

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО**

АНТОНЮК СЕРГІЙ АНАТОЛІЙОВИЧ

УДК: 616.345-006.6-091.8

**ОПТИМІЗАЦІЯ ВИЗНАЧЕННЯ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ
АДЕНОКАРЦИНОМИ ТОВСТОЇ КИШКИ ТА МОДЕЛЮ-
ВАННЯ ВИЖИВАНOSTІ НА ОСНОВІ БАГАТОФАКТОР-
НОЇ ОЦІНКИ ГІСТОЛОГІЧНИХ КРИТЕРІЇВ**

14.03.02 – патологічна анатомія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Львів – 2017

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Національному інституті раку МОЗ України.

Науковий керівник

доктор медичних наук, професор
Грабовий Олександр Миколайович,
Національний інститут раку МОЗ України, завідувач
науково-дослідного відділення патологічної анатомії
та імуногістохімії

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор
Дядик Олена Олександрівна,
Національна медична академія післядипломної освіти
імені П.Л. Шупика, завідувач кафедри патологічної
та топографічної анатомії

доктор медичних наук, професор
Гомоляко Ірина Володимирівна,
Національний Інститут хірургії та трансплантології
імені О.О. Шалімова НАМН України, завідувач лабораторії
патоморфології та цитології

Захист відбудеться « 27 » жовтня 2017 р. о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.600.03 при Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького МОЗ України (79010 м. Львів, вул. Пекарська, 52).

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України (79000 м. Львів, вул. Січових Стрільців, 6).

Автореферат розісланий « 19 » вересня 2017 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради

С.А. Томашова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Рак товстої кишки займає одне з лідируючих місць у структурі онкологічної захворюваності як у розвинутих країнах світу (Marley A., 2016), так і в Україні (Рак в Україні, 2007-2008.). Серед усіх гістологічних типів раку товстої кишки аденокарциноми складають понад 90 % (Hamilton S.R. et al., 2010). Диференціювання (Grade, G) наразі є основним і єдиним статистично значимим гістологічним прогностичним критерієм при аденокарциномах товстої кишки (АКТК) та обов'язковим складником патогістологічного заключення в повсякденній практиці (Hamilton S.R. et al., 2010). Але, визначення рівня порушення диференціювання пухлини при рутинному дослідженні, що базується на встановленні відносної частки тубулярних ракових структур у складі пухлини, досі є вельми суб'єктивним та не є достатнім для визначення оптимального лікування (Ueno H. et al., 2012; Barresi V. et al., 2015). Більшість випадків АКТК з позицій прогнозу залишається у «сірій зоні», для яких він є лише орієнтовним. За цих обставин, мають бути визначені додаткові прогностичні критерії, пов'язані з біологічними властивостями пухлини, як доповнення до класифікації TNM для обґрунтування проведення тактики лікування (Coppedè F. et al., 2014; Mei Z. et al., 2014; Zoratto F. et al., 2014). АКТК є вельми гетерогенними (Чехун В.Ф., 2012; Bardhan Liu K., 2013; Coppedè F., 2014; Kulendran M., 2011; Linnekamp J.F., 2015) і, навіть визначення цілої низки окремих ознак цих пухлин, сьогодні не є запорукою достовірного прогнозу для розвитку хвороби в окремого пацієнта та визначення найбільш ефективного лікування. Це пов'язано з тим, що прогностичні ознаки розглядаються окремо або механічно сумуються. Відсутня система оцінки зв'язку між ознаками та інтегративна оцінка потенціалу розвитку пухлини.

У зв'язку з цим актуальним є пошук критеріїв для об'єктивної оцінки властивостей та прогнозу при АКТК, надання додаткових критеріїв при виборі способів лікування, що сприятиме підвищенню ефективності медичної допомоги онкологічним хворим.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в Національному інституті раку МОЗ України та є фрагментами державних НДР «Об'єктивізація морфологічної верифікації злості новоутворень шляхом визначення їхнього клітинного субпопуляційного складу за ключовими ознаками багатфакторного морфо-функціонального аналізу» (номер державної реєстрації 0111U000379, 2011–2013 рр.) та «Розробити алгоритм гістологічного дослідження для визначення прогнозу при аденокарциномах товстої кишки з урахуванням зціплення морфологічних, гістохімічних та імуногістохімічних ознак» (номер державної реєстрації 0114U001061, 2014–2016 рр.). Тема дисертації затверджена ПК «Патологічна анатомія» МОЗ та НАМН України 25.10.2011, протокол № 3. Тема дисертації була затверджена вченою радою НІР 07.06.2012, протокол № 10, та уточнена 09.03.2017, протокол № 5.

Мета роботи: оптимізація визначення диференціювання аденокарциноми товстої кишки та моделювання виживаності на основі багатофакторної оцінки кількісних значень морфологічних, гістохімічних та імуногістохімічних ознак.

Завдання дослідження:

1. Визначити особливості вмісту нуклеїнових кислот у клітинах аденокарцином товстої кишки різного ступеня порушення диференціювання.
2. Дати характеристику особливостей стану ядерцевих організаторів в аденокарциномах товстої кишки.
3. Виявити особливості мітотичної активності за індексом мічення Ki-67 серед клітин аденокарцином товстої кишки.
4. Проаналізувати особливості експресії маркерів, пов'язаних з регуляцією апоптозу (Bcl-2, p53) серед клітин аденокарцином товстої кишки.
5. Оцінити гетерогенність клітинного складу аденокарцином товстої кишки за питомим вмістом ДНК у ядрах клітин.
6. Провести багатофакторний аналіз показників стану ядер та розробити математичну модель (тест) для уточнення визначення ступеня диференціювання аденокарцином товстої кишки.
7. Розробити математичну модель виживаності хворих з аденокарциномою товстої кишки на основі багатофакторного аналізу гістологічних критеріїв стану ядерного апарату пухлинних клітин.

Об'єкт дослідження: аденокарцинома товстої кишки.

Предмет дослідження: кількісні значення морфологічних, гістохімічних та імуногістохімічних ознак АКТК (кількість нуклеїнових кислот у ядрах пухлинних клітин, стан ядерцевих організаторів, експресія Ki-67, Bcl-2 та p53 клітинами пухлини).

Методи дослідження: гістологічні, гістохімічні, імуногістохімічні, морфометричні, денсіометричні, математичні.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше оцінено клітинний спектр АКТК за вмістом ДНК у ядрах пухлинних клітин. Показана можливість і розроблено спосіб непрямого визначення плоїдності клітин за каріометричними показниками у рутинній патогістологічній практиці без застосування складних методів забарвлення. Дана характеристика зміни стану ядерцевих організаторів залежно від ступеня диференціювання та вмісту ДНК у ядрах клітин АКТК. Проведена оцінка мітотичної активності клітин АКТК залежно від вмісту ДНК у ядрах. Серед АКТК виділені пухлини, що мають протилежні вектори формування їх клітинного спектра: зростання середнього вмісту ДНК у ядрах пухлинних клітин за рахунок синтезу під час мітозу та її зростання при порушенні механізму мітозу й утворення анеу-/поліплоїдних клітин. Визначено, що збільшення ДНК у ядрах пухлинних клітин супроводжується зростанням рівня кореляції з експресією Bcl-2 та p53, а наявність експресії Bcl-2 веде до більш значного, ніж p53, збільшення ДНК в ядрах клітин АКТК. Встановлено, що в АКТК зі зменшенням диференціювання (зростання G) відбувається збільшення відносної частки клітин з ядрами, які найбільш відповідають функціонально активним, і навпаки. Показано, що клітинна гетерогенність АКТК

є не лінійною, а функцією, що наближається до параболічної, максимум якої припадає на помірно диференційовані АКТК. Розроблено метод визначення різних морфо-функціональних типів пухлинних клітин у складі АКТК. Доведено, що окремо взяті ознаки стану ядер клітин аденокарцином (кількість ДНК, стан ядерцевих організаторів, експресія Ki-67, Bcl-2 і p53) не є значимими при самостійному використанні в якості прямих критеріїв для уточнення диференціювання пухлини та прогнозу. У той самий час похідні від низки зазначених ознак можуть слугувати достовірно значимими критеріями. АКТК різного ступеня диференціювання якісно відрізняються між собою, а для уточнення ступеня їх диференціювання необхідні різні математичні моделі, які мають різні коефіцієнти рівняння регресії та набір параметрів. Для пацієнтів з аденокарциномами G2 і G3 з підвищеним середнім вмістом ДНК в ядрах пухлинних клітин на основі рівняння пропорційних інтенсивностей Кокса розроблена модель виживаності хорошої якості, яка удвічі перевищує побудовану тільки на використанні ступеня диференціювання (G).

