

HODGKIN'S DISEASE: A STUDY OF PROGNOSTIC FACTORS IN A RANDOMIZED TRIAL

B. M. Aliev, G. V. Kruglova, N. F. Kondratieva, R. T. Aralbaev, M. M. Kaversneva

For the period 1979—1983 104 patients were treated for Hodgkin's Disease; 60 of them were considered as those, with favorable prognosis and 44 with unfavorable, according to their performance status, including age, stage, histologic type and ESR-test. Patients were randomized into groups either for radiotherapy alone or radiotherapy plus chemotherapy. Both treatment modalities were effected in "non-aggressive" way for favorable group or in "aggressive" way for the group with unfavorable prognosis. Complete remission was obtained in 103 (99 %) of patients. In the favorable and unfavorable groups 5-year survival rate was 98 and 88 % with 80 and 68 % of patients free of disease. Combined treatment versus radiotherapy alone proved to be beneficial in both groups, providing prolongation of disease-free interval: 88 and 61 % ($p < 0.001$). Repeated complete remissions were obtained in 91 % in favorable group versus only 57 % in the group with unfavorable prognosis. The size of lesions or their "biologic activity" are proved to have influence on the rate of recurrence in patients treated with radiation alone.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616-006.441/442-018

Г. Н. Зубрихина, Н. А. Пробатова, Ю. В. Червонобаб, Л. М. Родионова, Е. В. Флейшман, О. В. Чистякова, Р. М. Пропп, И. А. Финогонова

ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ КЛЕТОК ОПУХОЛИ ПРИ ЛИМФОГРАНУЛЕМАТОЗЕ И ЛИМФОСАРКОМЕ

НИИ клинической онкологии, НИИ канцерогенеза

Метод проточной цитометрии (ПЦ), широко используемый для определения плоидности и пролиферативной активности клеток солидных опухолей, применяется в последние годы в оценке прогноза заболевания. По мнению большинства авторов [10, 11], диплоидные опухоли, по распределению ДНК не отличающиеся от распределения ДНК клеток нормальных тканей, имеют лучший прогноз, чем анеуплоидные, в ядрах клеток которых наблюдаются значительные нарушения в содержании ДНК. Диплоидные опухоли составляют, как правило, 25—30 % всех солидных опухолей. Относительно распределения содержания ДНК в клетках при лимфогранулематозе и лимфосаркоме сведений меньше, и они во многом противоречивы [4, 8, 9]. Большинство авторов отмечают, что анеуплоидные опухоли при лимфосаркоме встречаются гораздо реже, чем при солидных опухолях, и прогностическая значимость их недостаточно ясна.

Целью настоящего исследования было изучить распределение клеток опухоли при биопсии лимфатических узлов по плоидности и пролифе-

ративной активности и сопоставить полученные данные с морфологическим вариантом опухоли, длительностью ремиссий и выживаемостью больных.

Материалы и методы. Обследовано 94 больных (50 мужчин и 44 женщины), которым в амбулаторных условиях ВОИ проводилась биопсия [83] лимфатических узлов и биопсии опухоли желудка и кишки во время гастро- и колоноскопии [11]. В 20 наблюдениях выявлена гиперплазия лимфатического узла, в 21 — лимфогранулематоз, в 53 — лимфосаркома.

Гистологический вариант лимфогранулематоза устанавливали в соответствии с классификацией ВОЗ (1976 г.), лимфосаркомы — в соответствии с видоизмененной классификацией ВОЗ [2, 3]. Во всех случаях параллельно с гистологическим исследованием проводили изучение цитологических мазков-отпечатков с опухоли. Материал для исследования забирали в день операции. Кусочки опухоли, предназначенные для исследования методом ПЦ, делили на 2—3 части, делали с каждого контрольные мазки-отпечатки и готовили суспензию клеток [1]. Исследование проводили на проточном цитометре ICP11 (PHUYWE, ФРГ). Использовали фиксированные этанолом клетки с последующей окраской их специфическими для ДНК красителями: этидиумом бромидом и митрамицином в равных объемах. В качестве контроля использовали лимфоциты здоровых лиц (доноров). Опухоль считали диплоидной, если на ДНК-гистограмме определялся один пик (G1), близкий по интенсивности флуоресценции ядрам лимфоцитов, и анеуплоидной, если наряду с пиком диплоидных клеток виден был один или несколько дополнительных пиков [13]. Для характеристики степени анеуплоидии клеток использовали индекс ДНК (ИДНК), который вычисляли как отношение интенсивности флуоресценции анеуплоидных клеток к диплоидным. ИДНК диплоидных клеток принимали за 1, ИДНК анеуплоидных опухолей был больше 1. Пролиферативную активность клеток опухоли оценивали по количеству клеток в S и G2M фазах клеточного цикла и их суммы — индексу пролиферации (ИП). Пролиферативную активность анеуплоидных опухолей определяли, если число анеуплоидных клеток превышало 50 %. Цитогенетическое исследование клеток опухоли проводили с помощью метода дифференциальной окраски хромосом (G-banding method).

