

Л.С. Болгова  
Т.М. Туганова  
О.І. Алексєєнко  
М.Г. Махортова  
С.Ю. Скляр  
Н.М. Храновська

Інститут онкології  
АМН України, Київ, Україна

**Ключові слова:** рак молочної залози, неoad'ювантна терапія, ефективність, цитоморфологічні, цитогенетичні, молекулярно-біологічні критерії.

## ЕФЕКТИВНІСТЬ НЕОАД'ЮВАНТНОЇ ТЕРАПІЇ ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ЗА ЦИТОЛОГІЧНИМИ, ЦИТОГЕНЕТИЧНИМИ І МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИМИ КРИТЕРІЯМИ

**Резюме.** Проведено цитологічні, цитогенетичні та молекулярно-біологічні дослідження клітин раку молочної залози до і після впливу різних видів неoad'ювантної терапії. Установлено, що рівень девіталізуючих змін клітин раку молочної залози є найбільш високим при внутрішньоартеріальній поліхіміотерапії та при комбінованому і внутрішньовенному (опроміненя, хіміотерапія) лікуванні, децю нижчий — при впливі внутрішньовенної поліхіміотерапії та незначний — після використання променевої терапії.

### ВСТУП

Рак молочної залози (РМЗ) займає перше місце серед злоякісних новоутворень жінок як у багатьох країнах світу, так і в Україні [1, 2]. При цьому у переважній більшості РМЗ виявляють на II–III клінічній стадії. Традиційно перед операцією використовували поліхіміотерапію (ПХТ) і променеву терапію (ПТ) [2]. На сьогодні спектр методів неoad'ювантної терапії (НАТ) значно розширився. Так, застосовують комбінації ПХТ і ПТ або ПХТ, ПТ і гормонотерапії (ГТ). Окремо використовують внутрішньоартеріальну ПХТ (ВАПХТ) або кріотерапію та ін. [2]. Впровадження різних методів НАТ потребує не тільки оцінки суб'єктивних та об'єктивних клінічних проявів, але й вивчення морфологічних особливостей лікувального патоморфозу на різних рівнях тканинної організації.

Результати впливу неoad'ювантної ПХТ чи ПТ на тканину РМЗ досліджувались у поодиноких роботах на гістологічному та цитологічному рівнях [3–5]. Слід підкреслити, що за допомогою цитологічного методу можна визначити кількісні та якісні зміни окремих пухлинних елементів, їх комплексів, дослідити структурні компоненти кожної клітини. Одним із високоспецифічних морфологічних методів є виявлення ядерцевоутворюючих регіонів хромосом (ЯУР) та визначення ступеня їх активності, що безпосередньо пов'язана із структурою та функціональним станом досліджуваних клітин [6–11]. Лише в окремих дослідженнях зроблена спроба вивчення деяких морфофункціональних типів ядерців у клітинах РМЗ і тільки з діагностичною метою [6–8]. Останнім часом усе ширше вивчають молекулярно-біологічні особливості клітин РМЗ, що можна використати для визначення чутливості до лікування на субклітинному рівні [12–14].

Мета роботи — визначення впливу різних методів НАТ на клітини РМЗ за допомогою цитоло-

гічних, цитогенетичних і молекулярно-біологічних досліджень.

### ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Цитоморфологічні зміни клітин РМЗ вивчали за розробленою «Схемою цитологічних ознак для формалізованої оцінки кількісного та якісного складу клітин РМЗ», що включає 76 ознак та їх градацій і враховує стан клітин, їх розміри, тинкторіальні властивості та характеристику ядра, ядерців і цитоплазми. Проводили цитологічні дослідження діагностичних пункційних матеріалів до використання НАТ і операційних — після лікування. Препарати забарвлювали за методом Паппенгейма. Вивчали зміни клітин РМЗ під впливом ПТ у 10 пацієнток, внутрішньовенної (ВВ) ПХТ — у 33, ВАПХТ — у 10 та поєднаної ВВПХТ і ПТ — у 18. У контрольній групі досліджено пункційний та операційний матеріал 17 хворих, які не отримали НАТ. Вік пацієнток коливався від 29 до 83 років. У кожному випадку вивчали усі фонові та клітинні ознаки РМЗ. Підрахунок проводили у 100 клітинах до і після НАТ та визначали відсотковий вміст кожної ознаки. Індекс ефекту встановлювали за відношенням показників в операційному матеріалі до таких — в пункційному [15]. Матеріал усіх хворих верифікований гістологічно, результатами більшості досліджень встановлено інфільтративний залозистий РМЗ.

