

Сравнительная морфологическая характеристика пролиферативной активности и содержания ДНК в ядрах клеток различных фенотипов злокачественных опухолей легкого

В.В. Ермилов, М.В. Букатин, М.С. Затямина, О.Н. Барканова, В.Б. Барканов, Н.А. Колобродова ✉, О.Ю. Кузнецова, Т.Н. Щербакова, А.В. Соколова

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

Аннотация. Выбор метода лечения рака легкого напрямую зависит от диагностики и верификации гистологического типа опухоли. Важными диагностическими критериями служат определение индекса накопления (ИН) ДНК и индекса пролиферации (ИП) Ki-67. Материалы и методы. ИН ДНК оценивали по 200 наблюдений рака легкого микроспектрофотометрическим методом. Подсчет ИП Ki-67 проводили на гистологическом материале иммуногистохимическим методом с использованием антител к Ki-67, Cytokeratin 5/6, TTF-1, Chromogranin A, Synaptophysin, Keratin.Pan, CD56. Результаты. По мере снижения степени дифференцировки опухоли увеличивается ИН ДНК и ИП Ki-67, что служит критериями агрессивного поведения опухоли. Выводы. Корреляционный анализ выявил статистически значимую взаимосвязь между ИН ДНК и ИП Ki-67 ($r = 0,987, p < 0,05$). Полученные данные могут быть полезны для диагностики и прогнозирования у больных раком легкого.

Ключевые слова: раковые клетки, рак легкого, пролиферативная активность клеток, индекс накопления ДНК, индекс пролиферации Ki-67

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

Comparative morphological characteristics of the proliferative activity and DNA content in the nuclei of cells of different lung cancer phenotypes

V.V. Ermilov, M.V. Bukatin, M.S. Zatyamina, O.N. Barkanova, V.B. Barkanov, N.A. Kolobrodova ✉, O.Yu. Kuznetsova, T.N. Shcherbakova, A.V. Sokolova

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Abstract. The choice of lung cancer treatment method directly depends on the diagnostic and verification of the histological type of tumor. Important diagnostic criteria are DNA accumulation index and proliferation index of Ki-67. Materials and methods. DNA accumulation index was assessed in 200 cases of lung cancer using a microspectrophotometric method. Ki-67 proliferative index was calculated using immunohistochemical study in histological material with antibodies to Ki-67, Cytokeratin 5/6, TTF-1, Chromogranin A, Synaptophysin, Keratin.Pan, CD56. Results. As the degree of tumor differentiation decreases, DNA accumulation index and Ki-67 proliferative index increase, serving as criteria for the aggressive behavior of the tumor. Conclusions. Correlation analysis revealed a statistically significant relationship between DNA accumulation index and Ki-67 proliferative index ($r = 0.987, p < 0.05$). The obtained data may be useful for diagnosis and prognosis in patients with lung cancer.

Keywords: cancer cells, lung cancer, cell proliferative activity, DNA accumulation index, Ki-67 proliferative index

Рак легкого представляет собой актуальную проблему в современной онкологии. Вместе со злокачественными новообразованиями трахеи и бронхов он имеет высокий удельный вес в структуре заболеваемости и летальности населения Российской Федерации от онкологической патологии [1].

Обозначенное состояние вопроса требует правильного выбора метода лечения, который напрямую зависит от диагностики и достоверной верификации гистологического типа опухоли. Прямым доказатель-

ством этого является выход в свет новой гистологической классификации ВОЗ опухолей легких пятого пересмотра (The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors). В данной классификации произошли существенные изменения, которые связаны с широким спектром накопленных данных, касающихся иммунофенотипа различных опухолей легкого, в том числе, применения молекулярно-генетических методов для выявления генетических мутаций. Авторы классификации подчеркивают необходимость

расширения сферы применения иммуногистохимического (ИГХ) исследования для установления диагноза при раке легкого [2].

В настоящее время установлено, что рак легкого характеризуется многочисленными генетическими изменениями [3]. Содержание ДНК в ядрах клеток различных гистологических типов опухолей легкого выявляет взаимосвязь между показателями среднего содержания ДНК и степенью дифференцировки новообразования. По мере нарастания степени анаплазии опухоли увеличивается обобщенный индекс накопления ДНК (ИН ДНК – взвешенное среднее арифметическое содержания ДНК на ядро клетки) и число клеток с полиплоидными значениями содержания ДНК в ядрах, что может быть использовано при решении вопросов прогноза [4].