Выживаемость и длительность ремиссии производили по методу Life Table (ВОЗ, 1979 г.). Выживаемость больных определяли с момента установления диагноза. Продолжительность полной ремиссии отсчитывали с момента ее констатации, частичной ремиссии — от начала лечения до первых признаков прогрессирования. Для сопоставления кривых выживаемости использовали метод Вилкоксона в модификации для метода Life Table.

Результаты исследования. У больных лимфогранулематозом гистологический вариант опухоли оказался следующим: нодулярный склероз — 8 больных, смешанно-клеточный вариант — 8 и вариант с лимфоидным истощением — 5 больных. Распределение ДНК во всех случаях: как при лимфогранулематозе, так и при гиперплазии лимфоузла — было диплоидным, пролиферативная активность клеток опухолевой ткани различалась незначительно. ИП при гиперплазии составил $10,4 \pm 1,3$ %, при лимфогранулематозе $11,4 \pm 1,1$ %. Число клеток в S-фазе клеточного цикла колебалось от 0 до 15,2 % при лимфогранулематозе и от 0 до 15 % при гиперплазии лимфатического узла и в среднем по группе составля-

Таблица 1

Пролиферативная активность клеток лимфатических узлов при гиперплазии и лимфогранулематозе

Морфологическая характеристика	Число больных	Содержание ДНК (%)			
		G1	S	G2	ИП
Гиперплазия	20	$89,6 \pm 1,3$	$4,8 \pm 0,7$	$5,7 \pm 0,7$	$10,4 \pm 1,3$
Лимфогранулематоз	21	$88,6 \pm 1,1$	$5,2 \pm 0,8$	$6,2 \pm 0,5$ $p > 0,05$	$11,4 \pm 1,1$

Распределение больных лимфосаркомой по стадиям, гистологическому варианту и плоидности опухоли

Таблица 2

Стадия заболевания	Число больных	Пролимфоцитарный вариант			Бластный вариант			
		с круглыми ядрами	с расщепленными ядрами	лимфо-плазмощитартный	микролимфобластный	с извитыми ядрами	макролимфобластный	иммунобластный
I—IIA	27(9)*	5	7(1)	2	1(1)	—	6(4)	6(3)
IIБ—IV	26(7)	7(1)	4(1)	—	2(2)	1	9(2)	3(1)
Всего...	53(16)	12(1)	11(2)	2	3(3)	1	15(6)	9(4)

* В скобках указано число больных с анеуплоидными опухолями.

ло $6,2 \pm 0,5 \%$ и $5,7 \pm 0,7 \%$ соответственно (табл. 1).