Практичне значення отриманих результатів. Результати дисертаційної роботи надають додаткові критерії для оптимізації визначення диференціювання аденокарциноми товстої кишки та прогнозу на основі багатофакторної оцінки гістологічних ознак. Показано, що окремо взяті ознаки стану ядер клітин аденокарцином (кількість ДНК, стан ядерцевих організаторів, експресія Ki-67, Bcl-2 і p53) не є значимими при самостійному використанні в якості прямих критеріїв для уточнення диференціювання пухлини та прогнозу її розвитку. Показана можливість і розроблено спосіб непрямого визначення плоідності клітин за каріометричними показниками у рутинній патогістологічній практиці без застосування складних методів забарвлення (патент України на корисну модель 85714 «Спосіб непрямого визначення вмісту ДНК у ядрах епітеліальних пухлин товстої кишки»). Розроблено спосіб оцінки клітинного складу АКТК (патент України на корисну модель 108521 «Спосіб визначення частки функціонально активних клітин у складі епітеліальних пухлин товстої кишки»). Розроблена математична модель на основі об'єктивних критеріїв забезпечує високу достовірність та відтворюваність визначення ступеня диференціювання АКТК. Запропонована математична модель виживаності при АКТК демонструє якість, що удвічі перевищує характерну для моделі, побудованої тільки на використанні ступеня диференціювання, яка на сьогодні є фактично єдиним загальноприйнятим самостійним гістологічним критерієм прогнозу (патент України на корисну модель 109373 «Спосіб прогнозування виживаності при аденокарциномі товстої кишки»). За матеріалами дисертації отримані акти впровадження у наукову і практичну роботу наступних закладів: Національний інститут раку, Запорізький державний медичний університет, КЗ «Черкаський обласний онкологічний диспансер», патогістологічна лабораторія ТОВ СШЕС ДІ ХЕЛС КЕА», Лабораторія патоморфології Одеського національного медичного університету. «Методика непрямого визначення ДНК у ядрах епітеліальних пухлин товстої кишки» опублікована у «Переліку наукової (науково-технічної) продукції, призначеної для впровадженнь досягнень медичної науки у сферу

охорони здоров'я (Реєстр. № 293/1/14). Видано інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 13 – 2017 «Визначення ступеня диференціювання аденокарцином товстої кишки за кількісними параметрами стану ядерного апарату пухлинних клітин».

Особистий внесок здобувача. Сумісно з науковим керівником сформульована концепція роботи та визначені її складові. Здобувачем самостійно проведений патентно-інформаційний пошук, аналіз актуальності та глибини вивчення теми, визначені методи дослідження; проведено визначення усіх кількісних значень гістологічних, гістохімічних, імуногістохімічних показників із застосуванням морфометричного і денсіометричного методів. Самостійно проведена статистична обробка отриманих результатів. Сумісно з Савчиним Т.М. розроблені математичні моделі оптимізації визначення диференціювання та виживаності при АКТК. Матеріали даної праці не були використані в інших дисертаціях.

Апробація матеріалів дисертації. Результати дисертаційних досліджень були представлені на: III конференції Українського дивізіону інтернаціональної академії патології (Харків, 2011); XII з'їзді онкологів України (Судак, 2011); VII з'їзді онкологів та радіологів СНД (Астана, 2012); науково-практичній конференції «Морфологічні основи наукових досліджень в медицині» (Київ, 2013); науковій конференції, присвяченій 90-річчю з дня народження К.С. Кабака «Фундаментальна та клінічна медицина» (Київ, 2014); науково-практичній конференції «Сучасні підходи до профілактики діагностики та лікування злоякісних пухлин (Київ, 2014); III Міжнародному медичному конгресі «Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України (Київ, 2014); науково-практичній конференції «Фундаментальна та клінічна медицина» (Київ, 2015); IV Міжнародному медичному конгресі «Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України (Київ, 2015); XIII з'їзді онкологів та радіологів України (Київ, 2016); XII International Scientific Conference for students and PhD students «Youth and Progress of Biology» (Lviv, 2016); 41st ESMO Congress (ESMO 2016, 7–11 October 2016, Copenhagen); науково-практичній конференції «Перспективи діагностики та лікування онкологічної патології» (Київ, 2016).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 30 наукових праць: 7 статей у фахових виданнях, у тому числі одна у виданні, що входить у наукометричну базу Scopus; 18 робіт – у матеріалах конгресів, з'їздів і конференцій; 3 патенти України на корисну модель; один інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я; одна робота – у «Переліку наукової (науково-технічної) продукції, призначеної для впровадження досягнень медичної науки у сферу охорони здоров'я».

Обсяг і структура дисертації. Робота викладена на 216 сторінках машинопису і складається з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, 2 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, додатків. Робота

ілюстрована 31 рисунком та 17 таблицями. Список літератури містить 261 джерела (51 кирилицею та 210 латиницею).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проведено на матеріалі 141 біопсії або вилученому під час оперативного втручання у пацієнтів з епітеліальними новоутвореннями товстої кишки (ЕНТК): контроль – умовно нормальна товста кишка (К) – 11; поліпи та аденоми (В) – 16; аденокарцинома G1 (G1) – 28; аденокарцинома G2 (G2) – 73; аденокарцинома G3 (G3) – 13.

Матеріал фіксували в забуференому 10 % формаліні з рН 7,4 та ущільнювали в парафін. З блоків виготовляли зрізи товщиною 5 мкм. Їх забарвлювали гематоксиліном і еозином для загальної оцінки пухлини, галоціанін-хромовим галуном за Ейнарсоном (рН 1,62; 37°C, 24 год) для виявлення нуклеїнових кислот (НК) (Лупа Х., 1980; Ташке К., 1980). Для кожного випадку частину зрізів обробляли РНК-азою (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Німеччина) для екстракції РНК (Лупа Х., 1980). Препарати вивчали та фотографували за допомогою мікроскопа Nikon Eclipse 80i з камерою DS-5SMc/L2 за стандартизованих умов (x400, 1280x960 пікселів RGB). На зображеннях з препаратів, забарвлених галоціанін-хромовим галуном, у 30 клітинах кожної пухлини за допомогою системи аналізу зображення Image J 1,46 визначали: площу перетину ядра клітини (Narea), його питому оптичну щільність (DM) та інтегративну оптичну щільність (NIntDen), а також розраховували об'єм ядра (NV) та вміст у ньому сумарної кількості нуклеїнових кислот (NHK) і ДНК (НДНК) за формулами 1 та 2:

$$NV = 3/4 * Narea^2 * \sqrt{(Narea/\pi)}, \quad (1)$$

де: NV – об'єм ядра;

Narea – площа перетину ядра клітини.

$$NHK (НДНК) = NIntDen * 3/4 * Narea * \sqrt{(Narea/\pi)}, \quad (2)$$

де: NHK (НДНК) – сумарна кількість нуклеїнових кислот;

NIntDen – інтегративна оптична щільність ядра клітини;

Narea – площа перетину ядра клітини.

Як вихідну точку відліку для оцінки вмісту НК у ядрах пухлинних клітин прийняли за одиницю значення, притаманні ядрам лімфоцитів (2с), що знаходилися у стромі пухлин. Клітини кожної пухлини рангували за НДНК. Отримана послідовність була поділена на ранги з кроком, що дорівнював середньому вмісту ДНК у ядрах лімфоцитів: P1 – до 1, P2 – 1-2, P3 – 2-3, і так далі. Клітини кожної пухлини при забарвленні на НК були ранговані за Narea/NV. Отримана послідовність була поділена на ранги за середніми значеннями Narea/NV, які визначені для рангів за НДНК. У межах кожного рангу

визначали абсолютну кількість клітин, середні значення Narea, NIntDen, NV, НДНК чи НК. Вміст РНК у ядрах клітин визначали як різницю між НК і НДНК. За середнім вмістом ДНК у ядрах клітини пухлини також були поділені на три підгрупи: D – середній вміст ДНК у ядрах до 1,2; D+ – середній вміст ДНК у ядрах від 1,2 до 2,5; T+ – середній вміст ДНК понад 2,5 (Автандилов Г.Г., 2006).

Виявлення ядерцевих організаторів (NOR) проводили імпрегнацією азотнокислим сріблом. На зображеннях з препаратів (x400, 1280x960 пікселів RGB) у кожній пухлині за допомогою системи аналізу зображення Image J 1,46 визначали: у 50 клітинах Narea, кількість (nNOR) та діаметр кожного NOR з наступним розрахунком їхнього загального (vNOR) та середнього об'єму (v/NOR). Для кожної пухлини при виявленні NOR клітини були ранговані за Narea відповідно середніх значень, визначених на препаратах, де виявлялася ДНК. Для кожного рангу визначали середні значення nNOR, vNOR, v/NOR.

Імуногістохімічні реакції проводили з моноклональними мишиними антитілами (Dako, Данія) проти антигенів: Ki-67 людини (MIB-1), Bcl-2 онкопротеїну людини та p53 протеїну відповідно до протоколу виробника з необхідними контролюями. Для візуалізації продуктів ІГХ реакції використовували систему детекції EnVision™ FLEX, (Dako, Данія). Зрізи дофарбовували гематоксиліном Gill. Визначали відсоток клітин пухлини, які експресували відповідні маркери. Для кожної пухлини при виявленні експресії Ki-67 клітини були ранговані за розмірами ядра відповідно до параметрів, визначених на препаратах, де виявлялась ДНК. У межах кожного рангу визначали абсолютну кількість клітин, ядра яких експресують Ki-67 та їх відсоток.

Отримані цифрові дані обробляли за стандартними статистичними методами з використанням Microsoft Excel. Статистичний аналіз та побудову математичних моделей проводили з використанням програмного забезпечення IBM SPSS Statistics 15. Кореляційний аналіз здійснювали методом рангової кореляції за Спірман. Для перевірки на нормальність використовували одновибірковий тест Колмогорова-Смирнова. Для порівняння вибірок використовували Н-критерій Крускала-Уоллеса та U-критерій Манна-Уїтні. Відмінності вважали статистично значимими при $p < 0,05$.

