

© Коллектив авторов, 2013
УДК: 616.24-006.6:616-076.5

ПРОТОЧНО-ЦИТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ДНК В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО С ПАРАНЕОПЛАСТИЧЕСКИМ РЕВМАТОЛОГИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

С.А. Лысенко¹, С.И. Куркилевский², И.Л. Черешнюк¹

Винницкий национальный медицинский университет имени Н.И. Пирогова,
г. Винница (1)
Национальный институт рака, г. Киев (2)

Проведено исследование содержания ДНК и показателей клеточного цикла опухолевых клеток 70 больных раком легкого: 30 пациентов с паранеопластическим ревматологическим синдромом (ПНРС) и 40 - без проявлений данного синдрома. Установлено, что в опухолях больных раком легкого с ПНРС, в отличие от опухолей больных без симптомов данного синдрома, наблюдаются более высокая пролиферативная активность опухолевых клеток (S-фаза), повышенные показатели анеуплоидии ДНК (индекс ДНК, клеточный индекс, индекс анеуплоидии), а также отмечается более низкий уровень апоптоза. Все эти изменения свидетельствуют о более высокой агрессивности и злокачественности опухолевого процесса у больных раком легкого с наличием ПНРС.

Ключевые слова: проточная ДНК-цитометрия, клеточный цикл, анеуплоидия, рак легкого, паранеопластический ревматологический синдром.

Как известно, большинство злокачественных опухолей состоит из гетероплоидных популяций клеток, которые характеризуются изменениями структуры и количества хромосом (анеуплоидия и полиплоидия) и соответственно изменением содержания ДНК в ядрах клеток [1, 12]. Так, полиплоидные опухоли чаще всего более злокачественные, чем диплоидные, они более инвазивны, быстрее растут и метастазируют [2, 8]. При этом клетки полиплоидных опухолей обладают большей жизнеспособностью и приспособительной реакцией к разнообразным условиям микроокружения [13, 14].

Современный метод проточной ДНК-цитометрии позволяет с высокой точностью произвести анализ большого количества клеток и определить различные показатели клеточного цикла. В основе метода лежит измерение флюоресценции специальных красителей (маркеров), избирательно связывающихся с ДНК [3, 5].

Результаты современных ретроспективных и проспективных исследований свидетельствуют о том, что показатели содержания ДНК определенные с помощью проточной цитометрии характеризуют степень гетероплоидности клеток опухоли и их пролиферативную активность. Эти исследования дополняют общепринятые признаки оценки опухолевого процесса (размер первичной опухоли, степень распространения опухоли и др.) и являются существенными прогностическими факторами при многих злокачественных новообразованиях [4, 6, 7, 10].

Как известно, рак легкого относится к высокозлокачественным опухолям. Довольно часто он сочетается с паранеопластическим ревматологическим синдромом (ПНРС) [9, 11]. В настоящее время все больший интерес у исследователей вызывает изучение ДНК-цитометрического профиля у больных злокачественными

опухолями, в том числе и раком легкого. Информации относительно анализа содержания ДНК в опухолевых клетках больных раком легкого с наличием ПНРС мы не обнаружили.

Цель исследования - определение и сравнительный анализ содержания ДНК в опухолевых клетках больных раком легкого с наличием и без ПНРС.

Материалы и методы

В исследование вошли 70 больных раком легкого, которые находились на лечении в торакальном отделении Винницкого областного клинического онкологического диспансера. Все больные были разделены на две группы. Первая группа - 40 больных раком легкого без наличия ПНРС, вторая - 30 пациентов с раком легкого с проявлениями ПНРС. Забор опухолевого материала осуществлялся во время операций, который до проведения исследования хранился в замороженном состоянии.

Содержание ДНК в ядрах опухолевых клеток определяли методом проточной ДНК-цитометрии. Суспензии ядер из опухолевых клеток получали с помощью специального раствора для исследования ядерной ДНК CyStain DNA Step 1 (Partec, Германия) согласно протокола-инструкции фирмы производителя. Данный раствор позволяет маркировать ядерную ДНК диаминофенилиндолом (DAPI), который входит в его состав. В процессе приготовления нуклеарных суспензий использовались специальные одноразовые фильтры CellTrics 50 мкм (Partec, Германия).

Регистрацию данных выполняли на многофункциональном научно-исследовательском проточном цитометре "Partec PAS" (Partec, Германия) с применением программного обеспечения FloMax (Partec, Германия) в научно-исследовательском центре Винницкого национального медицинского университета имени Н.И. Пирогова. Для возбуждения флюоресценции DAPI применялось УФ-излучение. С каждого образца нуклеарной суспензии анализу подвергалось 20 тыс. событий. Циклический анализ клеток выполнялся средствами про-

граммного обеспечения Modfit LT for Windows 4.0 (Verity Software House, USA). Определяли показатели: количество диплоидных и анеуплоидных клеток в образце (%), распределение клеток каждой популяции по фазам клеточного цикла (G0G1, S, G2 + M). Также вычисляли специальные индексы, которые характеризуют ДНК анеуплоидию: DI (индекс ДНК - характеризует отношение интенсивности флюоресценции пика анеуплоидных клеток к диплоидному), CI (клеточный индекс) и AI (индекс анеуплоидии) [10].

