

УДК 616-006

UDC 616-006

14.00.00 Медицинские науки

Medical sciences

**КЛИНИЧЕСКИЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ
ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА И ПАРАМЕТРЫ
КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ПРИ РАКЕ
ПИЩЕВОДА**

**CLINICAL AND MORPHOLOGICAL FACTORS
AND PREDICTION PARAMETERS OF CELL
CYCLE IN ESOPHAGEAL CANCER**

Кит Олег Иванович
д.м.н., профессор, директор
РИНЦ SPIN-код: 1728-0329
Scopus ID: 55994103100

Kit Oleg Ivanovich
Dr. Sci. Med., professor, director
RSCI SPIN code: 1728-0329
Scopus ID: 55994103100

Базаев Адлан Лечаевич
аспирант

Bazaev Adlan Lechaevich
postgraduate student

Новикова Инна Арнольдовна
к.м.н., руководитель лаборатории
РИНЦ SPIN-код: 2006-2016
Author ID: 7005153343

Novikova Inna Arnol'dovna
Cand.Med.Sci.Ph.D., head of laboratory
RSCI SPIN-code: 2006-2016
Author ID: 7005153343

Гранкина Анастасия Олеговна
младший научный сотрудник
РИНЦ SPIN-код: 1659-6976
Scopus ID: 56381527400

Grankina Anastasiya Olegovna
junior researcher
RSCI SPIN-code: 1659-6976
Scopus ID: 56381527400

Бондаренко Елена Сергеевна
младший научный сотрудник

Bondarenko Elena Sergeevna
junior researcher

Селютина Олеся Николаевна
научный сотрудник
РИНЦ SPIN-код: 4347-0302

Selutina Olesya Nikolaevna
researcher
RSCI SPIN-code: 4347-0302

Максимов Алексей Юрьевич
д.м.н., профессор, заместитель директора
РИНЦ SPIN-код: 7322-5589
*ФГБУ "Ростовский научно-исследовательский
онкологический институт" Министерства
здравоохранения РФ, Россия, Ростов-на-Дону,
ул. 14-я линия, 63*

Maksimov Aleksey Yurievich
Dr. Sci. Med., professor, deputy director
RSCI SPIN-code: 7322-5589
*Federal State Budgetary Institution "Rostov Cancer
Research Institute", of the Ministry of Health of the
Russian Federation, Russia, 344037, Rostov-on-Don,
str. 14-line 63*

Целью исследования является сопоставление традиционных клинико-морфологических факторов прогноза и параметров клеточного цикла, такие как ploidy, кинетика клеточного цикла, а также исследование содержания ДНК в опухолевой ткани больных раком пищевода. Рак пищевода – весьма агрессивное злокачественное заболевание, наиболее часто проявляющееся нарушением глотания. Как правило, данный вид онкопатологии характеризуется неблагоприятным исходом. Ploidy и активность клеточной пролиферации, определяемая по содержанию в опухоли ДНК - синтезирующих клеток, являются одними из важных показателей темпа роста злокачественных новообразований и прогноза заболевания. Исследование проводили на

The aim of the study is to compare the traditional clinicopathologic factors and prognosis of cell cycle parameters, such as ploidy, cell cycle kinetics, as well as the study of DNA content in the tumor tissue of patients with esophageal cancer. Cancer of the esophagus - a very aggressive malignant disease, most commonly manifested impaired swallowing. As a rule, this type of cancer pathology is characterized by unfavorable outcome. Ploidy and cell proliferation activity, defined by the content of the DNA of the tumor - synthesizing cells are one of the important indicators of the growth rate of malignancy and prognosis. The study was performed on tumor tissue fragments of the 30 patients operated on for cancer of the esophagus. DNA study - conducted in the open cell material aftercare. DNA cell content was determined by flow cytometry BD FACSCanto II. By studying the DNA-cytometric parameters, we found the prevalence