При розробці тесту для уточнення ступеня диференціювання АКТК застосовано метод логістичної регресії. Для порівняння моделей використовували перевірку відношенням правдоподібності (порівняння із нульовою моделлю). А також, для оцінки якості отриманих моделей використовувався ROC-аналіз, а саме значення площі під ROC-кривою (AUC).

Для побудови моделей виживаності використовували модель пропорційних інтенсивностей Кокса (регресивна модель Кокса). Оцінку якості моделей здійснювали за тестом відношення правдоподібності (LR) і ROC-аналізу. Прогностичну значимість розроблених моделей порівнювали з відповідними показниками базової моделі Кокса. Остання не включає в себе ні одну із характеристик пухлинного процесу з використанням тесту відношення

правдоподібності (LR). У якості показника моделей якості (виживаності хворих) використовували показник площі під кривою (AUC) у ROC-аналізі, яка градуєвана наступним чином: значення: AUC 0,5-0,6 – погана якість, 0,6-0,7 – середня, 0,7-0,8 – хороша, 0,8-0,9 – дуже хороша, 0,9-1 – відмінна.

Результати дослідження та їх обговорення. Проведена нами оцінка вмісту ДНК у ядрах клітин АКТК різних G та аденом товстої кишки показала, що в усі ці групи входять новоутворення з різним середнім вмістом ДНК (відповідають ди-, тетра- чи поліплоїдному). Відповідно цей показник (кількість ДНК, плоїдність) не може бути використаний для уточнення G пухлини, як пропонують деякі автори (Автандилов Г.Г., 2006).

Співвідношення клітин з різним вмістом ДНК у ядрах зі зростанням G пухлин показало схильність до збільшення кількості клітин з вмістом ДНК, який перевищує диплоїдний. Але, враховуючи варіабельність цього показника, довірчі межі значень якого у суміжних групах пухлин перекриваються, використання його як критерію ступеня анаплазії конкретної пухлини не є правомірним і, відповідно, не може бути самостійним прогностичним фактором (Petrișor O. et al., 2008). Разом з тим, різноманітність клітинного складу АКТК за вмістом ДНК є непрямою ознакою різноманітності властивостей та життєздатності пухлинних клітин і підставою для включення цього критерію до комплексної оцінки властивостей пухлини. Оскільки вміст ДНК у ядрах клітин залежить не тільки від порушення механізму поділу клітини, а й від активності її синтезу, то його необхідно розглядати в комплексі з мітотичною активністю як складну змінну (Compton C.C. et al., 2000).

Зменшення відносного вмісту РНК у ядрах клітин пухлини зі зростанням вмісту ДНК, виявленого нами, вказує на те, що додаткова ДНК не є функціонально активною. Це може бути ознакою зниження життєздатності таких клітин, що призводить до старіння, апоптозу та елімінації таких морфо-функціональних типів клітин зі складу пухлини (Compton C.C., 2000).

Наявність в АКТК клітин з плоїдністю понад 4с є свідченням хромосомної нестабільності та порушення механізмів мітозу (Kørner H., 2009). Це спричиняє виникнення в пухлині клітин з різними генетичними наборами, що результується у різноманітності клітинних фенотипів, які можна позначити як різні морфо-функціональні типи пухлинних клітин. Серед досліджених нами пухлин зростання клітинної гетерогенності як за вмістом ДНК, так і за морфологічними ознаками, спостерігали у ряду від аденом до АКТК G2. Логічно припустити, що серед цього різноманіття клітин будуть такі, що зберегли системи життєзабезпечення, та такі, у яких вони порушені. Останнє підтверджується поширеністю ознак дегенерації серед клітин рангів P4 (з кількістю ДНК в ядрах $2c \times 4$) і вищих, а також порівняно часті ознаки каріопікнозу серед клітин P1 (з кількістю ДНК в ядрах $< 2c$). Це вказує на те, що з розвитком пухлини (пухлинної прогресії) з її складу елімінуються нежиттєздатні морфо-функціональні типи пухлин. Разом з тим, з клітинного різноманіття виділяються життєздатні клітини які є основою для виникнення стійких клонів, здатних до необмеженого існування. Це підтверджується тим, що в АКТК G3 звужується спектр її

клітинного складу за вмістом ДНК у ядрах. Переважаючими стають клітини D+, що, з урахуванням високої проліферативної активності, дозволяє розглядати їх як диплоїдні, у яких відбувається синтез ДНК

Проведений порівняльний аналіз між визначеннями вмісту ДНК у клітинах епітеліальних пухлин товстої кишки (ЕПТК) (рис. 1) прямим денсіометричним способом при забарвленні зрізів галоціанін-хромовим галуном та непрямим способом на препаратах, забарвлених гематоксиліном і еозином, показав, що середні значення як площ перетину ядер, так і вміст у них ДНК достовірно не відрізняються. Це стало підставою запропонувати спосіб непрямого визначення ДНК у клітинах ЕПТК на зрізах, забарвлених гематоксиліном і еозином (пат. № 80458), який придатний для використання в рутинній патогістологічній оцінці властивостей АКТК.

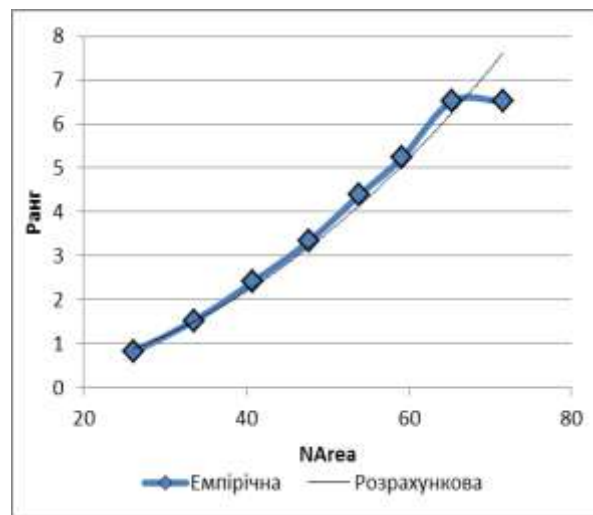


Рисунок 1 – Залежність між площею перетину ядер клітин АКТК (NArea – площа, мкм², середні значення у рангах) та кількістю і вмістом у них ДНК (NDNA, ранг клітин пухлини за вмістом ДНК у ядрі)

Отримана крива описується формулою 3 з величиною достовірності апроксимації $R^2=0,9896$:

$$\text{DNA} = 0,0017S^2 \times 0,012S, \quad (3)$$

де: ДНА – кількість ДНК у ядрі клітини, кратна диплоїдному (2 с);

S – площа перетину ядра клітини на гістологічному препараті (мкм²).

Наші дослідження стану NOR показали, що їх відносна кількість у ядрах клітин АКТК зі зростанням G виявляла тенденцію до зменшення, а їхній сумарний обсяг зростає, хоча різниця між межуючими G АКТК у цілому не була достовірною. Кількість і сумарний об'єм NOR в ядрах клітин доброякісних новоутворень (В) перебувають у прямій залежності від їхньої плідності ($r=0,98$), а в злоякісних пухлинах ця залежність порушується. Достовірні залежності між станом NOR та вмістом РНК у ядрах досліджених пухлин не виявлені ($p>0,05$).

Отже, стан NOR (кількість та об'єм) у цілому, не відображає ступінь пухлинної трансформації та не може бути самостійним критерієм для її оцінки.

Зменшення відносного вмісту РНК та відсутність пропорційного збільшення кількості/об'єму NOR у ядрах клітин пухлини зі зростанням вмісту ДНК вказує на те, що додаткова ДНК є функціонально обмеженою або не активною. Це може бути ознакою зниження життєздатності таких клітин, що призводить до старіння, апоптозу та елімінації таких морфо-функціональних типів клітин зі складу пухлини (Davoli T., de Lange T., 2011; Holland A.J., Cleveland D.W., 2012). Підтвердженням цього є високий рівень кореляції між вмістом ДНК та vNOR у доброякісних новоутвореннях, що закономірно очікувалося, та після порушення цієї залежності у G1–G2, її відновлення у G3, коли зменшується різноманітність клітинного складу пухлини за показником вмісту ДНК у ядрах.

Проведена нами оцінка проліферативної активності за ІМ Ki-67 в АКТК та аденомах показала, що середні значення цього показника зростають зі збільшенням G пухлини. Це узгоджується з уявленням про зв'язок підвищення мітотичної активності в пухлині з її злоякісністю та прогнозом (Gerdes J., 1990). Але варіабельність даного показника, значення якого як в АКТК різних G, так і в доброякісних пухлинах коливались від декількох до 90 %, що не дає можливості з достатньою достовірністю використовувати ІМ для визначення злоякісного потенціалу окремо взятої пухлини (Zlobec I. et al., 2009; Huh J.W. et al., 2010).

Оцінка кореляції між середніми значеннями вмісту ДНК у ядрах клітин та середньою мітотичною активністю в ЕПТК не виявила прямої залежності між ними. Але оцінка цього показника в окремо взятих пухлинах показала коливання індексу кореляції у межах від +1 до -1. Тобто, АКТК можна розділити на такі, у яких підвищення середнього вмісту ДНК у ядрах клітин відбувається за рахунок високої проліферативної активності (велика частка клітин, у яких відбувається синтез ДНК) та пухлини, у яких цей показник зумовлений збільшенням у спектрі частки поліплоїдних клітин.

