

основания поставить диагноз РМЖ, необходимо осуществлять термографический контроль через каждые 6—12 мес.

4. Наиболее эффективно термографический метод может применяться для формирования групп риска при массовых профилактических обследованиях женщин с использованием программы автоматизированного анализа тепловых изображений молочных желез.

© Коллектив авторов, 1994
УДК 618.19-006.6-037

Т.Г. Николаева, Я.В. Добрынин, Б.Н. Басов,
Б.Ш. Чиквашивили, И.К. Воротников, В.П. Летагин

ПРОТОЧНАЯ ДНК-ЦИТОМЕТРИЯ В ПРОГНОЗИРОВАНИИ ТЕЧЕНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей.
НИИ клинической онкологии

В последние годы отмечена взаимосвязь между популяционной структурой и уровнем прогрессии опухолей. Содержание в опухолевых клетках ДНК (плоидность), величина фракции пролиферирующих опухолевых клеток и наличие дополнительных субпопуляций клеток, выявляемых методом проточной ДНК-цитометрии, могут коррелировать с темпом роста, инвазивностью и способностью опухолей к метастазированию. Совокупность указанных факторов наряду с чувствительностью к проводимому лекарственному или лучевому лечению существенно влияет на общую продолжительность жизни онкологических больных. Такие наблюдения были сделаны в случаях с разными нозологическими формами новообразований человека. Велик интерес к использованию метода ДНК-цитометрии для прогнозирования течения опухолевого процесса, чувствительности к проводимому специфическому лечению и продолжительности жизни онкологических больных [2, 3—7, 9, 21].

Задача настоящего исследования — изучить методом проточной ДНК-цитометрии плоидность, популяционную структуру и, где это возможно, величину фракции пролиферирующих клеток в первичных опухолях молочной железы (ОМЖ) и их метастазах, проанализировать взаимосвязь указанных показателей с клиническими факторами прогноза (стадия заболевания, срок возврата заболевания, продолжительность жизни и др.) с целью прогнозирования течения опухолевого процесса у оперированных больных с ОМЖ.

Материалы и методы. Исследовано 280 случаев новообразований молочной железы (среди них 10 фиброаденом). Стадии заболевания классифицировали по системе TNM (UISS). Больные с I, II и частично III стадией получали химио- или лучевую терапию, после чего были оперированы. Операционный материал (ткань опухоли и нормальной молочной железы) исследовали ДНК-цитометрически. В 32 случаях был исследован материал трепанобиопсий, полученный до начала предоперационного лечения. В 14 случаях изучены первичная опухоль и метастазы в лимфоузлы. Срок после-

11. *Shanon B.C.* Биохимические аспекты опухолевого роста. — М., 1975. — С. 117—119.
12. *Carenza L., De Felice C., Figliani M. et al.* // *Minerva ginec.* — 1984. — Vol. 36, № 11. — P. 719—725.
13. *Gulliton B.J.* // *Science.* — 1977. — Vol. 196, № 4292. — P. 583—855; 857.

Поступила 13.07.93 / Submitted 13.07.93

T.G. Nikolaeva, Ya.V. Dobrynin, B.N. Basov,
B.Sh. Chikvashvili, I.K. Vorotnikov, V.P. Letyagin

FLOW DNA CYTOMETRY IN PROGNOSIS OF BREAST CANCER COURSE

Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of
Tumors, Research Institute of Clinical Oncology

The composition of tumor cell population has recently been found to be in relation to tumor progression. DNA content in tumor cells (ploidy), fraction of proliferative tumor cells and presence of additional cell populations, as revealed by flow DNA cytometry, may correlate with rate of growth, tumor invasive and metastatic potential. These factors together with tumor response to chemo- or radiotherapy are of significance for life time of cancer patients. These findings have been made on observation of various nosological forms of human tumors. There is a great interest to DNA cytometry in prognosis of tumor disease progression, response to specific treatment and cancer patients' life time [2, 3—7, 9, 21].

The purpose of this investigation was DNA cytometric study of ploidy, populational composition and, where possible, fraction of proliferative cells in primary breast tumors (BT) and their metastases, as well as analysis of relationship between the parameters mentioned above with clinical prognostic factors (disease stage, recurrence onset, life time, etc.) aimed at prognosis of tumor disease course in BT patients undergoing surgery.

Materials and Methods. The study was performed in 280 cases with BT (inclusive of 10 fibrous adenomas). The disease was staged according to the TNM (UISS) system. Patients with stage I, II and partially with stage III disease received chemo- or radiotherapy to be followed by surgery. The surgical specimens (tumor and normal breast tissue) were studied by DNA cytometry. The material to be studied was 32 trepanobiopsic specimens obtained before preoperative treatment and 14 specimens of primary tumors and lymph node metastases. The postoperative follow-up time was 7 years. The patients' survival was calculated by the life table technique.

Flow DNA Cytometry. Tumor tissue specimens were stored at — 20°C. Nuclear suspension was washed with PM-16 buffer and stained with ethidium bromide — mitramycin (1:1) mixture. Nuclear DNA content was measured with an ICP-22 (Phywe, FRG) cytofluorimeter. Lymphocytes of normal donors were used as standard. Numerical data obtained by cytometry were analyzed in accordance with specially

операционного наблюдения за больными составил 7 лет. Выживаемость больных рассчитывали по системе "Life-Table".

