

УДК 618.11– 006.6 – 076.5

АНАЛИЗ ФРАКЦИИ ДИПЛОИДНЫХ КЛЕТОК G_0/G_1 В ТКАНИ РАКА ЯИЧНИКОВ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ

Т.А. Богущ^{1*}, И.А. Мамичев¹, Ю.П. Борисенко², Е.А. Богущ¹, Н.О. Вихлянцева¹, В.Ю. Кирсанов³

(¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; ² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России; *e-mail: tatbogush@mail.ru)

Проведена оценка доли диплоидных клеток в фазах G_0/G_1 клеточного цикла методом проточной цитофлуориметрии в 60 образцах серозного рака яичников III стадии. Показано, что опухолевая ткань характеризуется значительной гетерогенностью по величине этой клеточной фракции – от 27 до 95% с медианой 73%. Выявлены статистически значимые различия по величине данной фракции между подгруппами опухолей, чувствительных и резистентных к первой линии химиотерапии препаратами платины и таксанов. Сделан вывод о предиктивной значимости величины фракции G_0/G_1 , количественная оценка этой фракции рекомендована для клинического применения.

Ключевые слова: фракция диплоидных клеток в фазах G_0/G_1 , эффективность химиотерапии, безрецидивная выживаемость, проточная цитофлуориметрия.

Показатели ploидности и пролиферативной активности опухолевых клеток позволяют прогнозировать агрессивность заболевания, что способствует оптимизации терапевтической тактики. В частности, для злокачественных новообразований характерны изменения в количественном содержании ДНК [1]. Анеуплоидия свидетельствует о генетической нестабильности опухоли и неблагоприятном прогнозе заболевания [2], при этом диплоидным опухолям свойственна меньшая агрессивность, что приводит к улучшению показателей выживаемости пациентов [3].

Прогностическая значимость показателей ploидности продемонстрирована при исследовании опухолей разных локализаций, в частности рака мочевого пузыря [4], эндометрия [5], молочной железы [6] и рака простаты [7].

При исследовании рака яичников отмечено, что анеуплоидия – независимый прогностически неблагоприятный фактор и у больных с анеуплоидными опухолями достоверно ниже показатели общей и безрецидивной выживаемости. При этом в целом по группе частота встречаемости анеуплоидных опухолей достигла 50% [8]. В другом исследовании получены сходные результаты. Доля анеуплоидных и диплоидных опухолей составила 60 и 40% соответственно. Пятилетняя выживаемость в группе пациенток с диплоидными опухолями достигла 74%, а с

анеуплоидными – только 22%. Показатели частоты безрецидивного течения болезни в этих группах сравнения составили 75 и 22% соответственно [9].

Прогностически значима и пролиферативная активность клеток, которую оценивают по величине фракции клеток в S-фазе. Показано, что высокий уровень опухолевых клеток в S-фазе является прогностически неблагоприятной характеристикой рака яичников. Больные с высокой (>10%) фракцией опухолевых клеток в S-фазе демонстрируют худшие показатели двухлетней общей выживаемости по сравнению с больными, чьи опухоли содержат невысокую фракцию клеток в S-фазе ($\leq 10\%$) [10].

При исследовании рака молочной железы показано, что анеуплоидия и высокий уровень клеток в S-фазе коррелируют с высокой степенью дифференцировки опухоли, большим размером и негативным статусом эстрогеновых и прогестероновых рецепторов. Уровень клеток в S-фазе был также выше на распространенных стадиях болезни. Неблагоприятная значимость анеуплоидии в прогнозе выживаемости больных подтверждена многофакторным анализом [11].

Результаты упомянутых выше работ указывают на безусловную информативность показателей ploидности и фракции клеток в S-фазе в прогнозе агрессивности опухолей разной ло-

кализации. Однако оценка этих молекулярных характеристик опухоли не вошла в рутинную практику. Причина этого видится в нерешенных методических проблемах, на которые указывают авторы многих исследований. И это несмотря на то, что речь идет о методике прецизионной проточной цитофлуориметрии.

