

В.Н. Богатырев, В.А. Соколовский, В.К. Соколова

ПЛОИДНОСТЬ И ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ФИБРОЗНОЙ ГИСТИОЦИТОМЫ КОСТИ, ИХ ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ.

ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

SUMMARY

Study of DNA ploidy in bone neoplasia demonstrated diploid DNA content to be characteristics of benign tumors (ecchondroma, osteochondroma, fibroma etc) and aneuploid or heteroaneuploid DNA pattern to be specific of most malignant tumors (osteosarcoma, chondrosarcoma, etc.). Treatment outcomes and prognosis in malignant fibrous histiocytoma of bone (MFHB) depend upon tumor ploidy and proliferation activity. Our study demonstrated tumor cell population pattern and ploidy to be important factors predictive of disease course; new biological parameter may help to assess MFHB malignancy grade. There is reliable evidence of DNA ploidy being an independent prognostic factor.

Key words: *MFHB, DNA ploidy, tumor proliferative activity.*

Изучение ploидности ДНК при новообразованиях кости показало, что для доброкачественных опухолей (экхондрома, остеохондрома, фиброма и др.) характерно диплоидное содержание ДНК, а для злокачественных опухолей (остеосаркома, хондросаркома и др.) в большинстве случаев — анеуплоидное и гетероанеуплоидное содержание ДНК. Анализ результатов лечения и прогноз злокачественной фиброзной гистиоцитомы кости зависят от определения ploидности и пролиферативной активности опухоли. Результаты проведенного исследования подчеркивают необходимость изучения популяционной структуры опухолевых клеток и их ploидности для прогнозирования течения, а также — для выявления новых биологических параметров в оценке степени злокачественности ЗФГК. К настоящему времени имеются вполне обоснованные данные, позволяющие отнести показатель ploидности ДНК к категории независимых прогностических факторов.

Ключевые слова: *ЗФГК, ploидность ДНК пролиферативная активность опухоли*

В РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в течение нескольких лет целенаправленно, с учетом собственного опыта и результатов лечения других крупных научных учреждений зарубежных стран проводятся изучение, анализ результатов лечения и прогноз злокачественной фиброзной гистиоцитомы кости.

Учитывая редкость данной нозологии (3,2% общего числа случаев злокачественных опухолей костей наблюдавшихся в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН), при сборе клинического материала были определенные трудности.

Проанализированы результаты лечения 114 больных первичной и вторичной злокачественной фиброзной гистиоцитомой кости, находившихся в НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН с 1981 по 1997 г. Из них у 105 больных была первичная опухоль, у семи патология расценена как вторичная и у двух — рецидивные опухоли.

В сообщениях последних лет отмечена взаимосвязь между содержанием ДНК (ploидность) в опухолевых клетках и клиническим течением злокачественных новообразований. Имеются данные о том, что опухоли с анеуплоидным содержанием ДНК имеют худший прогноз по сравнению с диплоидными, однако проявляют более высокую чувствительность к химиолучевому воздействию, чем диплоидные [Богатырев В.Н., 1999]. Изучение ploидности ДНК при новообразованиях кости показало, что для доброкачественных опухолей (экхондрома, остеохондрома, фиброма и др.) характерно диплоидное содержание ДНК, а для злокачественных опухолей (остеосаркома, хондросаркома и др.) в большинстве случаев — анеуплоидное и гетероанеуплоидное содержание ДНК [Kusuzaki T., 1992; Remmelink M. et. al., 1994].

Имеющиеся в настоящее время сведения о гистогенезе злокачественной фиброзной гистиоцитомы кости не позволяют считать этот вопрос решенным. Тем не менее накопились достаточно убедительные данные, позволяющие отнести данный процесс к группе опухолей, имеющих гистиоцитарную природу. В основе — единая примитивная гистиоцитарная клетка, способная дифференцировать в двух направлениях — гистиоцитарном и фибробластическом [Lagase R., 1979; Kumar R.V., 1990]. Однако продолжен поиск по выявлению дифференциально-диагностических критериев для злокачественной фиброзной гистиоцитомы. В этом контексте изучение содержания ДНК в опухолевых клетках ЗФГК может быть весьма полезно для определения характера и степени ее злокачественности и чувствительности к проводимой лекарственной терапии, а тем самым — для предсказания прогноза заболевания и выбора адекватных методов терапии.

Вышеизложенное послужило поводом для изучения таких фундаментальных биологических характеристик злокачественных клеток как ploидность ДНК и пролиферативная активность при злокачественной фиброзной гистиоцитоме кости.