Проточная ДНК-цитометрия. Образцы опухолевой ткани накапливали и хранили при -20°C . Суспензию ядер промывали буфером РМ-16 и окрашивали смесью: этидиума бромид — митрамицин (1:1). Содержание ДНК в ядрах измеряли с помощью цитофлуориметра ICP-22 ("Phywe", ФРГ). В качестве стандарта использовали лимфоциты здоровых доноров. Полученные на цитофлуориметре цифровые данные анализировали по специально разработанным программам на ЭВМ "Искра-226" и IBM PS/2 [1]. Значения пloidности пиков на ДНК-гистограммах выражали индексом ДНК (ИДНК), который вычисляли как отношение номера канала анеуплоидного пика к номеру канала пика нормальных диплоидных ядер. Коэффициент вариации ИДНК рассчитывали из аппроксимации для Гауссовского распределения. Его величина не превышала 9%. Если на ДНК-гистограмме присутствовал один пик, соответствующий диплоидному содержанию ДНК в ядрах (ИДНК = 0,90—1,10), образец (опухоль) считали диплоидным (рис. 1). Если ДНК-гистограмма содержала наряду с диплоидным или без него один пик отличающихся от диплоидных по содержанию ДНК ядер (ИДНК = 1,11—1,55), то такой материал (опухоль) рассматривали как анеуплоидный (гипердиплоидный). Наличие двух и более раздельных пиков анеуплоидных ядер позволило говорить о многоклоновой популяции. При наличии в тетраплоидной области (ИДНК = 1,56—1,94) пика, содержавшего более 20% ядер, популяцию считали тетраплоидной.

Результаты. Образцы опухолей 280 больных проанализированы ДНК-цитометрически, а полученные для 177 больных данные сопоставлены с клиническими показателями течения заболевания (стадия, время возникновения рецидива и метастазов, продолжительность жизни и др.), гистологическими характеристиками новообразований, наличием или отсутствием гормональных рецепторов.

На рис. 1 представлена гистограмма распределения 270 исследованных ОМЖ в зависимости от пloidности. Обращает внимание наличие трех кучностей, соответствующих значениям ИДНК около 1,0, в интервале 1,11—1,55 и около 2,0. Среди изученных злокачественных ОМЖ 30,8% были диплоидными и 69,2% — анеуплоидными. Из числа последних в 24,1% случаев определялись тетраплоидные опухоли. Небольшое количество опухолей было гиподиплоидными (ИДНК < 1,0) или гипертетраплоидными (менее 1,0%). В 60 (22,2%) случаях в опухолях были представлены несколько субпопуляций клеток (многоклоновые). В образцах из нормальной молочной железы и в 10 случаях фиброаденомы популяция клеток была диплоидной.

В табл. 1 содержатся данные о распределении изученных ОМЖ по стадиям заболевания, популяционной структуре (пloidности) и частоте возвратов заболевания. Вне зависимости от стадии возврат заболевания среди больных с анеуплоидными ОМЖ был более частым, чем с диплоидными новообразованиями. По мере прогрессирования опухолевого процесса вероятность возвратов заболевания возрастала. Однако если частота возвратов диплоидных опухолей в III стадии заболевания составляла 30,3%, то для анеуплоидных ОМЖ в III стадии (гипердиплоидных) новообразований этот показатель возрастал до 82,3%. Прогностически наименее благоприятными были гипердиплоидные ОМЖ и, особенно, многоклоновые, вероятность возврата которых в III стадии заболевания достигала

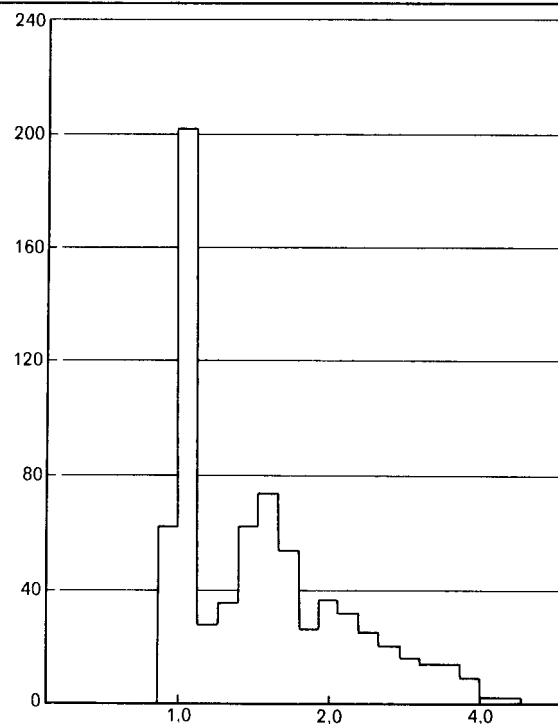


Рис. 1. ДНК-гистограмма ОМЖ.

По вертикали — частота случаев; по горизонтали — пloidность (ИДНК).

Fig. 1. BT DNA histogram.

Numerals on the vertical show the number of cases, numerals on the horizontal show ploidy (DNAI).

developed programs using an Iskra-226 and an IBM PS/2 computers [5]. Values of peak ploidy in DNA histograms were expressed in terms of DNA index (DNAI), i.e. the ratio of the channel number of an aneuploid peak to the channel number of the peak of normal diploid nuclei. Coefficient of variation for DNAI was calculated by approximation for Gaussian distribution. Its value did not exceed 9%. If there was only one peak for diploid nuclear DNA content (DNAI=0.90—1.10) on a DNA histogram the specimen (tumor) was considered diploid (fig. 1). If besides or without a diploid peak a DNA histogram contained a peak different from diploid (DNAI=1.11—1.55) the specimen (tumor) was considered aneuploid (hyperdiploid). The presence of two or more separate peaks of aneuploid nuclei suggested multiclonal population. In case there was a peak containing more than 20% of nuclei in the tetraploid region (DNAI=1.56—1.94) the population was considered tetraploid.

