

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ДНК ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ

Неродо Г.А., Новикова И.А., Никитина В.П., Арджа А.Ю., Кравцова О.Е., Черникова Е.Н., Ульянова Е.П., Бондаренко Е.С.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: onco-sekretar@mail.ru

Методом ДНК-проточной цитометрии исследован и проанализирован операционный материал, полученный от 24 больных раком яичников I–IV стадий. Возраст больных 46–68 лет. Проведено определение ploидности и анализ по фазам клеточного цикла. Выявлены закономерности при распределении клеток в зависимости от диплоидного и анеуплоидного типа опухоли. Получены достоверно значимые различия ранних и распространенных форм, характеризующих агрессивность течения заболевания, такие как повышение темпов пролиферации, индекс пролиферации и снижение доли клеток в G0/G1-фазе клеточного цикла. Отмечена тенденция к увеличению доли анеуплоидных опухолей при III–IV стадии заболевания в сравнении с ранними стадиями. При сопоставлении с клиническими данными выявлено, что при диплоидном типе распределения ремиссия более одного года отмечалась чаще, чем при анеуплоидном типе распределения клеток опухоли.

Ключевые слова: ДНК проточная цитометрия, рак яичников, III–IV стадия, ploидность.

CLINICAL VALUE OF DNA FLOW CYTOMETRY IN OVARIAN CANCER

Nerodo G.A., Novikova I.A., Nikitina V.P., Ardzha A.Yu., Kravtsova O. E., Chernikova E.N., Ulianova E.P., Bondarenko E.S.

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: onco-sekretar@mail.ru

Surgical material obtained from 24 patients with stage I-IV ovarian cancer was studied by DNA flow cytometry. The patients were aged from 46 to 68 years old. Tumor ploidy and phases of the cell cycle were analyzed. Some patterns in cell cycle distribution depending on diploid and aneuploid tumor types were revealed. We found statistically significant differences between early and advanced types characterizing the disease aggressiveness, such as higher proliferation rates, proliferation index and reduced proportion of cells in G0/G1 phase. A tendency to increasing proportion of aneuploid tumors in stage III-IV disease compared to early stages was observed. Comparison with the clinical data showed that remission for more than one year was more frequent in patients with diploid tumors than with aneuploid ones.

Keywords: DNA flow cytometry, ovarian cancer, stage III–IV, ploidy.

Рак яичников среди злокачественных опухолей женской репродуктивной системы занимает 3-е место после рака тела и шейки матки и 7-е место в общей структуре онкологических заболеваний.

Смертность от данной патологии остается на достаточно высоком уровне, несмотря на усовершенствование методов лечения. В России в 2013 году от рака яичников умерли 7,7 тыс. больных, что составляет 5,7 % среди всех злокачественных новообразований у женщин, причем средний возраст заболевших приходится на 59 лет [2].

Низкая выживаемость при раке яичников обусловлена поздней диагностикой, бессимптомным течением заболевания на ранних стадиях, и, как следствие, около 80 % заболевших умирают в первые два года после установления диагноза [1].

Для оценки прогноза и выживаемости учитывается возраст больных, стадия заболевания, размер остаточной опухоли после хирургического лечения, морфологическая

градация и степень дифференцировки опухоли, уровень маркера СА-125, HE-4 [7, 9].

К сожалению, используемые прогностические параметры не дают в полной мере информации, по которой можно объективно судить о течении заболевания.

Известно, что при различных патологических состояниях, в том числе злокачественных процессах, количество ДНК не бывает одинаковым (диплоидным) и отклоняется от нормального содержания (анеуплоидия) в сторону уменьшения или увеличения [3].

В настоящее время исследуется способ прогнозирования течения опухолевого процесса при различных новообразованиях с использованием метода лазерной ДНК-проточной цитометрии. В результате чего выявлено, что диплоидные опухоли имеют более благоприятное течение, чем анеуплоидные. Анеуплоидия является неблагоприятным признаком, у таких больных выше частота рецидивов, и короче период клинической ремиссии. [6].