В настоящее время совершенствование методик подготовки тканей к проточной цитофлуориметрии позволяет использовать не только свежий нефиксированный материал, но и материал парафиновых блоков. Необходимо отметить, что при этом лучшие результаты получают при фиксации в формалине [Hedley D.W. et. al., 1985; 1991]. Соответственно данная методика позволяет ретроспективно оценить прогноз больных спустя много лет.

Плоидность ДНК и пролиферативная активность клеток злокачественной фиброзной гистиоцитомы кости

Для 18 больных (7 (39%) женщин и 11 (69%) мужчин) злокачественной фиброзной гистиоцитомой кости в возрасте от 15 до 67 лет (в среднем 36,6 лет) исследованы опухолевые образцы, полученные из парафиновых блоков.

Опухоли локализовались в костях нижних конечностей (17/94,6%) и таза (1/5,4%). Диагноз во всех случаях был верифицирован морфологически. Содержание ДНК в ядрах опухолевых клеток исследовали в материале, по которому в дальнейшем проводилось цитологическая верификация диагноза. Следует подчеркнуть важность цитологического контроля для правильной трактовки ДНК-гистограмм. Для анализа плоидности ДНК выбирались те опухолевые образцы и ДНК-гистограммы, где в мазках отпечатках опухолевые клетки составляли больше 30%.

Полученные данные демонстрируют высокую степень злокачественности злокачественной фиброзной гистиоцитомы кости, о чем свидетельствуют высокая частота анеуплоидных клонов клеток. Так, опухолевые ткани у 14 (78%) больных имели анеуплоидное содержание ДНК, только у четырех (22%) в опухолевых клетках выявлено диплоидное содержание ДНК.

Среди анеуплоидных опухолей индекс ДНК (И-ДНК) варьировал от 1,2 до 2,58. В пределах митотического цикла в зависимости от И-ДНК опухоли распределялись следующим образом: диплоидные (17%), анеуплоидные с И-ДНК = 1,1–1,8 (44%), тетраплоидные — И-ДНК = 1,9–2,1 (11%). В 11% случаев выявлены гиперанеуплоидные — И-ДНК > 2,1, в 17% — многокლოновые опухоли (наличие в новообразовании нескольких клонов анеуплоидных клеток с различными показателями И-ДНК). На рис. 1 показано распределение опухолей в зависимости от индекса ДНК.

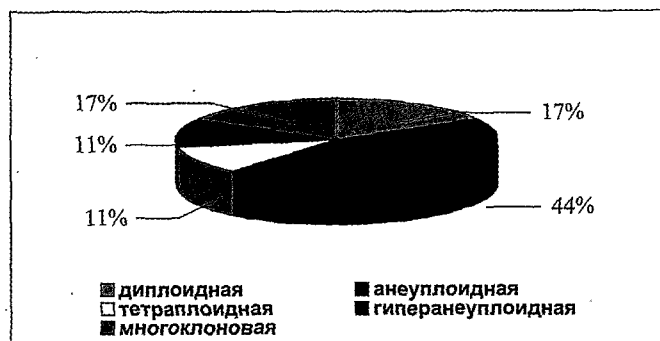


Рис. 1. Распределение опухолей в зависимости от индекса ДНК

Анализ индекса пролиферации (рис. 2) (количество опухолевых клеток находящихся в $G_2 + M + S$ фазах клеточного цикла) свидетельствует о том, что для анеуплоидных опухолей характерна статистически достоверно более высокая пролиферативная активность по

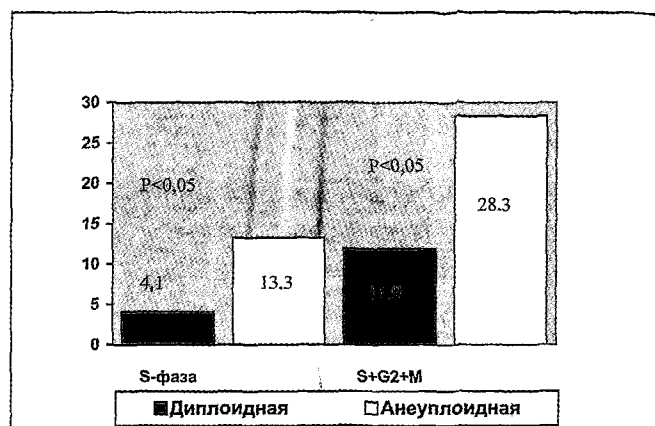


Рис. 2. Индекс пролиферации и число клеток в S-фазе при диплоидных и анеуплоидных опухолях ЗФГК

сравнению с диплоидными новообразованиями ($28,7 \pm 4,6$ и $11,9 \pm 2,8$ соответственно, $p < 0,05$). Анеуплоидные опухоли с высокой пролиферативной активностью встречались в 10 случаях (55,5%), тогда как среди диплоидных опухолей этот показатель не был зафиксирован ни в одном случае.

