

ISSN 0002–354X (print)

МЕДИЦИНА
MEDICINE

УДК 616-006.6:616-079

Поступило в редакцию 25.10.2016
Received 25.10.2016

Л. Н. Николаевич, член-корреспондент И. В. Залуцкий, И. В. Руденкова

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**НОВЫЕ ПОДХОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ ОПУХОЛЕЙ ТОЛСТОЙ КИШКИ
ПО КРИТЕРИЮ ДНК-ПЛОИДНОСТИ**

Методом проточной цитометрии изучена ДНК-плоидность и молекулярно-биологические характеристики аденокарцином сигмовидной кишки. У 71 % пациентов выявлены диплоидные, а у 29 % – анеуплоидные опухоли. В диплоидном варианте опухоли при распределении клеток по стадиям клеточного цикла выявлены достоверные различия в содержании клеток в G_0/G_1 и S фазах клеточного цикла по сравнению с анеуплоидным вариантом опухоли. Наблюдается повышенная ДНК – синтетическая и пролиферативная активность опухолевых клеток по сравнению с пациентами при анеуплоидном профиле опухоли. У пациентов с диплоидным профилем опухоли количество клеток в S фазе в 5 раз больше, нежели у больных с анеуплоидным вариантом опухоли. Можно предположить, что у больных анеуплоидным раком сигмовидной кишки частота рецидивов будет выше, а выживаемость ниже, чем при диплоидном профиле опухоли.

Ключевые слова: проточная цитометрия, опухоли толстой кишки, плоидность клеток.

L. N. Nikolaevich, Corresponding Member I. V. Zalutsky, I. V. Rudenkova

Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

**NEW APPROACHES TO THE DIAGNOSIS OF SIGMOID COLON CANCER OF PATIENTS WITH
COLORECTAL CANCER BY THE DNA-PLOIDY CRITERION**

The DNA ploidy and molecular biological characteristics of adenocarcinoma of sigmoid colon by flow cytometry were studied. In 71 % of the patients, diploid was detected and in 29 % of the patients – aneuploid tumors. In the diploid tumor profile in the distribution of cell cycle phases, significant differences are revealed in the content of cells in G_0/G_1 and S phases of the cell cycle, as compared to the aneuploid tumor profile. There is the increased DNA – the synthetic and proliferative activity of tumor cells compared to patients with the aneuploid tumor profile. Patients with the diploid tumor profile have a number of cells in the S phase 5 times more than in patients with the aneuploid tumor profile. It may be assumed that in patients with aneuploid sigmoid cancer, the recurrence rate is higher and the survival rate is lower than in those with the diploid tumor profile.

Keywords: flow cytometry, colon tumor, cell ploidy.

Введение. По частоте встречаемости колоректальный рак занимает третье место в мире среди злокачественных опухолей, уступая только раку легких, предстательной железы (у мужчин) и молочной железы (у женщин). Колоректальный рак представляет собой огромную опасность для здоровья с ожидаемым увеличением на 60 % по отношению к 2030 г. [1]. Многими авторами показано, что примерно 70 % карцином толстого кишечника развиваются из аденомы [2]. Вероятность развития рака возрастает с увеличением количества аденом в толстой кишке. Степень эпителиальной дисплазии, размер и тип аденомы связаны с ДНК-анеуплоидией в аденомах. Установлено, что аденомы размером меньше 1 см не имеют признаков анеуплоидии, аденомы большего размера, наоборот, имеют значительное увеличение анеуплоидии в ДНК, а тубуловорсинчатые аденомы имеют самую высокую частоту изменений в ДНК.

Методом проточной цитометрии по критерию ДНК-плоидности клеток в злокачественных новообразованиях показано, что популяции клеток в опухоли характеризуются высокой степенью гетерогенности [3]. 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 [4]. Полиплоидные опухоли чаще всего более злокачественные, чем диплоидные, они более инвазивны, быстрее растут и метастазируют [5]. Клетки полиплоидных опухолей обладают большей жизнеспособностью и приспособительной реакцией к разнообразным условиям микроокружения [6].

Цель исследования – изучить плоидность опухолей толстой кишки.

Материалы и методы исследования. Методом проточной цитометрии у 11 больных раком сигмовидной кишки изучена плоидность опухолей. Опухолевую ткань получали после их хирургического удаления. ДНК-цитометрический анализ популяции опухолевых клеток проводили на проточном цитофлюориметре FACS Canto II (BD, США), используя программное обеспечение DIVA. Суспензию опухолевых клеток выделяли из материала больных раком сигмовидной кишки, ранее не получавших противоопухолевого лечения. Были определены следующие параметры – плоидность опухоли, индекс пролиферации (ИП), содержание клеток опухоли в $G_{0/1}$, S, (G_2 +M) фазах клеточного цикла. Индекс пролиферации (ИП) определяли как сумму клеток, находящихся в синтетической (S), постсинтетической (G_2) фазах интерфазы клеточного цикла и в митозе (M).

