

Н. В. Лепкова¹, В. Н. Богатырев², К. П. Лактионов², Л. В. Мехеда²,
Л. М. Якупова³

ДИАГНОСТИКА МЕТАХРОННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹ Кафедра онкологии, Российский государственный медицинский университет, Москва

² НИИ клинической онкологии ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

³ Медицинский центр, Актюбинск

Цель исследования заключалась в выявлении клинических и биологических факторов прогноза у больных первичным раком молочной железы и их влияния на риск метастатического рака. Методом лазерной ДНК-проточной цитофлуориметрии проведено исследование опухолевых клеток первичного и метастатического рака молочной железы у 37 больных. Показано, что в 94,6% случаев у обеих опухолей (первичной и метастатической) одинаковая плоидность. У 37,8% больных метастатическим раком молочной железы опухоль является анеуплоидной с потерей хромосомного материала. При сочетании с такими клиническими факторами, как молодой возраст, начальная стадия заболевания, результаты ДНК-проточной цитофлуориметрии позволяют с 80% достоверностью прогнозировать возникновение метастатического рака молочной железы.

Ключевые слова: метастатический рак молочной железы, диагностика, лазерная ДНК-проточная цитофлуориметрия, общая выживаемость.

Рак молочной железы (РМЖ) у женщин занимает 1-е место в структуре онкологической заболеваемости, что определяет неослабевающий интерес исследователей к данной патологии. При этом одной из наименее изученных представляется проблема диагностики и лечения метастатического РМЖ. Доля метастатического рака в структуре заболеваемости РМЖ, по данным разных авторов, колеблется от 2 до 15%. Метастатический РМЖ составляет 69,6% всех первично-множественных опухолей, занимая среди них 1-е место по частоте возникновения. При этом до настоящего времени не выявлено достоверных клинико-морфологических и биологических факторов, которые позволили бы прогнозировать возможность возникновения метастатического РМЖ, что делает данную проблему чрезвычайно важной как с научной, так и с практической точки зрения.

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в последние годы в области изучения канцерогенеза, в клинической онкологии весьма непросто обосновать факторы риска заболевания, долгосрочный прогноз и выбрать адекватный объем и тактику лечения. В онкологической практике к группе прогностических факторов при метастатическом РМЖ относят такие клинические признаки, как возраст больной моложе 49 лет, сохраненная овариально-менструальная функция, раз-

мер первичного очага, гистологический тип опухоли, стадия заболевания [12]. К неблагоприятным факторам прогноза относят инвазию опухолевыми клетками лимфоидных и кровеносных сосудов. Однако РМЖ, как и другие опухоли, является гетерогенным заболеванием, т. е. в одной подгруппе больных течение болезни может варьировать от высокоагрессивного до относительно доброкачественного [14]. Эти различия обусловлены биологическими особенностями опухолей, которые включают в себя многочисленные параметры, в том числе геномные нарушения [11]. Все эти данные в совокупности и определяют развитие опухоли, степень ее злокачественности, метастатический потенциал, скорость прогрессии.

Обобщая все перечисленное, можно выделить следующие прогностические факторы [13]: стадия заболевания, размер опухоли, вовлечение регионарных лимфатических узлов, степень злокачественности и гистологический тип опухоли, уровень рецепторов эстрогенов и прогестерона, а также маркеры клеточной пролиферации, такие, как число клеток в фазе S клеточного цикла, степень пролиферации, ДНК-индекс, определяемые методами ДНК-цитофлуориметрии [10]. Идентификация таких нарушений, а также определение маркеров, позволяющих прогнозировать течение заболевания, подбирать оптимальную лечебную тактику и прогнозировать ее эффективность, являются приоритетными задачами молекулярно-генетических исследований в современной онкологии [11].

В 50—80-е гг. XX в. Т. Caspersson и соавт. [6; 7], И. А. Алов и соавт. [1]; G. Aueг и соавт. [4; 5] сообщили, что злокачественные клетки содержат ДНК больше, чем нормальные. Нарушения ДНК, происходящие в опухолевых клетках в результате процессов репликации, а также аномальное прохождение клеткой клеточного цикла сопровождаются не только увеличением содержания ДНК, но и хромосомными и генными мутациями, нарушением структуры хроматина, а это приводит к клеточному полиморфизму, наблюдаемому при цитологическом исследовании.

