

## ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ АНЕУПЛОЇДІЇ ТА ПОЛІПЛОЇДІЇ У КОЛОРЕКТАЛЬНОМУ КАНЦЕРОГЕНЕЗИ

М. Лозинська<sup>1</sup>, Р. Лозинський<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»  
вул. М. Лисенка, 31-а, Львів 79000, Україна  
e-mail: maria\_lozynska@ukr.net

<sup>2</sup>ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України»  
вул. Генерала Чупринки, 45, Львів 79044, Україна

Проведено вивчення каріотипу зразків новоутворень товстої кишки, отриманих від 58 пацієнтів, мешканців західних областей України. Найбільш типовою хромосомною аномалією у гіперпластичних поліпах, а також у аденомах була анеуплоїдія 13, 7, 20 хромосом. Перетворення тубулярних у тубулярно-ворсинчасті й ворсинчасті аденоми супроводжувалося збільшенням кількості хромосомних аномалій і розширенням їх спектра. Більшість аденокарцином мали полісомний каріотип із наближеними до триплоїдного, тетраплоїдного чи з більшою кількістю хромосомних наборів. Поява додаткових копій 20, 7, 2 і 5 хромосом, а також алейні втрати 18, 17, 6, 14 хромосом, моносомія і структурні перебудови 1-ї хромосоми та делеції різних за розміром ділянок хромосом мали важливе значення у пухлинній прогресії.

*Ключові слова:* гіперпластичні поліпи, аденоматозні поліпи, анеуплоїдія, поліплоїдія, колоректальний рак.

Дослідження механізмів канцерогенезу товстої кишки є важливою проблемою сьогодення у зв'язку з невинним ростом захворюваності на колоректальний рак (КРР), який визнано для осіб обох статей одним із найбільш частих злоякісних новоутворень (ЗН). Україна за захворюваністю на цю патологію посідає 10 місце у світі [1, 4]. Протягом другої половини ХХ та початку ХХІ століття між двома напрямками дослідження раку йдуть дебати про механізми канцерогенезу. Прихильники першого вважають, що канцерспецифічний фенотип є результатом багатоступневих мутацій, які зумовлюються домінуючими онкогенами чи інактивуються рецесивними генами-супресорами пухлин (генна теорія раку); прихильники другого – підтримують ідею, що канцер-специфічний фенотип є результатом впливу тисячі нормальних генів, доза яких змінена в результаті пересортування відповідних хромосом чи анеуплоїдії (хромосомна теорія раку) [7, 8, 12, 14]. Канцерогенез є рідкісним процесом, при якому нормальні клітини перетворюються в ракові шляхом багатоступневих процесів і стадій клітинної еволюції, що відповідає різним передраковим фенотипам і генотипам. На основі різних генетичних, у тому числі цитогенетичних маркерів, більшість вважають можливим виникнення раку з однієї клітини (клональне походження), інші дотримуються гіпотези поліклонального походження раку. Однак рідко дві ракові клітини бувають однаковими. Предметом обговорення залишаються механізми генетичної нестабільності, а саме вивчення анеуплоїдії і поліплоїдії [16]. Одним із ключових пояснень канцерспецифічного фенотипу є порушення функціонування кількох тисяч нормальних генів у результаті анеуплоїдії чи пересортування відповідних хромосом, що призводить до зміненої дози цих генів [6]. І хоча молекулярно-генетичні методи дещо витіснили з практики застосування цитогенетичний аналіз солідних пухлин, однак його інформативність, особливо при дослідженні клітин *in vivo*, і порівняна доступність не викликає сумнівів. На

сьогодні літературні дані стосовно прогностичного значення різних хромосомних перебудов та їх комбінації у розвитку раку є досить суперечливими і неоднозначними [11, 18, 19], хоча вважається, що ініціюючим генотипом ракових клітин є анеуплоїдія – порушення балансу хромосом, що сприяє процесові малігнізації [9, 10, 11, 13, 14, 17]. Тому пошук інформативних цитогенетичних маркерів безпосередньо в новоутвореннях має наукове значення для розуміння механізмів канцерогенезу та практичну цінність для ранньої діагностики КРР. Метою роботи було оцінити прогностичне значення анеуплоїдії та поліплоїдії на різних етапах переродження епітелію товстої кишки.