Гетерогенність АКТК за вмістом ДНК/проліферативною активністю є показником різноманітності властивостей та життєздатності пухлинних клітин, що певним чином пов'язана з різними патогенетичними механізмами їх виникнення (Davoli T., de Lange T., 2011; Holland A.J., Cleveland D.W., 2012). Комплексна ж оцінка цих параметрів може стати додатковим високоінформативним критерієм гістологічного визначення потенції розвитку АКТК.

Проведені дослідження показали, що ЕПТК мають широкий спектр частоти експресії Bcl-2 та p53, причому їхній рівень відрізняється і змінюється залежно від G та вмісту ДНК. Зростання останнього, у свою чергу, певною мірою залежить від гіперекспресії зазначених протеїнів, що пов'язують з запобіганням апоптозу (Valera V. et al., 2007; Vousden K., Lane D., 2007). Наявність експресії Bcl-2 у клітинах пухлини веде до більш значного, ніж p53, збільшення ДНК в ядрах клітин АКТК. Для АКТК, яким не притаманна гіперплоїдія, та які розвиваються за рахунок мікросателітної нестабільності чи за епігенетичним

механізмом, наявність експресії Bcl-2 і/або p53 практично не призводить до підвищення вмісту ДНК у ядрах їх клітин. Щодо пухлин, які проявляють ознаки поліплоїдії, пов'язаної з хромосомною нестабільністю, для них характерна кореляція між вмістом ДНК та відносною кількістю клітин, що експресують дані маркери. Слід зазначити, що наявність чи відсутність експресії Bcl-2 та p53 в АКТК у цілому достовірно не відрізняється в пухлинах різних G і не пов'язана з пухлинною прогресією, а визначається патогенетичним механізмом їх виникнення (Hadjihannas M.V. et al., 2006; Kørner H., 2009).

Разом з тим, простежується тенденція, коли зі збільшенням G у пухлинах, після періоду зростання, відбувається зменшення частки клітин, що експресують Bcl-2 та p53. Це можна розглядати як свідчення зміни клітинного складу новоутворення з відбуванням пухлинної прогресії, яке призводить до появи клітин домінуючого(их) фенотипу(ів). Останні, втрачаючи низку ознак, притаманних клітинам вихідної тканини, зберігають високу життєздатність і переважно визначають подальший розвиток пухлини.

Зі зростанням G в АКТК збільшується відносна частка клітин з ядрами, які найбільш відповідають функціонально активним ($p < 0,01$) (рис. 2). І навпаки, відносна кількість клітин, ядра яких не відповідають критеріям життєздатності (пікнотичні, зазнали лізису хроматину) зменшується. Це збігається з характером змін клітинного спектру АКТК за вмістом ДНК у ядрах пухлинних клітин, коли в АКТК G3, порівняно з більш диференційованими, він звужується.

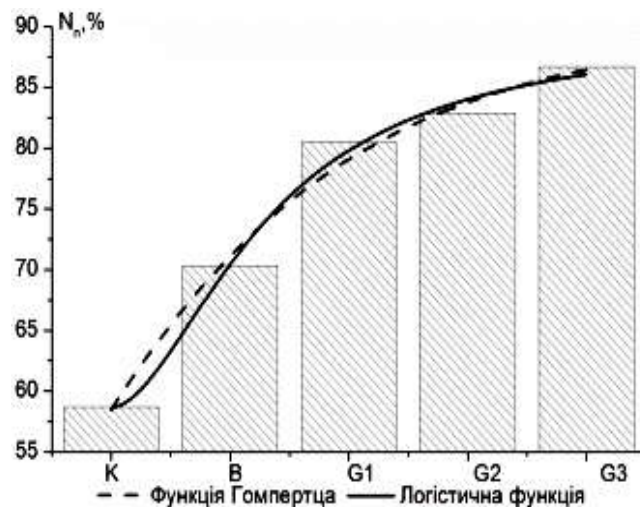


Рисунок 2 – Збільшення частки клітин в АКТК з умовно нормальними ядрами (N_n) за зниження ступеня диференціювання пухлини. Стовпчики гістограми – емпірично визначена частка N_n клітин у пухлині: К – контроль; В – доброякісні новоутворення; G1–G2–G3 – АКТК відповідного грейду

Отже, вищезазначене можна розцінити як пряме відображення концепції клональної еволюції (Greaves M., Maley C.S., 2012), і демонструє поступове набуття домінування в АКТК клону(ів) з ефективними системами життєзабезпечення і, можливо, зі стабілізованим геномом. З цих позицій клітинна гетерогенність (Melo F.D.S.E. et al., 2013) АКТК повинна розглядатися

не як лінійна, а як логістична функція ($R^2=0,98$), що найкраще описується функцією Гомпертца ($R^2=0,99$). Відповідно, на певному етапі розвитку (пухлинної прогресії) виразність гетерогенності досягає свого максимуму. Паралельно клональна еволюція, що відбувається, отримує максимум субстрату для реалізації відбору і зі складу пухлини елімінуються нежиттєздатні типи клітин. Разом з тим, з клітинного різноманіття виділяються такі, що, маючи спотворений генотип, але який забезпечує високу проліферативну активність зі збереженням систем життєзабезпечення та втратою специфічних функцій інтегрування у тканинні комплекси, є основою для виникнення стійких клонів, здатних до необмеженого існування.

Отже, АКТК характеризуються значною різноманітністю стану ядер, проліферативною активністю та експресією факторів, пов'язаних з регуляцією апоптозу. Це, перш за все, ми пов'язуємо з різноманітністю патогенетичних механізмів, притаманних АКТК (Bardhan K., 2013; Davoli T., de Lange T., 2011; Zoratto F. et al., 2014; Coppède F. et al., 2014). На прикладі нашої вибірки ЕПТК, а також за даними інших авторів (Coppède F. et al., 2014; Kulendran M. et al., 2011; Marusyk A. et al., 2012), можна вважати, що окремі ознаки не мають або мають слабкий зв'язок з G та прогнозом при АКТК. Це практично нанівець зводить спроби їх використання як самостійних прогностичних критеріїв. Однак, використання ключових ознак стану ядер АКТК та їх похідних у багатофакторній системі оцінки з використанням логістичної регресії, дає змогу підвищити достовірність визначення грейду АКТК за рахунок об'єктивізації цієї процедури.

Виходячи із вищевикладеного, нами поставлено завдання розробити спосіб уточнення диференціювання АКТК шляхом його обчислення за формулою логістичної регресії з використанням низки кількісно визначених параметрів ядерного апарату пухлинних клітин. До останніх було включено вміст ДНК в їх ядрах, стан NOR, відсоток різних морфо-функціональних типів клітин у складі пухлини, індекс мічення Ki-67, експресію p53 та Bcl-2. В основу уточнення диференціювання АКТК поклали метод ієрархічної класифікації, при якому відбувається послідовний поділ множини об'єктів на підмножини. Значення критеріїв підставляють у формулу 4 (логістичної регресії):

$$P(y) = \frac{1}{1 + e^{-z}} \quad (4)$$

де: $P(y)$ – ймовірність настання події y ;

$$z = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_n x_n;$$

β_0 – константа;

β_n – коефіцієнти регресії;

x_n – значення показників, що досліджуються.

На першому етапі загальна множина пухлин поділяється на доброякісні і злоякісні новоутворення (Модель I). На другому етапі множина АКТК ділиться на G1 і G2-G3 (Модель II). На третьому етапі відбувається розподіл між АКТК G2 та АКТК G3 (Модель III). До використання в моделях допускали параметри,

значення p для яких у парах було $< 0,05$. Можливого синергізму показників не відкидали та враховували і незначимі фактори (nNOR), а також здійснили спробу об'єднання низки факторів у якісно нові змінні. Результатом регресійного аналізу стала функція, що відображає сукупну дію факторів (табл. 1).

Таблиця 1

Значення коефіцієнтів рівняння регресії для моделей розмежування аденокарцином товстої кишки			
Параметр	β	SE	p
Модель I (B/AКTK)			
NDNA	5,406	1,967	$<0,01$
nNOR	3,195	1,329	0,016
NDNA x nNOR	-1,864	0,659	$<0,01$
Ki-67 %	0,030	0,014	0,028
p53 %	0,079	0,021	$<0,01$
p53 (+/-)	3,478	1,234	$<0,01$
Nn	0,058	0,018	$<0,01$
Константа	-17,291	4,572	$<0,01$
Модель II (G1/G2-3)			
NDNA	-1,968	0,587	0,001
nNOR/Ki-67	-0,090	0,038	0,018
NDNA x nNOR/Ki-67	0,034	0,016	0,034
v/NOR	2,199	0,888	0,013
p53 (%)	0,011	0,007	0,094
D, P	-2,503	0,951	0,008
Константа	2,901	1,481	0,050
Модель III (G2/G3)			
p53 (%)	-0,040	0,018	0,026
Bcl-2 (%)	-0,031	0,014	0,030
Bcl-2 (+/-)	-1,674	0,857	0,051
p53 (+/-)	-2,275	1,408	0,106
Константа	2,684	1,456	0,065

Примітки: NDNA – кількість ДНК (у.о.); nNOR – кількість ядерцевих організаторів; Ki-67, p53, Bcl-2 – % мічених пухлинних клітин відповідним маркером; p53(+/-) і Bcl-2(+/-) – наявність/відсутність експресії p53 у пухлині; Nn – відносна частка клітин з умовно нормальним ядром; β – значення коефіцієнтів; SE – стандартна похибка коефіцієнтів; p – статистична значимість.