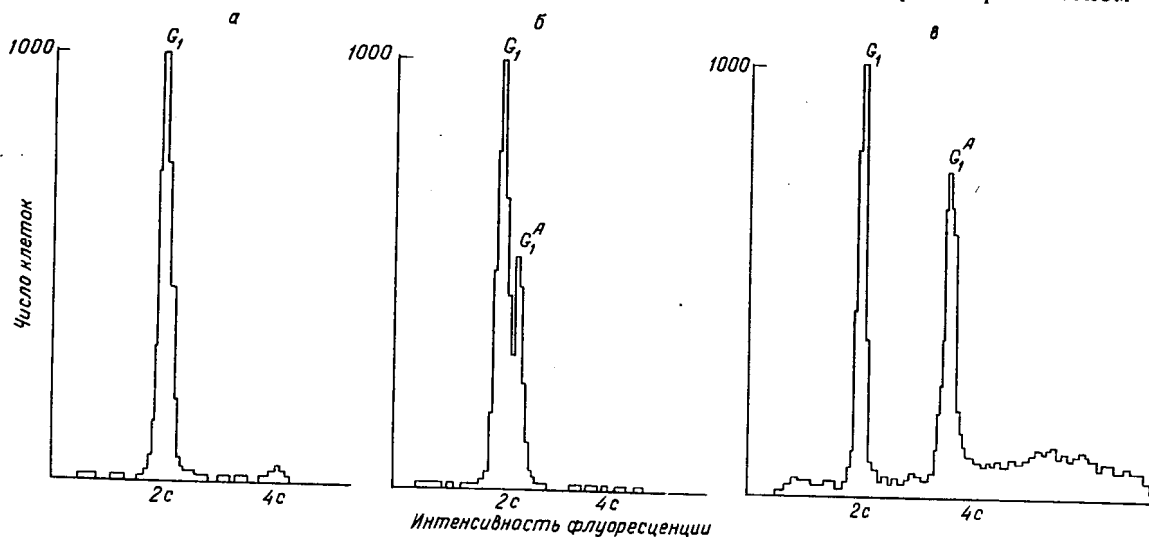
Среди больных лимфосаркомой 25 были с пролимфоцитарным вариантом опухоли (12 — с круглыми ядрами, 11 — с расщепленной формой ядер и 2 — с полиморфно-клеточной лимфоплазмощитартной лимфосаркомой) и 28 — с бластным вариантом: 19 лимфобластным (3 — микролимфобластным, 1 — с извитыми, convoluted, ядрами, 15 — макролимфобластным) и 9 — иммунобластным. Распределение больных лимфосаркомой в зависимости от гистологического варианта, стадии и плоидности опухоли представлено в табл. 2.

У большинства больных (37) опухоли были диплоидными, у 16 (30,2 %) — анеуплоидными. Число анеуплоидных опухолей преобладало при бластном варианте лимфосаркомы (13/28 — 48,4 %) по сравнению с пролимфоцитарным (3/25 — 12 %). В 6 случаях проведено цитогенетическое исследование клеток опухоли: в 3 случаях с бластным вариантом опухоли и в 3 — с пролимфоцитарным при нормальном числе хромосом (46) опухоль была диплоидной. Отклонение в кариотипе с увеличением или уменьшением числа хромосом на одну не улавливалось данным методом, и содержание ДНК расценивалось как диплоидное и было представлено одним пиком клеток на ДНК-гистограммах. И лишь при числе хромосом 49 на ДНК-гистограмме

наряду с диплоидной четко выявлялась линия клеток с околадиплоидным (ИДНК-1,14) значением ДНК (см. рис.). При кариотипе с почти удвоенным числом хромосом ($n=84-85$), ИДНК (1,93) также указывал на околотетраплоидное значение ДНК, близкое к удвоенному (4с).

При пролимфоцитарной лимфосаркоме анеуплоидное распределение ДНК выявлено в 1 случае лимфосаркомы с круглыми ядрами и в 2 — с расщепленной формой ядер. Все случаи [3] пролимфоцитарной лимфосаркомы, при которых выявлено анеуплоидное распределение ДНК, имели свои особенности, главной из которых было наличие бластных форм. В двух из них вариант определялся как пролимфоцитарно-лимфобластный. Число анеуплоидных клеток колебалось от 31,6 до 38,8 %, ИДНК — от 1,2 до 2, т. е. линия анеуплоидных клеток располагалась или вблизи диплоидной линии контрольных лимфоцитов, или приближалась к удвоенному их значению.

При бластных вариантах лимфосаркомы морфологический вариант опухоли, отражающий в какой-то степени размер клеток и ядер (микролимфобластный, макролимфобластный, иммунобластный), не коррелировал с плоидностью опухоли: все случаи (3—100 %) микролимфобластной лимфосаркомы оказались анеуплоидными почти с удвоенным значением ДНК (ИДНК 1,93—2,0), при макролимфобластном варианте



Распределение ДНК в клетках лимфосаркомы при различном числе хромосом.

а — диплоидное распределение ДНК в клетках опухоли при нормальном числе (46) хромосом;
б — анеуплоидное распределение ДНК с околадиплоидным (ИДНК—1,14) расположением клеток опухоли (кариотип 49 хромосом);
в — анеуплоидное распределение ДНК с околотетраплоидным (ИДНК — 1,93) расположением клеток опухоли (кариотип 84—85 хромосом).

Таблица 3

Выживаемость больных пролимфоцитарным и бластным вариантом лимфосаркомы

Морфологический вариант опухоли	Число больных	Выживаемость, %			Медиана, мес
		1 год	3 года	5 лет	
Пролимфоцитарный	25	81,4	81,4	81,4	Не достигнута 33,3
Бластный	28	81,5	44,3	44,3	
		$p^* < 0,001$			
Всего...	53	90,1	61,2	61,2	74,4

* р — бластные варианты по сравнению с пролимфоцитарными.