Results. Tumor specimens of 280 patients were analyzed by DNA cytometry. The data obtained for 177 patients were compared with clinical characteristics of disease course (stage, relapse or metastasis occurrence, life time, etc.), tumor histology, hormonal receptor status.

Fig. 1 shows distribution of 270 BT specimens with respect to ploidy. There are three groups of peaks corresponding to DNAI about 1.0, 1.11—1.55 and about 2.0. Among the malignant BT studied 30.8% were diploid and 69.2% aneuploid. 24.1% of the aneuploid tumors were tetraploid. There were also few hypodiploid (DNAI < 1.0) and hypertetraploid tumors (less than 1.0%). 60 (22.2%) tumor specimens had several cell subpopulations (multiclonal). All specimens of normal breast and 10 specimens of fibrous adenoma showed diploid cell populations.

Таблица 1

Table 1

Частота послеоперационных возвратов ОМЖ в зависимости от структуры популяции и стадии заболевания
Rate of postoperative BT recurrence with respect to cell population composition and disease stage

Структура популяции опухолевых клеток	Стадия заболевания			
	I + II		III	
	количество больных/из них с возвратами	частота рецидивирования, %	количество больных/из них с возвратами	частота рецидивирования, %
Диплоидная (ИДНК=1,1) Diploid (DNAI=1.1)	30/3	10,0	33/10	30,3
Анеуплоидная: Aneuploid:				
гипердиплоидная (ИДНК=1,11–1,55) hyperdiploid (DNAI=1.11–1.55)	21/5	23,8	19/14	82,3
тетраплоидная (ИДНК=1,56–1,94) tetraploid (DNAI=1.56–1.94)	20/5	25,0	30/9	30,0
многоклоновая multiclonal	4/1	25,0	20/20	100,0
И т о г о по группам ... Total by groups	75/14	18,7	102/53	51,9
В с е г о больных ... Overall	177/67			
Tumor cell population composition	no of cases/no of relapses	% of recurrence	no of cases/no of relapses	% of recurrence
	I + II		III	
	Disease stage			

100%. Особняком стоят тетраплоидные ОМЖ, частота возврата которых в I—II стадии не отличалась от таковой других анеуплоидных опухолей, а в III стадии заболевания была на уровне диплоидных (30,0%).

В табл. 2 проанализированы сроки возврата ОМЖ в послеоперационном периоде в зависимости от структуры популяции и стадии заболевания. Средний срок возврата заболевания в III стадии был существенно короче ($p < 0,05$), чем в I—II стадии. Вне зависимости от стадии заболевания более благоприятным было течение диплоидных и тетраплоидных ОМЖ. Сроки безрецидивного послеоперационного течения опухолевого процесса при диплоидных опухолях в I—II стадии были в 2,5 раза ($p < 0,05$), а в III стадии почти в 2 раза ($p < 0,05$) продолжительнее, чем при гипердиплоидных ОМЖ. Время возврата заболевания при многокловых ОМЖ во всех стадиях существенно не отличалось такового при от гипердиплоидных ОМЖ. Некоторые особенности представляли данные о сроках возврата тетраплоидных ОМЖ. При всех стадиях заболевания время наступления возврата для них существенно не отличалось от сроков возврата диплоидных ОМЖ. Таким образом, можно отметить, что наименее благоприятными с точки зрения сроков послеоперационного возврата опухолевого процесса были гипердиплоидные и многокловые ОМЖ.

Рассмотрены и проанализированы сроки выживания больных с III стадией заболевания в зависимости от структуры популяции ОМЖ (рис. 2). Выявлены существенные различия в сроках прогрессирования диплоидных и анеуплоидных ОМЖ. Для больных с анеуплоидными опухолями вероятность дожить до 3 лет составила 50%, а с диплоидными — около 90%. К исходу

Table 1 presents distribution of the BT studied with respect to disease stage, population composition (ploidy) and recurrence rate. Irrespective of disease stage patients with aneuploid BT relapsed more frequently than those with diploid tumors. The rate of disease recurrence was increasing with disease advance. However, the rate of recurrence for stage III diploid tumors was 30.3% versus 82.3% for stage III aneuploid (hyperdiploid) BT. The poorest prognosis was for hyperdiploid BT, particularly multiclonal, the recurrence rate for which in stage III disease was reaching 100%. Tetraploid BT are of note whose rate of recurrence in stage I—II was the same as that of aneuploid tumors, and in stage III was at the level of diploid neoplasms (30.0%).

Table 2 presents relapse-free survival time with respect to populational composition and BT stage. The mean relapse-free survival time in stage III was significantly shorter ($p < 0.05$) than in stage I—II. The course of diploid and tetraploid BT was better irrespective of disease stage. The time of postoperative relapse-free survival in stage I—II diploid tumors was 2.5-fold ($p < 0.05$) and in stage III about 2-fold longer than in hyperdiploid BT. Relapse-free survival time in multiclonal BT in all stages showed no considerable difference from hyperdiploid BT. Recurrence time of tetraploid BT was peculiar. The time till relapse onset for them did not differ considerably from relapse-free period for diploid BT in all disease stages. Thus, hyperdiploid and multiclonal BT had the poorest prognosis in terms of postoperative tumor recurrence.

