

Autorzy ocenili zawartość jądrowego DNA w nowotworach złośliwych i niezłośliwych jamy ustnej i twarzy u 30 leczonych rutynowo chorych. Uzyskane wyniki, identyczne w obu badanych grupach, były zaskoczeniem, bowiem oczekiwano zdecydowanej przewagi histogramów aneuploidalnych w grupie nowotworów złośliwych. Praca potwierdza, że ocena zawartości jądrowego DNA nie może być podstawą różnicowania złośliwości guza, jak i rokowania o przebiegu choroby nowotworowej.

Słowa kluczowe: nowotwory głowy i szyi, ploidia DNA.

Authors evaluated the content of nuclear DNA in malignant and benign tumors of face and oral cavity in 30 routinely treated cases. The results obtained were and identical in both groups examined, were a surprise for us, as we expected the higher number of aneuploidy in the group of malignant tumors. The article confirms that the evaluation of the nuclear DNA content can not form the basis for differentiating the malignancy of the tumor as well as the prognosis of the disease.

Key words: head and neck cancer, ploidy DNA.

Cytometria DNA złośliwych i niezłośliwych nowotworów jamy ustnej

DNA cytometry of malignant and benign tumors of oral cavity

Marian Tomasz Nowaczyk¹, Jan Sikora²

WSTĘP

Podstawowa wiedza o chorobie, czyli rozpoznanie histopatologiczne, stopień zróżnicowania komórek i ich klasyfikacja, nie wystarcza już do oceny dynamiki, a zwłaszcza rokowania w chorobie nowotworowej. Problemy związane z leczeniem i prognozowaniem przebiegu choroby kierują uwagę klinicystów i patologów na budowę oraz aktywność proliferacyjną badanej tkanki. Obecnie zwraca się również uwagę na ultrastrukturalne różnice budowy na poziomie cytoplazmy i jąder komórkowych. Z doniesień wielu autorów wynika, iż centralne części guza są często lepiej zróżnicowane niż jego obrzeże, które naciekając okoliczne tkanki świadczy o agresywnym charakterze choroby [3, 4, 12].

Dla raków płaskonabłonkowych dojrzałość cytoplazmy oznacza tworzenie perł rogowych, występowanie komórek kolczystych, licznych desmosomów i mostków cytoplazmatycznych oraz występowanie błon podstawnych pomiędzy tkanką nowotworową a jej podścieliskiem [5, 12].

Dowiedziano, iż liczba komórek nowotworowych w trakcie podziału mitotycznego jest wprost proporcjonalna do masy guza. Możliwości badania DNA w fazach cyklu życiowego pojedynczych komórek i ich populacji, znacznie rozszerzyła wiedzę o biologii komórek nowotworowych. Badając ilość jądrowego DNA w różnych nowotworach stwierdzono, iż w nowotworach o typie G-1 przeważa diploidalna ilość DNA. Natomiast w guzach o wyższej złośliwości G-2, G-3 zaczynają częściej występować cechy aneuploidalno-poliploidalne. Stanowi to podstawę stwierdzenia, że guzy aneuploidalne znacznie gorzej rokują [1, 10, 13, 15, 16]. Jednak inni autorzy uważają, iż nie ma prostej zależności między ploidią DNA a agresywnością nowotworu [2, 3, 7]. Postanowiono przebadać więc grupę nowotworów niezłośliwych dla wykazania w nich ilości jądrowego DNA i porównania z zawartością DNA w nowotworach złośliwych.

MATERIAŁ I METODA

Badania wykonano u 30 chorych, rutynowo leczonych w Klinice Chirurgii Szczęk-

kowo-Twarzowej Akademii Medycznej w Poznaniu, obojga płci, w wieku od 35 do 74 lat, u których stwierdzono:

- w 14 przypadkach raka płaskonabłonkowego języka i dna jamy ustnej w II i III° zaawansowania klinicznego,
- 1 przypadek raka podstawnokomórkowego skóry nosa,
- 13 chorych z brodawczakami błon śluzowych jamy ustnej i skóry twarzy,
- 1 przypadek tłuszczaka,
- 1 przypadek włókniaka policzka.