Методом ДНК проточной цитометрии изучалось содержание ДНК в опухолевых клетках при раках различных локализаций [4,5,6]. Данный метод позволяет определить ploидность опухолевых клеток, количество анеуплоидных клеток в опухоли, распределение по фазам клеточного цикла, а также определить индекс пролиферации.

Сопоставление с клиническими данными, а также известными факторами прогноза позволяет рассматривать данный показатель как независимый прогностический признак [3].

Содержание ДНК в клетках и интенсивность клеточной пролиферации, темп деления опухолевых клеток являются важными составляющими, которые характеризуют агрессивность злокачественного процесса, биологические свойства опухоли и возможно прогнозируют ее течение в будущем [8,10].

Таким образом, изучение ДНК-цитометрических параметров опухоли является перспективным в оценке прогноза заболевания, однако требует дополнительного изучения и сопоставления с клиническими данными, а также способствует индивидуализации лечения больных раком яичников.

Цель исследования

Изучение ДНК цитометрических параметров опухолей у больных раком яичников I–IV стадий заболевания.

Материал и методы исследования

Для ДНК цитометрии был использован операционный материал, полученный от 24 больных раком яичников I–IV стадий, находившимся на лечении в отделении гинекологии ФГБУ РНИОИ. Возраст больных 46–68 лет, их средний возраст составил 56,4. Методом ДНК проточной цитометрии изучено и проанализировано содержание клеток, определение

плоидности и анализ клеточного цикла в свежем операционном материале. Подготовка тканей опухоли для цитометрического анализа осуществлялась с использованием дезагрегирующего устройства BD Medimachine. Для анализа ДНК в тканях опухоли использовали CycleTEST™PLUS DNA ReagentKit (кат. №340242, BectonDickinson). Образцы (не менее 20 000 клеток) после окрашивания пропидиумом йодидом (PI) анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II, оборудованном модулем дискриминации дуплетов. Для тестирования и подтверждения оптимальной работы проточного цитометра использовали универсальные биологические частицы DNA QC Particles (BD, кат. №349523). Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы ModFit LT, позволяющей анализировать плоидность и распределение клеток опухоли по фазам клеточного цикла и детализировать число клеток в фазах S и G2 + M. Долю клеток с различным содержанием ДНК на гистограмме вычисляли как процент от общего числа исследованных клеток. Долю клеток в разных фазах клеточного цикла выражали в процентах. Диплоидным стандартом служили лимфоциты здоровых доноров.

Для оценки степени анеуплоидии вычисляли индекс ДНК как соотношение между значением канала пика G0/G1 нормального диплоидного образца. Индекс ДНК диплоидных клеток соответствовал 1,0. Если на ДНК-гистограмме имелся один пик, соответствующий нормальному содержанию ДНК, в ядрах опухоли считали диплоидной, если был пик, отличающийся от диплоидного, опухоль считали анеуплоидной.

Результаты и их обсуждение

Из 24 исследуемых женщин в I стадии было 3 больных (12,5 %), во II стадии 2 больных (8,3 %), в III стадии 16 больных (66,7 %), в IV стадии 3 больных (12,5 %). Всем больным лечение было начато с оперативного вмешательства. Из 24 больных 4 (16,7 %) рак яичников был диагностирован во время хирургического вмешательства по поводу другой патологии, у одной (4,2 %), рак яичников выявлен интраоперационно, у 8 (33,3 %) верификация получена путем цитологического исследования пунктата заднего свода и у 11 (45,8 %) верификация получена при цитологическом исследовании асцитической жидкости, полученной путем лапароцентеза.

При морфологическом исследовании послеоперационного материала у 17 больных (71 %) выявлена серозная аденокарцинома, у 6 больных (25 %) серозная папиллярная аденокарцинома и у одной (4 %) муцинозная аденокарцинома.

При исследовании индекса ДНК обнаружено, что 54,2 % опухолей являлись диплоидными и 45,8 % анеуплоидными. Опухоли у 90,9 % больных раком яичников содержали большое количество (более 40 %) анеуплоидных клеток, в то время как 9,1 % больных содержание анеуплоидных клеток в опухоли не превышало 20 %.