$CI = AnC / (AnC + DiC)$ и $AI = (AnC \times DI + DiC \times 1) / (AnC + DiC)$, где AnC – количество анеуплоидных клеток в G0G1 фазе по отношению к общему количеству анеуплоидных клеток; DiC – количество диплоидных клеток в G0G1 фазе по отношению к общему количеству диплоидных клеток.

Исследование апоптоза (фрагментации ядерной ДНК) выполнено путем выделения SUB-G0G1 участка на ДНК-гистограммах перед пиком G0G1, указывающего на ядра клеток с содержанием ДНК < 2с.

Для оценки количественных результатов исследования определяли значение среднего (M) и ошибку среднего (m) - $M \pm m$. Для сравнения средних показателей двух различных исследуемых групп использовали параметрический t-критерий Стьюдента. Статистическую обработку проводили с помощью программного обеспечения для статистического анализа "Biostat" и "MS Excel XP".

Результаты и их обсуждение

При проведении анализа показателей проточной ДНК-цитометрии опухолевых клеток больных раком легкого установлено наличие отличительных молекулярно-биологических характеристик этих опухолей в зависимости от наличия ПНРС.

Так выявлено, что при диплоидном варианте опухоли, статистически достоверной между двумя группами является разница в содержании клеток в G0G1 и S фазах клеточного цикла (табл. 1). Количество опухолевых клеток в G0G1 фазе клеточного цикла у больных раком легкого без ПНРС составляло $87,09 \pm 1,69$ %, в то время как у

больных раком легкого с наличием ПНРС значение этого показателя было меньше на 9,04 % ($p < 0,05$) и составляло $79,87 \pm 1,82$ %. Параллельно, уменьшение содержания клеток в G0G1 фазе клеточного цикла сопровождается повышением содержания клеток в S и G2 + M фазах. Так, у больных раком легкого с наличием ПНРС содержание опухолевых клеток в S фазе было в 2,21 раза больше ($p < 0,01$) чем у пациентов без данного синдрома - $13,99 \pm 1,43$ % и $6,33 \pm 1,66$ % соответственно. Это свидетельствует о повышенной пролиферативной активности опухолевых клеток больных второй группы.

Если сравнивать распределение опухолевых клеток больных раком легкого по фазам клеточного цикла при анеуплоидном варианте опухоли видно, что общее количество диплоидных клеток у больных второй группы ($51,94 \pm 3,47$ %) на 23,01 % меньше ($p < 0,05$), чем у больных первой группы ($13,99 \pm 1,43$ %). Соответственно и общее содержание анеуплоидных клеток ($48,06 \pm 3,47$ %) у пациентов раком легкого с наличием ПНРС на 33,09 % больше ($p < 0,05$) нежели у пациентов раком легкого без данного синдрома ($36,11 \pm 2,72$ %). Также следует отметить, что содержание опухолевых клеток в S-фазе ($30,37 \pm 2,20$ %) у больных раком легкого с наличием ПНРС на 33,38% больше ($p < 0,01$) нежели у больных без ПНРС ($22,77 \pm 2,50$ %).

Анализируя показатели клеточного цикла опухолевых клеток больных раком легкого выявлены следующие изменения связанные с наличием у больных ПНРС (табл. 2). Так, при диплоидном профиле опухоли у больных раком легкого с наличием ПНРС, наблюдается повышенная ДНК-синтетическая и пролиферативная активность опухолевых клеток по сравнению с пациентами без ПНРС. Подтверждение этому - общее содержание клеток в S-фазе ($13,99 \pm 1,43$ %) у больных второй группы в 2,21 раза больше ($p < 0,01$), чем у больных первой группы ($6,33 \pm 1,66$ %). Также было установлено, что при анеуплоидном профиле опухоли существует достоверная разница между двумя группами в таких показателях, как общее ко-

личество клеток в S-фазе, апоптотическая активность, индекс ДНК, клеточный индекс и индекс анеуплоидии.

Общее количество опухолевых клеток в S-фазе у пациентов раком легкого с наличием ПНРС ($18,73 \pm 1,78$ %) на 51,05 % больше ($p < 0,05$) нежели у пациентов раком легкого без ПНРС ($12,4 \pm 1,74$ %). В тоже время апоптотическая активность опухолевых клеток у больных второй группы была достоверно ниже по сравнению с аналогичным показателем больных первой группы: $6,55 \pm 0,88$ % и $11,71 \pm 1,83$ % соответственно, т.е. на 78,78 % ($p < 0,05$).