Для оцінки якості отриманих моделей використовували ROC-аналіз (AUC – значення площі під кривою) (табл. 2).

Отримали наступні z у формулі 4 для визначення грейду аденокарцином:

– для визначення належності пухлини до доброякісної чи аденокарциноми (Модель I): $z_1 = 5,4 \times \text{NDNA} + 3,2 \times \text{nNOR} - 1,86 \times \text{NDNA} \times \text{nNOR} + 0,03 \times \text{Ki67} + 0,08 \times \text{p53} - 3,48 \times \text{p53}^{+/-} + 0,06 \times \text{Nn} - 13,81$. При $P_{\text{гр}} < 0,56$ – доброякісна пухлина; при $P_{\text{гр}} > 0,56$ – АК;

– для визначення належності пухлини до високодиференційованої (G1) чи помірно/низькодиференційованої АКTK (G2/G3) (Модель II): $z_2 = 2,11 \times$

$1,97 \times \text{NDNA} + 2,2 \times \text{nNOR} + 0,01 \times \text{p53} - 9 \times \text{nNOR/Ki67} + 3,4 \times \text{NDNA} \times \text{nNOR/Ki67} + 2,5 \times \text{D/P}$.
 При $P_{\text{G}} < 0,716$ – G1. При $P_{\text{G}} > 0,716$ – G2/G3;

– для визначення належності пухлини до помірно (G2) чи низькодиференційованої АКТК (G3) (Модель III): $z_3 = 1,26 - 0,04 \times \text{Bcl-2} - 0,03 \times \text{p53} + 2,28 \times \text{p53}^{+/-} + 1,67 \times \text{Bcl-2}^{+/-}$. При $P_{\text{G}} < 0,216$ – G2; при $P_{\text{G}} > 0,216$ – G3.

Таблиця 2

**Якісна оцінка результатів ROC-аналізу
для моделей розмежування аденокарцином товстої кишки**

Параметр	AUC	SE	p	ДІ (95 %)	
Модель I (B/АКТК)					
Модель I	0,930	0,028	<0,01	0,876	0,985
NDNA	0,634	0,074	0,038	0,489	0,778
nNOR	0,499	0,064	0,993	0,374	0,625
NDNA x nNOR	0,598	0,074	0,126	0,453	0,744
Ki-67 (%)	0,711	0,058	0,001	0,598	0,824
p53 (%)	0,744	0,048	<0,01	0,650	0,837
Nn	0,715	0,067	0,001	0,584	0,846
Модель II (G1/G2-3)					
Модель II	0,816	0,045	<0,01	0,728	0,904
NDNA	0,591	0,068	0,151	0,458	0,723
nNOR/Ki-67	0,649	0,056	0,018	0,539	0,759
NDNA x nNOR	0,666	0,064	0,009	0,541	0,790
NDNA x nNOR/Ki-67	0,665	0,058	0,009	0,552	0,778
Ki-67	0,59	0,065	0,157	0,465	0,72
vNOR	0,686	0,058	0,004	0,573	0,8
p53 (%)	0,635	0,059	0,039	0,52	0,751
Модель III (G2/G3)					
Модель III	0,801	0,060	0,001	0,684	0,919
Bcl-2 (%)	0,583	0,072	0,344	0,443	0,724
p53 (%)	0,710	0,076	0,017	0,562	0,858

Примітки: див. табл 1.

За отриманими нами даними щодо окремих ознак АКТК та взаємозв'язків між ними, ми зробили спробу побудувати на основі багатофакторного аналізу стану ядерного апарату клітин пухлин, що досліджували, математичну модель виживаності, на основі визначених критеріїв.

Проведений аналіз виживаності в досліджуваний вибірці пухлин залежно від окремо взятих ознак (G, НДНК, стан NOR, ІМ Ki-67, експресія p53 і Bcl-2) показав, що вона достовірно відрізнялася тільки в групах, сформованих за диференціюванням (G) ($\chi^2=42,617$; $p<0,01$). Однак, для пухлин різних рангів за НДНК у ядрах клітин простежувалася тенденція до зменшення виживаності в ряду D–D+–T+, що може бути пов'язано з різними механізмами їх розвитку (Haigis K., 2009), пухлини групи D можуть бути віднесені до тих, що розвиваються за рахунок мікросателітної нестабільності, а D+ і T+ – хромосомної.

За отриманими даними була побудована модель виживаності на основі регресії Кокса (модель пропорційних ризиків). При цьому, до неї не увійшли пухлини В і G1, оскільки для них у нашій вибірці притаманна 100,0 % 5-річна виживаність, що обумовлює їх неінформативність. У якості змінних моделі були використані як окремі фактори, що визначалися, так і їх комбінації, між якими простежувався зв'язок. Побудову моделі здійснювали в декілька етапів з включенням чи виключенням змінних та оцінкою її якості. Як базова модель, нами була побудована Модель I, яка включала лише G АКТК (G2, G3), який на сьогодні є єдиним визнаним самостійним гістологічним прогностичним критерієм (Hamilton S.R. et al., 2010; Barresi V. et al., 2015). Оцінка якості цієї моделі (табл. 3) за допомогою ROC-аналізу визначила її як низьку (AUC = 0,339, $p=0,05$). Разом з тим, отримане високе значення загального коефіцієнта рівняння ($\beta = 1,87$) в моделі вказує на ймовірність збільшення летального результату при переході від G2 до G3 (з 50 до 88 % відповідно).

Таблиця 3

Параметри і змінні моделі регресійного аналізу виживаності (модель Кокса) при аденокарциномах товстої кишки за комбінацією факторів

Модель	n	LR	p(LR)	AUC	p(AUC)	Параметри	β	SE	p(β)
I	74	10,42	<0,01	0,339	0,05	G2, G3	1,870	0,504	<0,01
II	74	8,95	0,03	0,391	0,18	nNOR/Ki67	0,159	0,063	0,01
						nNOR×NDNA	0,239	0,080	<0,01
						nNOR×NDNA/Ki67	-0,069	0,028	0,01
III	74	20,67	<0,01	0,605	0,18	G2 і G3	2,031	0,517	<0,01
						nNOR/Ki67	0,173	0,066	<0,01
						nNOR×NDNA	0,265	0,086	<0,01
						nNOR×NDNA/Ki67	-0,074	0,028	0,01
IV	74	25,44	<0,01	0,663	0,04	G2 і G3	1,932	0,531	<0,01
						nNOR/Ki67	0,279	0,087	<0,01
						nNOR×NDNA	0,211	0,094	0,03
						nNOR×NDNA/Ki67	-0,118	0,038	<0,01
						D, D+, T+	1,459	0,692	0,04
V	65	28,14	<0,01	0,722	<0,01	G2, G3	1,936	0,557	<0,01
						nNOR/Ki67	0,378	0,107	<0,01
						nNOR×NDNA	0,232	0,104	0,03
						nNOR×NDNA/Ki67	-0,159	0,049	<0,01
						D+, T+	2,006	0,801	0,01

Примітки: n – кількість випадків (пухлин), що аналізується; LR – значення тесту відношення правдоподібності (Likelihood ratio); AUC – значення площі під ROC-кривою; β – коефіцієнт; SE – стандартна похибка коефіцієнта.

Модель II була побудована як альтернатива першої, у якій не використовували G, а в якості змінних включені похідні від NDNA, nNOR і IM Ki-67 – nNOR/Ki-67, nNOR×NDNA та nNOR×NDNA/Ki-67. Її якість практично

не відрізнялася від попередньої ($AUC = 0,391$), що також вказує на їх низьку прогностичну цінність, і при цьому не була статистично значимою ($p=0,18$). Об'єднання зазначених двох моделей у Модель III підвищило її якість ($AUC = 0,605$), але не зробило її статистично значимою ($p=0,18$) (див. табл. 3).

Введення у рівняння регресії як змінної рангу пухлини за вмістом ДНК (D, D+, T+), зробило Модель IV статистично значимою ($p=0,04$), якість якої була майже удвічі вища ($AUC = 0,663$), ніж у Моделі I. Тобто, зростання вмісту ДНК у ядрах пухлинних клітин виявилось фактором, принципово важливим для прогнозування виживаності.

Тому зроблена спроба виключити із змінних, що використовуються для моделювання рангу пухлин D, для яких нехарактерна наявність у складі поліплоїдних клітин. Отримана Модель V виявила якість більш ніж удвічі кращу, ніж при використанні окремо G пухлини, при суттєвому зростанні її статистичної значимості ($p<0,01$) (див. табл. 3).