Materiał tkankowy badano w Katedrze Immunologii Klinicznej Akademii Medycznej przy użyciu zestawu *Cycle Test™ Plus* firmy *Becton Dickinson*. Tkankę pobieraną podczas zabiegu operacyjnego zamrażano i przechowywano w temperaturze -70°C. Przed wykonaniem badań materiał rozmrażano i rozdrabniano na małe fragmenty w buforowanej soli fizjologicznej. Zawiesinę komórek uzyskiwano przez wielokrotną aspirację do strzykawki. Do testu używano 5 x 10⁵ komórek. Wzorcem normoploidii była zawartość DNA w ludzkich limfocytach dodawanych do ocenianych komórek w stosunku 2:1. Tak przygotowaną zawiesinę komórek wirowano przez 5 min, 1 000 obr./min. Po odrzuceniu supernatantu do osadu wprowadzono 250 ul buforu trypsynowego w celu uzyskania permeabilizacji błon komórkowych. Po 10-minutowej inkubacji trypsynę blokowano przez dodanie inhibitora tego enzymu, równocześnie z enzymem powodującym degradację RNA (RNaza). Po 10 min podawano roztwór jodku propidyny (PI). W tym środowisku próbki inkubowano przez 10 min w temp. 4°C, bez dostępu światła. Po przefiltrowaniu próbki przez filtr nylonowy (50 um) przeprowadzono akwizycję i analizę danych przy pomocy aparatu FACScan (BD) i programu LYSIS II. Oceniano 10 tys. komórek przy 1 024 kanałach fluorescencji. Obecność populacji aneuploidalnej stwierdzono na podstawie zidentyfikowanego dodatkowego piku, obok pików G₀/G₁ i G₂/M populacji normoploidalnej.

Analiza statystyczna

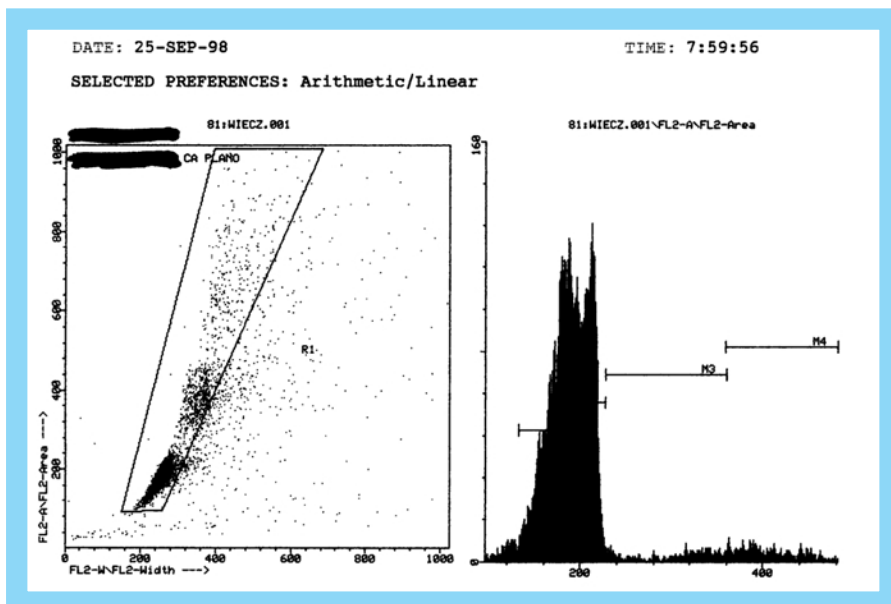
Uzyskane wyniki analizowano z zastosowaniem testów T-studenta i Mann-Whi-

