

Оксана Андреевна Богомолова¹, Николай Николаевич Тупицын²,
Валерий Витальевич Родионов³, Влада Владимировна Кометова⁴,
Мария Валерьевна Родионова⁵

ИММУНОЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ОБНАРУЖЕНИЯ ДИССЕМИНИРОВАННЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В КОСТНОМ МОЗГЕ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹ Аспирант, кафедра онкологии и лучевой диагностики Ульяновского государственного университета
(432017, РФ, г. Ульяновск, ул. Льва Толстого, г. 42)

² Д. м. н., профессор, заведующий, лаборатория иммунологии гемопоэза НИИ клинической онкологии
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

³ Д. м. н., профессор, заведующий, кафедра онкологии и лучевой диагностики Ульяновского государственного
университета (432017, РФ, г. Ульяновск, ул. Льва Толстого, г. 42)

⁴ К. м. н., врач, отделение патологической анатомии Областного клинического онкологического диспансера
(432063, РФ, г. Ульяновск, ул. 12 Сентября, г. 90)

⁵ Аспирант, хирургическое отделение № 5 НИИ клинической онкологии
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

Адрес для переписки: 432063, РФ, г. Ульяновск, ул. Кирова, д. 50, кв. 55,
Богомолова Оксана Андреевна; e-mail: oxana.bogomolova@gmail.com

В исследование включены 50 больных раком молочной железы I—IV стадии. Костный мозг изучали как стандартными морфологическими методами, так и с помощью проточной цитометрии с применением моноклональных антител к ЕрСАМ (CD326). Предварительно проведено иммуномагнитное обогащение клеток, связывающих антитела к ЕрСАМ. За пороговый диагностический уровень принято считать обнаружение 1 опухолевой клетки среди 1 млн миелокариоцитов. При цитологическом и гистологическом исследованиях метастазы в костном мозге выявлены у 1 (2%) и 2 (4%) пациенток соответственно. Методом проточной цитометрии подтвердилось поражение костного мозга в обоих случаях. Метод значительно увеличил частоту выявления микрометастазов и диссеминированных опухолевых клеток: они были обнаружены у 11 (22%) из 50 пациенток. По нашему мнению, проточная цитометрия с предварительным иммуномагнитным обогащением клеток с применением моноклональных антител к ЕрСАМ (CD326) может быть методом выбора для выявления диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге.

Ключевые слова: рак молочной железы, диссеминированные опухолевые клетки в костном мозге, микрометастазы, проточная цитометрия.

Диагностика гематогенного распространения эпителиальных опухолей на ранних стадиях — одна из главных проблем онкологии. Единичные разрозненные опухолевые клетки морфологически не определяются — для этого требуется применение высокочувствительных иммунологических методов. К таким методам в настоящее время относятся иммуноцитологические (иммуноцитохимический, проточная цитометрия) и молекулярно-биологические (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией) методы. В клинической практике пока не найдены методы обнаружения микрометастазов. Методы исследования костного мозга (КМ) нуждаются в дальнейшем развитии. Однако накапливаются данные

о том, что количественное определение и характеристика диссеминированных опухолевых клеток (ДОК) позволяют получить важную прогностическую информацию и проводить мониторинг эффективности терапии. Стандартизация методов исследования и обеспечение их приемлемой чувствительности и специфичности позволит сделать еще один шаг к индивидуализации антиметастатической терапии [1; 2].

Целью настоящей работы явилось установление степени гематогенной диссеминации рака молочной железы (РМЖ) на основании обнаружения ДОК высокочувствительным иммуноцитологическим методом с применением моноклональных антител к эпителиальным антигенам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы материалы клинического, морфологического и иммуноцитологического обследо-