Изучение ДНК-цитометрических параметров рака яичников в зависимости от стадии заболевания выявило преобладание при I–II стадии и III–IV стадии диплоидных опухолей. При III–IV стадии отмечена тенденция к увеличению доли анеуплоидных опухолей в сравнении с I–II стадией (табл. 1).

Таблица 1

**Распределение больных раком яичников в зависимости от стадии заболевания и
плоидности опухоли**

Стадия	диплоидные		анеуплоидные	
	абс ч.	%	абс ч.	%
I–II (n=5)	3	60	2	40
III–IV (n=19)	10	52,6	9	47,4

При анализе распределения клеток по фазам клеточного цикла (табл. 2) установлено, что основная масса клеток опухоли яичников, независимо от стадии заболевания, находилась в G0/G1 фазе клеточного цикла, так у больных с I–II стадиями заболевания в данной фазе клеточного цикла находилось 86,7%, а с III–IV стадиями – 78,6 %.

При этом скорость пролиферации клеток опухоли определялся по доле клеток в S-фазе и индекс пролиферации определяемый по доле клеток в S+G2+M-фазе при III–IV стадии заболевания достоверно значимо превышал аналогичные показатели при I–II стадии.

Скорость пролиферации клеток опухоли у больных с III–IV стадиями заболевания составляла 22,3 %, что значительно превышало скорость пролиферации у больных с I–II стадиями – 13,02 % ($p \leq 0,005$). Индекс пролиферации у больных с III–IV стадиями также был значительно больше, чем у больных с I–II стадиями – 23,6 % и 13,39 % соответственно ($p \leq 0,05$).

Таблица 2

Распределение клеток по фазам клеточного цикла в зависимости от стадии (%)

Стадия	G0/G1- фаза клеточного цикла	G2/M -фаза клеточного цикла	S - фаза клеточного цикла	Индекс пролиферации
I-II	86,70±4,7	0,37±0,2	13,02±2,7	13,39±2,5
III-IV	78,6±2,1	0,84±0,3	22,3±2,1*↑	23,6±2,4*↑

Примечания: * – отличия показателей достоверны по отношению к I–II стадии ($p \leq 0,05$).

Содержание клеток в G0/G1, S- и G2/M-фазах клеточного цикла диплоидных и анеуплоидных опухолей яичников меняется параллельно, при повышении пролиферативной активности характерно снижение содержания клеток в G0/G1-фазах клеточного цикла и увеличение содержания клеток в S- и G2+M-фазах клеточного цикла (табл. 3).

Нами отмечены достоверно значимые отличия анеуплоидных опухолей от диплоидных по трем из четырех исследованных показателей: снижение доли клеток в G0/G1-фазе и повышение темпов пролиферации (для клеток в S-фазе) и индекса пролиферации. Доля клеток в фазе G0/G1 анеуплоидных опухолей меньше, чем диплоидных: 72,6 % и 81,5 %, скорость пролиферации клеток анеуплоидных опухолей значительно выше, чем диплоидных (26,9 % и 18,1 %). Для анеуплоидных опухолей характерно значительное повышение индекса пролиферации по сравнению с диплоидными опухолями (27,2 % и 18,6 %). Представленные данные статистически достоверны ($p \leq 0,05$).

Таблица 3

Распределение клеток по фазам клеточного цикла (%)

Плоидность	G0/G1-фаза клеточного цикла	G2/M-фаза клеточного цикла	S -фаза клеточного цикла	Индекс пролиферации
Диплоидные	81,5±2,5	0,44±0,1	18,1±2,1	18,6±2,5
Анеуплоидные	72,6±2,8* ↓	0,5±0,1	26,9±1,9*↑	27,2±2,1*↑

Примечания: * – отличия показателей достоверны по отношению к диплоидным опухолям ($p \leq 0,05$).