Например, оценка фракции S-фазы затруднительна, так как граница пика G_0/G_1 на ДНК-гистограмме часто плохо различается для анеуплоидных клеток в связи с перекрыванием клеточных популяций или наличием мультиплоидных опухолей [12]. Во многих исследованиях ploidyность клеток определяется по так называемому индексу ДНК, который рассчитывается как отношение анеуплоидного пика G_0/G_1 к диплоидному пику G_0/G_1 . Однако неопределенность границ анеуплоидного пика G_0/G_1 вносит ошибку в оценку индекса ДНК, затрудняя интерпретацию гистограмм [13].

Мы предположили, что для прогноза заболевания можно обойтись без разделения перекрывающихся пиков, соответствующих пролиферирующим диплоидным клеткам и анеуплоидным клеткам в фазе покоя. По нашему мнению, прогностически значимой может быть суммарная фракция всех анеуплоидных и пролиферирующих клеток независимо от фазы клеточного цикла. Оценка такой интегральной неблагоприятной характеристики опухоли с помощью проточной цитофлуориметрии и специфического красителя ДНК не представляет методической сложности. При этом для упрощения восприятия результатов анализа мы считаем возможным ориентироваться на долю оставшихся заведомо «благоприятных», т.е. диплоидных клеток в фазах G_0/G_1 (в % от общего числа клеток, включенных в анализ).

В настоящем исследовании оценка этого показателя проведена в ткани серозного рака яичников, а клиническая значимость фракции G_0/G_1 диплоидных клеток определена при оценке статистической связи между величиной данной фракции и продолжительностью безрецидивного течения болезни после завершения стандартной первой линии химиотерапии с включением препаратов платины и таксанов.

Материалы и методы

Работа проведена на суспензиях опухолевых клеток серозного рака яичников, полученных из хирургических биопсийных образцов 60 пациенток, находящихся на лечении в «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Все пациентки в качестве первой линии стандартной химиотерапии получали 6 курсов цисплатина или карбоплатина с паклитакселом. Для оценки корреляции величины фракции диплоидных клеток в фазах G_0/G_1 с эффективностью лечения образцы опухолей были разделены на три группы в соответствии с проспективными клиническими данными о продолжительности безрецидивного периода после окончания терапии: резистентные опухоли (до 6 мес.), условно чувствительные опухоли (6–12 мес.), чувствительные опухоли (более 12 мес.).

Оценка величины фракции диплоидных клеток в фазах G_0/G_1 проведена с использованием специфического красителя ДНК методом проточной цитофлуориметрии. Метод адаптирован для исследования опухолевых маркеров в плотных тканях, лишен субъективизма и позволяет провести строго количественный анализ более 10 тыс. клеток из образцов опухолей до 2 см и более в диаметре [14].

После получения одноклеточных суспензий клетки инкубировали со специфическим ДНК красителем Хекст Н33258 («Sigma») до конечной концентрации 1,2 мкг/мл в течение 15 мин при +4 °С.

Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре «Navios» («Beckman Coulter», США). Скорость потока образца средняя, число анализируемых событий 5000. Напряжение в каналах FSS и SSC было установлено на 150 и 350 В соответственно. Число специфически флуоресцирующих клеток рассчитывали с помощью теста Колмогорова–Смирнова, включенного в программу FlowJo 10.0 («FlowJo LLC», США). Для расчета показателя средней флуоресценции использовали программу WinMDI 2.9.

Для проведения статистического анализа результатов использовали пакет прикладных программ STATISTICA (версия 10.0) фирмы «StatSoft» (США). Оценка статистической значимости различий между сравниваемыми выборками проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни, нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Различия признавались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты иммунофлуоресцентного анализа с использованием проточного цитофлуориметра представлены на гистограммах, отображаю-

щих распределение клеток, окрашенных специфическим красителем ДНК, в зависимости от интенсивности флуоресценции (рис. 1). Видно, что фракция диплоидных клеток в фазах G_0/G_1 легко детектируется и имеет четкие границы (на рис. 1 отмечены стрелками).

На рис. 1 представлены три варианта опухолей, значительно различающихся по величине фракции диплоидных клеток в фазах G_0/G_1 (отмечены стрелками). Эти и множество промежуточных вариантов встречались в группе образцов, включенных в исследование. Суммарно при анализе 60 образцов опухолей неинформативными оказались всего 3 случая (около 5%).

