

# ПРОТОЧНА ДНК-ЦИТОМЕТРІЯ В ОЦІНЦІ ПАРАНЕОПЛАСТИЧНОГО РЕВМАТОЛОГІЧНОГО СИНДРОМУ У ХВОРИХ НА РАК ЛЕГЕНІ

Лисенко С. А.

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова  
м. Вінниця, Україна

**Ключові слова:** рак легені, паранеопластичний ревматологічний синдром, проточна ДНК-цитометрія, клітинний цикл, анеуплоїдний ДНК-профіль пухлини.

## Вступ

Як відомо, застосування методів кількісної цитометрії в біологічних і медичних дослідженнях на сьогодні є досить поширеним та перспективним. Вони спрямовані на пошук найбільш інформативних морфометричних і цитоспектрофотометричних критеріїв кінетики ДНК у клітинному циклі з метою багатогранного вивчення гетерогенних популяцій досліджуваних експериментальних та клінічних об'єктів [1].

В даний час цитометрію прийнято поділяти на статичну і проточну. Для статичної цитометрії використовують звичайні люмінесцентні або конфокальні мікроскопи із спеціальними системами аналізу зображень. Другий різновид цитометрії здійснюється за допомогою спеціальних приладів – сортерів або проточних цитометрів. Метод проточної цитометрії сформувався за останні 40 років з окремих дослідів по підрахунку різноманітних частинок і визначенням їх розмірів. Так, в 1965 р. з'явилося перше повідомлення про клітинний сортер. Потім в 70-ті роки почали випускати прилади, які здатні визначати відразу кілька клітинних параметрів на основі вимірювання інтенсивності флуоресценції при двох і більше довжинах хвиль [12].

В цілому принципи проточної цитометрії дуже прості. Ядра або клітини поодиноці перетинають сфокусований лазерний світловий пучок. Світло певної довжини збуджує молекули кількох флуоресціюючих барвників, які пов'язані з різними клітинними компонентами, що дозволяє оцінити відразу кілька клітинних параметрів. Потім світло, що випускається цими барвниками, збирають за допомогою системи дзеркал і лінз та розкладають на компоненти. В кінцевому результаті світлові сигнали перетворюють в електричні імпульси зручні для комп'ютерної обробки та зберігання інформації [2].

За допомогою проточної цитометрії можна визначати такі параметри: вміст у клітині РНК і ДНК, основні параметри клітинного циклу (розподіл по фазам G0G1, S, G2 + M), сумарну кількість білків або специфічних білків, клітинний метаболізм (внутрішньоклітинний рН), кінетику ферментативних реакцій, транспорт іонів кальцію. Проточна ДНК-цитометрія або вимірювання вмісту ДНК на сьогодні являється одним із найпростіших та самих

розповсюджених застосувань проточної цитометрії взагалі. Найбільш поширеними її завданнями, які мають діагностичне і прогностичне значення, є ідентифікація клітин з аномальним вмістом ДНК (анеуплоїдні клітини), підрахунок клітин, що знаходяться в різних фазах клітинного циклу (особливо важливою є частка клітин у S – фазі) та оцінка ступеню проліферації [3, 10].

На перших порах основним стимулом для розвитку проточної цитометрії слугувало бажання автоматизувати цитологічні методи, які використовуються для діагностики захворювань, але в подальшому більшість досліджень було спрямовано на застосування цього методу в прогностичних цілях [5, 6]. Інтенсивний розвиток автоматизованих діагностичних систем скануючого та проточного типів сприяв якнайшвидшому впровадженню цитометричного методу в клінічну практику. Основними напрямками в освоєнні методу є:

- масові профілактичні огляди населення з метою виявлення ранніх стадій захворювання;
- диференційна діагностика пограничних станів та злоякісного росту;
- контроль розвитку злоякісного захворювання під впливом хірургічного, променевого, хіміотерапевтичного та комбінованого лікування [4].

В сьогодні особливо плідно цитометричні дослідження ведуться в гематології, пульмонології, гастроентерології, гінекології, урології, і найбільш активно в онкології [8, 11]. Так, одними з перших об'єктів вивчення були форменні елементи крові та епітеліальні клітини слизової оболонки шийки матки. Це пов'язано із розмаїттям клітинних елементів, що характеризують нормальний фізіологічний стан досліджуваних органів і тканин, доступністю отримання діагностичного матеріалу, а також з труднощами морфологічної ідентифікації їх при різних захворюваннях, особливо онкологічних [1, 6, 9].