При ПХТ використовували схему СМФ (циклофосфамід, метотрексат, флуороурацил), рідше — САМФ (циклофосфамід, доксорубіцин, метотрексат, флуороурацил) з інтервалом у 3 тиж від 1 до 6 курсів. ВАПХТ проводили після катетеризації внутрішньої грудної артерії, за схемою СМФ. Опромінення хворих здійснювали у класичному режимі фракціонування дози, сумарно від 36 до 40 Гр на пухлину молочної залози та регіонарні зони метастазування тривалістю 14–21 день.

Цитогенетичні дослідження клітин РМЗ, як і цитоморфологічні, проводили до і після НАТ у цитограмах пункційного і операційного матеріалів відповідно. При цьому вивчали вплив на ЯУР хромосом клітин РМЗ ВВПХТ — у 11 хворих, ВАПХТ — у 4, ПТ — у 3 та поєднаної ВВПХТ і ПТ — у 6. Цитологічні препарати забарвлювали за методом W. M. Howell, D.A. Black [16] з урахуванням рекомендацій Z. Likovsky, K. Smetana [17] та за модифікованим методом сріблення, застосованим при вивченні архівних препаратів [18]. Оцінку ЯУР проводили відповідно до класифікації П.В. Челідзе, О.В. Зацепіної на ультраструктурному рівні [19] та робочої схеми Т.М. Туганової та співавторів [7] на світлооптичному рівні при послідовному 900- і 1440-кратному збільшенні імерсійної системи мікроскопа МБИ-15-2. При цьому вивчено загальний та середній вміст основних морфофункціональних типів ядерців й визначені індекси ефекту НАТ [15].

Молекулярно-біологічні дослідження проведені на клітинах операційного матеріалу 31 хворої (контрольна група) та 28 пацієток після впливу ВВПХТ, 14 — ВАПХТ, 4 — ПТ та 5 — після поєднаної ВВПХТ і ПТ. Вміст ДНК у клітинах РМЗ оцінювали за допомогою проточнофлюороцитометричного методу на приладі FACScan («Becton Dickinson», США) після забарвлення флюорохромом протягом 10 хв (5 мкг/мл пропідію йодиду, 250 мкг/мл рибонуклеази, 0,1% Тритон X-100 у забуференому фізіологічному розчині). Усі реактиви фірми «Sigma Chemical Co», США. При цьому визначали: варіант пухлини за вмістом ДНК (диплоїдний чи анеуплоїдний); індекс ДНК (ІДНК), що характеризує відношення інтенсивності флюоресценції піка анеуплоїдних клітин до диплоїдних в анеуплоїдних пухлинах; вміст анеуплоїдних клітин у пухлині; індекс проліферації (ІП), що розраховують, виходячи з кількості клітин у S-фазі клітинного циклу, та апоптичний індекс (АІ).

Отримані результати досліджень статистично обчислювали з використанням критерію Стьюдента. Різниця середніх величин вважали вірогідними при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При цитологічному дослідженні клітин РМЗ до і після окремо проведених ПТ, ВВПХТ, ВАПХТ та поєднаної ВВПХТ і ПТ визначений ряд цитоморфо-