We analyzed survival time of patients with stage III disease with respect to BT population composition

Таблица 2

Table 2

Сроки послеоперационных возвратов ОМЖ в зависимости от структуры популяции и стадии заболевания ($M \pm m$)
 BT recurrence onset with respect to cell population composition and disease stage ($M \pm m$)

Структура популяции опухолевых клеток	Стадия заболевания					
	I + II			III		
	количество больных с возвратами заболевания	средний срок возврата заболевания, мес	<i>p</i>	количество больных с возвратами заболевания	средний срок возврата заболевания, мес	<i>p</i>
Диплоидная (ИДНК=1,1) Diploid (DNAI=1.1)	3	36,6±5,2		10	19,4±2,8	
Анеуплоидная: Aneuploid:						
гипердиплоидная (ИДНК=1,11–1,55) hyperdiploid (DNAI=1.11–1.55)	5	15,6±3,7	< 0,05	14	10,1±1,6	< 0,05
тетраплоидная (ИДНК=1,56–1,94) tetraploid (DNAI=1.56–1.94)	5	21,0±4,4	< 0,05	9	21,3±3,5	> 0,05
многокლოновая multiclonal	1	11,0	—	20	14,4±2,7	< 0,05
Итого по группам ... Total by groups	14	21,0± 2,8		53	16,3±1,9	
Всего больных с возвратами ... Overall of relapses	67					
Tumor cell population composition	no of relapses	mean relapse time, mo	<i>p</i>	no of relapses	mean relapse time, mo	<i>p</i>
	I + II			III		
	Disease stage					

Примечание. p — достоверность различия по сравнению с диплоидными опухолями.

Note. p , significance of difference in comparison with diploid tumors

6-летнего срока наблюдения были живы 7 (21,2%) человек из 33 больных с диплоидными ОМЖ и только 1 (1,4%) из 69 пациентов с анеуплоидными ОМЖ. Промежуточный вариант течения процесса выявлен у больных с тетраплоидными ОМЖ, однако к 4 годам выживаемость достигла общего показателя для анеуплоидных опухолей (7,2%) и составила 4,3%.

В 14 случаях наряду с первичными ОМЖ были изучены метастазы в подмышечные лимфоузлы. Сопоставление популяционной структуры первичных опухолей и метастазов выявило следующее. Изученные ОМЖ в большинстве случаев (10) были многокლოновыми с анеуплоидным компонентом. Метастазы многокლოновых опухолей в 7 из 9 случаев также были многокლოновыми и содержали либо одну из исходных, либо вновь появившуюся гипердиплоидную популяцию. В 3 случаях в метастазах многокლოновых ОМЖ присутствовали моноклоновые анеуплоидные популяции, близкие диплоидным (ИДНК = 1,11–1,16). Метастазы 4 диплоидных или околдиплоидных (ИДНК = 1,11–1,13) моноклоновых ОМЖ в 3 случаях были многокლოновыми и имели в своем составе новые гипердиплоидные популяции (ИДНК = 1,19–1,51). В 1 случае метастазы моноклоновой гипердиплоидной ОМЖ (ИДНК = 1,13) были диплоидными моноклоновыми. Можно думать, что развитие метастазов чаще связано с наличием преобладающей или вновь появившейся анеуплоидной субпопуляции опухолевых клеток.

(fig. 2). There was a considerable difference in progression time between diploid and aneuploid tumors. The 3-year survival of patients with aneuploid BT was 50% versus about 90% for diploid tumors. 6 years were survived by 7 (21.2%) of 33 patients with diploid BT and only 1 (1.4%) of 69 patients with aneuploid BT. Cases with tetraploid BT were an intermediate variant, however, the 4-year survival in these cases reached 4.3% and approached the rate for aneuploid tumors (7.2%).

In 14 cases besides primary tumors we studied axillary lymph node metastases. The comparison of populational composition of primary and metastatic cancer showed the following. Most (10) BT were multiclonal with an aneuploid component. Metastases of multiclonal tumors in 7 of 9 cases were multiclonal too and contained a parental or a newly generated hyperdiploid population. In 3 cases metastases of multiclonal BT contained monoclonal aneuploid populations close to diploid (DNAI=1.11–1.16). Metastases of 4 diploid or close to diploid (DNAI=1.11–1.13) monoclonal BT in 3 cases were multiclonal and had new hyperdiploid populations (DNAI=1.19–1.51). In 1 case metastases of monoclonal hyperdiploid BT (DNAI=1.13) were diploid and monoclonal. This suggests that the metastasis is mainly due to the presence of preexisting or newly generated aneuploid subpopulations of tumor cells.

Проведены анализ и сопоставление гистологической формы ОМЖ, их популяционной структуры и вероятности наступления послеоперационного возврата опухолевого процесса. В табл. 3 представлены данные, относящиеся к гистологическим формам и структуре популяции опухолей. Отмечено преобладание анеуплоидных опухолей среди протоковых (72,1%) и дольковых (57,7%) форм. Ввиду малочисленности иные гистологические формы не рассматривались. Сопоставление с клиническими данными выявило, что частота возврата заболевания в группе диплоидных протоковых ОМЖ составила 15,4%, а в группе анеуплоидных — 46,3%. Сходная картина наблюдалась в случаях дольковых ОМЖ (18,8 и 40,0% соответственно). Приведенные данные показывают, что в прогнозировании послеоперационного течения опухолевого процесса при ОМЖ, вероятно, более значимой является не гистологическая форма новообразования, а ее популяционная структура.