При сравнении значений индексов, которые характеризуют анеуплоидию ДНК (табл. 2), видно, что у больных раком легкого с ПНРС средние значения DI, CI и AI достоверно выше аналогичных показателей больных без данного синдрома. Так, индекс ДНК у больных второй группы ($1,78 \pm 0,07$) был значительно выше на 32,84 % ($p < 0,01$), чем у больных первой группы ($1,34 \pm 0,08$). Также были большими значения и клеточного индекса ($0,4 \pm 0,04$) у пациентов раком легкого с проявлениями ПНРС по сравнению с аналогичным показателем ($0,29 \pm 0,03$) у пациентов без данного синдрома, соответственно на 37,93 % ($p < 0,05$). Значения индекса анеуплоидии у больных второй группы были больше на 18,92 % ($p < 0,01$), чем у больных контрольной группы ($1,32 \pm 0,04$ и $1,11 \pm 0,03$ соответственно).

При анализе ДНК-цитометрических показателей опухолевых клеток больных раком легкого обеих групп, наблюдается следующее. Полученные данные свидетельствуют, что опухоли больных раком легкого с проявлениями ПНРС в отличие от опухолей больных без данного синдрома характеризуются повышенной пролиферативной активностью с одновременно пониженной апоптотической активностью опухолевых клеток. Также в опухолях больных раком легкого с наличием ПНРС наблюдаются более высокие индексы анеуплоидии ДНК, что дополнительно подтверждает их более злокачественное течение.

Таблица 1

**Распределение опухолевых клеток больных раком легкого по фазам клеточного цикла
в зависимости от наличия ПНРС ($M \pm t$)**

Характеристика групп больных по профилю опухоли		Показатели клеточного цикла, %							
		Диплоидные клетки				Анеуплоидные клетки			
		Всего	G0G1	S	G2 + M	Всего	G0G1	S	G2 + M
Рак легкого без ПНРС, n=40	Диплоидный	100	87,09±1,69	6,33±1,66	6,58±0,54	-	-	-	-
	Анеуплоидный	63,89±2,72	83,37±2,35	7,83±1,84	8,8±2,3	36,11±2,72	59,97±4,76	22,77±2,5	17,26±3,49
Рак легкого с ПНРС, n=30	Диплоидный	100	79,87±1,82**	13,99±1,43*	6,15±0,77	-	-	-	-
	Анеуплоидный	51,94±3,47**	81,96±2,38	11,14±1,8	6,9±1,69	48,06±3,47**	55,13±2,57	30,37±2,2*	14,5±1,4

Примечание:

* - $p < 0,01$ относительно показателей соответствующего профиля опухоли у больных первой группы

** - $p < 0,05$ относительно показателей соответствующего профиля опухоли у больных первой группы

Таблица 2

**ДНК-цитометрические показатели опухолевых клеток больных раком легкого
в зависимости от наличия ПНРС ($M \pm t$)**

Характеристика групп больных по профилю опухоли		Общая фаза S, %	SUB-G0G1 (апоптоз), %	Индекс ДНК, DI	Клеточный индекс, CI	Индекс анеуплоидии, AI
Рак легкого без ПНРС, n=40	Диплоидный	6,33±1,6	11,38±3,03	-	-	-
	Анеуплоидный	12,4±1,74	11,71±1,83	1,34±0,08	0,29±0,03	1,11±0,03
Рак легкого с ПНРС, n=30	Диплоидный	13,99±1,42*	8,33±1,26	-	-	-
	Анеуплоидный	18,73±1,78**	6,55±0,88**	1,78±0,07*	0,4±0,04**	1,32±0,04*

Примечание:

* - $p < 0,01$ относительно показателей соответствующего профиля опухоли у больных первой группы

** - $p < 0,05$ относительно показателей соответствующего профиля опухоли у больных первой группы

Выводы

1. Установлено наличие отличительных молекулярно-биологических характеристик опухолевых клеток, свидетельствующих о более злокачественном течении заболевания у больных раком легкого с проявлениями паранеопластического ревматологического синдрома.

2. В опухолях больных раком легкого с паранеопластическим ревматологическим синдромом наблюдается достоверно более высокая пролиферативная активность опухолевых клеток в отличие от аналогичных показателей у пациентов без паранеопластического ревматологического синдрома (общее количество клеток в S-фазе при диплоидном типе опухоли выше в 2,21 раза, при анеуплоидном - на 51,05 %).

3. Уровень апоптоза (фрагментации ДНК) достоверно ниже на 78,78 % при анеуплоидном типе опухоли у больных с проявлениями паранеопластического ревматологического синдрома в отличие от аналогичных показателей у пациентов без данного синдрома, что может свидетельствовать о более неблагоприятном прогнозе.