Некоторые исследования показали, что уровень экспрессии белка-индикатора клеточной пролиферативной активности Ki-67 является важным прогностическим фактором при различных видах рака, включая и рак легкого [5, 6]. Ki-67 – это ядерный белок, который экспрессируется во всех фазах клеточного цикла, за исключением фазы G0 (фазы покоя). Высокий уровень индекса клеточной пролиферации (ИП Ki-67) характеризует агрессивность опухолевого процесса, отрицательно влияя на дальнейший прогноз и выживаемость. Кроме того, недостаточный биопсийный материал может не отразить в полной мере выраженность внутриопухолевой гетерогенности и вызвать ошибки при морфологической диагностике [7].

Опубликованные данные наших предыдущих исследований и последнего десятилетия [6, 7] позволяют считать, что среднее содержание ДНК и уровень экспрессии белка Ki-67 коррелируют с пролиферативной активностью опухолевых клеток, однако, насколько нам известно, ни в одном исследовании не изучалась корреляция между данными показателями в зависимости от фенотипа злокачественных опухолей легкого.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Выявить корреляцию между ИН ДНК и ИП Ki-67 на основании различных вариантов фенотипа клеток злокачественных опухолей легкого в прогностическом аспекте.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе в работе были использованы результаты анализа 200 наблюдений рака легкого в областном онкологическом диспансере г. Волгограда за 10 лет с оценкой данных микроспектрофотометрического исследования содержания ДНК в ядрах клеток злокачественных опухолей легкого определенных гистологических типов.

На втором этапе была проведена морфологическая оценка операционного материала, полученного

у пациентов, которые проходили обследование в ГБУЗ «Волгоградский областной клинический онкологический диспансер» в 2017–2018 гг. и не получали специфического лечения. Полученный материал после фиксации в растворе 10%-го нейтрального формалина и проводки по спиртам возрастающей концентрации заливали в парафин. Изготавливали серийные срезы толщиной 4–5 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также применяли ИГХ-исследование в случаях умеренно- и низкодифференцированных опухолей, классифицировать которые не удавалось с помощью обзорной рутинной окраски. Для дальнейшего исследования были выбраны случаи эпителиальных опухолей легкого и сформированы следующие группы: 1-я – неороговевающая плоскоклеточная карцинома ($n = 12$); 2-я – базалоидная плоскоклеточная карцинома ($n = 3$); 3-я – солидная аденокарцинома ($n = 9$); 4-я – нейроэндокринная мелкоклеточная карцинома ($n = 15$). Все группы представлены малыми выборками.

На гистологических срезах, приготовленных из операционного материала, проводили ИГХ-исследование. Использовали моноклональные мышечные антитела к Ki-67 (клон SP 6 в разведении 1 : 100, Thermo Scientific), Cytokeratin 5/6 (клон D5/16B4 в разведении 1 : 50, Thermo Scientific), TTF-1 (клон 8G7G3/1 в разведении 1 : 50, Thermo Scientific), Chromogranin A (клон SP 12 в разведении 1 : 400, «Thermo Scientific»), Synaptophysin (клон SP 11 в разведении 1 : 200, Thermo Scientific), Keratin.Pan (клон AE1/AE3 в разведении 1 : 50, Thermo Scientific), CD56 (клон 56C04 в разведении 1 : 200, Thermo Scientific) для подтверждения соответствующего фенотипа клеток опухоли. Демаскировку антигенов проводили в PT MODULE Thermo Scientific с цитратным буфером Hier Buffer L (pH = 6,0) в течение 40 мин для Ki-67, TTF-1, Chromogranin A, Synaptophysin, CD56 с последующим охлаждением до 60 °C и с цитратным буфером Hier Buffer M (pH = 8,0) в течение 40 мин для Cytokeratin 5/6, Keratin.Pan с последующим охлаждением до 60 °C. В качестве системы визуализации использовали UltraVision Quanto Detection System (Thermo Scientific, USA) в аппарате Autostainer 480 S (Thermo Fisher Scientific, United Kingdom) с последующим докрасиванием ядер клеток гематоксилином Майера и заключением под покровное стекло при помощи автоматизированной системы Leica CV 5030 (Leica Geosystems, Switzerland).