В даний час також зростаючий інтерес у дослідників викликає вивчення ДНК-цитометричного профіля пухлини у хворих різноманітними злоякісними новоутвореннями, в тому числі і раком легені. Як відомо, паранеопластичний ревматологічний синдром (ПНРС) досить часто супроводжує розвиток саме раку легені [7, 13].

**Метою роботи** була порівняльна оцінка проточно-цитометричних особливостей у хворих на рак легені з ПНРС або без нього.

**Матеріали і методи**

В дослідження включено 70 хворих на рак легені, які знаходились на лікуванні у торакальному відділенні Вінницького обласного клінічного онкологічного диспансеру протягом 2012-2013 років. Всі хворі були розподілені на дві групи. Перша група – 30 (42,9%) хворих на рак легені з проявами ПНРС, друга – 40 (57,1%) пацієнтів на рак легені без симптоматики даного паранеопластичного синдрому. Серед досліджуваного контингенту було 59 (84,3%) чоловіків та 11 (15,7%) жінок. Всі пацієнти були віком від 41 до 76 років. Діагноз в усіх хворих був морфологічно (патогістологічно) верифікований. Забір пухлинного матеріалу відбувався під час оперативних втручань, який до проведення проточно-цитометричних досліджень зберігався в замороженому стані (-20°C).

Автором був отриманий дозвіл комітету з біоетики Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова на проведення досліджень з людським матеріалом.

Вміст ДНК в ядрах пухлинних клітин визначався методом проточної ДНК-цитометрії. Суспензії ядер з пухлинних клітин отримувались за допомогою спеціального розчину для дослідження ядерної ДНК CyStain DNA Step 1 (Partec, Німеччина), відповідно до протоколу-інструкції виробника. Даний розчин дозволяє маркувати ядерну ДНК діамідинофеніліндолом (DAPI), який входить до його складу. У процесі приготування нуклеарних суспензій використовувалися спеціальні одноразові фільтри CellTrics 50 мкм (Partec, Німеччина).

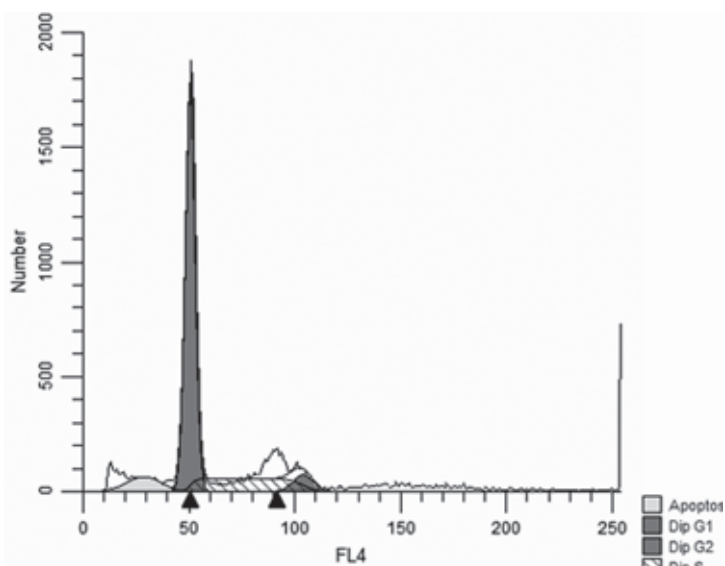
Проточний аналіз виконувався на багатофункціональному науково-дослідному проточному цитометрі "Partec PAS" фірми Partec, Німеччина із застосуванням програмного забезпечення FloMax (Partec, Німеччина) в науково-дослідному центрі Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова. Для збудження флуоресценції DAPI застосовувалось УФ-випромінювання. З кожного зразка нуклеарної суспензії аналізу підлягало 20 тис. подій. Циклічний аналіз клітин виконувався засобами програмного забезпечення Modfit LT for Windows 4.0 (Verity Software House, USA). Визначалась кількість диплоїдних і анеуплоїдних клітин у зразку (%), що давало можливість охарактеризувати тип або профіль пухлини. Розподіл клітин кожної популяції по фазах клітинного циклу (G0G1, S, G2 + M) відтворювався на ДНК-гістограмах. Дослідження апоптозу (фрагментації ядерної ДНК) виконувалось шляхом виділення SUB-G0G1 ділянки на ДНК-гістограмах перед піком G0G1, що вказує на ядра клітин з вмістом ДНК < 2с. Також обчислювався спеціальний індекс, який характеризує ДНК анеуплоїдію (індекс ДНК або DI), який показує співвідношення інтенсивності флуоресценції піка анеуплоїдних клітин до диплоїдного).