На примере 67 новообразований молочной железы III стадии была сопоставлена популяционная структура ОМЖ с наличием рецепторов стероидных гормонов — эстрогенов (Эр) и прогестерона (Пр). Из табл. 4 видно, что при средней частоте возвратов заболевания 47,8% прогестеронположительные (Пр⁺) опухоли рецидивировали с той же средней частотой (50%). В то же время Эр⁺Пр⁻-опухоли рецидивировали в 16,6%, а Эр⁻Пр⁻-опухоли — в 84,5% случаев. При средней частоте возвратов анеуплоидных ОМЖ 87,5% Эр⁻Пр⁻ ОМЖ рецидивировали в 100% случаев. Во всех указанных случаях возвраты заболевания наступали в более короткие сроки и быстро приводили к гибели больных. Из наблюдения следует, что рецепторотрицательные ОМЖ, как правило, анеуплоидны и в прогностическом отношении являются неблагоприятными. Последнее подтверждает представление об анеуплоидных ОМЖ как малодифференцированных новообразованиях, обладающих высоким потенциалом злокачественности.

С целью оценки методом ДНК-цитометрии эффективности предоперационной химиотерапии при ОМЖ изучали изменение доли ДНК-синтезирующих (S-фазных) клеток в процессе лечения. Больные получали

Таблица 3

Гистологическая форма и структура популяции клеток ОМЖ
BT histology and cell population composition

Гистологическая форма		Число случаев	Структура популяции	
			диплоидная	анеуплоидная
Протоковая	Ductal	93 (69,4)	26 (27,9)	67 (72,1)
Дольковая	Lobular	26 (19,4)	11 (42,3)	15 (57,7)
Тубулярная	Tubular	10 (7,5)	6 (60,0)	4 (40,0)
Медуллярная	Medullar	1 (0,7)	1 —	—
Слизистая	Mucinous	4 (8,0)	2 —	2 —
Итого ...	Total	134	46 (34,3)	88 (65,7)
Histology		No of cases	diploid	aneuploid
			Population composition	

Примечание. В скобках указано процентное соотношение.
Note. Numbers in parentheses represent percentage.

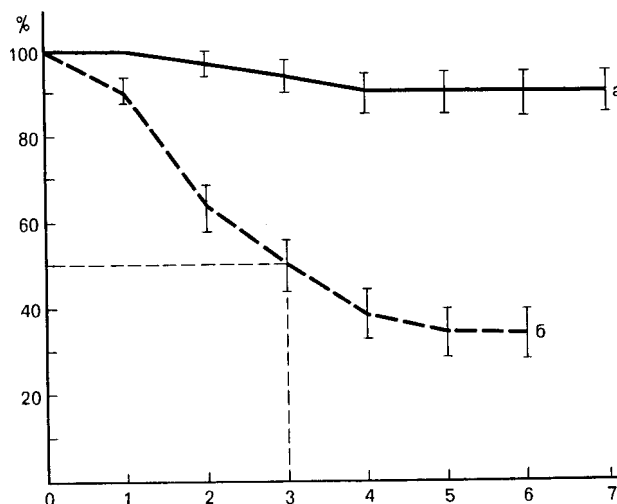


Рис. 2. Выживаемость больных с ОМЖ III стадии.

а — диплоидные опухоли (n = 33), б — анеуплоидные (n = 69). По оси абсцисс — время наблюдения, годы; по оси ординат — выживаемость.

Fig. 2. Survival of patients with stage III BT

a, diploid tumors (n = 33); b, aneuploid tumors (n = 69).

Numbers on the x axis show years of follow-up, numbers on the y axis show percentage of survival.

We performed comparison of BT histology, population composition and probability of disease postoperative recurrence.

Table 3 presents data on tumor histology and population composition. There is a predominance of aneuploid tumors among ductal (72.1%) and lobular (57.7%) forms. Other histological forms were scarce and therefore not considered. The comparison with the clinical data discovered that the recurrence rate of diploid ductal BT was 15.4%, of aneuploid 46.3%. The rates were similar in lobular BT (18.8 and 40.0%, respectively). These data give evidence of the fact that tumor cell population composition is of much greater importance for prognosis of postoperative course than tumor histology.

We analyzed the BT population composition and steroid hormone (estrogen — Er, and progesterone —

Table 3

Таблица 4

Table 4

Рецепторы стероидных гормонов, структура популяции клеток и частота послеоперационных возвратов ОМЖ
 BT steroid hormone receptors, cell population composition and postoperative recurrence rate

Наличие рецепторов стероидных гормонов		Число больных	Количество возвратов заболевания	Из них со следующей популяционной структурой	
				диплоидные	анеуплоидные
Эр ⁺ Пр ⁺	Er ⁺ Pr ⁺	26	13 (50,0)	2 (15,4)	11 (84,6)
Эр ⁺ Пр ⁻	Er ⁺ Pr ⁻	18	3 (16,6)	—	3 (100)
Эр ⁻ Пр ⁺	Er ⁻ Pr ⁺	10	5 (50,0)	2 (40,0)	3 (60,0)
Эр ⁻ Пр ⁻	Er ⁻ Pr ⁻	13	11 (84,5)	—	11 (100)
И т о г о ...	Total	67	32 (47,8)	4 (12,5)	28 (87,5)
Steroid hormone receptor status		No of cases	No of relapses	diploid	aneuploid
				Inclusive of populational composition	