¹ Klinika Chirurgii Szczękowo-Twarzowej Akademii Medycznej w Poznaniu

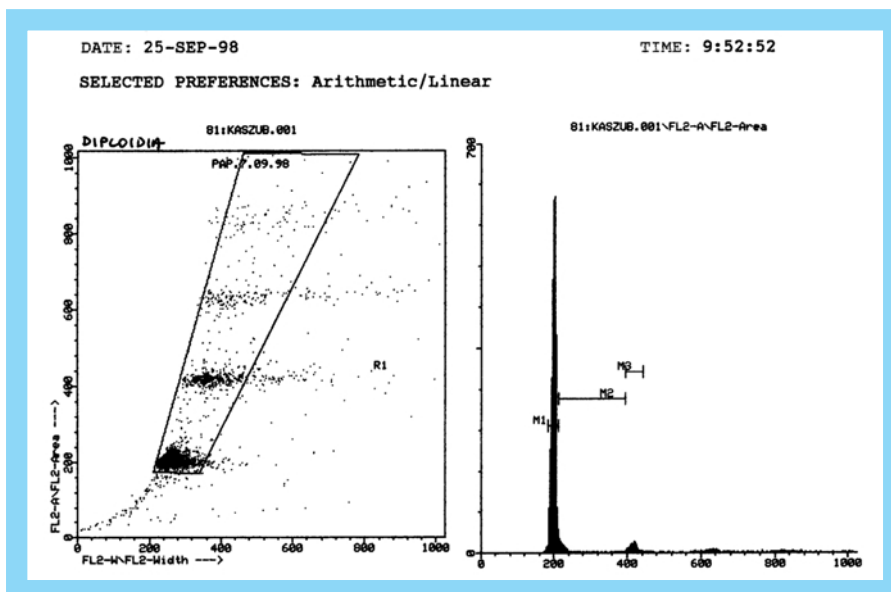
² Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej Akademii Medycznej w Poznaniu

Tab. Tabela zawiera wyniki uzyskane w zakresie pomiaru ploiddii DNA i oceny odsetka komórek występujących w poszczególnych fazach cyklu komórkowego

<i>tu. mal.</i>	ploidia	S	G ₂ M	S+G ₂ M	<i>tu. ben.</i>	ploidia	S	G ₂ M	S+G ₂ M
<i>ca plano.</i>	D	6,51	9,46	15,97	<i>Lipoma</i>	D	1,76	3,47	5,23
<i>ca plano.</i>	D	2,9	3,71	6,61	<i>Papilloma</i>	D	3,16	6,82	9,98
<i>ca plano.</i>	D	5,6	9,71	15,31	<i>Papilloma</i>	D	14,7	16,49	31,19
<i>ca plano.</i>	D	4,98	4,61	9,59	<i>Papilloma</i>	D	2,13	4,19	8,32
<i>ca plano.</i>	D	18,32	9,35	27,67	<i>Papilloma</i>	D	10,43	15	25,43
<i>ca plano.</i>	D	8,27	10,35	18,62	<i>Papilloma</i>	D	5,71	4,26	9,97
<i>ca plano.</i>	D	6,29	3,27	9,56	<i>Papilloma</i>	D	5,53	3,82	9,35
<i>ca plano.</i>	D	4,51	3,53	8,04	<i>Papilloma</i>	D	11,03	8,98	20,01
<i>ca plano.</i>	D	3,52	3,54	7,06	<i>Papilloma</i>	D	12,77	13,08	25,85
<i>ca plano.</i>	D	6,27	5,89	12,16	<i>Papilloma</i>	D	18,41	10,5	28,91
<i>ca baso.</i>	D	4,06	4,71	9,67	<i>Fibroma</i>	D	6,37	32,31	38,68
<i>ca plano.</i>	A	38,46	5,02	43,48	<i>Papilloma</i>	A	4,13	2,75	6,88
<i>ca plano.</i>	A	7,13	17,80	24,93	<i>Papilloma</i>	A	11,54	28,14	39,68
<i>ca plano.</i>	A	4,46	2,21	6,67	<i>Papilloma</i>	A	2,96	4,74	7,7
<i>ca plano.</i>	A	3,58	4,81	8,93	<i>Papilloma</i>	A	4,45	1,5	5,95



Ryc. 1. Histogram aneuploidalny nowotworu złośliwego



Ryc. 2. Histogram diploidalny nowotworu niezłośliwego

tney'a, przyjmując graniczny poziom istotności $p=0,05$.

