 1994. — Vol. 251. — P. 91 — 94.
15. McCormick D., Hall P.A. // Histopathology. — 1992. — Vol. 21. — P. 591 — 594.
16. Mercer W.E., Shields M.T., Ling D. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1991. — Vol. 88. — P. 1958 — 1962.
17. Miyachi K., Fritzler M.J., Tan E.M. et al. // J. Immunol. — 1978. — Vol. 121. — P. 2228 — 2234.
18. Munck-Wikland E., Fernberg J.O., Kaylenstierna R. et al. // Oral. Oncol. Eur. J. Cancer. — 1993. — Vol. 29B. — P. 75 — 79.
19. Oka K., Hoshi T., Arai T. // Cancer. — 1992. — Vol. 70. — P. 1545 — 1550.
20. Ploton D., Menager M., Jeannesson P. et al. // Histochem. J. — 1986. — Vol. 18. — P. 5 — 14.
21. Shin D. M., Voravud N., Ro J.Y. et al. // J. Nail. Cancer Inst. — 1993. — Vol. 85. — P. 971 — 978.
22. Silvestrini R., Diadone M.G., Di Fronzo G. et al. // Breast Cancer Res. Treat. — 1986. — Vol. 7. — P. 161 — 167.
23. Spafford M.F., Koeppe J., Pan Z. et al. // Arch. Otolaryngol. Head and Neck Surg. — 1996. — Vol. 122. — P. 627 — 632.
24. Tsuji T., Sasaki K., Kimura Y. et al. // Int. J. Oral. Maxillofac Surg. — 1992a. — Vol. 21. — P. 369 — 372.
25. Tsuji T., Shrestha P., Yamada K. et al. // Virchows. Archiv. A Pathol. Anat. — 1992. — Vol. 420. — P. 377 — 383.
26. Tsyplakov D.E., Petrov S.V., Kulagin R.N. // Pathol. Oncol. Res. — 1997. — Vol. 3. — P. 121 — 125.
27. Tubiana M., Courdi A. // Radiother. Oncol. — 1989. — Vol. 15. — P. 1 — 18.
28. Verhoeven D., Bourgeois N., Derde M.P. // Histopathology. — 1990. — Vol. 17. — P. 505 — 509.

Поступила 28.03.00.

PROLIFERATION MARKERS OF TUMORAL CELLS IN THE LARYNX CANCER

S. P. Petrov, E. N. Kulagin, D. E. Tsyplakov,
O. V. Nefedov, V. V. Savelyev, A. R. Utkuzov,
N. T. Raikhman

S u m m a r y

The cell proliferative process in the larynx cancer is studied. Contrary to the classical mitotic index the Ki-67 and PCNA indices are reliable and reproducible on the clinical material by the proliferative cell activity indices of the larynx tumors. There is a reverse connection between the proliferation index in cells of the squamous larynx cancer and the tumor differentiation. The direct correlation of the cell proliferation index of the squamous larynx cancer with the disease stage is revealed. The preoperative radiation therapy significantly decreases the cell proliferation rates of the squamous larynx cancer.