Для оценки плоидности могут быть использованы различные методы: морфометрический — с использованием компьютерного анализа изображения (image cytometry), а также самый распространенный — проточная цитофлюорометрия. Метод проточной цитофлюорометрии позволяет определить содержание ДНК в клетках нормальных и опухолевых тканей и преследует 3 основные цели:

- 1) установить различие между клетками нормальных и измененных тканей;
- 2) найти корреляции между особенностями ДНК-, РНК-гистограмм в клеточных популяциях и клиническими проявлениями болезни;
- 3) изучить кинетику содержания ДНК в клетках опухоли при различных терапевтических воздействиях.

Для более точного определения прогноза заболевания В. Н. Богатырев [3] предложил оценивать ДНК-гистограммы в целом, выделяя 5 основных типов, а для большинства из них (в зависимости от пролиферативной активности и числа анеуплоидных клеток) и подтипы:

- 1) ДНК-гистограммы диплоидных опухолей, с низкой, умеренной или высокой пролиферативной активностью;
- 2) ДНК-гистограммы тетраплоидных опухолей;
- 3) ДНК-гистограммы анеуплоидных опухолей, которые в зависимости от показателей пролиферативной активности и числа анеуплоидных клеток в опухоли подразделяются на 7 подтипов;
- 4) ДНК-гистограммы резко анеуплоидных опухолей с низкой, умеренной и высокой пролиферативной активностью;
- 5) ДНК-гистограммы многокловых опухолей (встречаются редко).

Указанные типы ДНК-гистограмм коррелируют с возрастом больных, со степенью злокачественности опухоли и с содержанием рецепторов стероидных гормонов и являются, как и степень злокачественности опухоли, независимым фактором прогноза [10].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящее исследование были включены 210 больных метастатическим РМЖ, которые получали лечение по поводу данного заболевания в ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН с 1984 по 2005 г. Возраст больных метастатическим РМЖ колебался от 26 до 72 лет (21,4% больных были в возрасте от 30 до 39 лет, 37,6% — в возрасте от 40 до 49 лет,

27,6% — в возрасте от 50 до 59 лет, 14,4% — в возрасте 60 лет и старше). Женщины 26—49 лет, т. е. репродуктивного возраста, составили 59%, что соответствует данным литературы, согласно которым первая опухоль при метастатическом раке выявляется в среднем в более молодом возрасте, чем при одностороннем РМЖ [2].

При выявлении первичного рака I стадия заболевания диагностирована в 23% случаев, IIa — в 31%, IIb — в 15%, III и IV — в общей сложности составили 31%. При обнаружении метастатического рака отмечено увеличение числа больных с I стадией заболевания с 23 до 31%. В 26,6% случаев у больных с различной степенью распространенности процесса стадия заболевания при выявлении первого и метастатического рака была одинаковой.

Для определения влияния биологических факторов первичной опухоли молочной железы на прогноз возникновения метастатического рака методом лазерной ДНК-проточной цитофлюорометрии исследовали плоидность опухолевых клеток у 37 женщин, как при первичном, так и при метастатическом раке. Кроме того, определяли индекс ДНК, содержание клеток в фазах G0/1, S и G2+M клеточного цикла и индекс пролиферации.

Проточная цитофлюорометрия

Для лазерной ДНК-проточной цитофлюорометрии использовали клеточную суспензию, фиксированную охлажденным 70% этанолом. Затем суспензию окрашивали флюорохромом пропидиума йодидом («Sigma Co.», США) и анализировали на проточном цитофлюорометре EPICS-XL («Coulter», США). Для характеристики степени анеуплоидии клеток опухоли вычисляли индекс ДНК (ИДНК), который характеризовал отношение интенсивности флюоресценции пика анеуплоидных клеток (его номер канала) к диплоидному. Диплоидными опухолями считали новообразования, у которых G0/1 пик находился в пределах контрольного пика диплоидных стандартов, и, соответственно, их ИДНК всегда равен 1,0. В анеуплоидных новообразованиях он был больше или меньше 1,0. В полученной ДНК-гистограмме процент клеточных ядер с различным содержанием ДНК вычисляли от общего числа исследованных клеток с помощью компьютерной программы Multicycle («Phoenix Flow System», США). Программа автоматически рассчитывала плоидность опухоли и число клеток в фазах G0/1, S и G2+M клеточного цикла, количество анеуплоидных клеток в процентах. Индекс пролиферации (ИП) определяли как сумму количества клеток в фазах S и G2+M.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В большинстве случаев как первичный, так и метастатический рак был диагностирован в более ранних стадиях, чем при одностороннем поражении молочной железы, что связано с тщательным диспансерным наблюдением за больными, получавшими специфическое противоопухолевое лечение.