I курс химиотерапии по схеме CMFAV. Материал для исследования брали перед началом курса и во время операции по завершении курса лечения. Доля ДНК-синтезирующих клеток в 46 образцах нормальной ткани молочной железы составила $13,0 \pm 0,85\%$, в ткани 10 фиброаденом — $22,6 \pm 4,6\%$. Среди 19 отобранных нелеченых диплоидных ОМЖ, у которых на ДНК-гистограмме могла быть идентифицирована зона ДНК-синтезирующих клеток, доля S-фазных клеток в среднем составила $30,9 \pm 3,2\%$. При повторном исследовании после успешного по клиническим данным курса лечения у 13 больных доля S-фазных клеток в среднем снизилась на $36,3 \pm 2,7\%$, а число клеток в пресинтетической (GO/1) фазе нарастало. Из числа указанных у 2 больных через 13 и 25 мес наступил возврат заболевания и они погибли через 20 и 36 мес соответственно. Средняя продолжительность жизни больных в этой группе составила около 4 лет, а 4 больных дожили до 6-летнего срока наблюдения. При неэффективном лечении 6 больных доля ДНК-синтезирующих клеток к исходу курса не только не снизилась, но во всех случаях возрастала. Возврат заболевания в указанной группе наступал через 8—18 мес, а средняя продолжительность жизни не превысила 2 лет. Думается, что кинетика изменений доли ДНК-синтезирующих клеток в процессе лечения отражает степень эффективности проводимой противоопухолевой химиотерапии.

Обсуждение. Среди 270 изученных ОМЖ в 30,8% случаев опухоли были диплоидными, в 69,2% — анеуплоидными (среди них 24,1% — тетраплоидными). В 22,2% случаев опухоли были многокловыми. Все 10 изученных фиброаденом были диплоидными. По данным литературы, среди ОМЖ доля анеуплоидных опухолей составляла от 42 до 92%. Указанный размах разные авторы связывают с клинической стадией заболевания, степенью дифференцировки опухолей, возрастом больных, а также со способами приготовления материала для исследования и особенностями используемых приборов и методов математической обработки полученных данных [8, 22].

По нашим наблюдениям, частота послеоперационных возвратов заболевания среди гипердиплоидных и многокловых опухолей была в 1,5—2,5 раза выше, чем среди диплоидных и тетраплоидных. Сроки возвратов заболевания среди гипердиплоидных и много-

Pr) receptor status in 67 specimens of stage III neoplasms.

As is seen in table 4 progesterone receptor positive (Pr⁺) tumors recurred at the same mean frequency (50%) as all BT in general (47.8%). While Er⁺Pr⁻ tumors recurred in 16.6% and Er⁻Pr⁻ tumors in 84.5% of the cases. The mean frequency of recurrence of aneuploid BT being 87.5%, Er⁻Pr⁻ BT recurred in 100% of the cases. In all these cases the recurrence onset was at a shorter time from treatment and resulted in death soon. Receptor-negative BT as a rule were aneuploid and prognostically poor. The last circumstance supports the notion of aneuploid BT being poorly differentiated neoplasms with high potential of malignancy.

To evaluate effectiveness of postoperative chemotherapy for BT we studied the on-treatment changes in the fraction of DNA synthesizing cells (S-phase). The patients received chemotherapy by CMFAV schedule. The specimens studied were taken prior to treatment, intraoperatively and after treatment. The DNA synthesizing cell fraction in 46 specimens of normal breast tissue was $13.0 \pm 0.85\%$, in tissue of 10 fibrous adenomas — $22.6 \pm 4.6\%$. Among 19 untreated diploid BT whose histograms had zones of DNA synthesizing cells the S-phase cell fraction was $30.9 \pm 3.2\%$ on the average. The reexamination after clinically successful treatment discovered that in 13 patients the mean S-phase cell fraction reduced by $36.3 \pm 2.7\%$, while the number of presynthetic (GO/1) phase was increasing. Of these patients 2 developed relapses at 13 and 25 mo and died at 20 and 36 mo, respectively. The mean life time in this group of patients was about 4 years, 4 patients survived 6 years. In 6 non-responders to treatment the DNA synthesizing cell fraction failed to decline by the end of the course and even showed increase in all cases. In this group the recurrence onset was detected at 8—18 mo and the mean life time was less than 2 years. We believe that changes in DNA synthesizing cell fraction during treatment reflect effectiveness of the antitumor chemotherapy undertaken.

Discussion. Among 270 BT studied 30.8% were diploid and 69.2% were aneuploid (inclusive of 24.1% tetraploid tumors). 22.2% of the tumors were multiclonal. All the 10 fibrous adenomas were diploid. By reported data the rate of aneuploid tumors ranges from

клоновых опухолей были в 2—2,5 раза меньше, а продолжительность жизни в 1,5—2 раза короче.