Для порівняння середніх показників двох різних досліджуваних груп використовували параметричний t – критерій Стьюдента. Статистичну обробку проводили за допомогою програмного забезпечення для статистичного аналізу "Biostat" і "MS Excel XP".

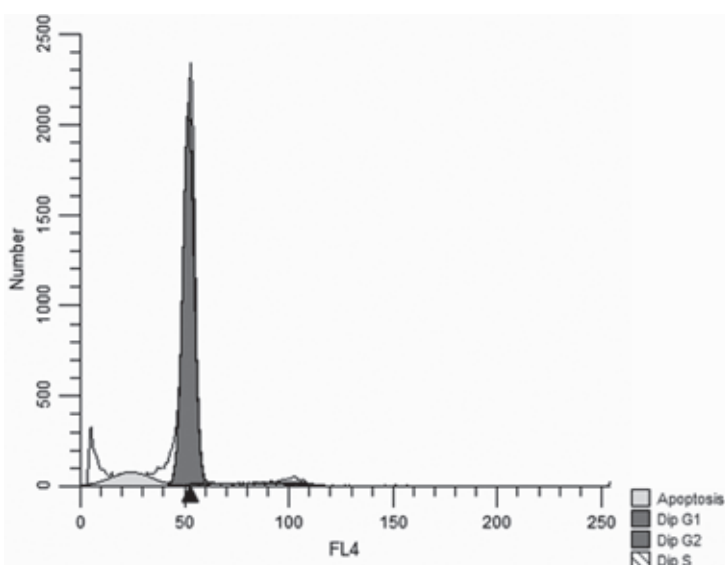
**Результати та обговорення**

При проведенні порівняльної оцінки ДНК-гістограм пухлинних клітин хворих на рак легені виявлено наявність суттєвих відмінностей в цитометричних характеристиках цих пухлин в залежності від наявності або відсутності ПНРС.

Так, диплоїдний ДНК-профіль пухлини (гістограми 1 та 2, табл. 1), коли індекс ДНК дорівнює 1,0, виявлено у пухлинах 19 хворих (27,14% по відношенню до загальної кількості хворих). З них 4 пацієнта (13,33% по відношенню



ДНК-гістограма 1. Розподіл пухлинних клітин за фазами клітинного циклу. Диплоїдний ДНК-профіль пухлини (DI=1, низький рівень апоптозу, підвищена S-фаза). Хворий Р. на рак легені з ПНРС.

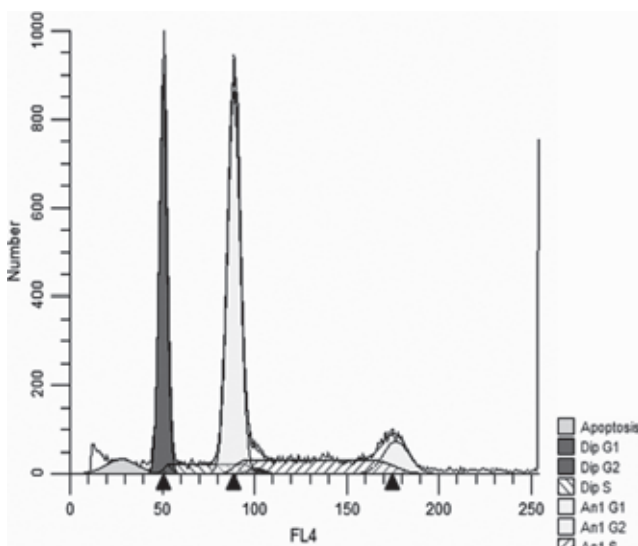


ДНК-гістограма 2. Розподіл пухлинних клітин за фазами клітинного циклу. Диплоїдний ДНК-профіль пухлини (DI=1, підвищений рівень апоптозу, низька S-фаза). Хворий Г. на рак легені без ПНРС.