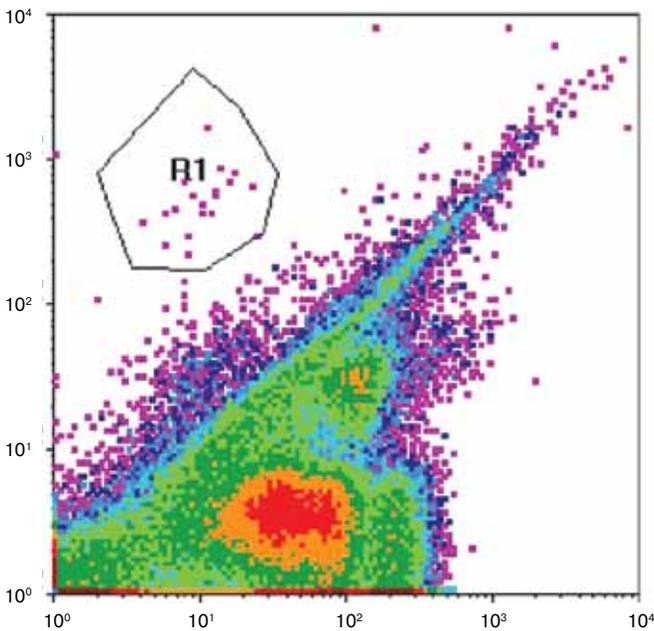


Рисунок 2. Цитограмма больной Б., 74 лет, с РМЖ IIВ стадии с микрометастазом в КМ, выявленным методом проточной цитометрии. R1 — «кластер» из 20 CD45-негативных клеток (ось абсцисс), положительных в реакции с антителами к EpCAM (CD326) (ось ординат). По оси абсцисс — уровни экспрессии лейкоцитарного антигена CD45. По оси ординат — уровни экспрессии эпителиального антигена EpCAM.

В нашем исследовании морфологические варианты РМЖ не влияли на диагностику ДОК в КМ: частота выявления ДОК при инфильтративном дольковом раке составила 40%, при инфильтративном протоковом раке — 27,8%, при инфильтративном смешанном раке — 13,3%, при других формах рака ДОК не были выявлены.

Статистически значимой связи между частотой выявления ДОК и размером, степенью злокачественности, рецепторным статусом, уровнем экспрессии HER2/печ, индексом пролиферации Ki-67, воспалительной инфильтрацией и лимфоваскулярной инвазией первичной опухоли не выявлено. Кроме того, отсутствовала связь между микрометастазированием РМЖ в КМ и статусом регионарных лимфатических узлов. По данным однофакторного дисперсионного анализа ANOVA, статистически значимая корреляция обнаружения ДОК выявлена только для такого фактора прогноза, как суммарный балл злокачественности — СБЗ первичной опухоли ($p = 0,009$) (рис. 3).

СБЗ — интегральный морфологический прогностический индекс для оценки прогноза эпителиальных злокачественных опухолей. Он оценивается в баллах и складывается из следующих показателей: степень дифференцировки опухоли — наличие в опухолевой ткани структур с отчетливым просветом (1—3 балла); полиморфизм опухолевых клеток (1—3 балла); митотическая активность опухолевых клеток (1—3 балла); инфильтративный компонент (1—5 баллов); лимфоидная инфильтрация стромы опухолевого узла (0—3 балла); опухолевые эмболы в сосудах стромы (0—3 балла). СБЗ колеблется в пределах от 6 до 20 баллов. В зависимости

от СБЗ все опухоли можно разделить на 4 группы с различным прогнозом заболевания. Этот индекс разработан ульяновскими патоморфологами в 2009 г. и указывается ими в гистологическом заключении [3].

Полагая, что обнаружение одной изолированной опухолевой клетки может быть диагностически незначимым, ряд исследователей попытались количественно определить «критическую» опухолевую нагрузку, превышение которой было бы достоверно связано с увеличением частоты рецидива заболевания. Показано, что количество рецидивов РМЖ резко возрастает при обнаружении в КМ 10 или 15 изолированных опухолевых клеток [4]. В нашем исследовании не прослежена общая и безрецидивная выживаемость в связи с небольшим сроком от начала исследования. Однако 3 больные РМЖ IV стадии, у которых были выявлены микрометастазы в КМ, умерли от прогрессирования заболевания в течение 1—12 мес с момента постановки диагноза.

Нами проанализированы миелограммы 50 больных РМЖ. У одной больной с метастазами РМЖ в КМ, обнаруженными обоими морфологическими методами, количество миелокариоцитов было снижено ($40\ 000\ \text{мкл}^{-1}$ при норме $41\ 600\text{—}195\ 000\ \text{мкл}^{-1}$), гранулоцитарный и эритроидный ростки были относительно сохранены, но среди клеток красного ряда преобладали оксифильные формы (8,6% при норме 0,8—5,6%), отмечено увеличение количества моноцитов (4,2% при норме 0,7—3,1%). У другой пациентки с метастазами РМЖ в КМ в миелограмме обнаружены следующие отклонения: сужение гранулоцитарного роста за счет зрелых форм нейтрофилов, некоторое расширение эритроидного роста за счет оксифильных форм нормобластов (17,2% при норме 0,8—5,6%), снижение, соответственно, лейкоэритробластического отношения (1,2 при норме 2,1—4,5), увеличение количества лимфоцитов (22,8% при норме 4,3—13,7%).

