

ПАРАМЕТРЫ ДНК-ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛЮОРОМЕТРИИ У БОЛЬНЫХ МЕСТНО-РАСПРОСТРАНЕННЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

М.В. Шомова, В.Н. Богатырев, В.П. Лetyагин

ГУЗ Областной клинический онкологический диспансер, Рязань;

ГУ РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

PARAMETERS OF DNA FLOW CYTOFLUOROMETRY IN PATIENTS WITH LOCALLY ADVANCED BREAST CANCER

M.V. Shomova, V.N. Bogatyrev, V.P. Letyagin

Regional Clinical Cancer Dispensary, Ryazan;

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The authors studied the results of an investigation of the criteria (proliferative activity, the count of cells in different phases of a cellular cycle) for DNA flow cytofluorometry and their correlation with an individual prognosis of the disease in 215 patients with locally advanced breast cancer. All the patients received various complex therapies. The material was investigated either before special therapy (prior to the neoadjuvant stage) or after surgery. Analysis of the findings showed that overall 5-year and relapse-free survival significantly correlated with the ploidy and count of cells in the S phase of a cellular cycle. There was a regularity of the progress of the disease, the significant deterioration of its prognosis, and a reduction in the values of DNA flow cytofluorometry.

Риск умереть от рака молочной железы (РМЖ) зависит, с одной стороны, от стадии заболевания на момент диагноза, а с другой — от биологических особенностей развития опухолевого процесса, в том числе скорости роста, способности опухоли к метастазированию, особенностей метастазирования, а также чувствительности опухоли к проводимому лечению. Факторы прогноза течения заболевания интенсивно изучаются при ранних стадиях РМЖ. Очевидно, что некоторые из них важны для всех стадий заболевания и сохраняют свое значение в процессе его развития от локального до генерализованного.

В течение последних двух десятилетий в отечественной и зарубежной литературе появилось большое количество научных работ, связанных с изучением возможностей количественных методов исследования клетки - морфометрией и ДНК-проточной цитофлюорометрией.

В литературе существует много данных о том, что наличие анеуплоидной опухоли свидетельствует о менее благоприятном прогнозе течения заболевания [1—3].

Однако в некоторых работах авторы не смогли отметить прогностического значения плоидности первичной опухоли [4—9], а по другим данным, плоидность опухоли имела прогностическое значение только в группе больных с метастазами в лимфатических узлах [10].

Многие исследователи отмечают связь между увеличением числа клеток в S-фазе клеточного цикла и повышенным риском возврата заболевания и смертностью больных [1, 7, 11—14]. Так, по данным ряда авторов, процент клеток в S-фазе клеточного цикла является прогностиче-

ским фактором для общей и безрецидивной выживаемости, уступающим по значимости только статусу лимфатических узлов [15—17].

Некоторые исследования указывают на то, что пролиферативная активность, особенно в комбинации с плоидностью опухоли, может дать больше прогностически значимой информации, чем только плоидность опухоли [18—20]. Кроме того, по данным P. Hupperts и соавт. [21], комбинация количества клеток в S-фазе клеточного цикла и процента анеуплоидных клеток в опухоли является важным фактором прогноза как для общей, так и для безрецидивной выживаемости у больных с I и II стадиями РМЖ.

В то же время, по сведениям некоторых авторов, количество клеток в S-фазе клеточного цикла не имеет прогностического значения [5, 6, 8]. По другим данным, этот показатель имеет значение для безрецидивной выживаемости, но не влияет на общую выживаемость [4]. По данным S.V. Ewers и соавт. [16], количество клеток в S-фазе клеточного цикла имеет прогностическое значение для безрецидивной выживаемости только при отсутствии поражения регионарных лимфатических узлов или при поражении 1—3 лимфатических узлов.

Кроме того, в литературе имеются сведения о том, что при проведении адьювантной химиотерапии у больных с поражением регионарных лимфатических узлов ни плоидность, ни процент клеток в S-фазе клеточного цикла не имеют прогностического значения [22].

Многие авторы отмечают корреляцию параметров ДНК-проточной цитофлюорометрии между собой, а также с другими важными прогностическими факторами.

Таблица 1. Зависимость числа клеток в S-фазе и ИП от числа пораженных лимфатических узлов

Число пораженных лимфатических узлов	Число клеток в S-фазе клеточного цикла, %	ИП, %
0 (n=26)	6,19±,53	16,84±0,97
1—3 (n=114)	7,89±0,45	20,16±0,95
4—10 (n=60)	10,03±0,67*	24,58±1,45*

Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с пациентами без поражения и с поражением 1—3 лимфатических узлов.