4. Более высокие показатели, которые характеризуют анеуплоидию ДНК клеток опухолевой ткани у пациентов раком легкого с паранеопластическим ревматологическим синдромом (DI выше на 32,84 %, CI – на 37,93 %, AI – на 18,92 %), по сравнению с аналогичными показателями у пациентов без данного синдрома, подтверждают у них более высокую агрессивность и злокачественность опухолевого процесса.

Литература

1. Abbas T. Genomic instability in cancer / T. Abbas, M.A. Keaton, A. Dutta // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2013. – Vol. 5, № 3. – P. 291-294.
2. Analysis of protein expression in pure cell nuclei populations isolated from human breast cancer tissue by DNA flow cytometric sorting / B. Baldetorp [et al.] // *J. Proteomics.* – 2010. – Vol. 73, № 6. – P. 1111-1116.
3. Chromosomal instability, aneuploidy and routine high-resolution DNA content analysis in oral cancer risk evaluation / W. Giaretti [et al.] // *Future Oncol.* – 2012. – Vol. 8, № 10. – P. 1257-1271.
4. Clinical aspect and molecular mechanism of DNA aneuploidy in gastric cancers / E. Oki [et al.] // *J. Gastroenterol.* – 2012. – Vol. 47, № 4. – P. 351-358.
5. Flow cytometric determination of stem/progenitor content in epithelial tissues: an example from nonsmall lung cancer and normal lung / V.S. Donnenberg [et al.] // *Cytometry A.* – 2013. – Vol. 83, № 1. – P. 141-149.
6. Heterogeneity of DNA content in laryngeal squamous cell carcinoma in relation to histopathological variables / B. Ladika-Davidovic [et al.] // *Acta Otolaryngol.* – 2009. – Vol. 129, № 7. – P. 768-773.
7. Kim D. W. Effects of DNA ploidy and S-phase fraction on fluorine-18 FDG uptake of primary breast cancer lesions / D.W. Kim, C.G. Kim // *Clin. Breast Cancer.* – 2013. – Vol. 13, № 3. – P. 196-201.
8. Oral cancer genesis and progression: DNA near-diploid aneuploidization and endoreduplication by high resolution flow cytometry / A. Donadini [et al.] // *Cell Oncol.* – 2010. – Vol. 32, № 5-6. – P. 373-383.
9. Polymyalgia rheumatica revealing a lung cancer / K. Cocquempot [et al.] // *Rev. Mal. Respir.* – 2013. – Vol. 30, № 1. – P. 67-70. – (in French).
10. Redefining the significance of aneuploidy in the prognostic assessment of colorectal cancer / R.-A. Risques [et al.] // *Lab. Invest.* – 2001. – Vol. 81, № 3. – P. 307-315.
11. Rheumatic disorders as paraneoplastic syndromes / V. Racanelli [et al.] // *Autoimmun. Rev.* – 2008. – Vol. 7. – P. 352-358.
12. Ricke R. M. Aneuploidy in health, disease, and aging / R. M. Ricke, J. M. van Deursen // *J. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 201, № 1. – P. 11-21.
13. The consequences of chromosomal aneuploidy on the transcriptome of cancer cells / T. Ried [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol. 1819, № 7. – P. 784-793.
14. Vitre B. D. Centrosomes, chromosome instability (CIN) and aneuploidy / B.D. Vitre, D.W. Cleveland // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 24, № 6. – P. 809-815.

**RESEARCH FLOW CYTOMETRIC OF THE DNA CONTENT
IN TUMOR CELLS OF LUNG CANCER PATIENTS
WITH PARANEOPLASTIC RHEUMATIC SYNDROME**

S.A. Lysenko, S.I. Kirkilevsky, I.L. Chereshnyuk

The study of the DNA content and cell cycle indicators of tumor cells of 70 lung cancer patients: 30 patients with paraneoplastic rheumatic syndrome (PNRS) and 40 - without manifestations of the syndrome. Found that in tumors of lung cancer patients with PNRS, unlike tumors of lung cancer patients without symptoms of this syndrome are observed higher proliferative activity of tumor cells (S-phase), increased indicators of DNA aneuploidy (DNA index, cell index, aneuploidy index) and also have lower levels of apoptosis. All these changes are indicative of more highly aggressiveness and malignancy of tumor process in lung cancer patients with PNRS.

Keywords: DNA flow cytometry, cell cycle, aneuploidy, lung cancer, paraneoplastic rheumatic syndrome.

Лысенко Сергей Андреевич – канд. мед. наук, докторант кафедры онкологии Винницкого национального медицинского университета им. Н.И. Пирогова.

21018, Украина, Винница, ул. Пирогова, 56.

E-mail: liss2001@ukr.net.