WYNIKI

Otrzymane dane zaskoczyły autorów głównie w odniesieniu do nowotworów niezłośliwych, ponieważ w tej grupie spodziewali się otrzymać tylko histogramy diploidalne.

► Ocena ploiddii DNA złośliwych i niezłośliwych nowotworów twarzoczaszki.

Obecność komórek o aneuploidalnej zawartości DNA stwierdzono zarówno w materiale pochodzącym od chorych z rakiem płaskonabłonkowym, jak i w materiale obejmującym chorych z nowotworami niezłośliwymi (włókniak, tłuszczak i brodawczak). Odsetek guzów aneuploidalnych w obu badanych grupach był taki sam i wynosił 26 proc.

► Ocena odsetka komórek występujących w fazie S i G₂M cyklu komórkowego.

Histogramy (ryc. 1. i 2.) obrazujące intensywność fluorescencji jodku propidyny, stechiometrycznie reagującego z komórkowym DNA, pozwalają nie tylko na ocenę ploiddii, ale także na ocenę odsetka komórek występujących w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. W obu grupach badanego materiału oceniano odsetek komórek występujących w fazie S, G₂M oraz S+G₂M. Odsetek komórek występujących w fazie S cyklu życiowego komórki w grupie chorych z rakiem średnio wynosił 8 proc., a w grupie chorych z nowotworem niezłośliwym 7 proc. (ryc. 3.). Średni odsetek komórek w fazie G₂M wynosił odpowiednio 6 i 10 proc. (ryc. 4.). Łączny odsetek komórek faz S+G₂M dla grupy chorych z rakiem wynosił średnio 14 proc., a dla chorych z nowotworem łagodnym 18 proc. (ryc. 5.).

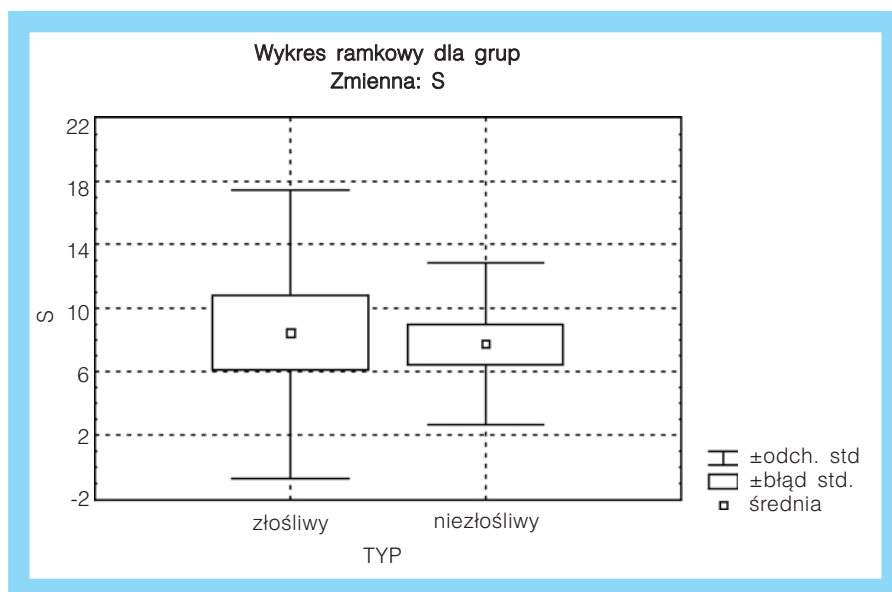
W ocenie statystycznej uzyskanych wyników nie stwierdzono znamienych różnic między poszczególnymi grupami badanego materiału.