Распределение опухолей в зависимости от величины фракции диплоидных клеток в фазах G_0/G_1 представлено на рис. 2. Обращает внимание тот факт, что ткань рака яичников у разных больных характеризуется выраженными различиями в уровне этого показателя – от 27 до 95%. В целом по группе медиана фракции диплоидных клеток в фазах G_0/G_1 оказалась достаточно высокой и составила 73%, при близком среднем значении показателей $70,0 \pm 16,9\%$.

Показатели исследуемой фракции клеток различно для подгрупп опухолей, различающихся по чувствительности к первой линии химиотерапии с включением препаратов платины и таксанов, приведены в таблице. Напомним, что деление опухолей на группы проведено в соответствии с принятым клиническим критерием по продолжительности безрецидивного периода болезни после завершения лечения: резистентные опухоли (до 6 мес.), условно чувствитель-

ные опухоли (6–12 мес.), чувствительные опухоли (более 12 мес.).

Видно, что по всем группам сравнения доля исследуемой фракции увеличивается в ряду опухолей: резистентные → условно чувствительные → чувствительные.

Медиана данного параметра в группе чувствительных опухолей составила 82%, в группе условно чувствительных – 73%, в группе резистентных опухолей – 65%.

При попарном сравнении исследуемых групп по величине фракции диплоидных клеток в фазах G_0/G_1 статистически значимыми оказались различия между группами чувствительных и резистентных опухолей ($p = 0,002$).

Таким образом, попарное сравнение групп опухолей с разной чувствительностью к химиотерапии по величине фракции диплоидных клеток в фазах G_0/G_1 выявило возможную прогностическую значимость данной фракции с точки зрения предсказания эффективности первой линии химиотерапии больных раком яичников. Различия оказались статистически значимыми для групп больных, резистентных и чувствительных к химиотерапии, но незначимыми для так называемой «зоны неопределенности» с продолжительностью безрецидивного течения болезни 6–12 мес., т.е. для группы пациенток с условно чувствительными опухолями.

На основании полученных результатов можно полагать, что имеет место лишь незначительное (около 5%) число случаев неинформативности гистограмм для количественной оценки доли диплоидных клеток в фазах G_0/G_1 .

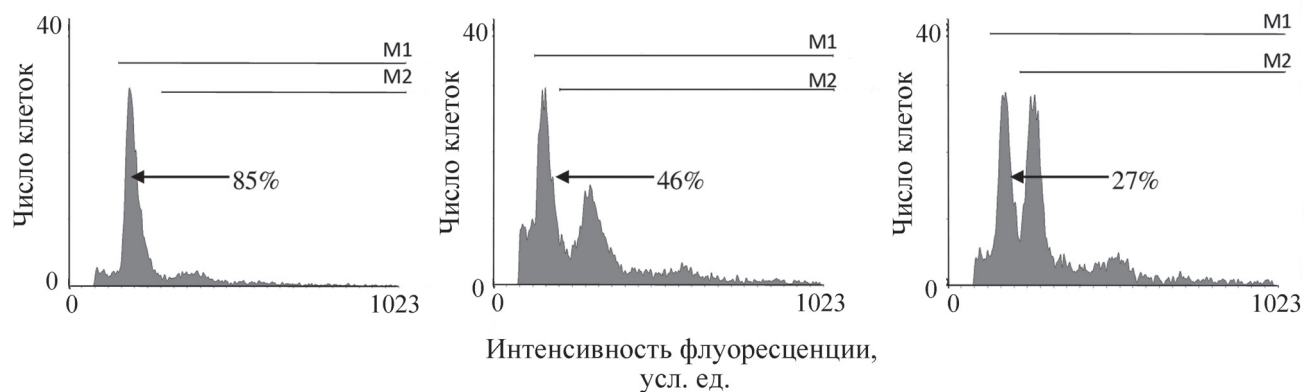


Рис. 1. Примеры гистограмм, демонстрирующих опухоли, которые значительно различаются по уровню фракции диплоидных клеток в фазах G_0/G_1 . M1 – общее количество клеток. M2 – фракция анеуплоидных и пролиферирующих клеток в различных фазах клеточного цикла. Стрелки указывают на положение фракции диплоидных клеток в фазах G_0/G_1 , цифрами обозначена доля (%) этих клеток в общей популяции

