

студентов; данная проблема требует дальнейшего изучения.

Мы планируем анкетирование студентов немедицинских высших учебных заведений, что позволит получить более достоверные данные о распространении данной проблемы среди молодого населения г. Иркутска, выявить структуру данной патологии и спланировать подходы к её возможному решению.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балашова Т.Н., Волкова Е.Н., Инсурина Г.Л. и др. Фетальный алкогольный синдром. — СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2012. — С. 3–51.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. — М.: Практика, 1999. — 459 с.
3. Голенков А.В. Пограничные психические расстройства у студентов Чувашии. — Чебоксары: Чуваш. ун-т, 1996. — 116 с.
4. Голенков А.В., Андреева А.П., Булыгина И.Е. Частотно-количественные показатели и мотивы потребления алкогольных напитков студентами медиками // Наркология. — 2009. — №10. — С. 25–29.
5. Завьялов В.Ю. Психологические аспекты форми-

рования алкогольной зависимости. — Новосибирск: Наука. Сиб. отд., 1988. — 198 с.

6. Иванов Н.Я., Личко А.Е. Патохарактерологический диагностический опросник для подростков: Краткое руководство. — М., СПб.: Фолиум, 1994. — 64 с.

7. Личко А.Е., Битенский В.С. Подростковая наркология: Руководство. — Л.: Медицина, 1991. — 304 с.

8. Михалевиц И.М., Алфёрова М.А., Рожков Н.Ю. Основы прикладной статистики. — Иркутск: РИО ИГИУВа, 2008. — 101 с.

9. Немчин Т.А., Цыцарев С.В. Личность и алкоголизм. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1989. — 192 с.

10. Программа первоочередных мер государственной антиалкогольной политики, Москва. — Август, 2006. — http://www.sbnt.ru/files/project_AntiAlkoProgram.doc (дата обращения: 01.03.14).

11. Серия технических докладов, 944. Каталог публикаций ВОЗ. Комитет экспертов ВОЗ по проблемам, связанным с потреблением алкоголя. — Женева, 10–13 октября. — 2006. — 66 с.

12. Ganaraja B., Kotian M., Bhat R. et al. Alcohol expectancy responses from first year medical students: are they prone to alcoholism? // Indian J. Med. Sci. — 2007. — Vol. 61, N 9. — P. 511–516.

13. Young R., Connor J., Ricciardelli L. et al. The role of alcohol expectancy and drinking refusal self-efficacy beliefs in university student drinking // Alcohol & Alcoholism. — 2006. — Vol. 41, N 1. — P. 70–75.

УДК 611.018.825: 616.345-006.66-036: 616-091-076-079

Т15

НИЗКИЙ УРОВЕНЬ ПРОЛИФЕРАЦИИ – НЕБЛАГОПРИЯТНЫЙ ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ ПРИЗНАК ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Григорий Александрович Раскин^{1*}, Семён Венедиктович Петров²

¹Российский научный центр радиологии и хирургических технологий, Санкт-Петербург,

²Казанский государственный медицинский университет

Реферат

Цель. Сопоставить пролиферативную активность клеток аденокарциномы толстой кишки со стадией опухолевого процесса и выживаемостью пациентов.

Методы. Иммуногистохимически исследовали экспрессию белка Ki-67 в первичных опухолях от 217 больных аденокарциномой толстой кишки. Гистологические срезы после демаскировки антигенов и ингибирования эндогенной пероксидазы 3% раствором водорода пероксида (перекиси водорода) окрашивали с использованием антител к белку Ki-67 (клон SP6, разведение 1:300) и полимерной системой детекции, в качестве хромогена использовали диаминобензидин. Контроль окрашивания ядер осуществляли при помощи гематоксилина Майера.

Результаты. При оценке пролиферативной активности в аденокарциноме толстой кишки выявлено существенное отличие доли случаев с экстремально высоким уровнем пролиферации (>70%) и относительно-низким (<30%) в группах с метастатическим и неметастатическим раком. При анализе пролиферативной активности опухолей у пациентов с прослеженным безрецидивным периодом оказалось, что в 21 (95%) случае из 22 пролиферация была выше 70%, лишь в одном наблюдении пролиферация по Ki-67 была 60%. Ни одного случая из последней группы с уровнем пролиферации менее 50% выявлено не было. При статистическом анализе оказалось, что у пациентов с метастатической аденокарциномой толстой кишки пролиферативный уровень достоверно ниже в сравнении с аденокарциномами без метастазов ($p=0,0019$). В наших исследованиях было клиническое наблюдение с агрессивной формой аденокарциномы толстой кишки с метастазами в сальник, брюшину и пупочную область у 28-летнего пациента. Пролиферативная активность, измеренная по Ki-67, составила в данном случае 20%.

