

ДНК-ЦИТОМЕТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЕРВИЧНЫХ САРКОМ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

Инна Арнольдовна Новикова, Евгения Марковна Непомнящая,
Елена Петровна Ульянова, Олеся Николаевна Селютина, Тимур Арсенович Алиев,
Лариса Николаевна Ващенко, Татьяна Валерьевна Аушева, Екатерина Игоревна Золотарёва*

Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, г. Ростов-на-Дону, Россия

Поступила 17.04.2017; принята в печать 02.05.2017.

Реферат

DOI: 10.17750/КМЖ2017-509

Цель. Определение содержания дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и распределения клеток по фазам митотического цикла в группах больных первичными саркомами мягких тканей.

Методы. Материалом исследования служила опухоль больных первичными саркомами мягких тканей. Методы исследования включали гистологический, ДНК-цитометрический и статистический.

Результаты. Установлены различия в пролиферативной активности и индексе пролиферации первичных сарком в зависимости от степени дифференцировки опухоли и стадии опухолевого процесса. Определены различия в каждой группе и между группами количества диплоидных, анеуплоидных и полиплоидных клеток в зависимости от фаз клеточного цикла. В зависимости от степени дифференцировки сарком мягких тканей параметры клеточного цикла были следующими: при высокой степени дифференцировки (G1) опухоли были диплоидными в 100% наблюдений, при умеренной степени дифференцировки (G2) в 50% наблюдений опухоли были анеуплоидными. Для опухолей низкой степени дифференцировки (G3) были характерны более высокие значения содержания анеуплоидных клеток в опухоли по сравнению с G2 ($33,1 \pm 5,2$ и $16,5 \pm 6,8\%$ соответственно). Анализ кинетических параметров клеточного цикла позволил установить снижение доли клеток в фазе G1/G0 клеточного цикла от G1 к G3, что сопровождалось статистически значимым повышением доли клеток в S-фазе ($p < 0,05$)

Вывод. Проведённое ДНК-цитометрическое исследование параметров клеточного цикла показало высокий биологический потенциал в первичных саркомах мягких тканей; высокий злокачественный потенциал, вероятно, определяется двумя показателями: долей клеток в G2+M-фазе и фактором клеточных потерь.

Ключевые слова: саркомы мягких тканей, наборы опухолевых клеток, анеуплоидные клетки, диплоидные клетки, пролиферативная активность.

DNA CYTOMETRIC CHARACTERISTICS OF PRIMARY SOFT TISSUE SARCOMAS

I.A. Novikova, E.M. Nepomnyashchaya, E.P. Ul'yanova, O.N. Selyutina, T.A. Aliev, L.N. Vashchenko, T.V. Ausheva, E.I. Zolotareva

Rostov Scientific Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Aim. Determination of deoxyribonucleic acid (DNA) content and cell distribution in mitotic cycle phases in the groups of patients with primary soft tissue sarcomas.

Methods. Study material was the tumours of patients with primary soft tissue sarcomas. Study methods included histological, DNA cytometric and statistical methods.

Results. Differences in proliferative activity and proliferation index in primary sarcomas depending on the tumor differentiation grade and disease stage were revealed. Differences in the numbers of diploid, aneuploid and polyploid cells depending on the cell cycle phases were determined in each group and between groups. Depending on the differentiation grade of soft tissue sarcoma, parameters of the cell cycle in soft tissue sarcomas were as follows: well-differentiated tumors (G1) were diploid in 100% of cases, and moderately differentiated tumors (G2) were aneuploid in 50% of cases. Poorly differentiated tumors (G3) were characterized by significantly higher content of aneuploid cells, in comparison with G2 tumors (33.1 ± 5.2 and 16.5 ± 6.8 , respectively). Analysis of kinetic parameters of cell cycle demonstrated decreased proportion of cells in G1/G0 cell cycle phase from G1 to G3, accompanied by a statistically significant increase of the proportion of cells in S phase ($p < 0.05$).