фрагментах ткани опухолей 30 пациентов, прооперированных по поводу рака пищевода. Исследование ДНК - клетки проводилось на свежем послеоперационном материале. Содержание ДНК-клеток определялось на проточной цитофлуориметре BD FACSCanto II. Изучая ДНК-цитометрические параметры, мы выявили преобладание анеуплоидных опухолей в 66,7%. Было показано, что ДНК-цитометрические параметры не зависят от гендерного признака. Основная масса диплоидных и анеуплоидных клеток опухолей пищевода находилась в G0/1-фазе клеточного цикла. Сравнительный анализ ДНК - цитометрических параметров и степени дифференцировки опухоли пищевода выявил преобладание анеуплоидных опухолей во всех исследуемых вариантах. Была выявлена закономерность распределения содержания клеток опухоли в G0/G1-, G2+M -, S - фазах клеточного цикла при различных стадиях заболевания

Ключевые слова: ДНК-ЦИТОМЕТРИЯ, ПРОТОЧНАЯ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРИЯ, РАК ПИЩЕВОДА, АДЕНОКАРЦИНОМА, ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫЙ РАК

Doi: 10.21515/1990-4665-124-028

of aneuploid tumors in 66.7%. It was shown that DNA-cytometric parameters are independent of gender. Major weight of diploid and aneuploid cell tumors of the esophagus was in G0 / 1 phase of the cell cycle. Comparative analysis of DNA - cytometric parameters and the degree of differentiation of esophageal tumor revealed a prevalence of aneuploid tumors in all the test cases. content distribution pattern of tumor cells was found in the G0 / G1-, G2 + M -, S - phase of the cell cycle at different stages of the disease

Keywords: DNA-CYTOMETRY, FLOW CYTOMETRY, CANCER OF THE ESOPHAGUS, ADENOCARCINOMA, SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Введение

Рак пищевода (РП) – сравнительно редко встречающаяся опухоль человека, являющаяся весьма агрессивным злокачественным заболеванием, наиболее часто проявляющимся нарушением глотания. Как правило, данный вид онкопатологии характеризуется неблагоприятным исходом [1,2]. Наиболее распространенными эпителиальными опухолями являются плоскоклеточный рак и аденокарцинома. В последнее время терапевтические возможности значительно расширились [3,8], снизилось количество хирургических осложнений и летальности, а также улучшилось своевременное выявление лиц с высоким риском заболевания, что позволило достигнуть существенного прогресса в лечении данного новообразования [5]. Несмотря на значительный прогресс в терапии данной онкопатологии, на сегодняшний момент все еще остаются

значительные разногласия по поводу выработки оптимальной индивидуальной тактики персонифицированного лечения [3,4,11].

Известно, что плоидность и активность клеточной пролиферации, определяемая по содержанию в опухоли ДНК - синтезирующих клеток, являются одними из важных показателей темпа роста злокачественных новообразований и прогноза заболевания. Анеуплоидия и полиплоидия, а также пролиферативная активность клеток – важные показатели биологического поведения опухоли, определяющие степень дифференцировки, инвазивность и потенцию к лимфогенному метастазированию. В связи с чем, проведения ДНК-цитометрии опухоли является своего рода прогностическим «тестом» для определения прогрессирования заболевания и продолжительности жизни больных [6,7,9,10].

Материалы и методы

В данной работе сопоставлялись традиционные клинико-морфологические факторы прогноза и параметры клеточного цикла, такие как плоидность, кинетика клеточного цикла, исследовалось содержание ДНК в опухолевой ткани больных раком пищевода.

Исследование проводили на фрагментах ткани опухолей 30 пациентов, прооперированных по поводу рака пищевода (7 женщин и 23 мужчин в возрасте от 40 до 78 лет). Все пациенты были подвергнуты хирургическому вмешательству в Ростовской научно-исследовательской онкологической институте за период с 2014 по 2016 годы.