По данным других авторов, полученным на материале более 3 тыс. наблюдений, диплоидные опухоли молочных желез в отличие от анеуплоидных имели более благоприятный прогноз течения заболевания [6, 9, 14, 15, 21]. К исходу 25-летнего наблюдения выживали около половины больных с диплоидными опухолями и только около четверти — с анеуплоидными. Отмечено, что при ИДНК = 1,3 прогноз был значительно лучше, чем при более высокой плоидности [20]. Наиболее неблагоприятное течение заболевания было отмечено при гипертетраплоидных (ИДНК > 2,2) опухолях [15, 20]. В то же время, тетраплоидные опухоли по своему течению были близки диплоидным [4, 6, 19]. Многоклоновые анеуплоидные опухоли при 2-летнем сроке наблюдения имели вдвое худший прогноз по возврату заболевания, чем моноклоновые анеуплоидные [4, 5, 10, 18]. Приведенные наблюдения позволили многим авторам рассматривать плоидность ДНК стволовых клеток опухолей как независимый прогностический признак [13, 21], однако, по мнению других исследователей, величина плоидности ДНК вторична и отражает лишь воздействие внешних по отношению к опухоли условий [6, 16].

По нашим наблюдениям, большинство метастазов в региональные лимфоузлы исходило из многоклоновых анеуплоидных опухолей. Метастазы в большинстве случаев также были многоклоновыми анеуплоидными и содержали аналогичную исходной опухоли или новую гипердиплоидную субпопуляцию. Ряд авторов также отметили различия в клеточном составе исходных опухолей и их метастазов [8, 13]. Указанное явление рассматривается как следствие гетерогенности популяции опухолевых клеток и/или появления новых субпопуляций клеток в процессе прогрессии опухолей. В качестве одного из механизмов появления новых субпопуляций, вероятно, можно принять селекционное давление микро- и макроокружения на базе высокой клеточной гетерогенности.

По нашим данным, характер течения опухолевого процесса при ОМЖ был в большей степени связан со структурой популяции (плоидностью ДНК), чем с гистологическим строением опухолей. Эти данные позволяют ставить вопрос о правомерности популяционной классификации новообразований, дающей возможность более точно предсказать картину развития опухолевого процесса.

Сопоставление ДНК-плоидности изученных нами ОМЖ с наличием у опухолевых клеток рецепторов стероидных гормонов показало, что анеуплоидные опухоли, как правило, были рецептороотрицательными, что связывается с неблагоприятным прогнозом. Данные литературы о связи плоидности с наличием гормональных рецепторов противоречивы [12]. По некоторым публикациям [11], для анеуплоидных опухолей более характерно отсутствие Пр-рецепторов. Отмечен более благоприятный прогноз для больных с диплоидными рецептороотрицательными ОМЖ [3, 11, 17]. Наблюдалась повышенная чувствительность к эндокринной терапии тетраплоидных опухолей в сравне-

42 to 92% of BT. The difference is associated with disease clinical stage, tumor differentiation, patient's age, as well as with specimen preparation techniques and particularly with instruments used and methods of mathematical analysis applied [8, 22].

As we found in our investigation the rate of postoperative recurrence of hyperdiploid and multiclonal tumors was 1.5—2.5-fold greater than that of diploid and tetraploid. The time of recurrence onset among hyperdiploid and multiclonal tumors was 2—2.5-fold and life time 1.5—2-fold as short.

By data of other authors obtained on more than 3 thousand cases diploid BT had a better disease prognosis than aneuploid tumors [6, 9, 14, 15, 21]. About half of patients with diploid tumors and one forth of those with aneuploid BT survived 25 years. Tumors with DNAI=1.3 had a considerably better prognosis than BT with higher ploidy [20]. The disease course was the poorest in hypertetraploid (DNAI > 2.2) tumors [15, 20]. While tetraploid tumors had a course similar to diploid [4, 6, 19]. After a 2-year follow-up multiclonal aneuploid tumors had a two-fold poorer prognosis for recurrence than monoclonal aneuploid BT [4, 5, 10, 18].

These findings compelled many investigators to the conclusion that DNA ploidy of tumor stem cells is a independent prognostic factor [13, 21] while others believe that DNA ploidy is reflection of external influence on the tumor [6, 16].

By our observations most regional lymph node metastases originated from multiclonal aneuploid tumors. The metastases were mostly multiclonal aneuploid and contained a similar to the parental or new hyperdiploid subpopulation. Some authors also note the difference in cellular composition of primary tumors and their metastases [8, 13]. This is considered to be due to heterogeneity of tumor cell population and/or generation of new cellular subpopulations in the course of tumor progression. Selective influence of the micro- and macroenvironment of the tumor with high grade cellular heterogeneity may be a mechanism of generation of new subpopulations.

Our findings show that the course of BT disease is associated with the population composition (DNA ploidy) to a greater degree than with tumor histology. This conclusion suggests the necessity of a population classification of neoplasms that would allow a more accurate prognosis of the disease course.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Басов Б.Н., Добрынин Я.В., Николаева Т.Г. // ЦИФ Гос-ФАП № 5089000111.
2. Богатырев В.Н. // Лаб. дело. — 1989. — № 11. — С. 54—56.
3. Зубрихина Г.Н., Кузьмина З.В., Бассалык Л.С. и др. // Вопр. онкол. — 1989. — Т. 35, № 10. — С. 1179—1186.
4. Николаева Т.Г., Добрынин Я.В., Чиквашвили Б.Ш. // Автоматизация цитологических исследований. — Киев, 1990. — С. 117—119.
5. Николаева Т.Г., Добрынин Я.В., Финько В.Е. и др. // Терапия, диагностика и профилактика опухолей в эксперименте. — М., 1990. — С. 66—70.
6. Beerman H., Kluin M., Van de Velde et al. // New Engl. J. Med. — 1989. — Vol. 321, № 7. — P. 473—474.