#### Матеріали та методи

Проведено вивчення каріотипу зразків новоутворень у 35 пацієнтів із різними за морфологічною будовою поліпами та 23 пацієнтів із аденокарциномою товстої кишки, що мали клінічно, ендоскопічно й гістологічно підтверджений діагноз. Пацієнти були мешканцями Львівської, Тернопільської, Закарпатської та Івано-Франківської областей України. Серед обстеженої групи осіб у 9 пацієнтів були виявлені гіперпластичні поліпи (ГПП), а у 26 – аденоматозні. Отримані зразки аденокарцином були взяті з різних відділів товстої кишки. За локалізацією у 15 (65,2%) пацієнтів пухлини містились у прямій кишці, у решти 8 (34,8%) – в ободовій кишці. За ступенем диференціювання 9 пухлин були високо диференційованими, 12 – помірно диференційованими та 2 – низько диференційованими. Препарати метафазних хромосом із поліпів отримували за стандартним методом [15] із власною модифікацією етапів фіксації клітин. Використовували розчин колхіцину в кінцевій концентрації 0,5 мкг/мл. Проводили гіпотонізацію клітин у суміші розчину хлористого калію (0,075М). Клітини фіксували в охолодженому розчині етилового спирту і льодяної оцтової кислоти й мацерували у розчині оцтової кислоти. Препарати із зразків аденокарцином виконували за авторським методом без синхронізації клітин метотрексатом і тривалого культивування, що може спотворювати об'єктивність результату, викликаючи селекцію клітин певного типу [3]. Зразок біоптату з пухлини переносили в чашку Петрі з культуральним середовищем RPMI і ембріональної телячої сироватки, додавали 10 мкг/мл розчину колхіцину та 100 мкг/мл розчину бромистого етидію. Гіпотонізацію проводили розчином суміші хлористого калію (0,075М) і 1%-ного цитрату натрію (1:1). Фіксували клітини у суміші етилового спирту і льодяної оцтової кислоти у співвідношенні 3:1 та проводили мацерацію клітин. Цитогенетичний аналіз виконували з використанням мікроскопа «Aristoplan» при збільшенні (10x100). Препарати аналізували диференційно по 7–15 метафазних пластинок зі зразка за допомогою G-методу з використанням барвника Романовського-Гімзи, розчиненого у фосфатному буфері.

#### Результати і їхнє обговорення

Цитогенетичне дослідження новоутворень товстої кишки становить значні труднощі у зв'язку з низьким рівнем проліферації клітин. Однак, незважаючи на це, агресивність цих пухлин і рівень метастазування є дуже високим. Це зумовлено анеуплоїдією, яка призводить до збільшення кількості копій багатьох сотень генів, і поліплоїдією [13, 14]. Особливий інтерес становить дослідження «пограничних» утворень із високим потенціалом неопластичних змін. До цієї групи відносять великі ГПП й аденоматозні поліпи змішаної будови з поєднанням гіперпластичного і аденоматозного компонентів. Вони вважаються неоплазіями проміжного типу, що виникають із зубчастої аденоми [2, 13]. У ГПП великого розміру та змішаного типу найчастіше траплялися додаткові копії 20, 7 і 13 хромосом, а також додаткові копії 14, 16, 17 та 19 хромосом. Такі ГПП мають бути повністю видалені. На рис. 1 наведено каріотип зразка ГПП з аденоматозним компонентом

із анеуплоїдією, зумовленою додатковими копіями 7, 19, 20 хромосом і структурною перебудовою 1 хромосоми (рис. 1).