Conclusion. DNA cytometric study of cell cycle parameters demonstrated high biological potential of primary soft tissue sarcomas; high malignant potential can probably be determined by two parameters: proportion of the cells in G2+M phase and cell loss factor.

Keywords: soft tissue sarcomas, cancer cell sets, aneuploid cells, diploid cells, proliferative activity.

В структуре онкологической заболеваемости саркомы мягких тканей (СМТ) составляют до 5% новообразований у взрослых. По гистологической структуре это самая многообразная группа новообразований человека, включающая более 170 нозологических форм и их морфологических вариантов согласно принятой в 2013 г. редакции Международной класси-

фикации опухолей мягких тканей. Эти заболевания отличают пёстрая клиническая картина, частое рецидивирование, мультицентричный рост, раннее появление отдалённых гематогенных метастазов [1].

Биологическими особенностями сарком следует считать высокую митотическую активность, рост вне одной фасциальной зоны, способность разрушать важные анатомические структуры и наличие очень агрессивных подтипов. Био-

логия каждого подтипа опухоли может варьировать от доброкачественной без метастатического потенциала, более агрессивной с местно-инвазивным ростом до злокачественной с высоким метастатическим потенциалом [1].

Прогноз заболевания при данной патологии зависит от размера первичного новообразования, гистологического типа опухоли и степени дифференцировки [2].

Скорость роста вторичных очагов рассматривают как производное сочетания двух параметров: доли клеток паренхимы опухоли в состоянии митоза и процента клеточных потерь — фактора клеточных потерь. Высокая скорость роста рецидивных и метастатических очагов СМТ обусловлена, прежде всего, низкими показателями фактора клеточных потерь. Митотическая активность этого вида опухолей в среднем невысокая. Однако баланс этих двух показателей (долей клеток, находящихся в митозе, и фактора клеточных потерь) в целом определяет высокую скорость роста данного вида опухолей [3].

Известно, что периферию опухоли составляют наиболее пролиферативно активные клетки [4]. Ближе к центру опухолевого очага сосредоточены в основном клетки в состоянии пролиферативного покоя. На каждые 100 вновь образовавшихся клеток в процессе митоза в опухолях в среднем приходится 98–99 гибнущих опухолевых клеток. Оставшегося 1–2% опухолевых клеток достаточно для того, чтобы сдвинуть баланс кинетических процессов в сторону роста опухоли. Взаимоотношение клеток определяет их поведение: кинетические особенности, степень злокачественности, биологическое поведение опухоли [5, 6].

Большинство обычных покоящихся клеток являются диплоидными, тогда как пролиферирующие клетки могут иметь различный уровень пloidности. На разных стадиях клеточного цикла (G0, G1, S, G2 и M) в ядрах клеток содержится различное количество дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), характерное для каждой стадии пролиферации.

Во время стадии G1 клеточного цикла в клетках происходит синтез рибонуклеиновой кислоты (РНК) и белков, что обеспечивает поддержание диплоидности (содержание ДНК, соответствующее полному двойному набору хромосом, 2N). Далее происходит синтез ДНК. В этой фазе кле-

точного цикла клетка содержит ДНК в количестве, промежуточном между G1 и G2. S-фаза заканчивается удвоением содержания ДНК с образованием так называемого G2-тетраплоида (содержание ДНК 4N). Во время стадии G2 происходит синтез белков и РНК. G2-фаза заканчивается митозом (M). M-стадия по содержанию ДНК практически не отличается от G2-стадии.

После завершения митоза получившиеся две дочерные клетки вступают в новый клеточный цикл или переходят в стадию покоя G0. По содержанию ДНК эта стадия не отличается от G1. Находясь в периоде G0, клетка может не выполнять каких-либо специфических функций, характерных для дифференцированных клеток, но сохраняет способность к пролиферации. С другой стороны, многие дифференцированные клетки способны переходить в клеточный цикл и делиться [7, 8].