При оценке плоидности опухоли анеуплоидные опухоли выявлены у 34 больных из 37 (91,9%). Из всех анеуплоидных опухолей наибольший процент (37,8%) составляют анеуплоидные опухоли с потерей хромосомного материала. Полученные данные представлены в табл. 1.

Следует отметить и еще одну важную особенность. У 35 больных из 37 (94,6%) у обеих опухолей, первичной и метакронной, выявлена одинаковая плоидность, т. е. если первичная опухоль была анеуплоидной с потерей хромосомного материала, то и метакронная также была анеуплоидной с потерей хромосомного материала. Весьма вероятно, что это подтверждает генетическую предрасположенность к развитию метакронного рака.

При исследовании плоидности опухолей в зависимости от возраста больных выявлено, что анеуплоидные опухоли преобладают у больных моложе 50 лет (70%), а опухоли с диплоидным набором хромосом — у больных старше 50 лет (66,6%). Только в группе больных с анеуплоидными тетраплоидными опухолями число пациентов было одинаковым, как в одной, так и в другой возрастной группе. Такая закономерность прослеживается и при первичном РМЖ, и при метакронном во всех группах плоидности.

Частота выявления анеуплоидных опухолей у больных метакронным РМЖ была максимальной на ранних стадиях заболевания. На поздних стадиях (Т3—Т4) частота выявления анеуплоидных опухолей снижается. В то же время при одностороннем РМЖ такая тенденция отмечается у больных с диплоидным клоном опухолей. В нашем исследовании диплоидные первичные опухоли, наоборот, обнаружены при местнораспространенной стадии. Метакронные опухоли у этих пациенток выявлены в течение 3 лет после окончания лечения первичного

рака, прогрессирования заболевания за время наблюдения у них не отмечено.

Во всех группах плоидности как при первичном, так и при метакронном раке чаще всего встречались опухоли II степени злокачественности; возможно, это свидетельствует об умеренной агрессивности метакронного рака. Анализ плоидности опухоли в зависимости от интервала возникновения метакронного рака позволил выявить, что чаще всего в ближайшие 2 года после лечения первичной опухоли метакронный рак выявляется у больных с анеуплоидными многоклоновыми опухолями. Это свидетельствует о высокой злокачественности опухолей данного вида. В интервале от 3 до 5 лет метакронный рак был чаще представлен анеуплоидными опухолями с ИДНК в пределах митотического цикла. Анеуплоидные опухоли с потерей хромосомного материала в большинстве случаев выявлялись через 5 лет и более после лечения первичного рака.

Больные с одинаковой плоидностью опухоли были условно разделены на 2 группы: выжившие в течение срока наблюдения и умершие. Большую часть группы выживших больных (39,%) составили пациентки, у которых опухоли были анеуплоидными с потерей хромосомного материала.

В группе умерших больных в 43% случаев обнаружены анеуплоидные опухоли с ИДНК в пределах митотического цикла; данный тип плоидности характерен и для одностороннего рака. Все пациентки с тетраплоидными опухолями живы.

Был проведен сравнительный анализ в группах выживших и умерших больных с одинаковой плоидностью по таким параметрам, как ИП и распределение клеток по фазам клеточного цикла. Согласно ранее полученным данным, неблагоприятное течение заболевания наблюдается при количестве клеток в фазе G0/1 клеточного цикла менее 80%, в фазе S более 6%, в фазе G2+M более 10% и при ИП более 25%.

Согласно полученным нами данным, у умерших больных показатели ИП и процентное содержание клеток в фазах S и G2+M клеточного цикла были почти в 2 раза больше, чем у выживших пациенток. У умерших больных, в отличие от выживших, число клеток в фазе G0/1 составило менее 80% (табл. 2, 3).

Отдаленные результаты исследования у больных с анеуплоидными опухолями показали, что общая 5-летняя выживаемость в группе анеуплоидных опухолей с потерей хромосомного материала составляет 92,3%, а в группе анеуплоидных опухолей в пределах митотического цикла — только 58,3%. Различия достоверны (см. рисунок).

Таким образом, на основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы.

1. Возраст больных метакронным первично-множественным РМЖ при заболевании первичной опухолью меньше, чем возраст больных с одиночной опухолью ($46,8 \pm 1,1$ и $57,1 \pm 1,1\%$ соответственно).