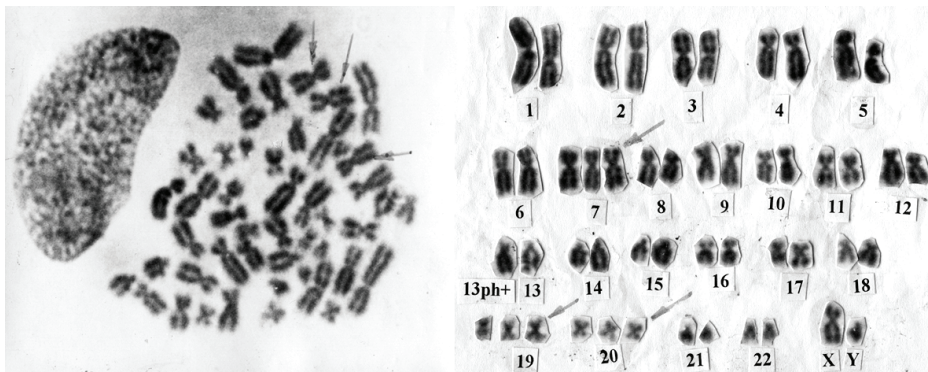


Рис. 1. Каріотип: 49, XY,del 1(q42.3-qter),+7,+19,+20 (зразок №3). Клон клітин №1. Стрілками вказано додаткові копії хромосом. Гіперпластичний поліп із аденоматозним компонентом. Локалізація поліпа: сигмоподібна кишка, Ø верхівки поліпа 4,0 см.

У малих ГПП в дистальних відділах товстої кишки неопластичне прогресування траплялося дуже рідко і каріотип був нормальним.

Широкий спектр аномалій у ГПП великого розміру з присутністю аденоматозного компонента свідчить про непластичний потенціал цих утворень. Найчастішими за морфологічною будовою доброякісними пухлинами товстої кишки виявилися аденоми. Найбільш типові хромосомні аномалії в аденомах були пов'язані з анеуплоїдією – трисомією 13, 7, 20 хромосом. У 10 (38,5%) пацієнтів із аденомами були підтверджені порушення, пов'язані з анеуплоїдіями хромосом. Результати виявлення найчастіших додаткових копій хромосом у різних за морфологічною будовою поліпах наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Анеуплоїдії хромосом у різних за морфологічною будовою поліпах товстої кишки

Морфологічна будова поліпів	Додаткові копії хромосом у зразках поліпів
Гіперпластичні поліпи («змішані» та >1 см) (ГПП)	+20(4), +7(2), +13(2), +14(1), +16(1), +17(1), +19(1)
Тубулярні аденоми (ТА)	+7(2), +13(2), +3(1)
Тубулярно-ворсинчасті аденоми (ТВА)	+13(3), +20(3), +7(1), +14(1), +15(1), +18(1)
Ворсинчасті аденоми (ВА)	+7(4), +13(3), +20(2), +16(1)
Разом	+13(10), +7(9), +20(9), +14(2), +16(2), +3(1), +15(1), +17(1), +18(1), +19(1)

**Примітка.** ( ) – кількість випадків із додатковими копіями хромосом.

Перетворення тубулярних у тубулярно-ворсинчасті й ворсинчасті аденоми супроводжувалося збільшенням кількості хромосомних аномалій і розширенням їх спектра. В одному зразку тубулярно-ворсинчастої аденоми та у двох зразках ворсинчастих аденом виявляли клони клітин із порушеною плоїдністю (3n, 4n, 5n) у поєднанні з нормальним каріотипом. Загальна кількість хромосомних аномалій у аденоматозних поліпах становила 13 (50,0%). Загальна кількість цитогенетичних аномалій, пов'язаних зі зміною кількості окремих хромосом (анеуплоїдією) та зі зміною плоїдності, становила у ГПП і тубулярних аденомах – 3 (33,3%), у тубулярно-ворсинчастих – 4 (44,4%), а у ворсинчастих – 6 (75,0%).