Целью исследования было определение содержания ДНК и распределения клеток по фазам митотического цикла в группах больных первичными СМТ.

Методом проточной цитофлуориметрии изучено и проанализировано содержание ДНК в опухолевой ткани 30 больных первичными СМТ. ДНК-анализ осуществляли на проточном цитометре FACS Canto II (Becton Dickinson, USA). Для анализа ДНК в ткани опухоли использовали Cycle TESTTMPLUS DNA ReagentKit.

Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы ModFit LT, позволяющей анализировать пloidность 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.

Опухоль считали диплоидной, если выявлялся один пик, который соответствовал нормальному содержанию ДНК в ядрах клеток. При наличии пиков, отличающихся от диплоидного, опухоль расценивали как анеуплоидную.

Чтобы оценить степень анеуплоидии, определяли индекс ДНК (ИДНК). Он представляет собой соотношение между значением канала пика G0/G1 опухолевого образца и значением канала пика G0/G1 нормального (диплоидного) образца. ИДНК диплоидных клеток соответствовал 1,0, следовательно, ИДНК анеуплоид-

Распределение диплоидных и анеуплоидных клеток по фазам клеточного цикла в первичных саркомах мягких тканей (%)

Тип опухоли	G0/G1-фаза клеточного цикла	G2+M-фаза клеточного цикла	S-фаза клеточного цикла	Индекс пролиферации
Диплоидные опухоли	86±9,5	0,9±0,1	12,9±2,4	13,7±3,8
Анеуплоидные опухоли	68,4±6,3	2,6±0,7*↑	28,6±6,1*↑	31,1±5,4*↑

Примечание: *отличия показателей статистически значимы по отношению к диплоидным опухолям ($p \leq 0,05$).

ных клеток был больше или меньше 1,0. Индекс пролиферации (ИП) вычислялся как суммарное число клеток опухоли, находящихся в S- и G2+M-фазах клеточного цикла.

Верификацию опухолей осуществляли с помощью гистологического метода на светооптическом уровне. Материал обрабатывали по общепринятой методике.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью критерия Стьюдента.

Изучение ДНК-цитометрических параметров выявило незначительное преобладание анеуплоидных опухолей в данной группе в 53,3% случаев (16 из 30 опухолей) — против 46,7% диплоидных (14 из 30 опухолей). Среднее содержание анеуплоидных клеток в первичных опухолях составило 43,2±4,6%.

Для характеристики степени анеуплоидии клеток первичных СМТ нами вычислен ИДНК, который определяли делением среднего значения относительного содержания ДНК анеуплоидной популяции клеток в фазе G0/G1 на среднее значение G0/G1 нормальной популяции. ИДНК диплоидной популяции равен единице, ИДНК анеуплоидной популяции при этом больше или меньше 1,0. В целом в группе первичных СМТ ИДНК был равен 2,04±0,2. Для первичных СМТ характерным оказалось отсутствие опухолей с ИДНК менее 1,0. Анеуплоидия в пределах митотического цикла (ИДНК=1,1–1,84) была выявлена в 31,25% (5 из 16), в 25% случаев отмечены тетраплоидные (ИДНК=1,85–2,15) опухоли (4 из 16), в 43,8% случаев анеуплоидных опухолей выявлены многоклеточные опухоли (7 из 16).

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла в среднем по группе показал, что основная масса клеток первичных опухолей находилась в G0/G1-фаза клеточного цикла, составив 75,5±4,9%. Доля клеток в G2+M-фаза клеточного цикла составила 2,2±0,5%.

Важным показателем, характеризую-

щим биологическое поведение опухоли, служит скорость пролиферации клеток, определяемая по доле клеток в S-фаза. В среднем в группе первичных СМТ доля клеток в S-фаза составила 22,7±3,5%. При анализе пролиферативной активности, оцениваемой по ИП (ИП — сумма клеток S+G2+M), оказалось, что ИП является высоким и составляет 25,1±3,2%.