Вывод. Низкая пролиферативная активность в аденокарциноме толстой кишки — плохой прогностический признак с точки зрения развития метастазов и рецидивов.

Ключевые слова: Ki-67, пролиферация, аденокарцинома толстой кишки, прогноз.

LOW PROLIFERATIVE LEVEL IS A POOR PROGNOSTIC FACTOR FOR COLON ADENOCARCINOMA
G.A. Raskin¹, S.V. Petrov². ¹Russian Research Centre for Radiology and Surgical Technologies, Saint-Petersburg, Russia, ²Kazan State Medical University, Kazan, Russia. **Aim.** To match up the proliferative activity of colon adenocarcinoma cells with tumor stage and survival rate. **Methods.** Ki-67 protein expression was evaluated by immunohistochemical methods in 217 patients with primary colon adenocarcinoma. After epitope retrieval and endogenous peroxidase inhibiting by 3% solution of

hydrogen peroxide, histologic samples were stained by antibodies to Ki-67 protein (clone SP6, dilution 1:300) and polymer systemic detection with diaminobenzidine as a chromogenic substrate. Nuclear counterstain was performed using Mayer's hematoxylin solution. **Results.** Assessment of colon adenocarcinoma proliferative activity showed a significant difference between the number of cases with high (>70%) and relatively low (≤30%) proliferative levels in groups with metastatic cancers and non-metastatic tumors. In patients with no relapses, colon adenocarcinoma proliferative activity assessment showed proliferation level exceeding 70% in 21 (95%) out of 22 cases, in a single case proliferation level of 60% was found according to Ki-67, no cases of proliferation level lower than 50% was found. Statistical analysis showed that proliferative activity was significantly lower in patients with metastatic colon adenocarcinoma compared to cases of adenocarcinoma without metastases ($p = 0.0019$). We observe one clinical case of aggressive colon adenocarcinoma with omental, peritoneal, paraumbilical metastases in 28-year old patient, in whom proliferative activity by Ki-67 was measured as 20%. **Conclusion.** Low proliferative level in colon adenocarcinoma is a poor prognostic factor for possible metastasing and cancer recurrence.

Keywords: Ki-67, proliferation, colon adenocarcinoma, prognosis.

Колоректальный рак — одна из наиболее распространённых злокачественных опухолей, которая также занимает лидирующие позиции по летальности от рака в мире [3]. Несмотря на то, что основным методом лечения служит оперативное вмешательство, с 1990 г. у пациентов с метастазами в лимфатические узлы стандартной считают адъювантную химиотерапию [2, 8]. Поиск молекулярных маркёров с прогностическим или предиктивным эффектом важен для подбора соответствующего лечения пациентам для исключения ненужных препаратов с токсичными побочными эффектами.

Пролиферация опухолевых клеток — неотъемлемая черта злокачественной опухоли, часто связанная с её агрессивностью. Белок Ki-67 экспрессируется с G1- по M-фазу клеточного цикла, с его помощью можно оценивать пролиферирующий пул клеток. Ядерный белок Ki-67 кодируется геном *MKI67*, локализованным на хромосоме 10 (10q25-qter). Он относится к семейству перихромонуклеиновых протеинов, окружающих хромосомы в течение митоза. Ki-67 впервые описан Gerdes и соавт. в 1983 г. на клеточной линии, полученной из лимфомы Ходжкина [5]. Так как Ki-67 выявлялся только в делящихся клетках, его стали широко применять как маркёр пролиферации [6].

В интерфазе Ki-67 входит в состав гетерохроматина в области ядрышек [9], начиная с поздней стадии G1, участвует в формировании малых гранул в ядре, а в дальнейшем в фазах G2 и S — больших фокусов гетерохроматина с ядрышками. В M-фазе локализация Ki-67 полностью изменяется, переходя на поверхность конденсированных хромосом [12].

Было высказано много предположений относительно функций Ki-67 в митозе. Одни авторы утверждали, что такая локализация Ki-67 на поверхности хромосом является лишь распределением ядерных белков в дочерние клетки. Другие считали, что Ki-67 играет важную роль в конденсации и

деконденсации хромосом. Эксперименты, проведённые Starborg [12] и Schluter [11], показали, что Ki-67 жизненно необходим в митозе клетки и что при его нейтрализации митоз останавливается.