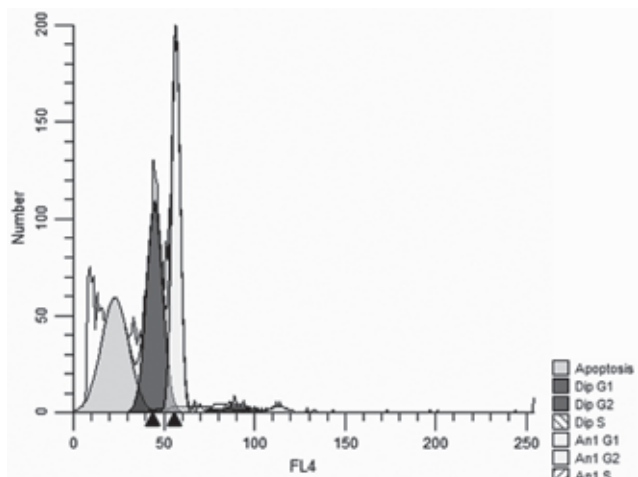
Розподіл хворих на рак легені за ДНК-профілем пухлини

ДНК-профіль пухлини	Групи хворих	
	Рак легені з паранеопластичним ревматологічним синдромом (перша група)	Рак легені без паранеопластичного ревматологічного синдрому (друга група)
Диплоїдний	4 (13,33%)	15 (37,50%)
Анеуплоїдний гіподиплоїдний	2 (6,67%)	7 (17,50%)
Анеуплоїдний гіпердиплоїдний	24 (80,00%)	18 (45,00%)
Всього	30 (100%)	40 (100%)

до всіх в даній дослідній групі) були в групі хворих на рак легені з наявністю ПНРС. Також диплоїдний ДНК-профіль пухлини мали 15 (37,50%) хворих на рак легені без ПНРС.



ДНК-гістограма 3. Розподіл пухлинних клітин за фазами клітинного циклу. Анеуплоїдний ДНК-профіль пухлини (2 G1-піки,  $DI=1,76$ , низький рівень апоптозу, підвищена S-фаза). Хворий О. на рак легені з ПНРС.



ДНК-гістограма 4. Розподіл пухлинних клітин за фазами клітинного циклу. Анеуплоїдний ДНК-профіль пухлини (2 G1-піки,  $DI=1,26$ , високий рівень апоптозу, низька S-фаза). Хворий С. на рак легені без ПНРС.

Анеуплоїдний профіль пухлини, це тип гістограми, при якому  $DI$  відмінний від 1,0 [11]. Відмічають два типи анеуплоїдних пухлин:

- анеуплоїдний гіподиплоїдний ( $DI < 1,0$ );
- анеуплоїдний гіпердиплоїдний ( $DI > 1,0$ ).

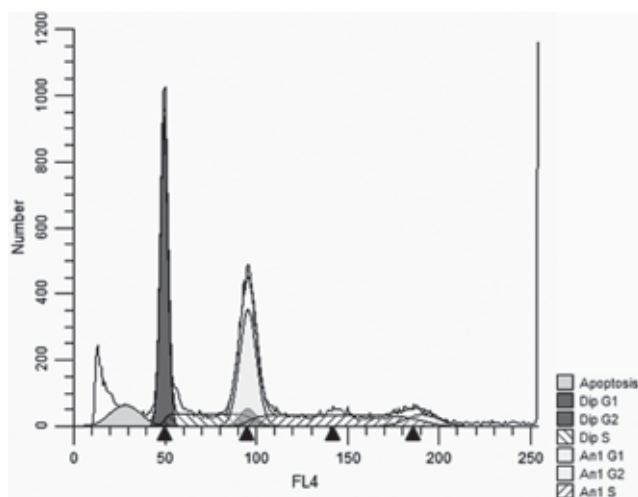
Отже, з таблиці 1 видно, що анеуплоїдний ДНК-профіль пухлини мали 51 пацієнт (72,86% по відношенню до загальної кількості хворих). Із них у 9 пацієнтів (12,86%) був анеуплоїдний гіподиплоїдний тип пухлин, у інших 42 хворих (60,00%) – анеуплоїдний гіпердиплоїдний. Якщо оцінювати розподіл за групами, то серед пухлин із анеуплоїдним гіподиплоїдним ДНК-профілем дві було у хворих з першої групи (6,67% по відношенню до всіх в даній дослідній групі), а 7 (17,50%) – у хворих з другої групи. Також виявилось, що в групі хворих на РЛ з ПНРС із анеуплоїдним гіпердиплоїдним ДНК-профілем (гістограма 3) було 24 пацієнти (80,00% по відношенню до всіх в даній групі). В групі хворих на РЛ без ПНРС – 18 (45,00%) було із анеуплоїдним гіпердиплоїдним ДНК-профілем (гістограма 4).