На основании гистограмм определяли плоидность клеток опухоли. Популяцию с одним модальным пиком, находящимся в области диплоидного стандарта, считали диплоидной. Клеточную популяцию с двумя главными пиками рассматривали как анеуплоидную. В случае анеуплоидии оценивали долю (%) опухолевых клеток.

Для оценки количественных результатов исследования определяли значение среднего (M) и ошибку среднего (m) – $M \pm m$. Для статистической обработки данных применяли непараметрический критерий U (Вилкоксона–Манна–Уитни) для сравнения средних. Достоверность данных оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Многими авторами показано, что доля клеток в фазе S клеточного цикла, а также сочетание этого параметра с плоидностью или индексом ДНК являются значимыми прогностическими факторами, характеризующими агрессивное поведение злокачественной опухоли. Анеуплоидные опухоли с высоким содержанием клеток в S фазе клеточного цикла характеризуются быстрой прогрессией, ранним метастазированием, большей частотой возвратов заболевания [2]. Сочетание анеуплоидности с высоким содержанием клеток в S фазе указывало на неблагоприятный прогноз, чем исследование только плоидности. Выживаемость больных анеуплоидными опухолями с высокой долей клеток в фазе S клеточного цикла (более 20 %) была в 3,7 раз ниже, чем при анеуплоидных опухолях с низкой пролиферативной активностью.

В современной литературе изменены подходы в анализе ДНК-плоидности с учетом типа и локализации опухолей при колоректальном раке [2]. Прогностическим благоприятным профилем признано сочетание диплоидной опухоли и низкой доли клеток в S фазе клеточного цикла, а неблагоприятным – сочетание диплоидной опухоли с высоким содержанием клеток в S фазе и все анеуплоидные опухоли, что позволило авторам выделить группы больных с низким и высоким риском рецидива заболевания [2].

Нами изучена плоидность ДНК опухолей, локализованных в области сигмовидной кишки, у пациентов первичными колоректальными аденокарциномами (таблица).

В зависимости от плоидности ДНК у 71 % больных выявлены диплоидные, а у 29 % – анеуплоидные опухоли. При распределении клеток по стадиям клеточного цикла в диплоидном варианте опухоли достоверной является разница в содержании клеток в фазах G_0 / G_1 и S клеточного цикла по сравнению с анеуплоидным вариантом опухоли.

Наблюдается повышенная ДНК-синтетическая и пролиферативная активность опухолевых клеток по сравнению с пациентами при анеуплоидном профиле опухоли. Общее количество

ДНК-ploidy и распределение клеток по стадиям клеточного цикла опухолей сигмовидной кишки
DNA-ploidy and the tumor cell distribution of sigmoid colon

Группа Group	Тип опухоли Cancer type	G ₀₁ , %	S, %	G ₂ + M, %	S + G ₂ + M, %
1	Диплоидные Diploids	40,66 ± 5,49*	6,28 ± 1,5*	10,42 ± 3,9*	16,48 ± 5,38*
2	Анеуплоидные Aneuploids	15,6 ± 1,33	1,25 ± 0,84	3,2 ± 0,2	4,45 ± 0,2

Пр и м е ч а н и е. * – достоверные отличия между группами, $p < 0,05$.

N o t e s. * – the reliable differences between the groups, $p < 0.05$.

опухолевых клеток в S фазе у пациентов с диплоидным профилем опухоли ($6,28 \pm 1,5 \%$) в 5 раз больше, нежели у больных с анеуплоидным вариантом опухоли ($1,25 \pm 0,84 \%$). Следовательно, пациентов с диплоидным профилем опухоли и высоким содержанием клеток в S фазе, как и пациентов с анеуплоидным профилем опухоли можно отнести к группе риска, характеризующейся высокой степенью рецидива [2].

Заключение. Как показывают многочисленные исследования, анеуплоидность является довольно частым и важным явлением в клетках злокачественных образований. Дальнейшее изучение ее роли в развитии опухолевого процесса представляется актуальным для клинической онкологии. Практическое использование ДНК-ploidy в оценке профиля опухолей колоректального рака с учетом места локализации является прогностическим критерием выделения групп риска для прогноза развития рецидива при данной патологии.

Благодарности. Работа выполнена в рамках задания 01.01 ГПНИ «Фундаментальные и прикладные науки – медицине».

Acknowledgement. The work of the assignment 01.01 SPR “Fundamental and applied sciences – medicine”.