нии с другими анеуплоидными новообразованиями [16]. По нашим наблюдениям, наиболее неблагоприятным был прогноз для анеуплоидных рецептороотрицательных ОМЖ. Отмечено также, что динамика изменений доли ДНК-синтезирующих диплоидных опухолевых клеток в ходе противоопухолевой химиотерапии связана с эффективностью проводимого лечения. Успешное медикаментозное лечение, сопровождавшееся снижением доли S-фазных клеток, вдвое увеличивало безрецидивный период и продолжительность жизни оперированных больных с ОМЖ.

Из представленных данных следует, что анеуплоидное (гипердиплоидное) содержание ДНК в клетках ОМЖ и особенно многоклоновый характер популяции опухолевых клеток ухудшают прогноз в отношении возврата опухолевого процесса и срока выживания радикально оперированных больных. Показатель пloidности ДНК (ИДНК) клеток ОМЖ в качестве прогностического критерия, видимо, целесообразно использовать для формирования групп риска для направленного противорецидивного лечения.

© Коллектив авторов, 1994
УДК 618.19-006.6-036.2

В.Ф. Левшин, А.В. Зеленый, П.А. Теленев,
М.В. Исакова, М.Н. Павлова

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ КОЛЬПОЦИТОГРАММ В ГРУППАХ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И КОНТРОЛЯ

НИИ канцерогенеза, Пермский областной онкодиспансер

Рак молочной железы (РМЖ) издавна относят к группе так называемых гормонально зависимых или гормонально обусловленных опухолей. Гипотезы и теории о гормональном генезе РМЖ возникли прежде всего на основании определенной гормональной зависимости самой молочной железы как органа-мишени, в своем развитии и функции контролируемого определенными гормонами. Теория гормонального генеза РМЖ была подкреплена рядом экспериментальных и клинических данных [5], однако до сих пор она остается во многих своих позициях не уточненной и не подтвержденной достаточно убедительными доказательствами. Все это побуждает к новым исследованиям в этом направлении, поиску новых подходов.

Следует отметить, что почти все исследования по изучению роли гормонов в генезе РМЖ основывались на определении уровня тех или иных гормонов и их метаболитов в крови и моче. В то же время, эти показатели могут не отражать истинной биологической активности гормонов на уровне клетки. Последняя мо-

7. Chassevent A., Geslin J., Bertand G. et al. // *Shectra biol.* — 1990. — Vol. 8, № 4. — P. 41—47.
8. Christov K., Milev A., Todorov V. // *Cancer (Philad.)*. — 1989. — № 64. — P. 673—679.
9. Clark G., Dressler L., Owens M. et al. // *New Engl. J. Med.* — 1989. — № 320. — P. 627—633.
10. Del Bino G., Silvestrini R. // *Cell Tissue kinet.* — 1989. — Vol. 22, № 2. — P. 143.
11. Dressler Z., Seamer L., Owens M. // *Cancer (Philad.)*. — 1988. — № 61. — P. 420—427.
12. Dressler L., Gray B., Eudey L. et al. // *Cell Tissue kinet.* — 1990. — Vol. 23, № 4. — P. 362.
13. Hedley D., Rugg C., Gelber R. // *Cancer (Philad.)*. — 1987. — № 47. — P. 4729—4735.
14. Joensuu H., Toikkanen S., Klemi P. // *Ibid.* — 1990. — № 66. — P. 331—340.
15. Kallioniemi O.-P., Blanco G., Alavaiko M. et al. // *Cancer Res.* — 1988. — № 62. — P. 2183—2190.
16. Kute N., Gregory B., Galeshaw J. et al. // *Cytometry.* — 1988. — № 9. — P. 494—498.
17. Kute N., Vuss H., Cocher M. et al. // *Cancer (Philad.)*. — 1990. — № 66. — P. 1810—1816.
18. Owainati A., Robins R., Hinton C. et al. // *Brit. J. Cancer.* — 1987. — № 55. — P. 449—454.
19. Stal O., Wingren S., Carstensen J. et al. // *Europ. J. Cancer Clin. Oncol.* — 1989. — № 25. — P. 301—309.
20. Toikkanen S., Joensuu H., Klemi P. // *Brit. J. Cancer.* — 1989. — № 60. — P. 693—700.
21. Volm M. // *Tumor Diagnostic Therapie.* — 1989. — № 10. — P. 229—232.
22. Winchester D., Duda R., August C. et al. // *Arch. Surg.* — 1990. — № 125. — P. 886—889.

Поступила 29.09.92 / Submitted 29.09.92

V.F. Levshin, A.V. Zeleny, P.A. Telenev,
M.V. Isakova, M.N. Pavlova

COLPOCYTOGRAM COMPARATIVE SRUDY IN BREAST CANCER AND CONTROL GROUPS

Research Institute of Carcinogenesis, Cancer Center of the Perm Region

Breast cancer (BC) is traditionally attributed to hormone-dependant or hormone-specific tumors. The hypotheses and theories of BC hormonal genesis mainly arise from the hormonal dependance of the breast as a target organ whose development and functioning are controlled by certain hormones. The theory of BC hormonal genesis has been supported by experimental and clinical data [5], however it still lacks certainty and needs verification in some aspects. All this necessitates new research and novel approaches.

About all studies of hormone contribution to BC genesis involve determination of various hormones or their metabolites in blood and urine. However, these characteristics do not allow true interpretation of hormonal activity at the cellular level. This activity may depend upon local sensitivity of tissues to hormones and peculiarities of their metabolism in breast tissues and cells rather than upon the hormone level in the blood. Therefore, tests for evaluation of cellular and