Прролиферативную активность опухолевых клеток оценивали по ИП Ki-67, который представляет собой долю Ki-67-позитивных клеток (%) во всей клеточной популяции опухоли, при подсчете 1000 клеток. Подсчет клеток выполняли при помощи программного комплекса ImageJ для обработки изображений. Статистическую обработку полученных данных проводили с помо-

щью стандартного пакета статистических программ Statistica 10.0 и Microsoft Excel 2010. Результаты представлены в виде средних арифметических значений и ошибки средней величины ($M \pm m$). Корреляционная зависимость оценивалась при помощи коэффициента корреляции Пирсона. Статистические данные считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты микроспектрофотометрического исследования срезов, окрашенных по Фельгену, позволили судить о динамике изменения количества ДНК в ядрах клеток ростковых зон опухолевой ткани. В случаях умереннодифференцированной неороговевающей плоскоклеточной карциномы легкого модальным классом представлены октоплоидные и параоктоплоидные клетки (50,0 %). Сдвиг гистограммы вправо достигает значений 15с. ИН ДНК этой опухоли состав-

ляет 6,2 (рис., см. А, В). В случаях низкодифференцированной плоскоклеточной карциномы число клеток с содержанием ДНК выше 8с увеличивается до 55,3 %, причем гетерогенность, полиплоидия, анеуплоидия были более выражены по сравнению с умереннодифференцированной формой плоскоклеточной карциномы. ИН ДНК низкодифференцированной плоскоклеточной карциномы равен 7,3 (рис., см. 2А, 2В).

В случаях низкодифференцированной аденокарциномы легкого наблюдалась более выраженная полиплоидия, сдвиг гистограммы вправо увеличивался до 23с, а ИН ДНК составлял 9,5 (рис., см. 3А, 3В). Наиболее выраженный сдвиг гистограммы вправо наблюдается в случаях недифференцированной мелкоклеточной карциномы и достигает значений 52с. Подавляющее количество опухоли составляли клетки с содержанием ДНК в ядрах выше 8с (64,0 %). ИН ДНК повышается до 10,0 (рис., см. 4А, 4В). Модальные классы в гистограммах не устанавливаются.