Таблица 1

Плоидность опухолей у больных РМЖ

Плоидность	ПРМЖ	МРМЖ
Диплоидные	3 (8,1) ^a	3 (8,1)
Анеуплоидные с потерей хромосомного материала	13 (35,2)	14 (37,8)
Анеуплоидные в пределах митотического цикла	12 (32,4)	11 (29,8)
Анеуплоидные тетраплоидные	1 (2,7)	1 (2,7)
Анеуплоидные многоклоновые	8 (21,6)	8 (21,6)
Всего	37 (100)	37 (100)

^a В скобках указаны проценты.

ПРМЖ — первичный рак молочной железы; МРМЖ — метакронный рак молочной железы.

Таблица 2

Показатели лазерной ДНК-проточной цитофлуорометрии при первичном РМЖ у выживших больных

Плоидность	Содержание клеток, %			ИП, %
	G0/1	S	G2+M	
Диплоидные (n = 2)	83,5±0,2	8,5±0,5	8±0,5	16,5±1,4
Анеуплоидные с потерей хромосомного материала (n = 9)	86,4±0,4	7,2±0,3	6,3±0,3	13,6±1,2
Анеуплоидные в пределах митотического цикла (n = 6)	74±0,6	12,7±1,2	13,3±1,4	27,6±2,3
Анеуплоидные тетраплоидные (n = 1)	89	8	3	11
Анеуплоидные многокლოновые (n = 5)	87,6±1,1	6,8±0,2	5,6±0,1	13±1,2

2. При метахронном первично-множественном РМЖ стадия заболевания ниже, чем при одностороннем, т.е. в 30% случаев как при первичной, так и при метахронной опухоли диагностирована I стадия заболевания.

3. Как при первичном РМЖ, так и при метахронном наблюдаются преимущественно анеуплоидные опухоли (91,9%), большая часть из них (35,2%) — с потерей хромосомного материала.

4. Любой из неблагоприятных клинко-морфологических факторов прогноза у больных метахронным РМЖ сочетается по крайней мере с одним из параметров лазерной ДНК-проточной цитофлуорометрии, свидетельствующих об увеличении пролиферативной активности опухоли: повышением содержания клеток в фазе S (более 6%) и в фазе G2 + M клеточного цикла (более 10%) или повышением ИП (более 25%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема диагностики метахронного РМЖ остается актуальной. Полученные нами результаты клинко-лабораторного обследования больных позволяют с 80% достоверностью определить признаки, влияющие на развитие метахронного рака. В группу риска входят мо-

лодые больные в репродуктивном возрасте, страдающие ранним РМЖ (I и II стадия), у которых опухоль является анеуплоидной с потерей хромосомного материала. Эти пациентки нуждаются в более тщательном наблюдении с целью возможно более раннего выявления метахронного РМЖ. Несмотря на развитие второго рака, общая 5-летняя выживаемость таких больных составляет 92,3%. Напротив, у пациенток с анеуплоидными опухолями в пределах митотического цикла, которые более характерны для одностороннего РМЖ, общая 5-летняя выживаемость составляет 58,3%.

Проведенное исследование показало необходимость совершенствования диагностики больных РМЖ для прогнозирования первично-множественных опухолей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алов И. А., Брауге А. И., Аспиз М. Е. Основы функциональной морфологии клетки. — М., 1966.
2. Дашков А. В. Клинико-лабораторные особенности первично-множественного рака молочной железы: Автореф. дис... канд. мед. наук. — Ростов-на-Дону, 2004. — С. 5—8.
3. Кушлинский Н. Е., Портной С. М., Лактионов К. П. Рак молочной железы. — М., 2005 — С. 229—235.
4. Auer G., Caspersson T., Gustagsson S. et al. Relationship between nuclear DNA distribution and estrogen receptors in human mam-

Таблица 3

Показатели лазерной ДНК-проточной цитофлуорометрии при первичном РМЖ у умерших больных

Плоидность	Содержание клеток, %			ИП, %
	G0/1	S	G2+M	
Диплоидные (n = 1)	80	10	10	20
Анеуплоидные с потерей хромосомного материала (n = 4)	74±0,1	11,7±1,1	14,3±1,2	26±2,1
Анеуплоидные в пределах митотического цикла (n = 6)	80,7±0,2	13,2±1,3	6,2±0,4	20,2±1,5
Анеуплоидные многоклоновые (n = 3)	79,7±0,3	15,3±1,2	5±0,2	20,5±1,4
Анеуплоидные многоклоновые (n = 5)	87,6±1,1	6,8±0,2	5,6±0,1	13±1,2