В литературе существуют противоречивые данные о влиянии уровня пролиферации на прогноз при аденокарциноме толстой кишки. Целью исследования было сопоставить пролиферативную активность со стадией опухолевого процесса и выживаемостью пациентов.

Был исследован материал первичных опухолей от 217 больных, получавших лечение в Городском клиническом онкологическом диспансере Санкт-Петербурга и 122-й клинической больнице (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика пациентов

Количество случаев	Распределение по стадиям	Средний возраст, годы	Распределение по полу
217	I-II — 55 (25%), IV — 162 (75%)	59	М: 104 (48%), Ж: 157 (52%)

Иммуногистохимическое исследование. Материал поступал в виде как парафиновых блоков, так и кусочков опухолей, залитых в 10% буферный формалин. В последнем случае выполняли вырезку материала и доведение фиксации в формалине до 24 ч. Затем проводили материал в 10 порциях изопропилового спирта и 3 парафинах. Приготавливали блоки, с них осуществляли срезы толщиной 4 мкм, которые помещали на стёкла с поли-L-лизиновым покрытием. Срезы подсушивали, депарафинировали и подвергали демаскировке антигенов при помощи цитратного буфера в условиях водяной бани, $t=95^\circ\text{C}$, 30 мин. После этого они остывали при комнатной температуре и промывались трис-буфером с твином. Каждый срез обводили парафиновым карандашом

Таблица 2

Уровень пролиферации в аденокарциномах толстой кишки в зависимости от метастатического статуса (n=217)

Пролиферация по Ki-67	Метастатическая форма	Неметастатическая форма
Ki-67 ≤30%	30 (18,5%)	2 (3,6%)
30% <Ki-67 ≤50%	40 (24,7%)	5 (9,1%)
50% <Ki-67 ≤70%	49 (30,3%)	19 (34,5%)
Ki-67 >70%	43 (26,5%)	29 (52,8%)
Всего случаев	162	55

шом, после чего осуществляли ингибирование эндогенной пероксидазы 3% раствором водорода пероксида (перекиси водорода) в течение 20 мин. Затем на каждый срез наносили первое антитело (Ki-67, клон SP6, разведение 1:300), экспозиция длилась 30 мин на термостойке в условиях «водяной бани» при температуре 30 °С.

Для визуализации реакции антиген-антитело применяли полимерную систему детекции «EnVision» компании «ДАКО», в качестве хромогена использовали диаминобензидин. Контр-окрашивание ядер осуществляли при помощи гематоксилина Майера. После каждого из этапов до окрашивания диаминобензидином стёкла со срезами промывали в трис-буфере с твином

(pH=7,1) фирмы «BioOptica». Стёкла заключали в среду «BioMaunt» фирмы «BioOptica».

Мы проанализировали уровень пролиферации, определённый по Ki-67, в случаях аденокарциномы толстой кишки с метастазами и без них. Все случаи по пролиферативному уровню были разделены на группы: меньше 30%; больше 30%, но меньше 50%; больше 50%, но меньше 70%; больше 70% (табл. 2).

Как видно из табл. 2, в группе аденокарцином без метастазов было два наблюдения, в которых пролиферация была ниже 30%. Однако необходимо учитывать, что оценка метастатического статуса в данной группе осуществлялась до операции при помощи компьютерной томографии и на удалённом материале гистологически (в группу вошли только те пациенты, у которых было забрано для исследования не менее 16 лимфатических узлов). Таким образом, выявленные два случая с относительно низким уровнем пролиферации могут быть сомнительны в плане метастатического потенциала, так как не был прослежен безрецидивный период. Если сравнить распределение случаев по уровню пролиферации в зависимости от метастатического потенциала, то мы увидим следующие кривые (рис. 1).