Так, количество клеток в S-фазе клеточного цикла изменяется значительно в зависимости от ploидности опухоли. При этом в анеуплоидных опухолях данный показатель значительно выше, чем в диплоидных [1, 2, 4, 6, 15]. Кроме того, отмечается увеличение индекса пролиферации (ИП; S+G2+M) в анеуплоидных опухолях по сравнению с диплоидными [1, 23].

По некоторым данным, существует зависимость между степенью поражения регионарных лимфатических узлов и ploидностью первичной опухоли. По данным D.W. Hedley и соавт. [18], наличие анеуплоидной опухоли коррелировало с поражением четырех и более аксиллярных лимфатических узлов. Эти результаты подтверждают и другие авторы, отмечая увеличение числа анеуплоидных опухолей при увеличении количества пораженных лимфатических узлов [5, 21, 24]. Однако, по данным других авторов, не существует связи между ploидностью опухоли и статусом лимфатических узлов [25].

В большинстве работ авторы изучали прогностическое значение параметров ДНК-проточной цитофлуорометрии у больных ранним РМЖ. Целью нашего исследования было изучение прогностического значения этих параметров у больных с местно-распространенным процессом (III стадия заболевания). 215 больных местно-распространенным РМЖ (МРРМЖ) были включены в наше исследование.

Pлоидность клеток опухоли, процент клеток в S-фазе клеточного цикла, ИП, процент анеуплоидных клеток изучали в образцах трепанобиопсии у больных, получавших предоперационное лечение, или в операционном материале, если предоперационное лечение не проводилось. Клеточную суспензию, окрашенную флюорохромом, исследовали на проточном анализаторе FACScan (Beckton Dickinson, США) с лазерным источником излучения. В каждом образце изучалось не менее 25 000 клеток.

На основании показателей флюоресценции окрашенных ядер прибор строил ДНК-гистограммы. Для анализа гистограмм использовалась стандартная программа Multicycle (Phoenix Flow System, США, 1994). В полученной ДНК-гистограмме количество клеток в различных фазах клеточного цикла (G0/1, S, G2+M) вычис-

лялось по отношению к общему числу исследованных клеток. ИП в опухоли соответствовал проценту клеток в S- и G2+M-фазах клеточного цикла.

При оценке ploидности опухоли рассчитывали индекс ДНК (ИДНК), который характеризовал отношение интенсивности флюоресценции пика анеуплоидных клеток к диплоидному. Диплоидными опухолями считали те, у которых пик G0/1 находился в пределах контрольного пика диплоидных стандартов (был равен 1,0). В анеуплоидных опухолях он был больше или меньше 1,0.

Из 215 пациенток 96 (44,7%) имели диплоидные опухоли и 119 (55,3%) — анеуплоидные. В группе больных с анеуплоидными опухолями в 61 (51,3%) случае доля анеуплоидных клеток в опухоли составила до 50% и в 58 (48,7%) — более 50%.

При анализе числа S-фазных клеток и ИП в зависимости от ploидности первичной опухоли мы установили, что в группе анеуплоидных опухолей эти показатели были достоверно выше, чем в группе диплоидных опухолей $10,51 \pm 0,5$ и $25,77 \pm 1,07\%$ против $5,94 \pm 0,27$ и $16,17 \pm 0,62\%$ соответственно ($p=0,000000$).

Нами была выявлена достоверная корреляция между степенью поражения регионарных лимфатических узлов и ploидностью первичной опухоли. Процент анеуплоидных опухолей возрастает при увеличении числа пораженных лимфатических узлов. Так, в группе больных с отсутствием вовлечения регионарных лимфатических узлов доля анеуплоидных опухолей составила 34,6%, при поражении 1—3 лимфатических узлов — 48,2%, при поражении более 4 лимфатических узлов — 73,5%.

Кроме того, мы отметили явную тенденцию увеличения ИП и числа S-фазных клеток в опухоли при увеличении числа пораженных лимфатических узлов (табл. 1).

В зависимости от количества клеток в S-фазе клеточного цикла мы выделили следующие 3 группы больных: пациентки с числом клеток $\leq 7\%$ — 111 (51,6%), > 7 и $\leq 14\%$ — 69 (32,1%) и $> 14\%$ — 35 (16,3%). При этом следует отметить, что в группе больных с количеством клеток в S-фазе клеточного цикла $> 14\%$ не было диплоидных опухолей.