логічних показників, за якими відзначали переважно статистично вірогідні ( $p \leq 0,05$ ) зміни у цитограмах операційного матеріалу порівняно з пункційним та встановлювали індекси ефекту проведеної НАТ (табл. 1). Відзначено, що за кількістю високих показників індексів ефекту, при порівнянні з контрольною групою, найбільш виразні цитоморфологічні зміни пухлинних елементів РМЗ відзначали при дії поєднаної ВВПХТ і ПТ і ВАПХТ як окремого виду лікування, дещо менші — при ВВПХТ і найменші — при ПТ. Так, при поєднаному впливі ВВПХТ і ПТ відзначали максимальне збільшення кількості поліморфних клітин та пухлинних елементів РМЗ з нормохромними ядрами, рівномірною дрібнозернистою або дрібнобрильчатою структурою хроматину та дрібними ядерцями. Дія неоад'ювантної ВАПХТ характеризувалась максимальним збільшенням кількості клітин РМЗ з великовакуолізованою цитоплазмою та великими ядерцями та найменшою кількістю пухлинних елементів з ядрами, що мали компактну структуру хроматину. Використання ВВПХТ зумовило найбільше зростання кількості клітин РМЗ великих розмірів і з гіпохромними ядрами, а ПТ — збільшення кількості ядер з середніми та великими ядерцями. Отримані показники відображають інтенсивність зазначених змін клітин РМЗ під впливом проведеної терапії і можуть бути використані як цитологічні критерії лікувального патоморфозу НАТ.

Для виявлення деструктивних ознак клітин РМЗ залежно від методу НАТ на субклітинному рівні проведені цитогенетичні дослідження з визначенням морфофункціональних типів ядерців. Встановлено, що загальна кількість ядерців у клітинах РМЗ після різних видів НАТ збільшувалась переважно за рахунок їх неактивних форм (табл. 2). Кількість активних ядерців — компактних і нуклеолонемних — мало значні коливання залежно від методу НАТ. Так, компактні ядерця рідше всього виявляли в ядрах клітин РМЗ після ВАПХТ, а потім їх кількість послідовно збільшувалась при окремому проведенні ПТ, ВВПХТ і поєднаному — ВВПХТ з ПТ. Подібну тенденцію відзначали і щодо нуклеолонемних ядерців. Неактивні кільцеподібні ядерця у найбільшій кількості визначені у клітинах РМЗ після ВАПХТ ( $3,38 \pm 0,04$ ), у вірогідно меншій — після ВВПХТ ( $2,73 \pm 0,03$ ) і виявляли її послідовне зменшення після ПТ ( $2,09 \pm 0,04$ ) і поєднаної ВВПХТ і ПТ ( $1,87 \pm 0,05$ ).

Таблиця 1

Індекси ефекту різних методів НАТ хворих на РМЗ за цитологічними ознаками

Цитологічна ознака		Контроль (n = 17)	Показник індексів ефекту в основних групах хворих				
			ПТ (n = 10)	ВВПХТ (n = 33)	ВАПХТ (n = 10)	ВВПХТ і ПТ (n = 18)	
Клітини	великі	1,07	1,18	1,22	1,21	1,11	
	поліморфні	0,85	1,10	1,15	1,12	1,94	
	з великими вакуолями в цитоплазмі	0,95	1,02	2,84	3,44	1,62	
Ядра	нормохромні	1,32	1,29	1,06	1,19	1,70	
	гіпохромні	1,74	0,58	2,32	1,47	1,95	
	структура хроматину	компактна	0,42	0,75	0,47	0,35	0,47
		рівномірна дрібнобрильчата	1,32	1,33	1,03	1,02	1,63
		рівномірна дрібнозерниста	1,50	1,00	1,76	0,70	1,94
Ядерця	дрібні	1,05	0,60	0,87	0,75	1,26	
	середні	0,86	1,72	1,10	1,40	0,95	
	великі	1,17	1,43	1,90	2,52	0,52	

## ОРИГИНАЛЬНІ ІССЛЕДОВАВАННЯ

Слід зазначити, що число мікроядерць характеризує ступінь некротичних змін у ядрі та яскраво відображає уражуючу дію різних методів лікування. При цьому встановлено, що ядра пухлинних клітин під дією поєднаної ВВПХТ і ПТ, а також ВАПХТ, мають найбільшу кількість мікроядерць ( $13,59 \pm 0,35$  і  $10,20 \pm 0,10$  відповідно), меншу — при окремому використанні ВВПХТ чи ПТ ( $9,92 \pm 0,14$  і  $8,98 \pm 0,17$  відповідно). Індеси ефекту проведеної НАТ високі при поєднаному використанні ВВПХТ і ПТ, а також окремо — ВАПХТ, нижчі — при ВВПХТ і ПТ. Виявлені вірогідні зміни морфофункціонального складу ядерць відповідають інтенсивності впливу різних видів НАТ на проліферативний потенціал клітин РМЗ і на ступінь їх дистрофічних змін.