При поєднанні аденоми і аденокарциноми товстої кишки спостерігали аномальні клони клітин, що містили додаткові копії 13, 18 і 20 хромосом. У біоптатах аденокарцином аномалії хромосом було виявлено у 100% випадків. Колоректальні неопластичні новоутворення є наслідком комбінації різних типів пошкодження геному. На препаратах досліджених зразків аденокарцином ми спостерігали три різні типи порушення плоїдності: моносомний, змішаний та полісомний. Більшість аденокарцином мали полісомний каріотип із наближеними до триплоїдного, тетраплоїдного чи з більшою кількістю хромосомних наборів. У каріотипі аденокарцином виявляли також анеуплоїдні набори хромосом, представлені додатковими копіями 20, 7, 2, 5, 3, 16, 19, 20, 21, 22 хромосом у різних комбінаціях. Існує гіпотеза, що додаткові копії хромосом чи втрати хромосом пов'язані зі зміною експресії генів, і ця експресія залежить від розміщення перебудованих ділянок у копіях хромосом. Зміни в рівні експресії генів у пухлинах пов'язані з вмістом ДНК. Згідно з літературними даними, при КРР найчастіше ампліфікується хромосома 20 (зокрема, ділянка 20q13.2) [5, 20]. Невідомо точно, чи ампліфікація різних ділянок відбувається незалежно, чи синхронізовано. У пацієнта з помірно диференційованою аденокарциномою прямої кишки з ділянками низької диференціації з ділянками розпаду в одному і тому ж зразку аденокарциноми виявили додаткові копії 20-ї хромосоми від однієї до 10. Збільшення клональної різноманітності, селективне нагромадження копій певних хромосом поряд із моносомією інших, структурні перебудови ділянок хромосом, зумовлені різними за розміром делеціями, переважно великими, а також малими, які неможливо було ідентифікувати за допомогою традиційного G-методу диференційного забарвлення, були типовими для аденокарцином. Важливе значення в пухлинній прогресії мали алельні втрати 18, 17, 1, 3, 8, 14 хромосом, поява додаткових копій 20, 7, 2, 5, 3 і 16 хромосом і делеції певних ділянок хромосом. Моносомії та часткові моносомії 17, 18, 1, 3 хромосом призводили до пухлинної прогресії у зв'язку із присутністю в 18q і 17p хромосомах рецесивних генів супресорів пухлин, що мають важливе значення у виникненні КРР. У зразку пухлини пацієнтки з низькодиференційованою аденокарциномою товстої кишки переважав моносомний каріотип (модальна кількість від 41 до 44 хромосом) з втратою 6, 11, 14, 18, X-хромосоми, зі структурною перебудовою 1-ї хромосоми, маркерною делецією, а також анеуплоїдією – трисомією 3-ї хромосоми (рис. 2).

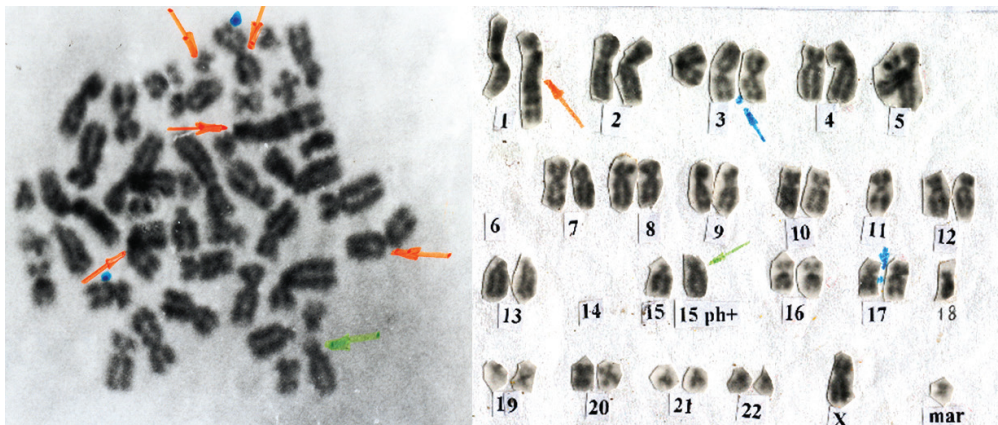


Рис. 2. Мікрофото. Каріотип: 41,X,rea(1),-6,-6,-14,-14,-18,+3,+mar,15ph+. Стрілками позначено ділянки хромосомних перебудов, хроматидних розривів і варіант 15qh+. Низькодиференційована аденокарцинома. Локалізація: низхідний відділ ободової кишки.