Исследование ДНК - клетки проводилось на свежем послеоперационном материале. Фрагменты опухолевой ткани доводили до гомогенного состояния с помощью дезагрегирующего устройства BD Medimachine. Содержание ДНК-клеток определялось на проточной цитофлюориметре BD FACSCanto II.

Проведенное гистологическое исследование верифицировало плоскоклеточный рак у 13 больных с ороговением без изъязвления, у 7 с ороговением с изъязвлением, без ороговения и без изъязвления у 4 пациентов, без ороговения с изъязвлением у 8 человек. У 3 больных была выявлена аденокарцинома. У 9 больных определялось низкодифференцированная степень дифференцировки опухоли, у 8 – умереннодифференцированная, у 3 – высокодифференцированная.

Для оценки степени анеуплоидии рака пищевода вычислен индекс ДНК (ИДНК), составляющий в среднем $1,65 \pm 0,06$.

Полученные результаты выражали в процентах. Статистическая обработка данных выполнялась с помощью параметрических и непараметрических методов, таких как t-критерий Стьюдента, критерий Уилкоксона, метод непрямых разностей.

Результаты

Изучая ДНК-цитометрические параметры, мы выявили преобладание анеуплоидных опухолей в 66,7% (20 из 30 опухолей), со средним содержанием анеуплоидных клеток в опухоли $39,5 \pm 5,8\%$, против 33,3% диплоидных опухолей (10 из 30).

Проводили анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла, скорости пролиферации и индекса пролиферации (Таблица 1).

Таблица 1.

Распределение клеток по фазам клеточного цикла опухолей пищевода (%)

Тип опухоли	G0/G1-фаза клеточного цикла	G2+M-фаза клеточного цикла	S-фаза клеточного цикла	Индекс пролиферации (ИП)
Диплоидные опухоли	$83,9 \pm 3,5$	$0,11 \pm 0,01$	$16,1 \pm 3,2$	$16,2 \pm 3,2$
Анеуплоидные опухоли	$75,9 \pm 2,7$	$3,66 \pm 0,6^* \uparrow$	$20,5 \pm 2,4$	$24,1 \pm 2,3^* \uparrow$

Примечания: * - отличия показателей достоверны по отношению к диплоидным опухолям ($p \leq 0,05$).

Анализ показал, что основная масса диплоидных и анеуплоидных клеток опухолей пищевода находилась в G0/1-фазе клеточного цикла. Отмечалось, что при анеуплоидных опухолях в G2+M фазе клеточного цикла индекс пролиферации и доля клеток в 1,5 и 33 раза выше ($p \leq 0,05$).

При изучении характеристики ДНК - цитометрических параметров опухолей пищевода по гендерному признаку было показано, что у женщин опухоли являлись анеуплоидными в 85,7% случаев, при этом у мужчин в 60,9% случаев. Среднее содержание анеуплоидных клеток в опухолях мужчин и женщин находилось практически на одном уровне ($39,9 \pm 7\%$ и $31,2 \pm 9,5\%$, соответственно).

В обеих группах преобладали опухоли с индексом ДНК (ИДНК) от 1,5 до 2. Опухоли с ИДНК выше 2,0 отмечены только у мужчин в 7,4% случаев.

Сравнительный анализ ДНК - цитометрических параметров и степени дифференцировки опухоли пищевода выявил преобладание анеуплоидных опухолей при G1 в 66,7% случаев, при G2 – 61,1%, при G3 – 77,8%. При G1 опухолях, ИДНК до 1,5 и от 1,5 до 2 определялся 1:1; при G2, ИДНК до 1,5 был определен в 36,6% случаев, от 1,5 до 2 – 54,4% и свыше 2 – 9%; при G3, ИДНК до 1,5 наблюдался в 42,9% случаев, от 1,5 до 2 – в 57,1%.

Было выявлено, что при повышении пролиферативной активности наблюдается увеличение содержания клеток в S- и G2+M-фазах клеточного цикла и снижение содержания клеток в G0/G1-фазах.