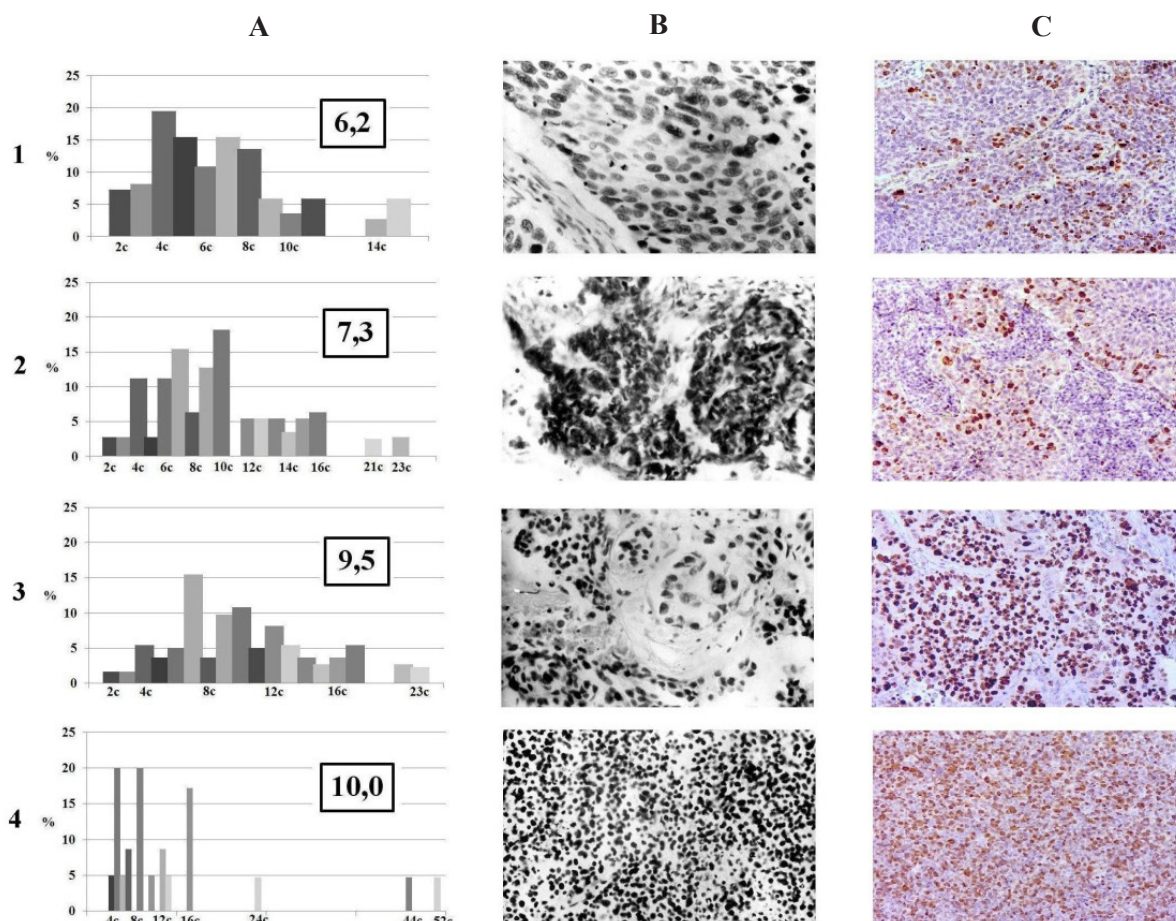


Рис. Содержание ДНК в ядрах клеток злокачественных опухолей легкого с различной степенью дифференцировки (микроспектрофотометрическое исследование) и иммуногистохимическая экспрессия фактора клеточной пролиферации Ki-67: 1 – неороговевающая плоскоклеточная карцинома; 2 – базалоидная плоскоклеточная карцинома; 3 – солидная аденокарцинома; 4 – нейроэндокринная мелкоклеточная карцинома. А – ИН ДНК, по оси ординат – количество клеток (%), по оси абсцисс – значения плоидности (с); В – реакция Фельгена, $\times 400$; С – экспрессия Ki-67, иммунопероксидазная реакция с DAB, $\times 400$

По результатам ИГХ-исследования значения ИП Ki-67 в случаях умереннодифференцированной неороговевающей плоскоклеточной карциномы (1-я группа, рис., см. 1С) колебались от 27,7 до 39,5 %, при этом значения ИП Ki-67 <30 % наблюдались в двух случаях, в остальных десяти случаях значения превосходили 30 %, и среднее значение ИП Ki-67 в данной группе составило $(33,1 \pm 2,11)$ %. Всего три случая составили группу низкодифференцированной базалоидной плоскоклеточной карциномы (2-я группа, рис., см. 2С). Значения ИП Ki-67 были равными 43,8; 48,4 и 50,6 % соответственно, среднее значение составило $(47,6 \pm 2,00)$ %. Кроме того, при отборе в данную группу учитывалась сплошная дольчатая архитектура опухоли с палисадным расположением клеток на периферии, небольшие размеры клеток, высокая частота митозов.

В данных двух группах иммунофенотип плоскоклеточных карцином был подтвержден по наличию интенсивной экспрессии Cytokeratin 5/6, а также отрицательной окраски на TTF-1, Chromogranin A, Synaptophysin. Наше исследование продемонстрировало, что в 13 случаях плоскоклеточных карцином опухолевые клетки обладали соответствующим иммунофенотипом и высокой степенью клеточной пролиферации: ИП Ki-67 >30 %, что согласуется с литературными данными [8].