При анализе клинического течения рака яичников в зависимости от типа опухоли выявлено, что ремиссия более одного года в 5 раз чаще отмечена при диплоидном типе распределения (9 % и 46 %), а прогрессирование заболевания в 3 раза чаще наблюдается при анеуплоидном типе распределения клеток опухоли (8 % и 27 %). Данные проведенного исследования представлены в таблице 4.

Таблица 4

Распределение больных в зависимости от плоидности опухоли и длительности ремиссии

	Диплоидный тип (n=13)		Анеуплоидный тип (n=11)	
	абс ч.	%	абс ч.	%
Ремиссия до одного года	6	46	7	64

Ремиссия более одного года	6	46	1	9
Прогрессирование	1	8	3	27

Заключение

Таким образом, на основании проведенного исследования ДНК – цитометрических параметров рака яичников нами получено, что для III–IV стадии заболевания отмечена тенденция к увеличению доли анеуплоидных опухолей в сравнении с ранними стадиями.

Анеуплоидные опухоли характеризуются достоверно значимым увеличением темпов пролиферации и индексом пролиферации и снижением доли клеток в G0/G1-фаза клеточного цикла в сравнении с диплоидными опухолями.

При анеуплоидных опухолях прогрессирование заболевания отмечено в 27 % случаев, при диплоидных в 8 % случаев, тогда как ремиссия более одного года при диплоидных опухолях отмечена у 46 % больных, при анеуплоидных у 9 % больных.

Нами получены достоверно значимые различия темпов пролиферации и индекса пролиферации опухолевых клеток при раке яичников ранних и распространенных его форм, характеризующих агрессивность течения злокачественного процесса, а также достоверно показано, что для анеуплоидных опухолей характерно увеличение скорости пролиферации и индекса пролиферации, определение которых может стать прогностическим фактором.

Список литературы

1. Антонеева И.И., Абакумова Т.В., Генинг Т.П. Схема дифференциальной диагностики стадий рака яичников // Современная онкология. – 2013. – Т. 15, № 1. – С.38-40.
2. Ашрафян Л.А., Киселев В.И., Муйжнек Е.Л. Современные принципы эффективной терапии рака яичников // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2015. – № 2. – С. 68-74.
3. Геворкян В.А. Пloidность как один из прогностических факторов течения заболевания у больных распространенной серозной аденокарциномой яичников: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Санкт-Петербург, 2006. – 26 с.
4. Неродо Г.А., Непомнящая Е.М., Новикова И.А., Шишкина О.Г. ДНК-цитометрический анализ параметров клеточного цикла рака тела матки у молодых женщин // Медицинская наука и образование Урала. – 2011. – № 2. – С.89-91.

5. Неродо Г.А., Новикова И.А., Акименко М.А., Мордань А.Ю. ДНК-цитометрические параметры эпителиального рака яичников // Мат. VII съезда онкологов и радиологов стран СНГ, (Астана, 5–7 сентября 2012 г.). – С.367.
6. Николаева Т.Г., Добрынин Я.В. Пloidность опухолевых клеток – важный прогностический фактор при некоторых злокачественных эпителиальных новообразованиях человека (собственные и литературные данные) // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2006. – Т.17, № 1. – С.29-36.
7. Паниченко И.В., Богатырев В.Н., Жордания К.И. Клиническое значение показателей ДНК-проточной цитофлуорометрии при раке яичников // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2007. – Т.18, № 1. – С.51-54.
8. Патент РФ №. 2013137090/15, 06.08.2013.
Неродо Г.А., Новикова И.А., Мордань А.Ю. Способ прогнозирования рецидива рака яичников// Патент России № 2530556. 2013. Бюл. № 28.
9. Kaern J., Aqhmeseh M., Nesland J.M. et al. Prognostic factors in ovarian carcinoma stage III patients. Can biomarkers improve the prediction of short-and long-term survivors? // Int. J Gynecol. Cancer. – 2005. – Vol.15, № 6. – P.1014-1022.
10. Novikova I., Nerodo G. Mordan A. Comparative Analysis of DNA-Cytometric Indices of Primary and Relapsing Ovarian Cencer. 2013 ASCO Annual Meeting (May 31 – June 4, 2013) e16558.