Згідно з літературними даними, експресія онкогенів (*N-RAS*, *SKI*), що містяться в хромосомі 1, також призводять до малігнізації клітин і прогресування КРР. Висока ймовірність мутацій 27 генів, розміщених у 3 хромосомі, підтверджує значення цієї хромосоми в колоректальному канцерогенезі [20].

Співвідношення анеуплоїдних і поліплоїдних наборів хромосом у новоутвореннях товстої кишки наведено на рис. 3.

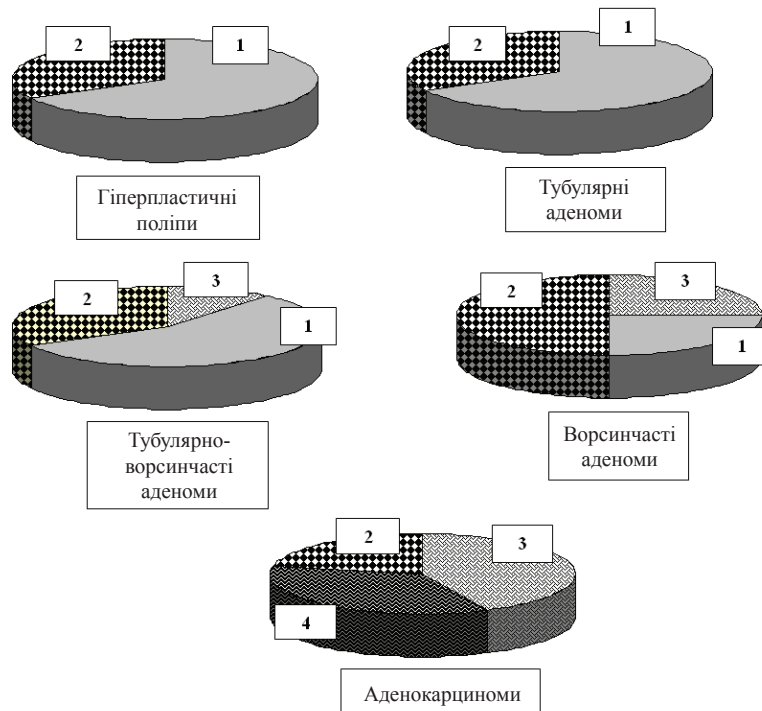


Рис. 3. Співвідношення анеуплоїдних і поліплоїдних наборів хромосом у новоутвореннях товстої кишки: 1 – кількість метафазних пластинок із диплоїдним набором хромосом; 2 – кількість метафазних пластинок із анеуплоїдним набором хромосом; 3 – кількість метафазних пластинок із поліплоїдним набором хромосом; 4 – кількість метафазних пластинок зі «змішаними» анеуплоїдними і поліплоїдними наборами хромосом.

Етапи перетворення аденоматозних поліпів на хромосомному рівні супроводжувалися збільшенням співвідношення анеуплоїдних клонів клітин щодо диплоїдних, з нормальним каріотипом, появою поліплоїдних наборів хромосом, наближених до  $3n$ ,  $4n$ ,  $5n$ .

Широкий спектр хромосомних аномалій, найчастіше анеуплоїдій 13, 7, 20 хромосом, у гіперпластичних поліпах великого розміру ( $> 1$  см) і «змішаних» поліпах із аденоматозним компонентом, свідчить про непластичний потенціал цих утворень.

Найбільш типові хромосомні аномалії в аденомах товстої кишки були пов'язані з анеуплоїдією – трисомією 13, 7, 20 хромосом. Етапи перетворення аденоматозних поліпів на хромосомному рівні супроводжувалися збільшенням співвідношення анеуплоїдних клонів клітин щодо диплоїдних, з нормальним каріотипом, появою поліплоїдних наборів хромосом, наближених до  $3n$ ,  $4n$ ,  $5n$ .