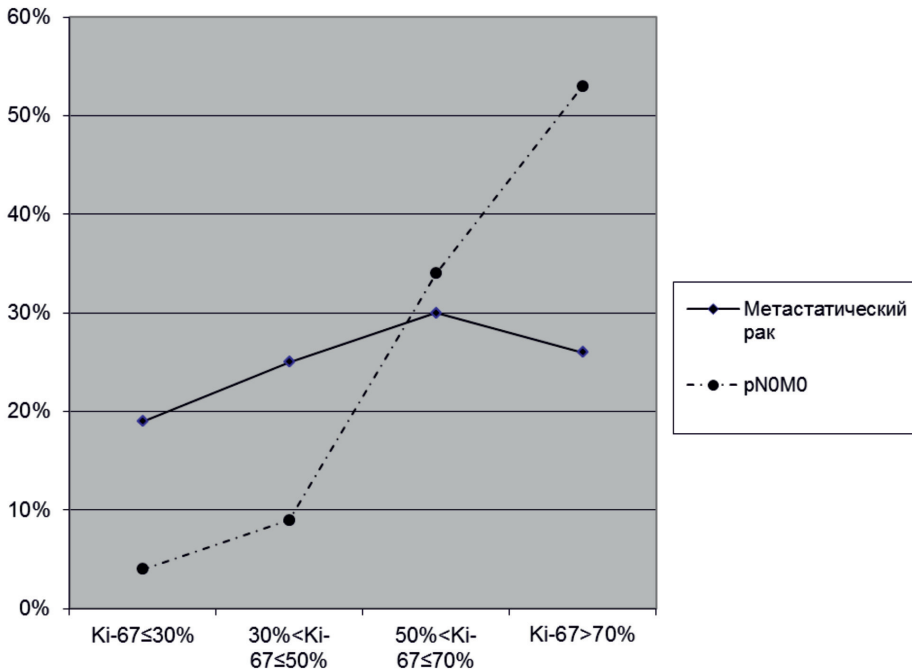


Рис. 1. Распределение случаев аденокарциномы толстой кишки в зависимости от пролиферативного уровня в категориях с метастатическим раком и раком pN0M0.

Как видно из рис. 1, пересечение кривых произошло в области [50%; 70%], но если для кривой метастатического рака это точка экстремума, то для неметастатического — точка с максимальным ростом. Точка экстремума для случаев **pNOMO лежит в области >70%**, то есть с максимальным пролиферативным уровнем.

Если сопоставить уровень пролиферации в группах с метастатическими аденокарциномами толстой кишки и неметастатическими опухолями с составлением таблицы сопряжения 2×2, то мы увидим следующую картину (табл. 3).

Таблица 3

Таблица сопряженности 2×2 для метастатической и неметастатической аденокарцином с уровнем пролиферации до 30% и превышающим 70%

	Метастатическая форма	Неметастатическая форма	
Пролиферация по Ki-67 ≤30%	30 (41%)	2 (6%)	$\chi^2=10,6883$, $p=0,0019$
Пролиферация по Ki-67 >70%	43 (59%)	29 (94%)	

Как видно из табл. 3, существует значительное отличие доли случаев с экстремально высоким уровнем пролиферации (>70%) и относительно низким (≤30%) в группах с метастатическим и неметастатическим раком. Это подтверждает наше предположение о том, что низкий уровень пролиферации в аденокарциномах толстой кишки — плохой прогностический признак. Высокий же уровень пролиферации не имеет самостоятельного прогностического значения.

Для подтверждения данных выводов мы провели исследование на группе аденокарцином с прослеженным 5-летним клиническим периодом. Отличием данных случаев является тот факт, что у пациентов был прослежен 5-летний период, и в группу вошли только те пациенты, у которых не было метастазирования и рецидивов в течение этого времени.

В 21 (95%) из 22 случаев пролиферация по Ki-67 была выше 70%, лишь в 1 наблюдении она составила 60%. Ни 1 случая с прослеженным 5-летним безрецидивным периодом и без развития метастазов с уровнем пролиферации менее 50% выявлено не было. Таким образом, это подтверждает наше

предположение о том, что низкий уровень пролиферации в аденокарциномах толстой кишки — плохой прогностический признак. Более того, в 2 случаях с низким уровнем пролиферации из предыдущей группы следует ожидать в будущем развития метастазов или рецидива.

Эта позиция позволяет понять данные предыдущего нашего исследования, где крайне высокая пролиферативная активность в аденокарциномах толстой кишки не сопровождалась высокой эффективностью химиотерапии, более того, все 9% случаев с низкой пролиферативной активностью имели регионарные или отдаленные метастазы [1].

К схожим результатам пришли E.C. Fluge и соавт. [4], показав, что высокий пролиферативный уровень (>40%) является хорошим прогностическим маркером для безрецидивного течения заболевания у пациентов с аденокарциномами ободочной кишки. Высокий уровень пролиферации наблюдается в ранних неметастатических формах аденокарцином толстой кишки [7].