Анеуплоидию опухолевых клеток рассматривают как показатель биологического поведения опухоли — способности к инвазивному росту и метастазированию [9]. Были проанализированы характер распределения клеток по фазам митотического цикла, скорость пролиферации и ИП диплоидных и анеуплоидных опухолей первичных СМТ. Данные проведенного исследования представлены в табл. 1.

Из представленных данных видно, что при повышении пролиферативной активности характерны снижение содержания клеток в G0/G1-фазах клеточного цикла и увеличение содержания доли клеток в S- и G2+M-фазах клеточного цикла. Отмечены достоверно значимые отличия анеуплоидных опухолей первичных СМТ по 3 из 4 проанализированных показателей ($p \leq 0,05$). Наиболее значимые среди них: превышение темпов пролиферации (доля клеток в S-фаза) и ИП (доля клеток в фазах S+G2+M) анеуплоидных опухолей в 2,2 и 2,3 раза соответственно по сравнению с диплоидными опухолями данной группы; доля клеток в фазе G2+M анеуплоидных опухолей оказалась выше в 2,9 раза по сравнению с диплоидными опухолями.

Проведенный анализ параметров клеточного цикла первичных опухолей в зависимости от степени дифференцировки выявил следующие особенности.

– Опухоли высокой степени дифференцировки (G1) в 100% случаев (3 из 3) характеризовались ИДНК, равным 1,0, то есть являлись диплоидными.

– Умеренно дифференцированные опухоли (G2) в 50% случаев (4 из 8) были анеуплоидными, из них 50% составляли

Распределение клеток по фазам клеточного цикла в первичных саркомах мягких тканей по степени дифференцировки (%)

Степень дифференцировки опухоли	G0/G1-фаза клеточного цикла	G2+M-фаза клеточного цикла	S-фаза клеточного цикла	Индекс пролиферации
G1	95,5±7,8	1,2±0,5	3,3±1,1	4,5±1,8
G2	80,9±9,6	2,2±0,5	16,5±4,9*↑	18,6±5,4*↑
G3	78,8±6,1	1,5±0,7	19,3±3,8*↑	21,1±4,2*↑

Примечание: *отличия показателей статистически значимы по отношению к G1 ($p \leq 0,05$).

Распределение клеток по фазам клеточного цикла в первичных саркомах мягких тканей в зависимости от стадий (%)

Стадия опухолевого процесса	G0/G1-фаза клеточного цикла	G2+M-фаза клеточного цикла	S-фаза клеточного цикла	Индекс пролиферации
II	89,7±6,6	1,6±0,4	8,9±2,7	10,5±2,5
III	77,1±6,4	1,6±0,8	21,3±4,3*↑	22,9±3,7*↑

Примечание: *отличия показателей статистически значимы по отношению к II стадии ($p \leq 0,05$).

многоклеточные опухоли (2 из 4), 25% — тетраплоидные (1 из 4).

– Опухоли низкой степени дифференцировки (G3) в 63,2% характеризовались ИДНК, отличным от 1,0 (12 из 19), среди которых на долю многоклеточных приходилось 41,7% (5 из 12), на долю тетраплоидных — 25% (3 из 12).

– Низкодифференцированные опухоли характеризовались достоверно высокими значениями среднего содержания анеуплоидных клеток в опухоли (33,1±5,2%) по сравнению с G2 (16,5±6,8%; $p \leq 0,05$).

Анализ кинетики клеточного цикла показал снижение доли клеток в G0/G1-фаза клеточного цикла от G1 к G3, что сопровождалось достоверно значимым повышением доли клеток в S-фаза в 5 раз при G2 и в 5,8 раза при G3. В связи с этим отмечено увеличение ИП в 4,1 и 4,7 раза соответственно ($p \leq 0,05$). Статистически значимой разницы проанализированных значений между G2 и G3 выявлено не было. Результаты отражены в табл. 2.