У зразках аденокарцином товстої кишки виявляли анеуплоїдні набори хромосом з додатковими хромосомами, найчастіше 20, 7, 2, 5, 19 та 16, та гіпоплоїдні (моносомні) набори з найчастішою втратою 18, 17, 6, 14 і 1 хромосом.

Клональна різноманітність із переважанням поліплоїдних наборів хромосом, наближених до 3n, 4n і 5n, була найбільш характерною цитогенетичною ознакою аденокарцином товстої кишки.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Гриневиц Ю. А., Юрїнова Л. Г.* Пухлинні маркери: вимоги до проведення аналізу, інтерпретація результатів їх визначення в онкологічній клініці // Лаб. діагн. № 1. 2004. С. 3–9.
2. *Никишаев В. И., Патий А. Р., Тумак И. Н., Коляда И. А.* Эндоскопическая диагностика раннего колоректального рака // Здоров'я України (Онкологія). 2012. Т. 20. № 1. С. 16–20.
3. Пат. на корисну модель 34834 Україна, МПК А61В 10/00 (2006). Спосіб приготування препаратів метафазних хромосом *in vivo* із аденокарцином товстої кишки для визначення спектра цитогенетичних змін при злоякісній трансформації епітелію в новоутвореннях товстої кишки / Лозинська М.Р.; заявник і патентовласник ДУ «Інститут спадкової патології АМН У». № u 2008 03282; заявл. 14.03.2008; опубл. 26.08.2008, Бюл. №16/2008.
4. *Спринсян Т.* «Опухоль и организм»: новые аспекты старой проблемы // Здоров'я України (Онкологія). 2010. Т. 5/6. С. 6–7.
5. *Albertson D. G., Collins C., McCornick F., Gray J. W.* Chromosome aberrations in solid tumors // Nat. Genet. 2003. Vol. 34. P. 369–376.
6. *Diep C. B., Kleivi K., Ribeiro F. R. et al.* The order of genetic events associated with colorectal cancer progression inferred from meta-analysis of copy number changes // Genes. Chromosomes. Cancers. 2006. Vol. 45. P. 31–41.
7. *Duesberg P., Li R.* Multistep carcinogenesis. A chain reaction of aneuploidizations // Cell Cycle. 2003. Vol. 2. N 3. P. 202–210.
8. *Duesberg P. H.* Are cancers dependent on oncogenes or an aneuploidy? // Cancer Genet. Cytogenet. 2003. Vol. 143. P. 89–9.
9. *Duesberg P., Li R.* Multistep carcinogenesis. A chain reaction of aneuploidizations // Cell Cycle. 2003. Vol. 2. N 3. P. 202–210.
10. *Duesberg P.* Chromosomal chaos and cancer // Scientific American. 2007. Vol. 296. N 5. P. 52–59.
11. *Duesberg P., Iokobuzio-Donahue C. A., Mandrioli D. et al.* Origin of metastases: subspecies of cancers generated by intrinsic karyotypic variations // Cell side. 2012. Vol. 11. N 6. P. 1151–1166.
12. *Fabarius A., Hehlmann R., Duesberg P.* Instability of chromosome structure in cancer cells increased exponentially with degrees of aneuploidy // Cancer Genet. Cytogenet. 2004. Vol. 2–3. N 143. P. 59–72.
13. *Holland A. J., Cleveland D. W.* Losing balance: the origin and impact of aneuploidy in cancer // EMBO Rep. 2012. Vol. 13. N 6. P. 501–514.
14. *Li R., Sonic A. S. R., Rasnick D., Duesberg P.* Aneuploidy vs gene mutation hypothesis of cancer: recent study claims mutation but is found to support aneuploidy // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97. P. 3236–3241.
15. *Longy M., Saura R., Schouler L. et al.* Chromosomal analysis of colonic adenomatous polyps // Cancer Genet. Cytogenet. 1990. Vol. 49. P. 249–257.
16. *McCormack A. A., Nikolson J. M. et al.* Cancer-causing karyotypes: chromosomal equilibria between destabilizing aneuploidy and stabilizing selection oncogenic function // Cancer Genet. Cytogenet. 2009. Vol. 188. N 1. P. 1–25.
17. *Nikolson J. M., Duesberg P.* On the karyotypic origin and evolution of cancer cells // Cancer Genet. Cytogenet. 2009. Vol. 194. N 2. P. 96–110.
18. *Noffsiger A. E.* Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy // Annu Rev. Pathol. 2009. N 4. P. 343–364.