Таблица 2. Показатели общей и безрецидивной выживаемости больных МРРМЖ с анеуплоидными и диплоидными новообразованиями

Плоидность опухоли	Безрецидивная выживаемость, %		Общая выживаемость, %	
	5-летняя	10-летняя	5-летняя	10-летняя
Диплоидные (n=96)	78,42±4,29	64,29±5,44	90,83±3,00	78,73±4,76
Анеуплоидные (n=119)	30,08±4,36	20,64±4,31	48,49±4,87	30,35±5,26

Примечание. Все различия между группами с диплоидными и анеуплоидными опухолями достоверны ($p < 0,00001$).

Таблица 3. Показатели общей и безрецидивной выживаемости больных МРРМЖ в зависимости от плоидности опухоли

Плоидность опухоли	Безрецидивная выживаемость, %		Общая выживаемость, %	
	5-летняя	10-летняя	5-летняя	10-летняя
Диплоидные (n=96)	78,42±4,29	64,29±5,44	90,83±3,00+	78,73±4,76
Тетраплоидные (n=13)	54,42±14,61	28,79±14,32	58,38±14,4	30,89±15,0
Анеуплоидные с ИДНК 1,1—1,84 (n=96)	28,16±4,72*	16,19±4,62*	47,84±5,4*	26,84±5,4*

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с тетра- и диплоидными опухолями; + $p < 0,02$ по сравнению с тетраплоидными опухолями.

Нами была проведена оценка отдаленных результатов лечения больных МРРМЖ в зависимости от различных параметров ДНК-проточной цитофлуорометрии. Показатели общей и безрецидивной выживаемости оказались достоверно лучше при наличии диплоидных опухолей (табл. 2).

Группа анеуплоидных опухолей достаточно разнообразна в плане прогноза, поэтому разные авторы предлагают варианты их классификации в зависимости от значения ИДНК и показателей пролиферативной активности [1, 18]. Так, выделяются группы анеуплоидных опухолей с ИДНК 1,1—1,84 в пределах митотического цикла. В нашем случае 96 (80,8%) пациенток составляют эту группу. Кроме того, у 13 (10,9%) больных выявлены тетраплоидные опухоли с ИДНК 1,85—2,15, которые, по данным литературы, имеют относительно благоприятный прогноз [1, 26]. Существуют варианты анеуплоидных опухолей, отличающихся наиболее неблагоприятным течением. Среди них в нашем исследовании можно выделить анеуплоидные многокლოновые опухоли, имеющие несколько анеуплоидных клонов с разными значениями ИДНК — у 7 (5,8%) пациенток, а также гиперанеуплоидные опухоли со значением ИДНК $> 2,15$ — у 3 (2,5%) больных.

В связи с небольшим количеством наблюдений в подгруппах больных с анеуплоидными многокლოновыми и гиперанеуплоидными опухолями мы не смогли достоверно оценить отдаленные результаты. В то же время следует отметить, что из 7 пациенток с анеуплоидными многокლოновыми опухолями у 6 (85,7%) были зафиксированы рецидивы заболевания за 4-летний период наблюдения. Кроме того, 5 (71,4%) из

них умерли в течение первых 5 лет от начала лечения, что действительно может указывать на очень плохой прогноз у этих больных.

Из 3 пациенток с гиперанеуплоидными опухолями у 2 отмечены рецидивы заболевания за 5-летний период; одна больная умерла на 4-м, другая — на 7-м году наблюдения.

Отдаленные результаты в группах больных с анеуплоидией в пределах митотического цикла и с тетраплоидными опухолями представлены в табл. 3.

Сравнение двух групп больных показало, что в группе больных с тетраплоидными опухолями безрецидивная и общая выживаемость достоверно лучше, чем в группе пациенток с анеуплоидными опухолями с ИДНК 1,1—1,84. В то же время общая выживаемость в группе больных с диплоидными опухолями достоверно выше, чем при наличии тетраплоидной опухоли лишь за 5-летний период наблюдения (см. табл. 3). Показатели безрецидивной выживаемости достоверно не различались. Полученные данные свидетельствуют о том, что тетраплоидные опухоли имеют наиболее благоприятный прогноз в группе анеуплоидных опухолей.