Случаи низкодифференцированной солидной аденокарциномы (3-я группа, рис., см. 3С) были подтверждены хорошо выраженной экспрессией фактора транскрипции TTF-1, и отрицательной реакцией с другими антителами первичной дифференциально-диагностической панели: Cytokeratin 5/6, Chromogranin A, Synaptophysin. Сольдидная аденокарцинома характеризуется высоким уровнем экспрессии Ki-67, в наших наблюдениях значения ИП Ki-67 колебались от 59,8 % до 79,2 %, среднее значение составило $(66,03 \pm 2,18)$ %.

Нейроэндокринная мелкоклеточная карцинома (4-я группа, рис., см 4С) является низкодифференцированной опухолью и характеризуется высокой степенью злокачественности с ИП Ki-67 обычно >50 %, высокой митотической активностью, диффузным ростом в виде широких тяжей и пучков клеток [9, 10]. Иммунофенотип опухолей данной группы включал в себя позитивные реакции на Keratin.Pan, CD 56, Chromogranin A, Synaptophysin. Значения ИП Ki-67 колебались от 69,8 до 87,2 %, среднее значение составило $(78,57 \pm 1,39)$ %.

Микроспектрофотометрическое исследование содержания ДНК в ядрах клеток опухолей легкого выявило взаимосвязь между показателями среднего содержания ДНК и степенью дифференцировки новообразования. По мере ее снижения увеличивается ИН ДНК и резко изменяется клональный состав

опухоли в сторону увеличения числа клеток с полиплоидными значениями содержания ДНК в ядрах. Анализ пролиферативной активности Ki-67 выявил аналогичную закономерность: по мере снижения степени дифференцировки опухоли увеличивается ИП Ki-67 с учетом экспрессии соответствующих ИГХ-маркеров дифференциально-диагностических панелей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, оба оцениваемых индекса позволяют разграничить злокачественные образования легкого различной степени дифференцировки и агрессивности. При этом корреляционный анализ демонстрирует статистически значимую сильную взаимосвязь ($r = 0,987$, $p < 0,05$) между содержанием ДНК в ядрах и пролиферативной активностью различных типов эпителиальных злокачественных опухолей легкого в зависимости от иммунофенотипических характеристик их клеток. Полученные данные подтверждают целесообразность сравнительного анализа ИН ДНК и ИП Ki-67 в целях диагностики, прогнозирования, а также могут быть учтены при выборе тактики лечения с позиции персонализированной медицины.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2021 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М., 2022. 239 с.
2. Travis W.D., Brambilla E., Nicholson A.G. et al. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *Journal of Thoracic Oncology*. 2015;10(9):1243–1260.
3. Шикеева А.А., Кекиева Т.В., Завалишина Л.Э. и др. Аллельные нарушения у пациентов немелкоклеточным раком легкого. *Архив патологии*. 2013;75(2):3–8.
4. Мехеда Л.В., Карева Л.П., Богатырев В.Н. Возможности цитологической диагностики при заболеваниях легких. *Новости клинической цитологии России*. 2010;14(3-4):5–14.
5. Chen C., Zhu W.D., Zhang X.H. et al. Value of Ki-67 and computed tomography in the assessment of peripheral lung adenocarcinoma. *Journal of Biomedical Science*. 2016;73(1):32–37.
6. Park S., Lee E., Rhee S. et al. Correlation between Semi-Quantitative ^{18}F -FDG PET/CT Parameters and Ki-67 Expression in Small Cell Lung Cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2016;50(1):24–30.
7. Zhou B., Xu J., Tian Y. et al. Correlation between radiomic features based on contrast-enhanced computed tomography images and Ki-67 proliferation index in lung cancer: A preliminary study. *Thorac Cancer*. 2018;9(10):1235–1240.

8. Masuda D., Masuda R., Matsuzaki T. et al. Ki-67 labeling index affects tumor infiltration patterns of lung squamous cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports*. 2015; 12(5):7303–7309.

9. Делекторская В.В. Нейроэндокринные опухоли легкого: современная классификация и алгоритм морфологической диагностики. *Успехи молекулярной онкологии*. 2017; 4(2):46–58.

10. Travis W.D. Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Modern Pathology*. 2012;25:S18–S30.

REFERENCES

1. The state of oncological care for the population of Russia in 2021. A.D. Kaprina, V.V. Starinsky, A.O. Shahzadovoi (eds.). Moscow, 2022. 239 p. (In Russ.).