OMÓWIENIE

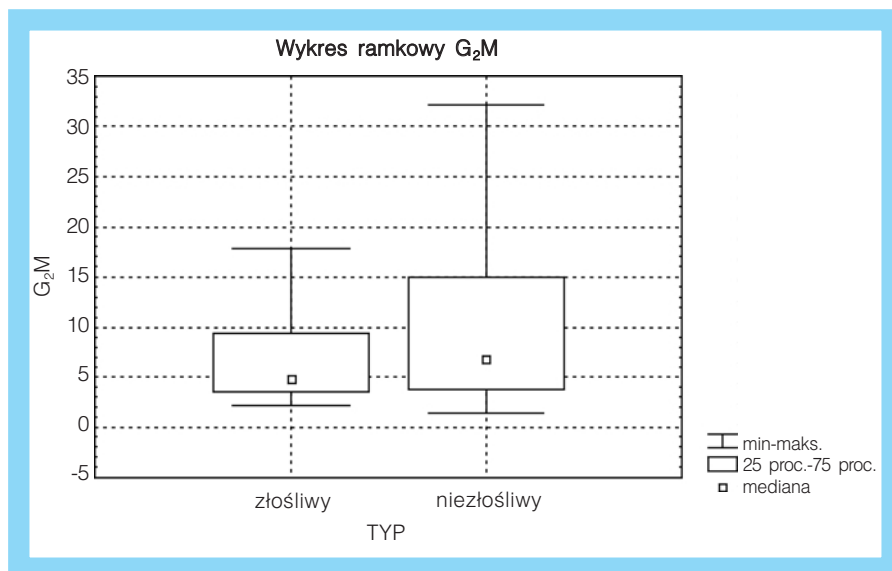
Uzyskane wyniki, co prawda na małej grupie chorych oraz ich ocena statystyczna potwierdzają, na podstawie rozkładu histogramów w obu grupach, że ploidia DNA nie może być podstawą do postawienia diagnozy o stopniu złośliwości nowotworu [18]. W wielu publikacjach podkreśla się jednakże dużą wartość prognostyczną ploiddii DNA, szczególnie w odniesieniu do guzów złośliwych w bardziej zaawansowanych stanach klinicznych [5, 6, 8, 9, 11, 14]. Na uwagę zasługują również opinie innych autorów, którzy nie znajdują prostego związku pomiędzy stopniem złośliwości guza a DNA-histogramem [2, 3, 7]. Praktyka kliniczna dowodzi, że guzy złośliwe diploidalne dają wznowy i przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych [4, 6, 17, 19]. Również ocena samego DNA-histogramu nie może być podstawą do różnicowania między złośliwymi a niezłośliwymi guzami [18]. Na podstawie przeprowadzonych badań i dostępnego piśmiennictwa należy stwierdzić, że badanie zawartości DNA w jądrach komórek nowotworowych pozwoliło poszerzyć znacznie naszą wiedzę o guzach nowotworowych i przebiegu choroby nowotworowej, jednakże nie jest badaniem jednoznacznie rozstrzygającym.