ВИСНОВКИ

Аденокарцинома товстої кишки складає 90–95 % з усіх гістологічних типів колоректального раку, який посідає четверте місце в світі серед вперше виявлених злоякісних новоутворень. Визначення ступеня диференціювання цих пухлин сьогодні залишається вельми суб'єктивним, а точність прогнозування не повністю відповідає сучасним потребам. У дисертації представлено теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової задачі, спрямоване оптимізувати визначення диференціювання аденокарцином товстої кишки та моделювання виживаності на основі багатофакторної оцінки кількісних значень морфологічних, гістохімічних та імуногістохімічних ознак.

1. Наявність прямого зв'язку між механізмами розвитку та зміною клітинного складу пухлини в процесі пухлинної прогресії та клональної еволюції дозволяє використовувати зміни кількості ДНК у клітинах аденокарцином товстої кишки як складову при багатофакторному аналізі для визначення G та індивідуального прогнозу. Вміст ДНК у ядрах клітин аденокарцином товстої кишки не може виступати у якості самостійного критерію для визначення G пухлини та індивідуального прогнозу, у зв'язку зі значною варіабельністю.

2. У рангованих рядах клітин аденом за кількістю ДНК у ядрах існує високий ступінь зв'язку між кількістю ДНК і загальним обсягом ядерцевих організаторів ($r=0,92$), а у аденокарциномах ця залежність порушується. Ступінь порушення зв'язку стану NOR з накопиченням ДНК є підставою для їх включення до комплексної оцінки властивостей пухлини. Стан ядерцевих організаторів (кількість та об'єм) у цілому не відображає ступінь порушення диференціювання аденокарцином товстої кишки та не може бути самостійним критерієм для її оцінки.

3. Аденокарциноми товстої кишки за кореляцією між вмістом ДНК у ядрах клітин та ІМ Ki-67 (r від +1 до -1) можна розділити на такі, у яких зростання вмісту ДНК відбувається за рахунок високої проліферативної активності (велика

частка клітин, у яких відбувається синтез ДНК) і пухлини, у яких цей показник зумовлений збільшенням частки поліплоїдних клітин. Відповідно, комплексна оцінка ДНК/проліферативної активності може бути високоінформативним критерієм при визначенні потенції розвитку аденокарцином товстої кишки. Варіабельність проліферативної активності як в аденокарциномах товстої кишки різних G, так і в доброякісних пухлинах (2,17-98,00 %; $r=0,58$), не дає можливості з достатнім ступенем достовірності використовувати самостійно ІМ Ki-67 для визначення злоякісного потенціалу окремо взятої пухлини.

4. Аденокарциноми товстої кишки мають широкий спектр частоти експресії Bcl-2 та p53. Наявність чи відсутність експресії Bcl-2 та p53 в аденокарциномах товстої кишки у цілому достовірно не відрізняється в пухлинах різних G. Наявність експресії Bcl-2 у клітинах пухлини призводить до більш значного ($p=0,416$; $p<0,05$), ніж p53 ($p=0,313$; $p<0,05$), збільшення ДНК в ядрах клітин аденокарцином товстої кишки.

5. Гетерогенність клітинного складу аденокарцином товстої кишки за вмістом ДНК у ядрах клітин зменшується зі зростанням G, що проявляється збільшенням відносної частки клітин з ядрами, які найбільш відповідають функціонально активним ($p<0,01$). З цих позицій клітинна гетерогенність аденокарцином товстої кишки повинна розглядатися не як лінійна, а як логістична функція ($R^2=0,98$), що найкраще описується функцією Гомпертца ($R^2=0,99$).

6. Аденокарциноми товстої кишки різних грейдів якісно відрізняються одна від одної за ознаками стану ядра. Для розмежування аденокарцином товстої кишки суміжних грейдів потрібні моделі, які мають різні коефіцієнти рівняння регресії та набір параметрів. Ключовими ознаками при розрізненні доброякісних новоутворень від аденокарцином є: середній вміст ДНК, відносна частка клітин з функціонально активними ядрами, кількість ядерцевих організаторів, ІМ Ki-67 та рівень експресії p53. Схожим набором характеризується модель, що розмежовує аденокарциноми товстої кишки G1 від G2 та включає ще середній об'єм ядерцевого організатора. Різниця між аденокарциномами товстої кишки G2 та G3 є досить нечіткою, яка відрізняється лише двома параметрами – рівнем експресії Bcl-2 та p53.

7. Окремо взяті ознаки стану ядер клітин аденокарцином товстої кишки (кількість ДНК, кількість і обсяг ядерцевих організаторів, частота експресії Ki-67, Bcl-2 і p53) не можуть слугувати в якості самостійних критеріїв її індивідуального прогнозу. Проте, похідні від ряду зазначених ознак можуть бути достовірно значущими критеріями прогнозу (зокрема nNOR/Ki-67, nNOR×NDNA і nNOR×NDNA/Ki-67). На основі рівняння пропорційних інтенсивностей Кокса отримана модель виживаності гарної якості для пацієнтів з аденокарциномами товстої кишки G2 і G3 зі збільшеним середнім вмістом ДНК в ядрах пухлинних клітин. Запропонована модель демонструє якість ($AUC=0,725$; $p<0,01$), що удвічі перевищує притаманну моделі, побудованої лише на використанні ступеня диференціювання ($AUC=0,339$; $p=0,05$).

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Окремо взяті ознаки стану ядер клітин аденокарцином товстої кишки (кількість ДНК, кількість і об'єм ядерцевих організаторів, частота експресії Ki-67, Bcl-2 і p53) не мають значимої цінності та не можуть виступати в якості прямих критеріїв визначення G пухлини та індивідуального прогнозу.

2. Площа перетину ядер пухлинних клітин на гістологічному препараті може використовуватись для непрямого визначення плоідності аденокарцином товстої кишки у рутинній патогістологічній практиці без застосування складних методів забарвлення та вимірювань.

3. Визначення G аденокарцином товстої кишки може бути здійснено за багатофакторною оцінкою, що включає такі ознаки: середній вміст ДНК, частка клітин з функціонально активними ядрами, стан ядерцевих організаторів, частка клітин, що експресують Ki-67, Bcl-2 та p53.

4. Ймовірність виживаності в різних часових інтервалах хорошої якості для пацієнтів з аденокарциномою товстої кишки G2 і G3 може бути розрахована з використанням таких критеріїв: грейд (G), середня кількість ДНК в ядрах клітин пухлини, індекс мічення Ki-67, середня кількість ядерцевих організаторів.

СПИСОК ПРАЦЬ, ЩО ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Грабовий О. М., Антонюк С. А., Воробей Є. А. Вміст нуклеїнових кислот у ядрах клітин епітеліальних пухлин товстої кишки // Український морфологічний альманах. – 2013. Т. 11, № 1. С. 73–76. *(Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак (морфометрична і денсіометрична), статистичний аналіз, узагальнення, підготовка публікації).*

2. Грабовий О. М., Антонюк С. А., Воробей Є. А. Мітотична активність та вміст нуклеїнових кислот у ядрах клітин епітеліальних пухлин товстої кишки // Патологія. 2013. № 2 (28). С. 13–16. *(Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак (морфометрична і денсіометрична), статистичний аналіз, узагальнення, підготовка публікації до друку).*

3. Грабовий О. М., Антонюк С. А., Воробей Є. А. Стан ядерцевих організаторів та вміст нуклеїнових кислот у ядрах клітин епітеліальних пухлин товстої кишки // Клиническая онкология. 2013. № 11 (3). С. 156–159. *(Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак (морфометрична і денсіометрична), статистичний аналіз, узагальнення, підготовка публікації до друку).*

4. Колоректальний рак: патогенетична інформативність гістологічного дослідження / О. М. Грабовий, С. А. Антонюк, Є. А. Воробей, Т. М. Савчин // Клиническая онкология. 2014. № 16 (4). С. 62–69. *(Особистий внесок: пошук і аналіз літератури – 70%, оформлення статті).*

5. Питомий вміст ДНК у ядрах клітин та клітинна гетерогенність аденокарцином товстої кишки / О. М. Грабовий, С. А. Антонюк, В. П. Сільченко, Є. А. Воробей, Т. М. Савчин // Патологія. 2015. № 1 (33). С. 44–47. *(Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак (морфометрична і*

денсіометрична), статистичний аналіз проведено разом з Т. М. Савчиним, узагальнення, підготовка публікації до друку).