Наличие диплоидного пика на гистограммах анеуплоидных опухолей свидетельствует о присутствии различных клонов клеток. Этот факт подчеркивает гетерогенность опухоли и необходимость исследования методом проточной цитофлуорометрии как можно большей массы опухолей из различных участков, чтобы избежать возможных ошибок.

Анализ клеточного цикла опухолей (см. табл.) показывает, что по мере увеличения злокачественности (grade) в опухолевой популяции наблюдается увеличение числа клеток в S-фаза клеточного цикла (до 18% в высокозлокачественных опухолях по сравнению с 10% при низкозлокачественных и доброкачественных опухолях [Hezberg A., 1992; Cohen C., 1996; Sato T., 2000; Schajowicz F., 1994]). Эта зависимость соответствует полученным в нашем исследовании данным. Так, выявлено статистически достоверное увеличение числа клеток, находящихся в S-фаза в анеуплоидных по сравнению с диплоидными опухолями ЗФГК ($13,3 \pm 2,1$ и $4,1 \pm 1,2$ соответственно, $p < 0,05$).

Таблица

Плоидность ДНК и пролиферативная активность опухолевых клеток ЗФГК

Плоидность ДНК опухоли	Количество больных	Фазы клеточного цикла			Индекс пролиферации G_2+M+S
		G_0+G_1	S	G_2+M	
Анеуплоидная Опухоль	14	$71,6 \pm 4,6$	$13,3 \pm 2,1$	$15,7 \pm 3,1$	$28,3 \pm 4,6$
Диплоидная Опухоль	4	$88,0 \pm 2,8$	$4,1 \pm 1,2$	$7,8 \pm 3,1$	$11,9 \pm 2,8$
P		<0,05	<0,05	>0,05	<0,05

Прогностическое значение плоидности ДНК и пролиферативной активности клеток ЗФГК

В клинической практике любая биологическая характеристика клеток опухоли получает прогностическую оценку. В ряде солидных опухолей показатель плоидности и пролиферативной активности рассматривается в качестве одного из важных прогностических факторов. С этих позиций мы оценивали их прогностическую значимость.

При анализе отдаленных результатов лечения при диплоидных опухолях трех- и пятилетняя выживаемость оказалась на уровне $50 \pm 28,87\%$, тогда как при анеуплоидных опухолях эти показатели соответствовали $28,57 \pm 12,53\%$. Полученные данные свидетельствуют о тенденции к худшему прогнозу заболевания при наличии анеуплоидных клонов клеток по сравнению с диплоидными, однако данные различия не носят статистической достоверного характера (см. рис. 3).



Рис. 3. Выживаемость больных ЗФГК в зависимости от плоидности ДНК опухолевых клеток

При анализе выживаемости всей группы больных в зависимости от степени пролиферативной активности выявлено, что на уровне 1,5–2 лет показатели между опухолями с высокой и низкой пролиферативной активностью соответствуют $33,33 \pm 16,67$ и $66,67 \pm 16,67$ ($p > 0,05$). При трех- и пятилетних сроках наблюдения ($33,33 \pm 16,67$ и $33,33 \pm 16,67$) (см. рис. 4).

Подобная картина наблюдается и при анализе безметастатической выживаемости среди лиц с анеуплоидными опухолями в зависимости от данного признака. Так, при анеуплоидных опухолях с высокой пролиферативной активностью двухлетняя выживаемость соответствовали $33,3 \pm 16,7$, а при низкой пролиферативной активности и аналогичном содержании ДНК — $66,7 \pm 16,7$. Однако на 3-м году различий безметастатической выживаемости у больных с высокой и низкой пролиферативной активностью нет.

Результаты проведенного исследования подчеркивают необходимость изучения популяционной структуры опухолевых клеток и их плоидности для прогнозирования течения, а также для выявления новых биологических

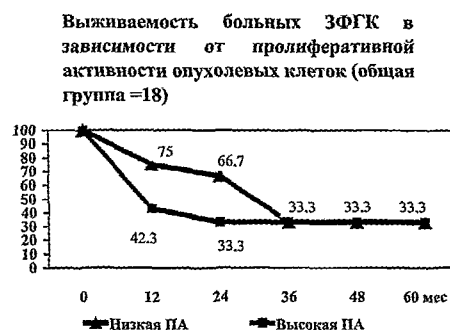


Рис. 4. Выживаемость больных ЗФГК в зависимости от пролиферативной активности опухолевых клеток (общая группа = 18)