PIŚMIENICTWO

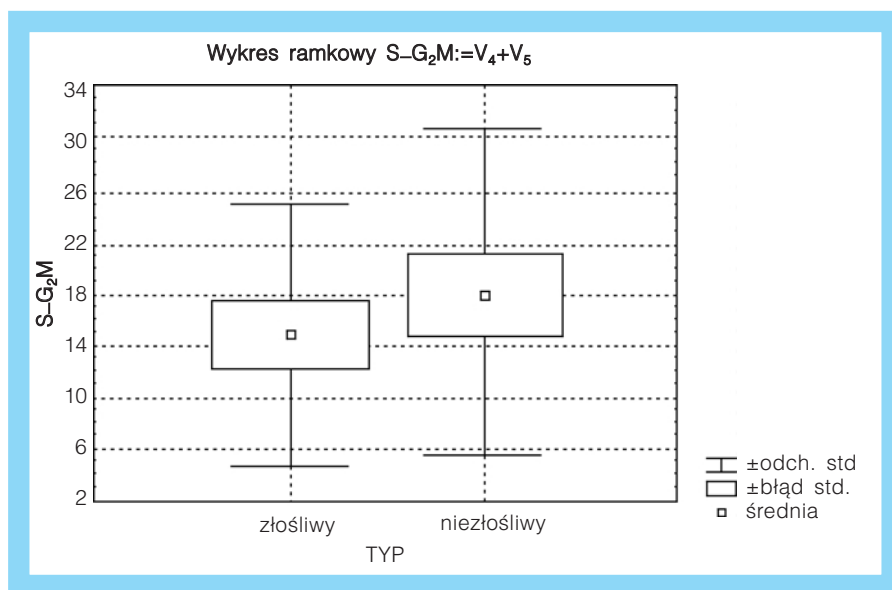
1. Balsara BR, Borges AM, Pradhan SA, Rajpal RM, Bhisey AN. *Flow cytometric DNA analysis of squamous cell carcinomas of the oral cavity: correlation with clinical and histopathological features.* Eur J Cancer B Oral Oncol 1994; 2: 98-101.
2. Barlogie B, Raber M, Shumann J. *Flow cytometry in clinical cancer research.* Cancer Rec 1983; 43: 3982-97.
3. Farrar W, Sickle-Santanello B, Keyhani-Rafagha S. *Follow up on flow cytometric DNA analysis of squamous cell carcinoma of the tongue.* Am J Surg 1989; 157: 377-80.
4. Goluśiński W, Szmaja Z, Stojałowska A, Biczysko W, Majewski P, Kopeć T. *Badania DNA-ploidii u chorych na raka krtani.* Otolaryng Pol 1994; 4: 322-6.
5. Goluśiński W, Szmaja Z, Olafson J, Biczysko W, Krygier-Stojałowska A, Majewski P. *Wartość diagnostyczna i prognostyczna onkogenu p53 wybranych markerów nowotworowych (Ki67, PCNA, DNA ploiddii) ultrastruktury u chorych na raka krtani.* Otolaryng Pol 1996; 6: 607-17.
6. Goluśiński W, Szmaja Z, Krygier-Stojałowska A, Biczysko W. *Wartość cytometrii przepływowej DNA w ocenie zdolności proliferacyjnej komórek nowotworowych u chorych na raka krtani.* Otolaryng Pol 1998; 4: 411-17.
7. Guo Y, Desanto L, Osctinsky G. *Prognostic implications of nuclear DNA content in head and neck cancer.* Otolaryng Head Neck Surg 1989; 100: 95-8.
8. Kolotas C, Tonus C, Ballas D, Cernea M, Vogt HG, Martin T, Strassmann G, Zamboglou N. *Clinical relevance of tumor ploidy and micronucleus formation for oral cavity cancer.* Tumori 1999; 85, 4: 253-8.
9. Kusuzaki K, Murata H, Takeshita H, Hirata M, Hashiguchi S, Tsuji Y, Nakamura S, Ashihara T, Hirasawa Y. *Usefulness of cytofluorometric DNA ploidy analysis in distinguishing benign cartilaginous tumors from chondrosarcomas.* Mod Pathol 1999; 12: 863-72.



Ryc. 3. Wykres ramkowy 1. Ocena statystyczna różnic między zmianą złośliwą i niezłośliwą w zakresie odsetka komórek występujących w fazie G₂/M cyklu komórkowego



Ryc. 4. Wykres ramkowy 2. Ocena statystyczna różnic między zmianą złośliwą i niezłośliwą w zakresie odsetka komórek występujących w fazie S cyklu życiowego komórek



Ryc. 5. Wykres ramkowy 3. Ocena statystyczna różnic między guzem złośliwym i niezłośliwym w zakresie odsetka komórek występujących w fazach S+G₂/M

KOMUNIKAT ● KOMUNIKAT ● KOMUNIKAT ● KOMUNIKAT

IV Zjazd Polskiego Naukowego Towarzystwa Otyłości i Przemiany Materii

Kraków
8–10 listopada 2002 r.