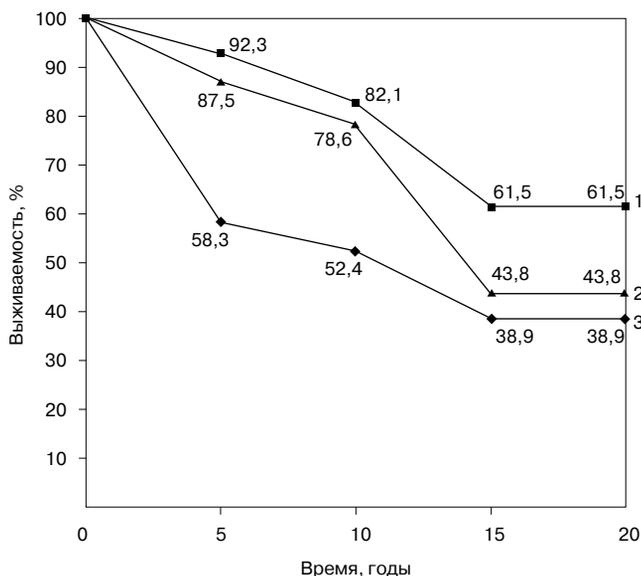


Рисунок. Общая выживаемость больных метакронным РМЖ в зависимости от индекса пloidности опухоли. 1 — опухоли, анеуплоидные с потерей хромосом; 2 — опухоли, анеуплоидные в пределах митотического цикла; 3 — анеуплоидные многокლოновые опухоли.

mary carcinomas // *Ann. Quant. Cytol. Histol.* — 1980. — Vol. 2. — P. 280—284.

5. Auer G., Fallenius A. G., Erhardt K. Y., Sundelin B. Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary carcinomas in humans // *Cancer Res.* — 1984. — Vol. 44. — P. 394—396.

6. Caspersson T. Uver den chemischem Aufbau der Strukturen des zellkernes // *Scand. Arch. Physiol.* — 1936. — Vol. 73, Suppl. 8. — P. 1—151.

7. Caspersson T., Auer G., Fallenius A. et al. Cytochemical changes in the nucleus during tumor development // *J. Histochem. Cytochem.* — 1983. — Vol. 15. — P. 337—362.

8. Eccles D., Evans D., Mackay J. et al. Guidelines for a genetic risk-based approach to advising women with a family history of breast cancer // *J. Med. Gen.* — 2000. — Vol. 37, N 3. — P. 203—209.

9. Martin A. M., Weber B. L. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer // *J. Natl. Cancer Ins.* — 2000. — Vol. 92, N 14. — P. 1126—1135.

10. Martinez-Arribas F., Nunez-Villar M. J., Lucas A. R. et al. The S-phase fraction of the aneuploid cell subpopulation is the biologically relevant one in aneuploid breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.* — 2005. — Vol. 92. — P. 77—80.

11. Nabholz J.-M., Reese D., Lindsay M.-A., Riva A. Evidence for the use of chemotherapy in breast cancer // *Int. J. Clin. Oncol.* — 2002. — Vol. 7. — P. 254—264.

12. Schootman M., Fuortes L. et al. Prognosis of metachronous contralateral breast cancer according to stage at diagnosis: the importance of early detection // *Breast Cancer Res. Treat.* — 2006. — Vol. 99. — P. 91—95.

13. Spietholf A., Schenck A., Bohrer M. Relationship of DNA ploidy to hormone receptor status and proliferation in invasive breast carcinoma // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* — 2000. — Vol. 1, N 26. — P. 707—710.

14. Verkooijen H., Chatelain V. et al. Survival after bilateral breast cancer: result from a population-based study // *Breast Cancer Res. Treat.* — 2006. — Vol. 10. — P. 105—126.

Поступила 28.02.2007

N. V. Lepkova¹, V. N. Bogatyrev², K. P. Laktionov², L. V. Mekheda², L. M. Yakupova³

THE DIAGNOSIS OF METACHRONOUS BREAST CANCER

¹ Oncology Chair, Russian State Medical University, Moscow

² Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin RCRC RAMS, Moscow

³ Medical Center, Aktyubinsk

The purpose of this study was to identify clinical and biological factors of prognosis in patients with primary breast cancer and to assess their influence on the risk of metachronous cancer development. We studied tumor cells from primary or metachronous breast cancer in 37 patients using DNA flow cytometry. Both (primary and metachronous tumors) had similar ploidy in 94.6% of cases. In 37.8% of patients with metachronous breast cancer the tumor was aneuploid with loss of chromosomal material. DNA flow cytometry findings in combination with clinical factors such as young age and early disease predict development of metachronous breast cancer with an 80% accuracy.

Key words: metachronous breast cancer, diagnosis, laser DNA flow cytometry, overall survival.