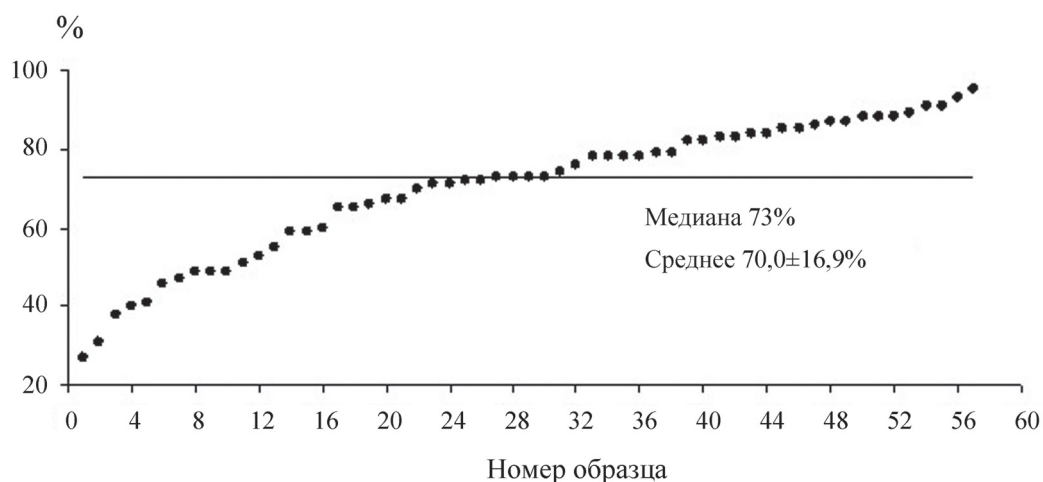


Рис. 2. Значения фракции диплоидных клеток в фазах G_0/G_1 в ткани рака яичников. По оси абсцисс указаны номера образцов опухолей, включенных в анализ, которые ранжированы от минимального до максимального значения фракции диплоидных клеток в фазах G_0/G_1 (%). По оси ординат указана величина данной фракции. Сплошная горизонтальная линия – медиана

Важными представляются данные, продемонстрировавшие существенные (более чем в четыре раза) различия в уровне этого показателя между опухолями разных больных.

И наконец, важным результатом можно считать подтверждение правомочности гипотезы авторов о возможной прогностической значимости уровня диплоидных клеток в фазах G_0/G_1 в предсказании эффективности первой линии химиотерапии препаратами платины и таксанами. Во-первых, показано, что медианы и средние значения показателя изменяются от большего к меньшему в ряду: резистентные опухоли → условно чувствительные опухоли → чувствитель-

ные опухоли. Во-вторых, в проспективном исследовании выявлены статистически значимые различия в опухолях пациентов, резистентных и чувствительных к химиотерапии, по величине фракции.

С учетом простоты предложенного подхода к количественной оценке фракции диплоидных клеток в фазах G_0/G_1 и ее прогностической значимости можно считать, что эта характеристика рака яичников может быть использована для персонализированного прогноза эффективности первой линии химиотерапии препаратами платины и таксанов в рутинной клинической практике.

Величина фракции диплоидных клеток в фазах G_0/G_1 в опухолях с разной чувствительностью к химиотерапии с включением препаратов платины и таксанов

Номер подгруппы	Чувствительность к химиотерапии (число образцов)	Уровень фракции диплоидных клеток в фазах G_0/G_1 (%)		Различия между группами, U-критерий Манна–Уитни, p^*
		медиана	интерквартильный размах	
I	чувствительные (30)	82,0	72–85	I vs III 0,002
II	условно чувствительные (13)	73,0	51–85	II vs III 0,154
III	резистентные (14)	65,0	40–73	I vs II 0,135
Все пациенты (57)		73,0	67–79	