Problematyka Zjazdu będzie obejmować całokształt zagadnień otyłości, w tym etiopatogenezę, powikłania i leczenie oraz inne choroby towarzyszące ze szczególnym uwzględnieniem cukrzycy i chorób układu krążenia.

W programie Zjazdu przewiduje się referaty plenarne, doniesienia oryginalne, postery.

Zorganizowana będzie wystawa firm farmaceutycznych i żywieniowych oraz ciekawy program imprez towarzyszących.

Zainteresowanych uczestnictwem prosimy o kontakt z organizatorami. Informacje zjazdowe znajdują się także na stronie internetowej Katedry i Kliniki Chorób Metabolicznych CMUJ www.cm-uj.krakow.pl/metabol/

przewodniczący
Komitetu Organizacyjnego IV Zjazdu PNT0 i PM
prof. dr hab. **Jacek Sieradzki**

prezes PNT0i PM
prof. dr hab. **Wiktor B. Szostak**

przewodnicząca
Komitetu Naukowego Zjazdu
prof. dr hab. **Barbara Zahorska-Markiewicz**

Adres do korespondencji
Komitet Organizacyjny IV Zjazdu PNT0iPM
Katedra i Klinika Chorób Metabolicznych CM UJ
31-501 Kraków, ul. Kopernika 15
tel. (012) 421 39 72, fax (012) 421 97 86
e-mail: mmsierad@cyf-kr.edu.pl

10. Lewandowski L, Adamska K, Osmola K, Filipiak K, Warchoń W. *Badania nad ploidią DNA raków płaskonabłonkowych jamy ustnej*. Now Lek 1998; 67, 4: 457-66.
11. Murata H, Kusuzuki K, Takeshita H, Hirata M, Hashiguchi S, Ashihara T, Hirasawa Y. *Cytofluorometric DNA ploidy analysis in giant cell tumor of bone: histologic and prognostic value*. Cancer Lett 1999; 136, 2: 223-9.
12. Nowaczyk MT, Dworacki G, Majewski P, Biczysko W, Żeromski J. *Wielokierunkowa ocena morfologiczna obwodowych części nowotworów jamy ustnej*. Czas Stomat 1998; 5: 344-8.
13. Osmola K, Lewandowski L, Adamska K, Filipiak K. *Zastosowanie cytometrycznego oznaczania DNA w ocenie nowotworów jamy ustnej*. Czas Stomat 1998; 51, 1: 37-40.
14. Obrębowska A, Spaczyński M. *Cytometria DNA w diagnostyce onkologicznej*. Współcz Onkol 1997; 2: 13-15.
15. Perotti D, Corletto V, Giardini R, Parafioriti A, Fossati-Bellani F, Luksch R. *Retrospective analysis of ploidy primary osseous and extrasosseous Ewing family tumors in children*. Tumori 1998; 84: 493-8.
16. Pinto AE, Fonesca I, Soares J. *The clinical relevance of ploidy and S-phase Fraction determination in salivary gland tumors; a flow cytometric study of 97 cases*. Cancer 1999; 85: 273-81.
17. Skowronek J. *Analiza zawartości DNA metodą video-imaging w komórkach czerniaków złośliwych*. Nowotwory 1997; 1: 89-99.
18. Skowronek J. *Ploidia DNA jako czynnik rokowniczy w nowotworach*. Nowotwory 1997; 2: 343-53.
19. Wennerberg J, Baldetorp B. *There is no difference in the distribution of flow cytometric (FCM) DNA-indices between node-positive and node-negative squamous cell carcinomas of the head and neck*. Int Symp on Metast in Head and Neck Cancer Germany, Kiel, Brith J Cancer 1998; 14.

ADRES DO KORESPONDENCJI

dr n. med. **Marlan Tomasz Nowaczyk**
Klinika Chirurgii Szczękowo-Twarzowej
Instytutu Stomatologii
Akademii Medycznej
ul. Przybyszewskiego 49
60-355 Poznań
tel. (061) 869 14 01