Результати ДНК-цитофлюорометричних досліджень свідчать, що при неоад'ювантній дії ПТ як окремого виду лікування, так і у поєднанні з ВВПХТ, відзначали тільки диплоїдний варіант пухлин (табл. 3). У пухлинах пацієнток цих двох груп найбільш виражений лікувальний патоморфоз клітин РМЗ після проведення НАТ, що визначено за високими показниками АІ. Крім того, у групі хворих, яким проводили ВВПХТ і ПТ, виявлений найнижчий ІП. Під впливом на РМЗ як ВВПХТ, так і ВАПХТ, у пухлинах з диплоїдним і анеуплоїдним варіантами ДНК відзначено певне зростання проліферативного потенціалу клітин. При цьому відзначали деяке підвищення ІДНК в анеуплоїдних варіантах пухлин. Після використання неоад'ювантної ВВПХТ відзначали підвищення АІ у пухлинах з диплоїдним вмістом ДНК, а після ВАПХТ — з диплоїдним і анеуплоїдним варіантом ДНК, що свідчить про більш високу чутливість клітин РМЗ до передопераційної ВАПХТ, ніж до ВВПХТ. Разом з тим, використання неоад'ювантної ВАПХТ сприяло змен-

шенню кількості випадків з анеуплоїдним варіантом пухлин до 36 проти 48% у контрольній групі. Слід зазначити, що зниження ступеня анеуплоїдності у пухлині є ознакою більш сприятливого прогнозу захворювання, оскільки саме наявність анеуплоїдних клітин визначає прогресуючий характер перебігу пухлинного процесу.

Таким чином, отримані оригінальні морфологічні дані, що вказують на ступінь пошкоджувальної дії НАТ на клітини РМЗ і дозволяють визначити найбільш ефективний спосіб передопераційної терапії.

## ВИСНОВКИ

1. Найбільш інформативні цитологічні ознаки, за якими можна визначити рівень девіталізуючих впливів НАТ на клітини РМЗ, це — великі, поліморфні елементи з великими вакуолями у цитоплазмі; нормо- і гіпохроматоз ядер; компактна, рівномірна дрібнобрильчата чи рівномірна дрібнозерниста структура хроматину, а також наявність і кількість ядерць різних розмірів.

2. За цитоморфологічними і цитогенетичними ознаками виявлено найбільший девіталізуючий ефект від НАТ у хворих, яким проводили ВАПХТ і поєднану ВВПХТ і ПТ.

3. Виявлена загальна закономірність відносно морфофункціональних типів ядерць — кількість високоактивних їх форм зменшується під дією різних видів НАТ, а малоактивних збільшується, що свідчить про зростання дистрофічних змін у клітинах РМЗ і віддзеркалює ефект лікувальної дії.

4. За молекулярно-біологічними показниками найбільш ефективний вплив на клітини РМЗ та більш сприятливий прогноз визначено після неоад'ювантної поєднаної дії ВВПХТ і ПТ.

Таблиця 2

Морфофункціональні типи ядерць та індекси ефекту при різних видах НАТ хворих на РМЗ