(75 %) [6] случаев были анеуплоидными (ИДНК 1,14—2,1), тогда как при иммунобластном варианте лишь 44 % [4] оказались анеуплоидными с колебаниями ИДНК от 1,3 до 2,0.

ИДНК анеуплоидных опухолей колебался в широких пределах (1,1—2,1) чаще [7] линия анеуплоидных клеток располагалась в околотетраплоидной области (ИДНК=1,9—2,1).

Число анеуплоидных клеток в анеуплоидных опухолях колебалось в широких пределах (от 21 до 79,4 %), в 6 случаях превышая 50 %, что позволило в этих наблюдениях оценить пролиферативную активность анеуплоидной линии клеток, в 5 случаях оказавшуюся очень высокой: ИП превышал 25 %, число клеток в S-фазе клеточного цикла — 15 %. В одном наблюдении ее можно было оценить как умеренную (число клеток в S-фазе было 12,7 %). В диплоидных опухолях пролиферативная активность клеток была ниже, чем в анеуплоидных, однако в диплоидных опухолях при бластных вариантах лимфосаркомы число клеток в S-фазе клеточного цикла было достоверно выше ($p < 0,01$) в среднем по группе, чем при пролимфоцитарном варианте, и составило $8 \pm 1,4$ % и $4,7 \pm 0,7$ % соответственно. При анализе индивидуальных показателей выявлено, что при бластных вариантах в 4 случаях число клеток в ранней S-фазе клеточного цикла превышало 10 %, тогда как при пролимфоцитарных ни в одном случае не было выше 10 %. Это можно расценить как высокую пролиферативную активность клеток опухоли, однако не исключена возможность наличия при бластных вариантах анеуплоидных клеток, близких по содержанию ДНК к диплоидным. При небольшом их количестве не всегда возможно определить, является ли представленная популяция однородной с большим числом клеток в ранней S-фазе клеточного цикла или состоит из разнородных по содержанию ДНК линий клеток. В некоторых случаях увеличение коэффициента вариации диплоидного пика (cv_1), отражающего его ширину, является косвенным показателем наличия анеуплоидных клеток, и опухоли в таких случаях можно расценивать как анеуплоидные [14]. В наших наблюдениях cv_1 был в пределах 5 %, что соответствует cv_1 нормальных лимфоцитов ($3,93 \pm 0,1$ %). Это не позволило высказаться определенно в пользу наличия анеуплоидных клеток, и опухоли учиты-

вались как диплоидные с большим числом клеток в ранней S-фазе клеточного цикла.

3- и 5-летняя выживаемость и медиана длительности жизни больных бластными вариантами опухоли была достоверно ($p < 0,001$) меньше, чем пролимфоцитарными (табл. 3).

Поскольку анеуплоидные опухоли встречались главным образом при бластных вариантах лимфосаркомы, анализ выживаемости в зависимости от плоидности опухоли проведен только у больных этой группы. В среднем по группе выживаемость больных диплоидными и анеуплоидными опухолями не различалась. 5-летняя выживаемость составила 40,5 и 48,7 %; Ме была равна 36,4 и 35,4 мес соответственно ($p > 0,05$). При IIIБ—IV стадиях заболевания больные с анеуплоидными опухолями жили меньше, чем больные с диплоидными: все больные с анеуплоидными опухолями погибли в течение 3 лет, медиана длительности жизни в этой группе была $21 \pm 5,8$ мес, 3-летняя выживаемость больных с диплоидными опухолями составила 30 %, и Ме оказалась выше ($31,3 \pm 18,4$ мес). Однако различия оказались недостоверными, возможно, из-за малого числа наблюдений.

Длительность безрецидивного периода как среди больных пролимфоцитарным, так и бластным вариантом лимфосаркомы четко коррелировала со стадией процесса внутри каждой группы (табл. 4). При I—IIА стадиях длительность безрецидивного периода у больных пролимфоцитарным и бластным вариантами была одинаковой, при IIIБ—IV стадиях она была достоверно выше у больных пролимфоцитарной лимфосаркомой. Длительность безрецидивного периода у больных с диплоидными опухолями IIIБ—IV стадий процесса была выше, чем у больных с анеуплоидными опухолями тех же стадий, однако статистической достоверности не получено.