*Полужирным шрифтом выделено статистически значимое различие между группами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Davidson B., Risberg B., Kleinberg L., Pradhan M., Tropé C.G., Nesland J.M. // *Diagn. Cytopathol.* 2008. Vol. 36. N 9. P. 637.
2. Brown M., Wittwer C. // 2000. Vol. 46. № 8. P. 1221.
3. Borre M., Hoyer M., Nerstrom B., Overgaard J. // *The Prostate.* 1998. Vol. 36. N 4. P. 244.
4. Bol M.G.W., Baak J., van Diermen B., Buhr-Wildhagen S., Janssen E., Kjellevoid K.H., Kruse A.J., Mes-tad O., Шгред P. // 2003. Vol. 56. N 6. P. 447.
5. Pradhan M., Abeler V.M., Danielsen H.E., Sandstad B., Trope C.G., Kristensen G.B., Risberg B.A. // 2012. Vol. 23. N 5. P. 1178.
6. Pinto A.E., Pereira T., Silva G.L., Andre S. // *Breast.* 2015. Vol. 24. N 4. P. 449.
7. Keyes M., Macalay C., Hayes M., Korbelik J., Morris W.J., Palcic B. // 2013. Vol. 86. N 5. P. 829.
8. Eissa S., Khalifa A., Laban M., Elian A., Bolton W.E. // *Br. J. Cancer.* 1998. Vol. 77. N 3. P. 421.
9. Murray K., Hoopwood L., Volk D., Wilson J.F. // 1989. Vol. 63. N 12. P. 2456.
10. Kim Y.T., Zhao M., Kim S.H., Lee C.S., Kim J.H., Kim J.W. // 2005. Vol. 88. N 3. P. 286.
11. Reles A., Gee S., Schellschmidt I., Schmider A., Unger M., Friedmann W., Lichtenegger W., Press M.F. // *Gynecol. Oncol.* 1998. Vol. 71. N 1. P. 3.
12. Pinto A.E., Pereira T., Santos M., Branco M., Dias A., Silva G.L., Ferreira M.C., Andre S. // 2013. Vol. 20. P. 1530.
13. Ichinose Y., Hara N., Ohta M., Kuda T., Asoh H., Chikama H. // 1991. Vol. 52. N 3. P. 469.
14. Бозуи Т.А., Шатурова А.С., Дудко Е.А., Жураев Э.Э., Полоцкий Б.Е., Унгуадзе Г.В., Давыдов М.И. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2011. Т. 52. № 4. С. 305.

Поступила в редакцию 12.04.18

THE ASSESSMENT OF DIPLOID CELLS IN G_0/G_1 CELL CYCLE-PHASES IN OVARIAN CANCER TISSUE BY FLOW CYTOMETRY

T.A. Bogush^{1*}, I.A. Mamichev¹, I.P. Borisenko², E.A. Bogush¹, N.O. Vichlzantseva¹, V.J. Kirsanov³

(¹ FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Ministry of Health of the Russian Federation; ² FSB Educational Institution of Higher Education M.V. Lomonosov Moscow State University; ³ Sechenov First Moscow State Medical University; *e-mail: tatbogush@mail.ru)

A quantitative assessment of the diploid cell fraction in G_0/G_1 phases of cell cycle was performed by flow cytometry method (60 surgery specimens of ovarian cancer stage III). It was shown that the distribution of tumoral diploid cell numbers in G_0/G_1 was widely dispersed, from 27 up to 95% with the median of 73%. Significant differences between tumor samples of patients sensitive to the first line platinum/taxanes chemotherapy and patients resistant to it were observed ($p = 0,002$). The predictive value of G_0/G_1 fraction has been concluded, quantitative assessment of the fraction is recommended for clinical usage.

Key words: fraction of diploid cells G_0/G_1 , predictive value, platinum/taxanes chemotherapy, ovarian cancer, recurrence period, flow cytometry.

Сведения об авторах: Бозуи Татьяна Анатольевна – руководитель группы молекулярных маркёров опухолей лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, профессор, докт. биол. наук (tatbogush@mail.ru); Мамичев Иван Андреевич – мл. науч. сотр. группы молекулярных маркёров лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России (Mamichev99@gmail.com); Бозуи Елена Александровна – ст. науч. сотр. отделения клинической фармакологии и химиотерапии ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, канд. мед. наук (labmedchem@mail.ru); Вихлянцева Надежда Олеговна – мл. науч. сотр. группы молекулярных маркёров лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России (labmedchem@mail.ru); Борисенко Юлия Павловна – студентка факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (labmedchem@mail.ru); Кирсанов Владислав Юрьевич – доцент кафедры онкологии лечебного факультета ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, канд. мед. наук (labmedchem@mail.ru).