Анализ различных стадий дифференцировки выявил, что при I стадии анеуплоидные опухоли встречаются в 75% случаев, при II – в 44,4%, при III – в 76,5%. При I и II стадии среднее содержание анеуплоидных клеток в опухоли находилось практически на одном уровне,

тогда как их доля при III стадии в 1,9 и 1,7 раз превосходила данные значения в сравнении с I и II стадиями ($p \leq 0,05$). При характеристике степени анеуплоидии клеток в зависимости от стадии заболевания выявлено, что при I стадии в 100% случаев наблюдались опухоли с ИДНК от 1,5 до 2. При II стадии на долю опухолей с ИДНК до 1,5 приходилось 25%, от 1,5 до 2,0 – 75%. При III стадии заболевания в 38,5% выявлены опухоли с ИДНК до 1,5, от 1,5 до 2,0 – в 53,8%, и свыше 2,0 – в 7,7% случаев.

Была выявлена закономерность распределения содержания клеток опухоли в G0/G1-, G2+M -, S - фазах клеточного цикла при различных стадиях заболевания: при высоких значениях доли клеток в фазе G0/G1- клеточного цикла, наблюдались наименьшие значения доли клеток в фазах G2+M- и S-, наиболее выраженные в при I стадии. Также мы получили достоверно значимые отличия содержания клеток в фазе G2+M- при II и III стадиях заболевания в сравнении с I стадией, значения которых превышали в 5 и 6,1 раза показатели I стадии ($p \leq 0,05$). При этом достоверные различия значений между II и III стадиями не выявлены. Пролиферативная активность (темпы роста) опухолевых клеток и индекс пролиферации также показывала наибольшие значения при II и III стадиях, хотя их разница не имела достоверных различий. При I стадии наблюдался наименьший индекс пролиферации и количество клеток в S-фазе, по сравнению со II и III стадиями. Данные показатели во II и III стадиях находились практически на одном уровне, составив соответственно, для темпов пролиферации $21,9 \pm 3,6\%$ и $20,1 \pm 2,7\%$, а для индекса пролиферации – $25,1 \pm 3,7\%$ и $24,8 \pm 3,5\%$.

Достоверные отличия были выявлены при анализе распределения клеток по фазам клеточного цикла в зависимости от гистологической структуры опухоли. Так, доля клеток в фазе G0/G1- при плоскоклеточном

раке с ороговением без изъязвления в 1,1 и 1,2 раза превышала аналогичные показатели при плоскоклеточном раке без ороговения с изъязвлением и плоскоклеточном раке с ороговением с изъязвлением ($p \leq 0,05$). При плоскоклеточном раке без ороговения с изъязвлением и аденокарциноме были достигнуты максимальные значения для доли клеток в фазе G2+M. Для остальных видов гистологических структур опухоли данный показатель находился практически на одинаковом уровне.

Максимальные значения темпов пролиферации, определяемые по доле клеток в S-фазе клеточного цикла выявлялись при плоскоклеточном раке с ороговением с изъязвлением, плоскоклеточном раке без ороговения с изъязвлением и плоскоклеточном раке без ороговения без изъязвления. При плоскоклеточном раке с ороговением с изъязвлением, плоскоклеточном раке без ороговения с изъязвлением разница значений превышала в 1,7 и 2 раза темпы пролиферативной активности клеток плоскоклеточного рака с ороговением без изъязвления ($p \leq 0,05$). Для индекса пролиферации отмечена аналогичная тенденция, при которой значения плоскоклеточного рака без ороговения с изъязвлением достоверно значимо превышали в 1,7 раз индекс пролиферации плоскоклеточного рака с ороговением без изъязвления ($p \leq 0,05$). Индекс пролиферации при остальных видах гистологических структур (плоскоклеточный рак с ороговением с изъязвлением, плоскоклеточный рак без ороговения без изъязвления и аденокарцином) находился практически на одинаковом уровне и превышал для первых двух в 1,5 раза и для аденокарциномы в 1,3 раза индекс пролиферации плоскоклеточного рака с ороговением без изъязвления, при этом разница значений не была достоверна.