Список использованных источников

1. Assessment of clinically related outcomes and biomarker analysis for translational integration in colorectal cancer (ACROBATICC): study protocol for a population-based, consecutive cohort of surgically treated colorectal cancer and resected colorectal liver metastasis / S. Kjetil [et al.] // *J. of Translational Medicine*. – 2016. – Vol. 14. – P. 192–200. doi.org/10.1186/s12967-016-0951-4.
2. DNA ploidy and morphology of colon tumors in the adenoma-carcinoma sequence / J. Staarmann [et al.] // *Folia histochemica et cytobiologica*. – 2015. – Vol. 53, N 1. – P. 11–18. doi.org/10.5603/fhc.a2015.0001.
3. Method for cancer diagnosis using DNA ploidy analysis with combination of fast Fourier transform and domain method / N. Hinata [et al.] // *Transactions of Japanese Society for Medical and Biological Engineering*. – 2014. – Vol. 52, N 3. – P. 136–144.
4. Aneuploidy in health, disease, and aging / R. M. Ricke [et al.] // *J. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 201, N 1. – P. 11–21. doi.org/10.1083/jcb.201301061.
5. A study on the method for cancer diagnosis using FFT on DNA ploidy analysis / N. Hinata [et al.] // *Transactions of Japanese Society for Medical and Biological Engineering*. – 2013. – Vol. 51, N 2. – P. 103–111.
6. The consequences of chromosomal aneuploidy on the transcriptome of cancer cells / T. Ried [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2012. – Vol. 1819, N 7. – P. 784–793. doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.02.020.

References

1. Kjetil S., Watson M. M., Lea D., Nordgerd O., Arne S. J., Hagland R. H. Assessment of clinically related outcomes and biomarker analysis for translational integration in colorectal cancer (ACROBATICC): study protocol for a population-based, consecutive cohort of surgically treated colorectal cancer and resected colorectal liver metastasis. *Journal of Translational Medicine*, 2016, vol. 14, pp. 192–200. doi.org/10.1186/s12967-016-0951-4.
2. Staarmann J., Kotb W. F. A., Petersen I. DNA ploidy and morphology of colon tumors in the adenoma-carcinoma sequence. *Folia histochemica et cytobiologica*, 2015, vol. 53, no. 1, pp. 11–18. doi.org/10.5603/fhc.a2015.0001.
3. Takeda S., Hinata N., Kanda H., Shioyama T., Suzuki A., Ishikawa Y., Yamaguchi T., Kato Y. Method for cancer diagnosis using DNA ploidy analysis with combination of fast Fourier transform and domain method. *Transactions of Japanese Society for Medical and Biological Engineering*, 2014, vol. 52, no. 3, pp. 136–144.
4. Ricke R. M., van Deursen J. M. Aneuploidy in health, disease, and aging. *The Journal of Cell Biology*, 2013, vol. 201, no. 1, pp. 11–21. doi.org/10.1083/jcb.201301061.

5. Hinata N., Kanda H., Shioyama T., Suzuki A., Takeda S., Ishikawa Y., Yamaguchi T., Kato Y. A study on the method for cancer diagnosis using FFT on DNA ploidy analysis. *Transactions of Japanese Society for Medical and Biological Engineering*, 2013, vol. 51, no. 2, pp. 103–111.

6. Ried T., Hu Y., Dfilippantonio M. J., Ghadimi B. M., Grade M., Camps J. The consequences of chromosomal aneuploidy on the transcriptome of cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 2012, vol. 1819, no. 7, pp. 784–793. doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.02.020.

Информация об авторах

Николаевич Лариса Николаевна – канд. биол. наук, доцент, заведующая лабораторией, Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: nikolarisa@tut.by.

Залуцкий Иосиф Викторович – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, директор, Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: biblio@fizio.bas-net.by.

Руденкова Ирина Владимировна – мл. науч. сотрудник, Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kiranan4@gmail.com.

Для цитирования

Николаевич, Л. Н. Новые подходы в диагностике опухолей толстой кишки по критерию ДНК-плоидности / Л. Н. Николаевич, И. В. Залуцкий, И. В. Руденкова // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 1. – С. 85–88.

Information about the authors

Nikolaevich Larisa Nikolaevna – Ph. D. (Biology), Assistant Professor, Head of the Laboratory, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nikolarisa@tut.by.

Zalutsky Iosiph Victorovich – Corresponding Member, D. Sc. (Medicine), Professor, Director, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: biblio@fizio.bas-net.by.

Rudenkova Irina Vladimirovna – Junior researcher, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kiranan4@gmail.com.

For citation

Nikolaevich L. N., Zalutsky I. V., Rudenkova I. V. New approaches to the diagnosis of sigmoid colon cancer of patients with colorectal cancer by the DNA-ploidy criterion. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2017, vol. 61, no. 1, pp. 85–88. (in Russian)