6. Вміст ДНК у ядрах клітин аденокарцином товстої кишки та експресія Bcl-2 і p53 / О. М. Грабовий, С. О. Антонюк, В. П. Сільченко, Є. А. Воробей, Т. М. Савчин // Клиническая онкология. 2015. № 18 (2). С. 18–21. *(Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак, статистичний аналіз проведено разом з Т. М. Савчиним, узагальнення, оформлення статті).*

7. Modelling of survival of patients with colon adenocarcinoma based on multivariable analysis of the state of cancer cell nuclear apparatus / A. N. Grabovoy, O. O. Kolesnik, T. M. Savchyn, S. A. Antoniuk // Exp. Oncol. (Ukraine). 2016. V. 38, № 1. P. 45–48. *(Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак, статистичний аналіз, побудова математичної моделі проведено разом з Т. М. Савчиним, узагальнення, оформлення статті).*

8. Клітинна гетерогенність пухлин як показник їх патогенетичного потенціалу / О. М. Грабовий, М. Б. Зарецький, О. М. Потороча, С. А. Антонюк, А. Д. Великошапко // Актуальні проблеми онкоморфології : матеріали наук.-практ. конф. з між нар. участю та III конференції Українського дивізіону інтернаціональної академії патології. 12–13 травня 2011 р., м. Харків. – Харків, 2010. С. 17. *(Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак, оформлення тез).*

9. Морфо-функціональна гетерогенність клітин пухлин як показник їх патогенетичного потенціалу / О. М. Грабовий, М. Б. Зарецький, О. М. Потороча, С. А. Антонюк, А. Д. Великошапко // XII з'їзд онкологів України : матеріали з'їзду. 20–22 вересня 2011, Судак, АР Крим. Клиническая онкология. 2011. Спец. вып. II. С. 20. *(Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак, оформлення тез).*

10. Грабовой А. Н., Антонюк С. А., Василишин О. И. Гетерогенность клеточного состава эпителиальных опухолей толстой кишки по содержанию нуклеиновых кислот // VII съезд онкологов и радиологов СНГ (5–6 сентября 2012 г., Астана). Астана, 2012. С. 45–46. *(Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак, оформлення тез).*

11. Грабовий О. М., Антонюк С. А., Воробей Є. А. Вміст нуклеїнових кислот у ядрах клітин епітеліальних пухлин товстої кишки різного ступеня злоякісності // Український медичний альманах. 2013. Т. 16, № 3 (додаток). С. 173. *(Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак, оформлення тез).*

12. Грабовий О. М., Антонюк С. А. Зв'язок між станом ядерцевих організаторів та вмістом нуклеїнових кислот у ядрах клітин епітеліальних пухлин товстої кишки // Морфологічні основи наукових досліджень в медицині : матеріали наук.-практ. конф., присвяч. 110-річчю з дня народження Зазибіна М. І. Київ, 2013. С. 50. *(Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак, оформлення тез).*

13. Грабовий О. М., Антонюк С. А. Вміст нуклеїнових кислот у ядрах клітин та стан ядерцевих організаторів в епітеліальних пухлинах товстої кишки //

Фундаментальна та клінічна медицина : матеріали наук. конф., присвяч. 90-річчю з дня народження К. С. Кабака. К., 2014. С. 71–72. (*Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак, оформлення тез*).

14. Антонюк С. А., Грабовой А. Н. Современные подходы гистологического типирования и прогнозирования рака прямой кишки // Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України : III Міжнар. мед. конгрес, Київ, 14–16 жовтня 2014 р. Київ, 2014. С. 39. (*Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак, оформлення тез*).

15. Грабовий О. М., Антонюк С. А., Савчин Т. М. Експресія p53 та вміст ДНК в клітинах аденокарцином товстої кишки // Фундаментальна та клінічна медицина : матеріали наук.-практ. конф. (Київ, 20–22 травня 2015 р.). К., 2015. С. 29–30. (*Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак, оформлення тез*).

16. Антонюк С. А., Грабовий О. М. Експресія Vcl-2 та вміст ДНК у клітинах аденокарцином товстої кишки // Сучасна онкологія: діагностика та лікування : тези наук.-практ. конф. з міжнар. участю (для молодих вчених). 17 квітня 2015 р., Київ. Клиническая онкология. 2015. № 2 (18). С. 61. (*Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак, оформлення тез*).

17. Грабовой А. М., Антонюк С. А., Савчин Т. М. Состояние ДНК в ядрах клеток аденокарцином толстой кишки // XIII з'їзд онкологів та радіологів України: матеріали з'їзду, 26–28 травня 2016 р., Київ. Український радіологічний журнал. 2016. Додаток 1. С. 12–13. (*Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак, оформлення тез*).

18. Антонюк С. А., Савчин Т. М., Грабовий О. М. Клітинна гетерогенність за питомим вмістом ДНК як самостійний прогностичний показник при аденокарциномах товстої кишки // Перспективи діагностики та лікування онкологічної патології : матеріали наук.-практ. конф. молодих вчених. 18 березня 2016 р., Київ. Клиническая онкология. 2016. № 2 (22). С. 64. (*Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак, оформлення тез*).

19. Грабовий О. М., Антонюк С. А., Савчин Т. М. Багатофакторний аналіз морфо-функціонального стану ядерного апарату клітин аденокарцином товстої кишки // Впровадження сучасних досягнень медичної науки у практику охорони здоров'я України : IV Міжнар. мед. конгрес (15–17 квітня 2015 р., м. Київ). Київ, 2015. С. 25. (*Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак, оформлення тез*).

20. Грабовой А. Н., Антонюк С. А., Савчин Т. М. Гистологическая градация аденокарцином толстой кишки: уточнение на основе состояния ядерного аппарата опухолевых клеток // XIII з'їзд онкологів та радіологів України : матеріали з'їзду, 26–28 травня 2016 р., Київ. Український радіологічний журнал. 2016. Додаток 1. С. 13. (*Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак, оформлення тез*).

21. Моделирование выживаемости при аденокарциноме толстой кишки / А. Н. Грабовой, Т. М. Савчин, С. А. Антонюк, Т. А. Тарасова, Е. А. Колесник // XIII з'їзд онкологів та радіологів України: матеріали з'їзду, 26–28 травня 2016 р.,

Київ. Український радіологічний журнал. 2016. Додаток 1. С. 69. (*Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак, сумісно з Савчиним Т. розрахунок моделі, оформлення тез*).

22. Виживаність при аденокарциномах товстої кишки та стан ядер пухлинних клітин / С. А. Антонюк, Т. М. Савчин, Т. О. Тарасова, О. О. Колеснік, О. М. Грабовий // Перспективи діагностики та лікування онкологічної патології: матеріали наук.-практ. конф. молодих вчених. 18 березня 2016 р., Київ. Клиническая онкология. 2016. № 2 (22). С. 64. (*Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак, сумісно з Савчиним Т. розрахунок моделі, оформлення тез*).

23. Савчин Т. М., Антонюк С. А., Грабовий О. М. Об'єктивізація визначення ступеня дедиференціювання аденокарциноми товстої кишки // Перспективи діагностики та лікування онкологічної патології : матеріали наук.-практ. конф. молодих вчених. 18 березня 2016 р., Київ. Клиническая онкология. – 2016. № 2 (22). С. 75. (*Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак, сумісно з Савчиним Т. розрахунок моделі, оформлення тез*).

24. Savchyn T., Grabovoy A., Antoniuk S. Morphofunctional types of tumor cells as prognostic factors in colorectal cancer // Youth and Progress of Biology : XII International Scientific Conference for students and PhD students : Book of Abstr. Lviv, 2016. P. 320–321. (*Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак*).

25. Savchyn T., Antoniuk S.A., Grabovoy A.N. 1594P Qualitative and quantitative differences in a set of criteria for histological grading of colorectal cancer // Annals of Oncology. 2016. V. 27, Suppl. 6 (Abstract Book of the 41st ESMO Congress (ESMO 2016) 7–11 October 2016, Copenhagen, Denmark). P. 548–549. (*Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак*).

26. Спосіб непрямого визначення вмісту ДНК у ядрах епітеліальних пухлин товстої кишки: пат. 85714 Україна / Грабовий О. М., Антонюк С. А., Воробей Є. А.; № у 2013 07549; заявл. 14.06.2013; опубл. 25.12.2013. Бюл. № 22. (*Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак (морфометрична і денсіометрична), статистичний аналіз, узагальнення, оформлення заявки*).

27. Спосіб визначення частки функціонально активних клітин у складі епітеліальних пухлин товстої кишки: пат. 108521 Україна / Грабовий О. М., Антонюк С. А., Савчин Т. М.; № у 2015 12522; заявл. 18.12.2015; опубл. 25.07.2016. Бюл. № 14. (*Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак (морфометрична і денсіометрична), статистичний аналіз, узагальнення, оформлення заявки*).

28. Спосіб прогнозування виживаності при аденокарциномі товстої кишки: пат. 109373 Україна / Грабовий О. М., Колесник О. О., Антонюк С. А., Савчин Т. М.; № у 2016 01526 ; заявл. 19.02.2016; опубл. 25.08.2016. Бюл. № 16. (*Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак, статистичний аналіз, побудова математичної моделі проведено разом з Т. М. Савчиним, узагальнення, оформлення заявки*).

29. Грабовий О. М., Антонюк С.А., Савчин Т.М. Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 13 – 2017 «Визначення ступеня диференціювання аденокарцином товстої кишки за кількісними параметрами стану ядерного апарату пухлинних клітин». Київ, 2017. 4 с. (*Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак, статистичний аналіз, побудова математичної моделі проведено разом з Т. М. Савчиним, узагальнення, оформлення листа*).

30. Грабовий О. М., Антонюк С. А., Воробей Е. А. Методика непрямого визначення ДНК у ядрах епітеліальних пухлин товстої кишки // Перелік наукової (науково-технічної) продукції, призначеної для впроваджень досягнень медичної науки у сферу охорони здоров'я (Реєстр. № 293/1/14). – Київ, 2015. В. 1, т. 1. С. 185. (*Особистий внесок: відбір матеріалу, кількісна оцінка ознак, статистичний аналіз, узагальнення, підготовка публікації*).

АНОТАЦІЯ

Антонюк С.А. Оптимізація визначення диференціювання аденокарциноми товстої кишки та моделювання виживаності на основі багатфакторної оцінки гістологічних критеріїв. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.02 «Патологічна анатомія». – Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, Львів, 2017.