Это можно объяснить тем, что тетраплоидные опухоли имеют ИДНК, приближенный к таковому нормальных клеток, находящихся в стадии деления.

Для определения групп больных, имеющих наименее благоприятный прогноз в плане выживаемости, мы выделили подтипы анеуплоидных опухолей с разным числом анеуплоидных клонов. Все пациентки с анеуплоидными опухолями были разделены на 2 группы: в 1-й группе содержание анеуплоидных клонов было до 50 %, во второй — более 50 %.

Таблица 4. Показатели выживаемости больных МРРМЖ в зависимости от числа клеток в S-фазе клеточного цикла

Количество клеток в S-фазе, %	Безрецидивная выживаемость, %		Общая выживаемость, %	
	5-летняя	10-летняя	5-летняя	10-летняя
≤7 (n=111)	77,65±4,03	64,88±5,1	90,49±2,86	78,16±4,68
>7—≤14 (n=69)	30,02±5,75	18,01±5,69	53,81±6,5	34,17±7,22
>14 (n=35)	10,82±5,63	0	22,5±7,34	0

Примечание. Все $p < 0,01$.

Сравнение отдаленных результатов в группах показало достоверные преимущества по показателям как общей ($p=0,0083$), так и безрецидивной выживаемости ($p=0,01436$) в группе пациенток, имеющих опухоли с содержанием анеуплоидных клеток до 50%. При этом 5- и 10-летняя безрецидивная выживаемость у пациенток 1-й группы составила 38,91±6,51 и 23,88±6,94%, а общая выживаемость — 63,81±6,52 и 36,97±8,87% соответственно.

Соответствующие показатели во 2-й группе составили 21,8±5,63 и 11,77±4,84% и 33,09±6,68 и 18,29±5,88%. Таким образом, увеличение доли анеуплоидных клеток в анеуплоидной опухоли еще более ухудшает прогноз заболевания.

Мы провели анализ отдаленных результатов лечения больных МРРМЖ в зависимости от количества клеток в S-фазе клеточного цикла. При этом больные были разделены на группы, как указывалось выше (табл. 4).

Сравнение показателей общей и безрецидивной выживаемости выявило достоверные преимущества в группе больных с числом клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла, до 7% по сравнению с двумя другими группами ($p < 0,01$).

Кроме того, увеличение количества клеток более 14% приводит к достоверному ухудшению

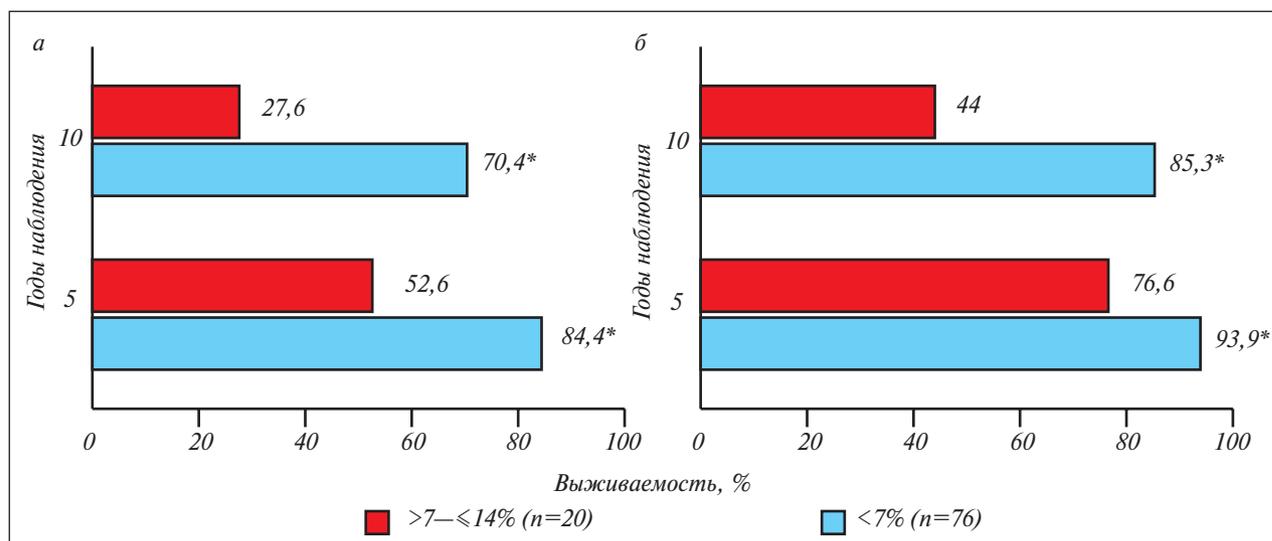
общей и безрецидивной выживаемости по сравнению с группой больных, имеющих опухоли с содержанием S-фазных клеток $\geq 7 - \leq 14\%$ ($p < 0,01$).