При анализе параметров митотического цикла первичных СМТ в зависимости от стадии заболевания было показано преобладание при II стадии диплоидных опухолей над анеуплоидными. Так, при стадии IIb диплоидных опухолей было 62,5% — против 37,5% анеуплоидных. При стадии IIc в 100% случаев (у 2 больных) выявлены диплоидные опухоли. Опухоли III стадии в 65% случаев характеризовались ИДНК, отличным от 1,0 (13 из 20), из которых на долю многоклеточных приходилось 53,8% (7 из 13), на долю тетрапло-

идных — 15,4% (2 из 13). При стадии IIb из анеуплоидных опухолей 66,7% были тетраплоидными (2 из 3). Среднее содержание анеуплоидных клеток в первичных опухолях различных стадий было повышено в 2 раза при увеличении стадии заболевания от IIb к III (16,5±6,8% при IIb — против 33,1±5,2% при III; $p > 0,05$).

Характер распределения клеток по фазам клеточного цикла первичных СМТ различных стадий представлен в табл. 3. Из-за малого количества опухолей стадии IIc мы объединили больных IIb и IIc во II стадию.

Полученные данные свидетельствуют о возрастании злокачественного потенциала первичных СМТ в зависимости от стадии опухолевого процесса. Это подтверждается статистически значимым повышением в 2,4 раза темпа пролиферации опухоли и в 2,2 раза — ИП ($p \leq 0,05$). При этом доля клеток в G2+M-фаза клеточного цикла и при II и III стадиях находилась на одинаковом уровне, а доля клеток в G0/G1-фаза несколько снижалась.

ВЫВОДЫ

1. Проведённое ДНК-цитометрическое исследование параметров клеточного цикла показало высокий биологический потенциал первичных сарком мягких тканей.

2. В зависимости от степени дифференцировки сарком мягких тканей параметры клеточного цикла были следующими: при высокой степени дифференцировки (G1) опухоли были диплоидными в 100% на-

блюдений, при умеренной степени дифференцировки (G2) в 50% наблюдений опухоли были анеуплоидными. Для опухолей низкой степени дифференцировки (G3) были характерны более высокие значения содержания анеуплоидных клеток в опухоли по сравнению с G2 ($33,1 \pm 5,2$ и $16,5 \pm 6,8$ соответственно).

В представленной статье конфликт интересов отсутствует.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fletcher C.D.M., Bridge J.A., Hogendoorn P.C.W., Mertens F. *World Health Organization Classification of tumours of soft tissue and bone*. 4th ed. Lyon: IARC Press. 2013; 80 p.
2. Patrikidou A., Domont J., Cioffi A., Le Cesne A. Treating soft tissue sarcomas with adjuvant chemotherapy. *Curr. Treat. Options Oncol.* 2011; 12 (1): 21–31. DOI: 10.1007/s11864-011-0145-5.
3. Coindre J.M. New WHO classification of tumours of soft tissue and bone. *Annales de pathologie.* 2012; 32: 115–116.
4. Базанов К.В. Исследование скорости роста рецидивных и метастатических сарком мягких тканей. *Соврем. пробл. науки и образования.* 2014; 6: 1227. [Bazanov K.V. Research of growth rate of recurrent and metastatic sarcomas of soft tissues. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya.* 2014; 6: 1227. (In Russ.)]
5. Колобов А.В., Полежаев А.А. Влияние случайной подвижности злокачественных клеток на устойчивость фронта опухоли. *Компьютерные исследования и моделирование.* 2009; 1 (2): 225–232. [Kolobov A.V., Polezhaev A.A. Influence of random

malignant cell motility on growing tumor front stability. *Компьютерные исследования и моделирование.* 2009. 1 (2): 225–232. (In Russ.)]