19. Snover D. C., Ahnen D. J., Burt R. W. et al. Serrated polyps of the colon and rectum and serrated polyposis // WHO classification of tumors of the digestive tract. 2010. IARC; Lyon: 2010. P. 160–165.
20. Tsafir D., Bacolod M, Selvanayagam Z. et al. Relationship of gene expression and chromosomal abnormalities in colorectal cancer // Cancer Res. 2006. Vol. 66. N4. P. 2129–2136.

Стаття: надійшла до редакції 27.09.13

доопрацьована 09.12.13

прийнята до друку 12.12.13

## PROGNOSTIC VALUE OF ANEUPLOIDY AND POLYPLOIDY IN COLORECTAL CANCEROGENESIS

M. Lozynska<sup>1</sup>, R. Lozynsky<sup>2</sup>

<sup>1</sup>SI «Institute of Hereditary Pathology of NAMS of Ukraine»

31-a, M. Lysenko St., Lviv 79000, Ukraine

e-mail: maria\_lozynska@ukr.net

<sup>2</sup>SI «Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine of NAMS of Ukraine»

45, General Chuprynka St., Lviv 79044, Ukraine

It was carried out the cytogenetic examination of the colorectal polyps and adenocarcinoma samples from 58 patients with neoplasia, who lived in west regions of Ukraine. The most typical chromosomal abnormality in the samples of hyperplastic polyps and adenomas was aneuploidy of chromosomes 13, 7, and 20. The transformation of tubular adenomas in tubulovillous and in villous adenomas was accompanied with increasing number of chromosome abnormalities and widening of its spectrum. The majority of the adenocarcinoma samples showed polysomic karyotype, ranging from near-triploid and near-tetraploid to even higher number of chromosomal sets. The appearance of the additional copies of chromosomes 20, 7, 2, 5 and allelic losses of chromosomes 18, 17, 6, 14, 1, and the chromosome deletions of various sizes may be significant in colorectal tumorigenesis.

*Keywords:* hyperplastic polyps, adenomas, aneuploidy, polyploidy, colorectal cancer.

## ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ АНЕУПЛОИДИИ И ПОЛИПЛОИДИИ В КОЛОРЕКТАЛЬНОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

М. Лозинская<sup>1</sup>, Р. Лозинский<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГУ «Институт наследственной патологии НАМН Украины»

ул. М. Лысенко, 31-а, Львов 79000, Украина

<sup>2</sup>ГУ «Институт патологии крови и трансфузионной медицины НАМН

Украины» ул. Генерала Чупрынки, 45, Львов 79000, Украина

Проведено изучение кариотипа образцов новообразований толстой кишки, полученных от 58 пациентов, жителей западных областей Украины. Наиболее типичной хромосомной аномалией в гиперпластических полипах, а также в аденомах была анеуплоидия 13, 7, 20 хромосом. Превращение тубулярных в тубулярно-ворсинчатые и ворсинчатые аденомы сопровождалось увеличением количества хромосомных аномалий и расширением их спектра. Большинство аденокарцином имели полисомный кариотип с приближенными к триплоидным, тетраплоидным или большими по количеству хромосомными наборами. Появление добавочных копий 20, 7, 2 и 5 хромосом, а также аллельные потери 18, 17, 6, 14, 1 хромосом, делеции разных по размеру участков хромосом имели важное значение в опухолевой прогрессии.

*Ключевые слова:* гиперпластические полипы, аденоматозные полипы, анеуплоидия, полиплоидия, колоректальный рак.