Заключение

Исследование показало, что ДНК-цитометрические параметры не зависят от гендерного признака. При этом анеуплоидные опухоли преобладали во всех случаях, максимальная доля которых была характерна для G3. Нами получены достоверно значимые отличия содержания клеток в фазе G2+M- при II и III стадиях заболевания в сравнении с I стадией ($p \leq 0,05$). Минимальная доля анеуплоидных опухолей была выявлена при плоскоклеточном раке с ороговением без изъязвления (53,8% случаев), тогда как максимальная – при плоскоклеточном раке с ороговением с изъязвлением (85,7%). Плоскоклеточный рак с ороговением с изъязвлением и плоскоклеточный рак без ороговения с изъязвлением характеризуются достоверно более высокими значениями темпов пролиферации в сравнении с плоскоклеточным раком с ороговением без изъязвления, индекс пролиферации плоскоклеточного рака без ороговения с изъязвлением достоверно значимо превышает данный показатель плоскоклеточного рака с ороговением без изъязвления ($p \leq 0,05$).

Литература

1. Бойко В.В. Хирургическое лечение рака пищевода Сообщение II. Хирургическое лечение рака грудного и абдоминального отделов пищевода / Бойко В.В., Савви С.А., Далавурак В.П., Лыхман В.Н., Лазирский В.А. // Международный медицинский журнал. – 2010. – № 3. – С. 70-79.
2. Брюсов П.Г. Клиническая онкология: учебное пособие / под ред. Брюсова П.Г., Зубарева П.Н. // СПб.: СпецЛит. – 2012. – 455 с.
3. Важенин А.В. Лучевой аспект комбинированного лечения рака пищевода / А.В. Важенин, МП. Васильченко, А.В. Нохрин // Уральское медицинское обозрение 2000 г. № 3-4 (30-31). – С.94.
4. Кавайкин А.Г. Внутриплевральная эзофагопластика при раке пищевода и гастроэзофагеальном раке: непосредственные и отдаленные результаты / Кавайкин А.Г., Чичеватов Д.А. // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. – 2013. – № 1 (25). – С. 84-91.
5. Киркилевский С.И. Хирургическое лечение больных злокачественными новообразованиями пищевода / Киркилевский С.И., Крахмалев П.С., Кондрацкий Ю.Н., Крахмалев С.Н., Зайцев С.Л., Фридель Р.И., Супруненко А.А. // Клиническая онкология. – 2013. – № 2 (10). – С. 24-30.
6. Кит О. И. Первый опыт детекции циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови / Кит О. И., Новикова И. А., Бахтин А. В., Никипелова Е. А., Шатова Ю. С., Габараева В. М., Нистратова О. В. // Международный журнал экспериментального образования. – 2013. – № 11. – С. 37-39.

7. Кит О.И. Особенности влияния цАМФ-модифицированной химиотерапии на биологические свойства саркомы 45 и продолжительность жизни животных-опухоленосителей / Кит О.И., Шихлярова А.И., Максимов Г.К., Новикова И.А., Акименко М.А. // Вестник южного научного центра. – 2013. – Т. 9. – № 1. – С. 71–76.

8. Мамонтов А.С., Борисов В.И., Верещагин В.Г. Комбинированное лечение рака пищевода с адьювантной полихимиотерапией. // Пособие для врачей. Под редакцией В.В. Старинского. М. 1998. 12 с.

9. Непомнящая Е. М. Циркулирующие опухолевые клетки и некоторые морфо-иммуногистохимические показатели при колоректальном раке / Непомнящая Е. М., Кит О. И., Нистратова О. В., Новикова И. А., Никипелова Е. А., Бахтин А. В., Ульянова Е. П., Вострикова Ж. И., Селютин О. Н. // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 2.