параметров в оценке степени злокачественности ЗФГК. К настоящему времени имеются вполне обоснованные данные, позволяющие отнести показатель плоидности ДНК к категории независимого прогностического фактора. Для солидных злокачественных новообразований яичника и молочной железы на большом клиническом материале показана взаимосвязь между увеличением плоидности и плохим прогнозом [Богатырев В.И., 1991; 1999; Collin F., 1997; Nacher M. et al., 1999; Neuburger M., 1999; Remmelink M., 1999]. По данным Herzberg A. (1992), ДНК анеуплоидная имеет тесную связь со степенью злокачественности ("Tumor grade") и распространенности опухоли. Так, опухоли мягких тканей с Grade III чаще анеуплоидны (до 83%), в то время как при Grade I и II анеуплоидность наблюдается только в 33%. Пролиферативная активность (индекс пролиферации — ИП) также связаны с плоидностью и Grade опухоли: она увеличивается при анеуплоидии (ИП > 2% в 73% опухолей), чем при нормальном распределении ДНК (эуплоидии), когда ИП > 2 наблюдался только в 30% опухолей.

Что касается костных сарком, то пока имеются лишь единичные сообщения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богатырев В.И. Использование количественных методов исследования (компьютерной морфометрии и проточной цитометрии) в клинической цитологии // Клиническая лабораторная аналитика / Под ред. В.В. Меньшикова. Т. 2. — М.: Лабинформ-РАМЛД, 1999. С. 151–95.
2. Becrossian C.W.M., Rader M., Barlogie B. Flow cytometry and cytomorphology in primary resectable breast cancer // Anal. Quant. Cytol. 1981. № 3. P. 112–6.
3. Cohen C. Image cytometric analysis in pathology // Hum. Pathol. 1996. 27. P. 482–93.
4. Collin F., Chassevent A., Bonichon F., Bertrand G. Flow cytometric DNA content-analysis of 185 soft-tissue neoplasms indicates that S-phase fraction is a prognostic factor for sarcomas // Cancer. 1997. 79(12). P. 2371–9.
5. Fukunaga M., Nikaido T., Shimoda T. A flow cytometric DNA analysis of giant cell tumors of bone including two cases with

- malignant transformation // *Cancer*. 1991. 70(7): 1886–94.
6. *Hedley D.M., Fiedlander V.L., Taylor I.W.* Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance // *Cytometry*. 1985. 6. P. 327–33.
7. *Hedley D.M.* Development in the of flow cytometry as a guide in the prognosis of cancer // *Diagn. Onc.* 1991. 1. P. 2–4.
8. *Herzberg A., Kerns B., Honcanen J.* DNA ploidy and proliferation index of soft tissue sarcomas determined by image cytometry of fresh flozen tissue // *Am. J. Clin. Pathol.* 1992. 97(5). P. 29–37.
9. *Kumar R.V., Mukherjee G., Bhargava M.K.* Malignant fibrous histiocytoma of bone // *Journal Surgery of Oncology*. 1990. 44(3). P. 166–70.
10. *Nacher M., Serrano S. et al.* DNA image cytometry: An alternative method in osteoblast proliferation assays // *Analytical and Quantitative cytology and histology*. 1999. 21. 5. P. 381–6.
11. *Neuburger M., Xia Y., Herget G., Huang Y., Adler C.* Prognostic significance of DNA image cytophotometry for osteosarcoma // *Analytical and Quantitative cytology and histology*. 1999. 21. 6. P. 461–7.
12. *Rommelink M., Salmon I., Petein M., Gras T., Zandoni C., Pastels J.L., Kiss R.* Determination DNA ploidy, nuclear size, and proliferative activity by means of the computer-assisted image analysis of Feulgen-stained nuclei in 68 soft tissue tumors of adults // *Human Pathol.* 1994. 25. P. 694–701.
13. *Sato T., Miura T., Nakano K., Nozaka H., Sato T., Ishikawa T., Chiba M.* Reliable Differential diagnosis between osteosarcoma and regenerative bone cells in rats through simultaneous analysis of nuclear DNA content and size // *Analytical and Quantitative cytology and histology*. 2000. 22. 4. P. 327–32.
14. *Schajowicz F.* Tumors and tumorlike lesions of bone // Berlin, Springer, 1994
15. *Volm M., Bruggemann A., Gunther M., Kleine W.* Prognostic relevance of ploidy and proliferation os resistance-predictive tests in ovarian carcinoma // *Cancer Res.* 1985. P. 5180–5.