6. Кит О.И., Новикова И.А., Бахтин А.В. и др. Первый опыт детекции циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови. *Международ. ж. эксперим. образования.* 2013; 11: 37–39. [Kit O.I., Novikova I.A., Bakhtin A.V. et al. The first experience of detection circulating tumor cells in peripheral blood. *Mezhdunarodnyy zhurnal eksperimental'nogo obrazovaniya.* 2013; 11: 37–39. (In Russ.)]

7. Неродо Г.А., Новикова И.А., Никитина В.П. и др. Клиническое значение ДНК проточной цитометрии при раке яичников. *Соврем. пробл. науки и образования.* 2016; 3: 35. [Nerodo G.A., Novikova I.A., Nikitina V.P. et al. Clinical value of DNA flow cytometry in ovarian cancer. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya.* 2016; 3: 35. (In Russ.)]

8. Кумар В., Аббас А.К., Фаусто Н., Астер Дж.К. *Основы патологии заболеваний по Роббинсу и Котрану*. Пер с англ. Под ред. Е.А. Коган. В 3 т. М.: Логосфера. 2014; 1 (главы 1–10): 312–313. [Kumar V., Abbas A.K., Fausto N., Aster J.C. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 2010. 1450 p. Russ. Ed.: Kumar V., Abbas A.K., Fausto N., Aster Dzh.K. *Osnovy patologii zabolevaniy po Robbinsu i Kotranu*. V 3 t. Ed. by E.A. Kogan. Moscow: Logosfera. 2014; 1: 312–313. (In Russ.)]

9. Николаева Т.Г., Добрынин Я.В. Плоидность опухолевых клеток — важный прогностический фактор при некоторых злокачественных эпителиальных новообразованиях человека (собственные и литературные данные). *Вестн. РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.* 2006; 17 (1): 29–36. [Nikolaeva T.G., Dobrynin Ya.V. Tumor cell ploidy is an important factor of prognosis in some human epithelial cancer types (the authors' own and literature findings). *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina RAMN.* 2006; 17 (1): 29–36. (In Russ.)]

УДК 616.831-005.4-036

КОГНИТИВНАЯ ТРАЕКТОРИЯ ПАЦИЕНТОВ В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА: РОЛЬ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ И СТРУКТУРНЫХ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ

Алексей Александрович Кулеш^{1*}, Виктор Евгеньевич Дробаха¹,
Елена Михайловна Куклина², Владимир Васильевич Шестаков¹

¹Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера, г. Пермь, Россия;

²Институт экологии и генетики микроорганизмов, г. Пермь, Россия

Поступила 13.01.2017; принята в печать 07.03.2017.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2017-513

Цель. Изучить роль нейровоспаления и структурных церебральных факторов в развитии когнитивных нарушений в восстановительном периоде ишемического инсульта.

Методы. У 55 пациентов с ишемическим инсультом проводили оценку глобального когнитивного статуса в остром и восстановительном периодах, исследование концентрации цитокинов (интерлейкина-1β, интерлейкина-4, интерлейкина-6, интерлейкина-10, фактора некроза опухоли α) в ликворе и сыворотке крови, изучение морфометрических и диффузионно-тензорных показателей магнитно-резонансной томографии.

Результаты. Предикторами стабильного высокого когнитивного статуса оказались низкая концентрация интерлейкинов-6 и -10, а также доминантность интерлейкинов-1β и -10 в ликворе, высокая фракционная анизотропия инспилаторного очага верхнего продольного пучка в остром периоде инсульта. К предикторам положительной динамики когнитивного статуса можно отнести низкий уровень С-реактивного белка, среднее значение фракционной анизотропии обозначенного тракта, высокий уровень липопротеинов высокой плотности в сыворотке крови и интерлейкина-10 в ликворе, кодоминантность концентраций интерлейкинов-1β и -6 в сы-