10. Николаева Т. Г., Добрынин Я. В., Алферов В. С. и др. Пloidность ДНК опухолевых клеток и прогноз при раке гортани. Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН № 1, том 6, 1995.

11. Скворцов М.Б. Рак пищевода: хирургическое лечение // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – № 4. – С. 21-30.

References:

1. Bojko V.V. Hirurgicheskoe lechenie raka pishchevoda Soobshchenie I Hirurgicheskoe lechenie raka grudnogo i abdominalnogo otdelov pishchevoda / Bojko V.V., Savvi S.A., Dalavurak V.P., Lyhman V.N., Lazirskij V.A. Mezhdunarodnyj medicinskij zhurnal. – 2010. – №3. – S. 70-79.

2. Brjusov P.G. Klinicheskaja onkologija: uchebnoe posobie / pod red. Brjusova P.G., Zubareva P.N. // SPb.: SpecLit. – 2012. – 455 s.

3. Vazhenin A.V. Luchevoj aspekt kombinirovannogo lechenija raka pishhevoda / A.V. Vazhenin. MP. Vasil'chenko, A.V. Nohrin N Ural'skoe medicinskoe obozrenie 2000. № 3-4 (30-31). - s.94.

4. Kavajkin A.G. Vnutriplevral'naja jezofagoplastika pri rake pishhevoda i gastrojezofageal'nom rake: neposredstvennyye i otdalennyye rezul'taty / Kavajkin A.G., Chichevatov D.A. // Izvestija vysshih uchebnyh zavedenij. Povolzhskij region. – 2013. – № 1 (25). – S. 84-91.

5. Kirkilevskij S.I. Hirurgicheskoe lechenie bol'nyh zlokachestvennymi novoobrazovanijami pishhevoda / Kirkilevskij S.I., Krahmalev P.S., Kondrackij Ju.N., Krahmalev S.N., Zajcev S.L., Fridel' R.I., Suprunenko A.A. // Klinicheskaja onkologija. – 2013. – № 2 (10). – S. 24-30.

6. Kit O. I. Pervyj opyt detekcii cirkulirujushhh opuholevyh kletok v perifericheskoj krovi / Kit O. I., Novikova I. A., Bahtin A. V., Nikipelova E. A., Shatova Ju. S., Gabaraeva V. M., Nistratova O. V. // Mezhdunarodnyj zhurnal jeksperimental'nogo obrazovaniya. – 2013. – № 11. – S. 37-39.

7. Кит О.И. Особенности влияния цАМФ-модифицированной химиотерапии на биологические свойства саркомы 45 и продолжительность жизни животных-опухоленосителей / Кит О.И., Шихлярова А.И., Максимов Г.К., Новикова И.А., Акименко М.А. // Вестник южного научного центра. – 2013. – Т. 9. – № 1. – С. 71–76.

8. Мамонтов А.С., Борисов В.И., Верещагин В.Г. Комбинированное лечение рака пищевода с адьювантной полихимиотерапией. // Пособие для врачей. Под редакцией В.В. Старинского. М. 1998. 12 с.

9. Непомнящая Е. М. Циркулирующие опухолевые клетки и некоторые морфо-иммуногистохимические показатели при колоректальном раке / Непомнящая Е. М., Кит О.

I., Nistratova O. V., Novikova I. A., Nikipelova E. A., Bahtin A. V., Ul'janova E. P., Vostrikova Zh. I., Seljutina O. N. // *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija*. – 2016. – № 2.

10. Nikolaeva T. G., Dobrynin Ja. V., Alferov V. S. i dr. Ploidnost' DNK opuholevyh kletok i prognoz pri rake gortani. *Vestnik RONC im. N. N. Blohina RAMN № 1, tom 6, 1995.*

11. Skvorcov M.B. Rak pishhevoda: hirurgicheskoe lechenie // *Sibirskij medicinskij zhurnal*. – 2011. – № 4. – S. 21-30.