Якщо порівнювати розподіл хворих з різних груп за ДНК-профілем пухлини видно, що у хворих на рак легені з ПНРС у 1,39 рази частіше зустрічався анеуплоїдний профіль пухлини, ніж у аналогічних хворих без ПНРС (86,67% та 62,50% відповідно). Одночасно, у пацієнтів на рак легені без ПНРС у 2,81 рази переважав диплоїдний тип пухлини, в порівнянні з аналогічними пацієнтами з наявністю ПНРС.

Також у хворих на рак легені з ПНРС у 2,62 рази рідше, ніж у хворих другої групи, зустрічається гіподиплоїдний варіант анеуплоїдного ДНК-профілю пухлини (6,67% та 17,50% відповідно). Протилежна ситуація із гіпердиплоїдним варіантом анеуплоїдного ДНК-профілю пухлини, який був у 1,78 рази частіше у пацієнтів із ПНРС, аніж у аналогічних пацієнтів без даного синдрому (80,00% та 45,00% відповідно).

Серед анеуплоїдних пухлин виявлено також 3 пухлини з тетраплоїдним (гістограма 5) ДНК-профілем (4,29% по відношенню до загальної кількості хворих). Всі вони спостерігалися у хворих на рак легені з наявністю ПНРС (10% по відношенню до всіх пацієнтів у першій групі), у хворих з другої групи таких випадків не виявлено.

Аналіз усіх ДНК-гістограм свідчить, що у хворих на рак легені з ПНРС спостерігається низький рівень апоптозу та підвищена S-фаза на відміну від аналогічних пацієнтів без даного синдрому, у яких виявляється високий рівень апоптозу і низька S-фаза.



**ДНК-гістограма 5.** Розподіл пухлинних клітин за фазами клітинного циклу. Анеуплоїдний тетраплоїдний ДНК-профіль пухлини (DI=1,93, низький рівень апоптозу, підвищена S-фаза). Хворий К. на рак легені з ПНРС.

Отримані дані вказують на те, що пухлини хворих на рак легені з проявами ПНРС на відміну від пухлин хворих без даного синдрому характеризуються більшою злоякісністю, що може також характеризувати більш несприятливий прогноз у даної групи пацієнтів.

#### Висновки:

1. Пухлини хворих на рак легені з ПНРС у 1,39 рази частіше мають анеуплоїдний ДНК-профіль пухлини, ніж пухлини аналогічних хворих без ПНРС.

2. Гіпердиплоїдний варіант анеуплоїдного ДНК-профілю пухлини зустрічається у 1,78 рази частіше у пацієнтів із ПНРС, ніж у аналогічних пацієнтів без даного синдрому, гіподиплоїдний варіант анеуплоїдного ДНК-профілю – відповідно у 2,62 рази рідше.

3. Виявлені відмінності в ДНК-цитометричних особливостях пухлинних клітин у хворих на рак легені з ПНРС та аналогічних пацієнтів без даного синдрому підтверджують більш злоякісний перебіг захворювання у хворих на рак легені з наявністю ПНРС.

**Перспективи подальших розвідок у даному напрямку.** Планується дослідження віддалених результатів перебігу пухлинного процесу у хворих на рак легені з ПНРС в залежності від проточно-цитометричних особливостей пухлинних клітин.

Рецензент: д.мед.н., професор Щепотін І.Б.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Мининкова А. И. Исследование тромбоцитов методом проточной цитофлуориметрии (обзор литературы). II часть / А. И. Мининкова // *Клин. Лаборат. Ди- агн.* – 2011. – № 4. – P. 25–30.

2. Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы в микроскопии и цитометрии / Воробьев И. А. [и др.]. // *Цитология.* – 2011. – Т. 53, № 5. – С. 392–403.

3. 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. – V. 73, № 6. – P. 1111–6.

4. Chang R. L. Quantification of intracellular proteins and monitoring therapy using flow cytometry / R. L. Chang, C. H. Yeh, M. Albitar // *Curr. Drug Targets.* – 2010. – V. 11, № 8. – P. 994–9.