Чтобы оценить влияние параметров пролиферативной активности при диплоидных и анеуплоидных опухолях, которые значимо различаются в плане отдаленных результатов лечения, и выделить среди них подгруппы с наихудшим прогнозом, мы сравнили показатели выживаемости в зависимости от количества S-фазных клеток. В группе больных с диплоидными опухолями 76 пациенток имели количество клеток в S-фазе $\leq 7\%$ и 20 — > 7 и $\leq 14\%$.

Ни у одной больной, как указывалось выше, количество S-фазных клеток не превышало 14%. Сравнение отдаленных результатов лечения показало, что как общая ($p=0,0046$), так и безрецидивная ($p=0,0058$) выживаемость была достоверно лучше в группе больных, имеющих диплоидные опухоли с содержанием S-фазных клеток $< 7\%$ (см. рисунок).

Группа пациенток с анеуплоидными опухолями (119 человек) была также разделена в зависимости от количества S-фазных клеток и ИП опухоли.

При этом 5-летняя общая выживаемость в группах больных с количеством S-фазных клеток $\leq 7\%$, $> 7 - \leq 14\%$ и $> 14\%$ составляла



Безрецидивная (а) и общая (б) выживаемость больных МРРМЖ, имеющих диплоидные опухоли, в зависимости от числа S-фазных клеток.
* $p < 0,01$ по сравнению с пациентками, имеющими $> 7 - \leq 14\%$ клеток в S-фазе

79,05±7,06, 42,39±7,87 и 22,4±7,34%, безрецидивная — 61,37±8,43, 20,86±6,06 и 10,81±5,63% соответственно.

Сравнение показателей общей и безрецидивной выживаемости выявило высокодостоверные различия между всеми тремя группами за весь период наблюдения — в среднем 13 лет ($p < 0,01$). Прослеживается явное преимущество выживаемости у больных с меньшим содержанием клеток в S-фазе клеточного цикла.