Выводы. Изучение содержания ДНК методом проточной цитометрии позволило установить, что во всех случаях лимфогранулематоза (21) и в большинстве случаев (37—69,8 %) лимфосаркомы распределение ДНК было диплоидным и не отличалось от распределения ДНК

Таблица 4

Длительность безрецидивного течения у больных с различными вариантами лимфосаркомы, %

Длительность безрецидивного течения	Пролимфоцитарный вариант		Бластный вариант			
	I—IIА	IIIБ—IV	I—IIА	III—IVБ		
				Все опухоли	Д	А
1 год	92,3	61,3	100	46,7	40,0	60,0
3 года	83,9	38,0	79,2	20,0	30,0	0
5 лет	60,5	7,6	63,6	0	30,0	0
Медиана, мес	Не достигнута	24,6	Не достигнута	11,3	10,0	14,0
	$p' < 0,05$		$p' < 0,05$		$p'' > 0,05$	
Число больных	14	11	13	15	10	5

Примечание. Д — диплоидные опухоли, А — анеуплоидные опухоли, p' — I—IIА стадия по сравнению с IIIБ—IV стадиями, p'' — Д-опухоли по сравнению с А-опухолями.

в клетках лимфатических узлов при гиперплазии. При лимфогранулематозе обнаруживается, как правило, диплоидное распределение ДНК [12, 14], при лимфосаркоме анеуплоидные опухоли встречаются в 15—45 % случаев, по данным разных авторов [19, 20, 21]. В наших исследованиях анеуплоидное распределение ДНК выявлено в 30,2 % случаев, чаще при бластных вариантах (46,4 %), чем при пролимфоцитарных (12 %), т. е. обнаружена связь между морфологическим вариантом опухоли и плоидностью, однако между различными вариантами бластной лимфосаркомы и плоидностью опухоли корреляции не выявлено. На связь между плоидностью, морфологическим вариантом опухоли и иммунологическим типом бластных клеток указывают ряд авторов [17, 20, 21].

Нарушение кариотипа при лимфосаркоме встречалось чаще, чем выявлялось методом ПЦ, анеуплоидия клеток сочеталась с гипердиплоидным кариотипом (>47 хромосом), хотя отдельные авторы описывают наличие анеуплоидии при нормальном числе хромосом [5, 15]. Таким образом, разделение опухолей на диплоидные и анеуплоидные методом ПЦ возможно при значительном изменении в кариотипе, когда число хромосом превышает 47.

Проллиферативная активность анеуплоидных опухолей была выше, чем диплоидных, а среди диплоидных — при бластных вариантах по сравнению с пролимфоцитарными ($p < 0,01$).

Не получено достоверных различий выживаемости больных в зависимости от плоидности опухоли ни в целом по группе, ни по стадиям процесса, хотя больные IIIB—IV стадией заболевания с анеуплоидными опухолями жили несколько меньше, чем в той же стадии с диплоидными опухолями. По данным одних авторов [7, 14, 16], выживаемость больных при неходжкинских лимфомах связана с плоидностью опухоли, по данным же других [6, 17, 18], такой зависимости не обнаружено.