5. Chromosomal instability, aneuploidy and routine high-resolution DNA content analysis in oral cancer risk evaluation / W. Giaretti [et al.] // *Future Oncol.* – 2012. – V. 8, № 10. – P. 1257–71.

6. Clinical aspect and molecular mechanism of DNA aneuploidy in gastric cancers / E. Oki [et al.] // *J. Gastroenterol.* – 2012. – V. 47, № 4. – P. 351–8.

7. Dabrowska-Zimoc A. A review of paraneoplastic rheumatic syndromes / A. Dabrowska-Zimoc, M. Brzosko // *Ann. Acad. Med. Stetin.* – 2006. – V. 52. – P. 17–22.

8. 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. – V. 83, № 1. – P. 141–9.

9. Heterogeneity of DNA content in laryngeal squamous cell carcinoma in relation to histopathological variables / B. Ladika-Davidovic [et al.] // *Acta Otolaryngol.* – 2009. – V. 129, № 7. – P. 768–73.

10. 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. – V. 13, № 3. – P. 196–201.

11. Pinto A. E. DNA flow cytometry in solid tumors / A. E. Pinto, I. Fonseca, J. Soares // *Acta Med. Port.* – 2002. – V. 15, № 2. – P. 133–42.

12. Quirke P. Flow cytometry: methodology and applications in pathology / P. Quirke, J. E. Dyson // *J. Pathol.* – 1986. – V. 149, № 2. – P. 79–87.

13. Thomas L. Management of paraneoplastic syndromes in lung cancer / L. Thomas, Y. Kwok, M. J. Edelman // *Curr. Treat. Options Oncol.* – 2004. – V. 5, № 1. – P. 51–62.

**ПРОТОЧНАЯ ДНК-ЦИТОМЕТРИЯ  
В ОЦЕНКЕ ПАРАНЕОПЛАСТИЧЕСКОГО  
РЕВМАТОЛОГИЧЕСКОГО СИНДРОМА  
У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО**

Лысенко С. А.

Винницкий национальный медицинский  
университет им. Н.И. Пирогова,  
г. Винница, Украина

**Резюме:** Проведено проточно-цитометрическое исследование содержания ДНК опухолевых клеток 70 больных раком легкого: 30 пациентов с паранеопластическим ревматолическим синдромом (ПНРС) и 40 – без проявлений данного синдрома. Установлено, что опухоли больных раком легкого с ПНРС в 1,39 раза чаще имеют анеуплоидный ДНК-профиль, чем опухоли аналогичных больных без ПНРС. Гипердиплоидный вариант анеуплоидного ДНК-профиля опухоли встречается в 1,78 раза чаще у пациентов с ПНРС, чем у аналогичных пациентов без данного синдрома, гиподиплоидный вариант анеуплоидного ДНК-профиля – соответственно в 2,62 раза реже. Все эти особенности свидетельствуют о большей злокачественности опухолей у данной группы больных, что может также указывать на более неблагоприятный прогноз.

**Ключевые слова:** рак легкого, паранеопластический ревматолический синдром, проточная ДНК-цитометрия, клеточный цикл, анеуплоидный ДНК-профиль опухоли.

**DNA FLOW CYTOMETRY IN THE EVALUATION  
OF RHEUMATIC PARANEOPLASTIC SYNDROME  
IN LUNG CANCER PATIENTS**

S. A. Lysenko

Pirogov National Medical University, Vinnitsa, Ukraine

**Summary.** The study of the flow cytometric DNA content of tumor cells of 70 lung cancer patients was conducted and included 30 patients with paraneoplastic rheumatic syndrome (PNRS) and 40 – without manifestations of this syndrome. The study revealed that tumors of lung cancer patients with PNRS in 1.39 times more likely have aneuploid DNA profile unlike tumors of similar lung cancer patients without PNRS. Hyperdiploid variant of aneuploid DNA profile of the tumor occurs in 1.78 times more frequently in patients with PNRS than in similar patients without this syndrome, hypodiploid variant of aneuploid DNA profile – respectively in 2.62 times less often. All these changes are indicative for the more malignant tumors in patients with this group, which may also indicate poor prognosis.

**Key words:** lung cancer, paraneoplastic rheumatic syndrome, DNA flow cytometry, cell cycle, aneuploid DNA profile.