Морфофункціональний тип ядерць	Пункційний матеріал n = 24	Операційний матеріал після різних видів НАТ			
		ВВПХТ n = 11	ВАПХТ n = 4	ПТ n = 3	ВВПХТ і ПТ n = 6
Компактні ядерця	0,07 ± 0,01*	0,05 ± 0,01*	0,02 ± 0,01 <sup>1</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>1</sup>	0,06 ± 0,01
		0,71**	0,29	0,42	0,85
Нуклеолонемні ядерця	1,59 ± 0,02	1,87 ± 0,03 <sup>1</sup>	1,40 ± 0,02 <sup>1</sup>	1,79 ± 0,03 <sup>1</sup>	1,28 ± 0,03 <sup>1</sup>
		1,18	0,89	1,13	0,80
Кільцеподібні ядерця	1,82 ± 0,02	2,73 ± 0,03 <sup>1</sup>	3,38 ± 0,04 <sup>1</sup>	2,09 ± 0,04 <sup>1</sup>	1,87 ± 0,05
		1,50	1,86	1,15	1,03
Мікроядерця	7,55 ± 0,13	9,92 ± 0,14 <sup>1</sup>	10,20 ± 0,10 <sup>1</sup>	8,98 ± 0,17 <sup>1</sup>	13,59 ± 0,35 <sup>1</sup>
		1,31	1,35	1,19	1,80
Середнє число ядерць у ядрі	11,03 ± 0,19	14,57 ± 0,20 <sup>1</sup>	15,00 ± 0,20 <sup>1</sup>	12,89 ± 0,31 <sup>1</sup>	16,81 ± 0,19 <sup>1</sup>
		1,32	1,36	1,17	1,52

\*Середня кількість ядерць у ядрі, абсолютні значення; \*\*показники індексів ефекту при зіставленні основних морфофункціональних типів ядерць у пункційному й операційному матеріалі; <sup>1</sup>p < 0,05 порівняно з пункційним матеріалом.

Таблиця 3

Результати проточної цитофлюориметрії клітин РМЗ при різних методах НАТ

Метод неоад'ювантної терапії	Варіант пухлини за вмістом ДНК	Число хворих (%)	Кількість клітин у пухлині (%)		ІП	ІДНК	АІ
			диплоїдні	анеуплоїдні			
Без неоад'ювантної терапії, n = 31	Диплоїдний	52	100,00	—	23,48 ± 4,31	—	25,93 ± 2,99
	Анеуплоїдний	48	54,08 ± 5,91	45,92 ± 5,91	23,96 ± 2,99	1,56 ± 0,12	22,32 ± 2,73
ВВПХТ, n = 28	Диплоїдний	46	100,00	—	28,01 ± 5,36	—	28,92 ± 4,76
	Анеуплоїдний	54	57,78 ± 5,09	42,22 ± 5,09	31,32 ± 4,14	1,82 ± 0,15	22,14 ± 3,05
ВАПХТ, n = 14	Диплоїдний	64	100	—	28,81 ± 5,46	—	30,69 ± 5,47
	Анеуплоїдний	36	50,97 ± 13,25	49,03 ± 13,25	28,55 ± 6,75	1,73 ± 0,12	28,31 ± 6,55
ПТ, n = 4	Диплоїдний	100	100,00	—	29,41 ± 11,49	—	45,25 ± 10,73
	Анеуплоїдний	—	—	—	—	—	—
ВВПХТ і ПТ, n = 5	Диплоїдний	100	100	—	18,89 ± 5,44	—	39,66 ± 16,46
	Анеуплоїдний	—	—	—	—	—	—