Таким образом, изучение содержания ДНК методом проточной цитометрии позволило установить различный характер распределения ДНК при лимфопролиферативных заболеваниях, выявить относительно большую частоту анеуплоидных опухолей и более высокую их пролиферативную активность при бластных вариантах лимфосаркомы по сравнению с пролимфоцитарными. Установить связь между плоидностью опухоли, выживаемостью больных и длительностью безрецидивного периода болезни не удалось.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зубрихина Г. Н., Соколова И. Н., Чистякова О. В. // Арх. пат.— 1989.— № 8.— С. 16—20.
2. Краевский Н. А., Пробатова Н. А., Ермилова Е. Д. // Арх. пат.— 1980.— № 1.— С. 87—90.
3. Пробатова Н. А. Морфологические варианты лимфосаркомы (дифференциальная диагностика, морфофункциональные критерии, вопросы гистогенеза): Автореф. дисс. ... докт. мед. наук.— М., 1982.
4. Bauer K. D., Merkel D. E., Winter J. N. et al. // Cancer Res.— 1986.— Vol. 46.— P. 3173—3178.
5. Bernheim A., Berger R. // Nouv. rev. franç. Hemat.— 1989.— Vol. 31, № 2.— P. 140—141.
6. Bocking A., Chatelain R., Auffermann W. et al. // Anticancer Res.— 1986.— Vol. 6.— P. 1205—1216.
7. Bunn P. A., Whang-Peng J., Carney D. N. et al. // J. clin. Invest.— 1980.— Vol. 65.— P. 1440—1448.
8. Costa A. // Basic and Applied Histochemistry.— 1981.— Vol. 25.
9. Diamond L. W., Nathwani B. N., Rappaport H. // Cancer.— 1982.— Vol. 50.— P. 1122—1135.
10. Frankfurt O. S., Slocum H. K., Rustum J. M. et al. // Cytometry.— 1984.— Vol. 5.— P. 71—80.
11. Friedlander V., Taylor L., Hedley D., Tattarshall M. // J. clin. Path.— 1984.— Vol. 37.— P. 961—974.
12. Hagemeister F. B., Raber M., Barlogie B. et al. // Proc. Amer. Ass. Cancer Res.— 1981.— Vol. 22.— P. 42.
13. Hiddemann W., Schuman J., Andreef M. et al. // Cytometry.— 1984.— Vol. 5.— P. 445—446.
14. Joensuu H., Soderstrom K., Klemi P., Eerola F. // Cancer.— 1987.— Vol. 60.— P. 3042—3048.
15. Lakkala-Paranko T., Franssila K., Lappalainen K. et al. // Cytometry Suppl.— 1987.— Vol. 1.— P. 388.
16. McLaughlin P., Osborne B., Johnston D. et al. // Cancer Res.— 1988.— Vol. 48.— P. 6614—6619.
17. Morgan D. R., Williamson J. M. S., Quirke P. et al. // Brit. J. Cancer.— 1986.— Vol. 54.— P. 643—649.
18. Roos G., Pige U., Lennert P. et al. // Oncol.— 1985.— Vol. 3.— P. 233—242.
19. Srigley J., Barlogie B., Butler J. J. et al. // Blood.— 1985.— Vol. 65.— P. 1090—1096.
20. Stanley J., Levine A. M., Fisher R. I. et al. // J. clin. Invest.— 1984.— Vol. 73.— P. 1201—1214.
21. Wain S. L., Braylan R. S., Borowitz M. J. // Cancer.— 1987.— Vol. 60.— P. 2403—2411.

Поступила 18.01.90

FLOW CYTOMETRY ANALYSIS OF LYMPHNODE CELLS IN LYMPHOMAS (HODGKIN'S DISEASE AND NON-HODGKIN'S MALIGNANT LYMPHOMA)

G. N. Zubrikhina, N. A. Probatova, Ju. V. Chervonobab, L. M. Rodionova, E. V. Fleishman, O. V. Chistyakova, R. M. Propp, I. A. Finogenova

DNA content by flow cytometric analysis was studied in 94 patients with lymphoproliferative diseases (20 — hyperplasia of lymphnode, 21 — Hodgkin's disease and 53 — non-Hodgkin's malignant lymphoma). DNA distribution was diploid in all cases of hyperplasia and Hodgkin's diseases and didn't differ from DNA distributions in normal tissues. 16 cases (30,2 %) of non-Hodgkin's lymphoma were aneuploid mainly in the cases (13) with blast type of cells. There were blast cells in three cases of prolymphocytic lymphomas with aneuploid DNA distribution patterns. Karyotypically abnormal tumors observed more often than aneuploid tumors. DNA aneuploidy revealed when karyotype has 49 chromosomes. The proliferative activity was higher in aneuploid tumors than in diploid ones and among diploid tumors it was higher in the tumors with blast type of cells. There were no evident associations of the survival and free of disease period with DNA aneuploidy. Patients with aneuploid tumors in IIIB—IV stage of disease appeared to have worse prognosis than with diploid ones in the same stages although this was not statistically significant.

© Л. А. ДУРНОВ, Л. А. МАХОНОВА, 1990

УДК 616-006-053.2-08

Л. А. Дурнов, Л. А. Махонова

СТРАТЕГИЯ ПРОГРАММНОЙ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ У ДЕТЕЙ

НИИ детской онкологии

Злокачественные новообразования у детей отличаются от таковых у взрослых преобладанием сарком, локализацией поражения, быстротой метастазирования и распространением опухолевого роста. Наиболее часто (до 35—40 %) это опухоли лимфоидной клетки и макрофагальной системы, т. е. иммунокомпетентной ткани ребенка.

Учитывая это, можно предполагать, что в этиологии и патогенезе заболевания большое значе-