Таким образом, проведенный нами анализ показал высокую информативность в пла-

не прогноза течения заболевания у больных МРРМЖ параметров ДНК-проточной цитофлюорометрии — плоидности опухоли, процента анеуплоидных клеток в опухоли, а также числа клеток в S-фазе клеточного цикла. При этом последний показатель сохраняет свое прогностическое значение в группе как диплоидных, так и анеуплоидных опухолей и может использоваться для выделения групп больных, имеющих более агрессивное течение заболевания и, вероятно, требующих других подходов к лечению.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богатырев В.Н. Значение количественных методов исследования (морфометрии, проточной цитофлюорометрии, сканирующей микрофотометрии) в клинической онкоцитологии: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М., 1991.
2. Clark G.M., Dressler L.G., Owens M.A. et al. DNA flow cytometry predicts time to recurrence and survival in 606 axillary node-negative breast cancer patients (meeting abstract). Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol 1988;7:abstr. 52.
3. Pinto A.E., Andre S., Nogueira M. et al. Flow cytometric DNA hypertriploidy is associated with unfavourable prognostic features in breast cancer. J Clin Pathol 1997;50(7):591—5.
4. Kaufmann M., Feichter G.E., Nhila A. et al. [Flow cytometry parameters, hormone receptors and axillary lymph node status as prognostic factors in primary breast cancer]. Geburtshilfe Frauenheilkd 1988;48(10):705—9.
5. Pfisterer J., Kommos F., Sauerbrei W. et al. DNA flow cytometry in node-positive breast cancer. Prognostic value and correlation with morphologic and clinical factors. Anal Quant Cytol Histol 1995;17(6):406—12.
6. Prasad A.R., Divine G., Zarbo R.J. Two-color, cytokeratin-labeled dna flow cytometric analysis of 332 breast cancers: lack of prognostic value with 12-year follow-up. Arch Pathol Lab Med 2001;125(3):364—74.
7. Russo A., Bazan V., Morello V. et al. Vimentin expression, proliferating cell nuclear antigen and flow cytometric factors. Prognostic role in breast cancer. Anal Quant Cytol Histol 1994;16:365—74.
8. Stanton P.D., Cooke T.G., Oakes S.J. et al. Lack of prognostic significance of DNA ploidy and S-phase fraction in breast cancer. Br J Cancer 1992;66(5):925—9.
9. Wong S.W., Rangan A.M., Bilous A.M. et al. The value of S-phase and DNA ploidy analysis as prognostic markers for node-negative breast cancer in the Australian setting. Pathology 1999;31(2):90—4.
10. Utada Y., Yoshimoto M., Kasumi F. et al. [Relationship between DNA ploidy and survival in breast cancer]. Gan To Kagaku Ryoho 1998;25(Suppl 3):431—5.
11. Chassevent A., Jourdan M.L., Romain S. et al. S-phase fraction and DNA ploidy in 633 T1T2 breast cancers: a standardized flow cytometric study. Clin Cancer Res 2001;7(4):909—17.
12. Chevillard S., Lebeau J., Pouillart P. et al. Biological and clinical significance of concurrent p53 gene alterations, MDR1 gene expression, and S-phase fraction analyses in breast cancer patients treated with primary chemotherapy or radiotherapy. Clin Cancer Res 1997;3(12 Pt 1):2471—8.
13. Jones S., Clark G., Koleszar S. et al. Low proliferative rate of invasive node-negative breast cancer predicts for a favorable outcome: a prospective evaluation of 669 patients. Breast Cancer 2001;1(4):310—4.
14. Vielh P., Carton M., Padoy E. et al. S-phase fraction as an independent prognostic factor of long-term overall survival in patients with early-stage or locally advanced invasive breast carcinoma. Cancer 2005;105(6):476—82.
15. Camplejohn R.S., Ash C.M., Gillet C.E. et al. The prognostic significance of DNA flow cytometry in breast cancer: results from 881 patients treated in a single centre. Br J Cancer 1995;71(1):140—5.
16. Ewers S.B., Attewell R., Baldetorp B. et al. Prognostic potential of flow cytometric S-phase and ploidy prospectively determined in primary breast carcinomas. Breast Cancer Res Treat 1992;20(2):93—108.
17. Largillier R., Namer M., Ramaioli A. et al. Prognostic value of S-phase fraction in 920 breast cancer patients: focus on T1N0 status. Int J Biol Markers 2003;18(4):273—9.
18. Hedley D.W., Rugg C.A., Gelber R.D. Association of DNA index and S-phase fraction with prognosis of nodes positive early breast cancer. Cancer Res 1987;47:4729—35.
19. Joensuu H., Toikkanen S., Klemi P.J. DNA index and S-phase fraction and their combination as prognostic factors in operable ductal breast carcinomas. Cancer 1990;66:331—40.
20. Moureau-Zabotto L., Bouchet C., Cesari D. et al. Combined flow cytometry determination of S-phase fraction and DNA ploidy is an independent prognostic factor in node-negative invasive breast carcinoma: analysis of a series of 271 patients with stage I and II breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2005;91(1):61—71.
21. Hupperts P., Blijham G., Volovics L. et al. The prognostic value of flow cytometry (FCM) in node-positive breast cancer patients. Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol 1994;13:abstr. 147.
22. Witzig T.E., Ingle J.N., Schaid D.J. et al. DNA ploidy and percent S-phase as prognostic factors in node-positive breast cancer: Results from patients enrolled in two prospective randomized trials. J Clin Oncol 1993;11(2):351—9.
23. Ostrowski M.L., Chakraborty S., Laucirica R. et al. Quantitative Image Analysis of MIB-1 Immunoreactivity. A comparison with flow cytometric assessment of proliferative activity in invasive carcinoma of the breast. Anal Quant Cytol Histol 1995;17:15—24.
24. Uzarevic B., Petroveci M., Marusic M. et al. Prognostic significance of cell cycle parameters in infiltrative ductal breast carcinoma. J Clin Lab Anal 1998;12(3):131—6.
25. Machado-Santelli G.M., Mori L., Pereira C.A. Prediction of relapse in patients with breast cancer by DNA cytometry. Anal Cell Pathol 1994;7(4):321—34.
26. Baildam A.D., Zaloudik J., Howell A. DNA analysis by flow cytometry, response to endocrine treatment and prognosis in advanced carcinoma of the breast. Br J Cancer 1987;55:553—9.
27. Sigurdsson H., Baldetorp B., Borg A. et al. Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. N Engl J Med 1990;322:1045—53.