## ЛІТЕРАТУРА

1. Федоренко ЗП, Гулак ЛО, Горох ЕЛ та ін. Рак в Україні 2003–2004. Київ, 2005; (6). 97 с.
2. Шалимов СА, Тарутинов ВИ, Литвиненко АА. Рак молочной железы. Укр хімотерапевт журн 1999; (4): 63–70.
3. Галахин КА, Югринов ОГ, Курик ЕГ и др. Химиотерапевтический патоморфоз злокачественных опухолей. Укр хімотерапевт журн 2000; (4): 8–12.
4. Заридзе МВ, Герсамия РК, Буркадзе РМ. Возможные критерии оценки постхимиотерапевтического патоморфоза при инфильтративном раке молочной железы. *Georg Med News* 2002; (3): 34–7.
5. Страхова ТН, Чтириди НГ, Богатырев ВН. Количественная оценка цитоморфологических изменений у больных раком молочной железы до и после лучевой терапии. В: Тр III республиканского съезда врачей-лаборантов БССР. Минск, 1986: 193–4.
6. Лебекова ЖТ, Шибанова АИ. Определение активности ядрышко-организующих зон в дифференциальной диагностике заболеваний молочной железы. *Новости клин цитол России* 2000; 4 (3–4): 90–2.
7. Туганова ТН, Болгова ЛС, Махортова МГ, Алексеенко ОИ. Морфофункциональные типы ядрышек в цитологической диагностике фиброаденом и рака молочной железы. *Новости клин цитол России* 2004; 8 (1–2): 27–30.
8. Туганова ТН, Болгова ЛС, Алексеенко ОИ, Махортова МГ. Качественные и структурные особенности проявления ядрышкообразующих регионов хромосом в клетках рака молочной железы. *Цитол и генет* 2005; 39 (4): 57–63.
9. Упоров АВ, Цирлина ЕВ, Пожариский КМ. Сравнительное изучение пролиферации (по выявлению антигена Ki-67) и активности ядрышковых организаторов клеток рака молочной железы. *Вопр онкологии* 1998; 44 (3): 316–24.
10. Guski H, Hufnagl P, Kaufmann O, et al. AgNOR analysis of atypical ductal hyperplasia and intraductal carcinoma of the breast. *Anal Quant Cytol Histol* 2000; 22 (3): 206–12.
11. Ceccarelli C, Trere D, Santini D, et al. AgNORs in breast tumors. *Micron* 2000; 31 (2): 143.
12. Абраменко ИВ, Фильченков АА. Прогностическое значение апоптического и пролиферативного индексов при солидных новообразованиях. *Онкология* 2002; 4 (3): 165–70.
13. Степанова ЕВ, Загрекова ЕИ, Ермилова ВД и др. Молекулярно-биологические маркеры как факторы прогноза при раке молочной железы I–IIА стадии. *Архив патол* 2003; 65 (3): 14–8.
14. Bagwell CB, Clark GM, Spyrtos F, et al. Optimizing flow cytometric DNA ploidy and S-phase fraction as independent pro-

gnostic markers for node-negative breast cancer specimens. *Cytometry* 2001; 46 (3): 121–35.

15. Лушников ЕФ. Лучевой патоморфоз опухолей человека. Москва: Медицина, 1977: 97.

16. Howell WM, Black DA. Controlled silver staining of nucleolar regions with protective colloidal developer: a one step method. *Experientia* 1980; 36: 1014–5.

17. Likovsky Z, Smetana K. Further studies on the cytochemistry of the standardized silver staining of interphase nucleoli in smear preparation of Yoshida ascitic sarcoma cells in rats. *Histochemistry* 1981; 72 (2): 301–13.

18. Болгова ЛС, Туганова ТН, Кузина ИС. Модификация окраски по Howell W., Black D. на выявление ядрышкообразующих регионов хромосом при лимфопролиферативных заболеваниях. N Д-26735. Рукопись депонирована в ГЦНМБ (Россия) 20.04.01.

19. Челидзе ПВ, Зацепина ОВ. Морфофункциональная классификация ядрышек. *Успехи современ биол* 1988; 105 (2): 252–68.

#### EFFICACY OF NEOADJUVANT THERAPY OF BREAST CANCER PATIENTS ON CYTOLOGICAL, CYTOGENETIC AND MOLECULAR-BIOLOGICAL CRITERIA

L.S. Bolgova, T.M. Tuganova, O.I. Alexeyenko, M.G. Makhortova, S.Y. Sklyar, N.M. Khranovskaya

**Summary.** *Cytological, cytogenetic and molecular-biological examinations of breast cancer cells prior to and after various methods of neoadjuvant therapy have been performed. Devitalizing changes of breast cancer cells are shown to be the highest after intra-arterial polychemotherapy and combination of radio- and intravenous polychemotherapy, somewhat lower — after intravenous polychemotherapy and insignificant — after radiotherapy.*

**Key Words:** breast cancer, neoadjuvant therapy, efficacy, cytomorphological, cytogenetic, molecular-biologic features.

#### Адреса для листування:

Болгова Л.С.  
03022, Київ, вул. Ломоносова, 33/43  
Інститут онкології АМН України