2. Travis W.D., Brambilla E., Nicholson A.G. et al. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *Journal of Thoracic Oncology*. 2015;10(9):1243–1260.

3. Shikeeva A.A., Kekeeva T.V., Zavalishina L.E. et al. Allelic disorders in patients with non-small cell lung cancer. *Arkhiv patologii = Pathology Archive*. 2013;75(2):3–8. (In Russ.).

4. Meheda LV, Kareva LP, Bogatyrev VN. Possibilities of cytological diagnostics in lung diseases. *Novosti klinicheskoi tsitologii Rossii = News of clinical cytology of Russia*. 2010; 14(3-4):5–14. (In Russ.).

5. Chen C., Zhu W.D., Zhang X.H. et al. Value of Ki-67 and computed tomography in the assessment of peripheral lung adenocarcinoma. *Journal of Biomedical Science*. 2016;73(1):32–37.

6. Park S., Lee E., Rhee S. et al. Correlation between Semi-Quantitative 18F-FDG PET/CT Parameters and Ki-67 Expression in Small Cell Lung Cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2016;50(1):24–30.

7. Zhou B., Xu J., Tian Y. et al. Correlation between radiomic features based on contrast-enhanced computed tomography images and Ki-67 proliferation index in lung cancer: A preliminary study. *Thorac Cancer*. 2018;9(10):1235–1240.

8. Masuda D., Masuda R., Matsuzaki T. et al. Ki-67 labeling index affects tumor infiltration patterns of lung squamous cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports*. 2015; 12(5):7303–7309.

9. Delector V.V. Neuroendocrine lung tumors: modern classification and algorithm of morphological diagnostics. *Uspekhi molekulyarnoi onkologii = Advances in molecular oncology*. 2017;4(2):46–58. (In Russ.).

10. Travis W.D. Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Modern Pathology*. 2012;25:S18–S30.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Информация об авторах

Виктор Владимирович Ермилов – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры судебной медицины, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; vladimirovich2001@hotmail.com

Михаил Владимирович Букатин – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фундаментальной медицины и биологии, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; buspak76@mail.ru

Мария Сергеевна Затямина – аспирант кафедры теоретической биохимии с курсом клинической биохимии, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; sandy535@mail.ru

Ольга Николаевна Барканова – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой фтизиопульмонологии, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; barkmed@mail.ru

Вячеслав Борисович Барканов – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой судебной медицины, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; barkanoff@mail.ru

Наталья Александровна Колобродова – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фундаментальной медицины и биологии, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; medbiochem@mail.ru

Ольга Юрьевна Кузнецова – кандидат биологических наук, доцент кафедры фундаментальной медицины и биологии, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; umkbio@mail.ru

Татьяна Николаевна Щербакова – кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры биологии Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; serxacheva@mail.ru

Анастасия Витальевна Соколова – студентка медико-биологического факультета, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; sokolooovaaaa@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 14.11.2022; одобрена после рецензирования 03.02.2023; принята к публикации 12.05.2023.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Information about the authors

Viktor V. Ermilov – Doctor of Medical Sciences, Professor, Professor of the Department of Forensic Medicine, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; vladimirovich2001@hotmail.com

Mikhail V. Bukatin – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Fundamental Medicine and Biology, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; buspak76@mail.ru

Maria S. Zatyamina – Postgraduate student of the Department of Theoretical Biochemistry with a course in Clinical Biochemistry, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; candy535@mail.ru

Olga N. Barkanova – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Phthisiopulmonology, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; barkmed@mail.ru

Vyacheslav B. Barkanov – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Forensic Medicine, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; barkanoff@mail.ru

Natalia A. Kolobrodova – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Fundamental Medicine and Biology, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; medbiochem@mail.ru

Olga Yu. Kuznetsova – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Fundamental Medicine and Biology, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; umkbio@mail.ru

Tatyana N. Shcherbakova – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Biology Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; serxacheva@mail.ru

Anastasia V. Sokolova – Student of the Faculty of Medicine and Biology, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; sokolooovaaaa@yandex.ru

The article was submitted 14.11.2022; approved after reviewing 03.02.2023; accepted for publication 12.05.2023.