E.B. Salminen и соавт. [10] показали, что высокий пролиферативный уровень, определённый по Ki-67, — хороший прогностический фактор для выживаемости пациентов в сравнении с низкой пролиферативной активностью.

В наших исследованиях было клиническое наблюдение с агрессивной формой аденокарциномы толстой кишки с метастазами в сальник, брюшину и пупочную область у 28-летнего пациента. Пролиферативная активность, определённая по Ki-67, составила в данном случае 20%.

ВЫВОД

Низкая пролиферативная активность в аденокарциномах толстой кишки — плохой прогностический признак с точки зрения развития метастазов и рецидивов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Раскин Г.А., Орлова Р.В., Петров С.В., Протасова А.Э. Иммуногистохимическое исследование аденокарциномы толстой кишки для оценки прогностических факторов // Вестн. Санкт-Петербург. ун-та. — 2012. — Серия 11. — №1. — С. 172-182.
2. Belac-Lovasic I., Petković M., Ferrari A.M. Evaluation of adjuvant chemotherapy in patients with colorectal cancer in Primorsko-Goranska and Istarska County — a twenty years retrospective study // Coll. Antropol. — 2011. — Vol. 35. — P. 111-114.
3. Ferlay J., Shin H.R., Bray F. et al. GLOBOCAN 2008 v2.0, cancer incidence and mortality worldwide: IARC

CancerBase No. 10 [Internet]. — Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. — Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.

4. *Fluge III., Gravdal K., Carlsen E. et al.* Expression of EZH2 and Ki-67 in colorectal cancer and associations with treatment response and prognosis // *Br. J. Cancer.* — 2009. — Vol. 101, N 8. — P. 1282–1289.

5. *Gerdes J., Schwab U., Lemke H., Stein H.* Producing of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation // *Int. J. Cancer.* — 1983. — Vol. 31. — P. 13–20.

6. *Gerdes J.* Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies // *Semin. Cancer Biol.* — 1990. — Vol. 1. — P. 99–106.

7. *Hoos A., Nissan A., Stojadinovic A. et al.* Tissue microarray molecular profiling of early, node-negative adenocarcinoma of the rectum. A comprehensive analysis // *Clin. Cancer Res.* — 2002. — Vol. 8 — P. 38–41.

8. *Moertel C.G., Fleming T.R., Macdonald J.C. et al.* 5-FU plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: a final report // *Ann.*

Intern. Med. — 1995. — Vol. 122. — P. 321–326.

9. *Saiwaki T., Kotera I., Sasaki M. et al.* *In vivo* dynamics and kinetics of pKi-67: transition from a mobile to an immobile form at the onset of anaphase // *Exp. Cell Res.* — 2005. — Vol. 308, N 1. — P. 123–134.

10. *Salminen E., Palmu S., Vahlberg T. et al.* Increased proliferation activity measured by immunoreactive Ki-67 is associated with survival improvement in rectal/recto sigmoid cancer // *World J. Gastroenterol.* — 2005. — Vol. 11, N 21. — P. 3245–3249.

11. *Schluter C., Duchrow M., Wohlenberg C. et al.* The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins // *J. Cell. Biol.* — 1993. — Vol. 123, N 3. — P. 513–522.

12. *Starborg M., Gell K., Brundell E., Hoog C.* The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression // *J. Cell. Sci.* — 1996. — Vol. 109. — Pt. 1. — P. 143–153.

Уважаемые читатели!

Продолжается подписка на II полугодие 2014 года на «Казанский медицинский журнал»

Тематика «Казанского медицинского журнала» охватывает широкий круг самых актуальных проблем по терапии, хирургии, акушерству и гинекологии, онкологии, фтизиатрии, неврологии и психиатрии, ортопедии и травматологии, социальной гигиене и др. В статьях даётся описание современных методов лечения и диагностики с помощью новейшего медицинского оборудования. Журнал информирует о съездах и конференциях, проводимых как в нашей стране, так и за рубежом.

Решением Высшей аттестационной комиссии Министерства образования и науки России «Казанский медицинский журнал» включён в перечень периодических научных изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых рекомендуется публикация основных результатов диссертаций на соискание учёной степени кандидата и доктора наук. Тираж журнала удостоверяется Национальной тиражной службой РФ.

Редакционная цена на II полугодие 2014 г. на «Казанский медицинский журнал» — 450 руб. без почтовых расходов на пересылку. Подписка осуществляется во всех отделениях связи.

Статьи от авторов принимаются только при наличии ксерокопий квитанций о подписке на 2014 год.

Индекс журнала — 73205