Похідні ряду ознак ядер клітин аденокарцином товстої кишки (кількість ДНК, кількість і обсяг ядерцевих організаторів, експресія Ki-67, Bcl-2 і p53) є значущими критеріями для визначення їх грейду та моделювання виживаності. Розмежування аденокарцином товстої кишки різних грейдів можливе за допомогою моделі на основі рівняння логістичної регресії. Похідні від ряду ознак ядер клітин пухлини можуть бути значущими критеріями прогнозу (кількість ядерець/Ki-67, кількість ядерець×кількість ДНК і кількість ядерець×кількість ДНК/Ki-67). На основі рівняння пропорційних інтенсивностей Кокса отримана модель виживаності гарної якості для пацієнтів з аденокарциномами товстої кишки G2 і G3 зі збільшеним середнім вмістом ДНК в ядрах пухлинних клітин. Запропонована модель демонструє якість, що удвічі перевищує притаманну моделі, побудованої тільки на використанні ступеня диференціювання.

Ключові слова: аденокарцинома товстої кишки, диференціювання, виживаність, ДНК, ядерцеві організатори, Ki-67, Bcl-2, p53, моделювання.

АННОТАЦИЯ

Антонюк С.А. Оптимизация определения дифференцировки аденокарциномы толстой кишки и моделирования выживаемости на основе многофакторной оценки гистологических критериев. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.02 «Патологическая анатомия». – Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого МЗ Украины, Львов, 2017.

Установлено, что прямая связь с механизмами развития и изменением клеточного состава опухоли в процессе опухолевой прогрессии и клональной эволюции позволяет использовать изменения количества ДНК в клетках аденокарцином толстой кишки как составляющую при многофакторном анализе для определения грейда и индивидуального прогноза.

Состояние ядрышковых организаторов (NOR) (количество и объем) в целом не отражает степень нарушения дифференцировки аденокарцином толстой кишки и не может быть самостоятельным критерием для ее оценки. В ранжированных рядах клеток аденом по количеству ДНК в ядрах существует высокая степень связи между количеством ДНК и общим объемом ядрышковых организаторов ($r=0,92$). В аденокарциномах эта зависимость нарушается. Степень нарушения связи состояния NOR с накоплением ДНК является основанием для их включения в комплексной оценки свойств опухоли.

Аденокарциномы толстой кишки по корреляции между содержанием ДНК в ядрах клеток и индекса мечения Ki-67 (r = от 1 до -1) можно разделить на такие, в которых рост содержания ДНК происходит за счет высокой пролиферативной активности (большая часть клеток, в которых происходит синтез ДНК), и опухоли, в которых этот показатель обусловлен увеличением доли полиплоидных клеток. Соответственно, комплексная оценка ДНК/пролиферативной активности может быть высокоинформативным критерием при определении потенции развития аденокарцином толстой кишки.

Аденокарциномы толстой кишки имеют широкий спектр частоты экспрессии Bcl-2 и p53. Наличие или отсутствие экспрессии Bcl-2 и p53 в аденокарциномах толстой кишки в целом достоверно не отличается в опухолях различных грейдов. Наличие экспрессии Bcl-2 в клетках опухоли приводит к более значительному ($p=0,416$; $p<0,05$), чем p53 ($p=0,313$; $p<0,05$), увеличению ДНК в ядрах клеток аденокарцином толстой кишки.

Гетерогенность клеточного состава аденокарцином толстой кишки по содержанию ДНК в ядрах клеток уменьшается с ростом грейда, что проявляется увеличением относительной доли клеток с ядрами, которые наиболее соответствуют функционально активным ($p<0,01$). С этих позиций клеточная гетерогенность аденокарцином толстой кишки должна рассматриваться не как линейная, а как логистическая функция ($R^2=0,98$), что наиболее точно описывается функцией Гомпертца ($R^2=0,99$).

Аденокарциномы толстой кишки различных грейдов качественно отличаются друг от друга по признакам состояния ядра. Для разграничения аденокарцином толстой кишки смежных грейдов нужны модели, которые имеют разные коэффициенты уравнения регрессии и набор параметров. Ключевыми признаками при различении доброкачественных новообразований от аденокарцином толстой кишки являются: среднее содержание ДНК, относительная доля клеток с функционально активными ядрами, количество ядрышковых организаторов, индекс мечения Ki-67 и уровень экспрессии p53. Схожим набором характеризуется модель, которая разграничивает аденокарциномы толстой кишки G1 от G2 и включает еще и средний объем

ядрышкового организатора. Разница между аденокарциномами толстой кишки G2 и G3 незначительна и отличается только двумя параметрами – уровнем экспрессии Bcl-2 и p53.

Отдельно взятые признаки состояния ядер клеток аденокарцином толстой кишки (количество ДНК, количество и объем ядрышковых организаторов, частота экспрессии Ki-67, Bcl-2 и p53) не могут служить в качестве самостоятельных критериев ее индивидуального прогноза. Однако производные от ряда признаков могут быть достоверно значимыми критериями прогноза (в частности $nNOR/Ki-67$, $nNOR \times NDNA$ и $nNOR \times NDNA/Ki-67$). На основе уравнения пропорциональных интенсивностей Кокса полученная модель выживаемости хорошего качества для пациентов с аденокарциномами толстой кишки G2 и G3, которые имеют увеличенное среднее содержание ДНК в ядрах опухолевых клеток. Предложенная модель демонстрирует качество ($AUC=0,725$; $p<0,01$), что вдвое превышает качество модели, построенной только на использовании степени дифференцировки ($AUC=0,339$; $p=0,05$), которая на сегодня является фактически единственным общепринятым самостоятельным гистологическим критерием прогноза.

Интеграция критериев (отдельных признаков и их сложных производных), отражающих состояние ядерного аппарата клеток АКТК, а точнее комплекса митотическая активность/количество ДНК в математическую модель, позволило получить инструмент, который дает возможность объективно и с достаточно высокой степенью достоверности определить качественно новые характеристики опухоли. Последние являются основой для персонализации лечения пациентов с этим типом рака и повышением его эффективности.

Ключевые слова: аденокарцинома толстой кишки, дифференцировки, выживаемость, ДНК, ядрышковые организаторы, Ki-67, Bcl-2, p53, моделирование.

SUMMARY

Antoniuk S.A. Optimization of determination of colon adenocarcinoma differentiation and survival modeling based on multivariate assessment of histological criteria. – As Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Medical Sciences by specialty 14.03.02 «Pathological Anatomy». – Danylo Halytsky Lviv National Medical University Ministry of Health of Ukraine, Lviv, 2017.

Established that a number of features derived from the cell nuclei of colon adenocarcinoma (amount of DNA, number and volume of nucleolar organizers expression of Ki-67, Bcl-2 and p53) are important criteria to determine their grade and survival modeling. Differentiation of the different grade colon adenocarcinoma can be done using a model based on logistic regression equation. Derivatives from a number of features can serve as significant prognostic criteria (number of nucleolar organizers/Ki-67, the number of nucleolar organizers $\times$ DNA amount and of nucleolar organizers $\times$ DNA amount/Ki-67). Based on the equation of Cox proportional intensities, there was developed the survival model of good quality for patients with colon adenocarcinoma of grades G2 and G3 with increased average content of DNA in

the nuclei of tumor cells. The proposed model demonstrates the quality (AUC=0.725; $p<0.01$) twice higher than that of the model based on the use of the differentiation grade only (AUC=0.339; $p=0.05$), which today is in fact the only generally accepted independent histological criterion of prognosis.

Keywords: adenocarcinoma of the colon, differentiation, survival, DNA, nucleolar organizer, Ki-67, Bcl-2, p53, modeling.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

AUC	–	значення площі під ROC-кривою
D	–	пухлини з середнім вмістом ДНК у ядрах (до 1,2)
D+	–	пухлини з середнім вмістом ДНК у ядрах (від 1,2 до 2,5)
DM	–	питома оптична щільність ядра клітини
G	–	ступінь диференціювання пухлини
LR	–	тест відношення правдоподібності
M	–	середнє арифметичне значення
m	–	помилка середнього
Narea	–	площа перетину ядра клітини
NIntDen	–	інтегративна оптична щільність ядра клітини
Nl	–	відносна кількість пухлини з ядрами у стані лізису хроматину
Nn	–	відносна кількість пухлини з нормальними ядрами
nNOR	–	кількість ядерцевих організаторів
NOR	–	ядерцевий організатор
Np	–	відносна кількість пухлини з ядрами у стані пікнозу
NV	–	об'єм ядра
NДНК	–	вміст ДНК в ядрі клітини
NHK	–	вміст нуклеїнових кислот у ядрі клітини
<i>p</i>	–	достовірна різниця
P	–	поліплоїдні пухлини
T+	–	пухлини з середнім вмістом ДНК у ядрах (понад 2,5)
v/NOR	–	середній об'єм ядерцевого організатора
vNOR	–	сумарний об'єм ядерцевих організаторів у ядрі
AK	–	аденокарцинома
AKTK	–	аденокарцинома товстої кишки
ЕПТК	–	епітеліальна пухлина товстої кишки
IM	–	індекс мічення
KPP	–	колоректальний рак
NK	–	нуклеїнова кислота
P1, P2 ...	–	ранг пухлинних клітин пухлини за вмістом ДНК