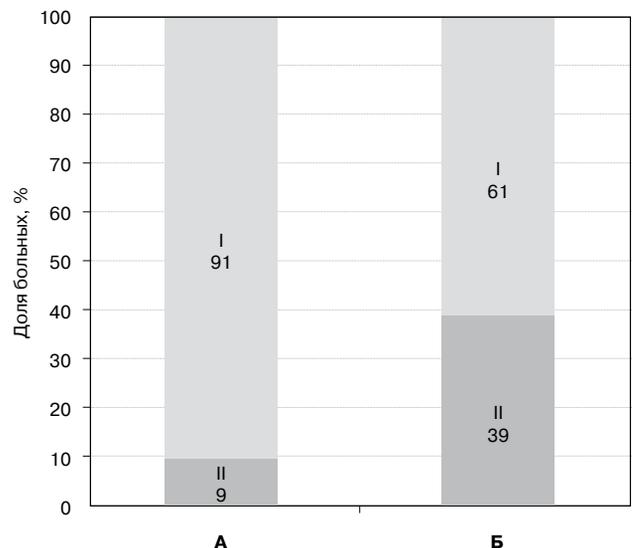


Рисунок 3. Распределение больных РМЖ в зависимости от СБЗ первичной опухоли и выявления ДОК в КМ. I — больные без ДОК в КМ; II — больные с ДОК в КМ. А. СБЗ 1—2. Б. СБЗ 3—4.

В работе О. В. Крохиной и соавт. [5] сделано предположение, что к наиболее ранним проявлениям реакции КМ на наличие отдельных опухолевых клеток можно отнести следующие изменения кроветворения по данным миелограмм: гипоклеточность КМ, скопления плазматических клеток, обнаружение крупных клеток с гиперхромным ядром и множественными нуклеолами, повышение лейкоэритробластического отношения, увеличение среднего количества моноцитов и лимфоцитов [5].

При проведении анализа миелограмм выявлено, что в группе больных с микрометастазами снижение клеточности КМ отмечалось чаще (36,4%), чем у пациентов без метастатического поражения (25,6%; $p > 0,05$). Содержание лимфоцитов в КМ у больных с микрометастазами было достоверно выше, чем в отсутствие опухолевого поражения КМ ($63,6 \pm 0,5$ и $30,8 \pm 0,47\%$ соответственно; $p = 0,048$). Не исключено, однако, что увеличение количества лимфоцитов было относительным. Обнаружено снижение лейкоэритробластического отношения в группе пациенток с микрометастазами по сравнению с таковым у больных без микрометастазов, но различие статистически незначимо. Увеличение содержания моноцитов чаще наблюдалось в группе больных без микрометастазов (53,8 и 18,2% соответственно).

В анализах периферической крови не обнаружено статистически значимых различий содержания эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов и гемоглобина, а также различий других показателей в зависимости от наличия или отсутствия ДОК в КМ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проточная цитометрия может быть методом выбора для оценки ДОК в КМ после иммуномагнитного обогащения опухолевых клеток с применением моноклональных антител к ЕрСАМ (CD326). В то же время обнаружение малого количества опухолевых клеток при проточной цитометрии сложно трактовать в случаях, когда опухолевые клетки не формируют четкого кластера. При об-

наружении такого кластера микрометастазы могут быть констатированы даже при наличии менее 1 опухолевой клетки на 1 млн миелокариоцитов. Остается неясным, какова «критическая» опухолевая нагрузка КМ, превышение которой было бы связано с ростом частоты рецидива заболевания. На основании анализа миелограмм не удалось выявить косвенные признаки наличия единичных опухолевых клеток РМЖ.

Представленные нами данные демонстрируют необходимость внедрения в клиническую практику иммунологического исследования КМ, особенно на ранних стадиях РМЖ, для оценки распространенности опухолевого процесса и индивидуализации лечения.

Работа поддержана государственным заданием Минобрнауки РФ. Шифр государственного задания 4. 1219. 201.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alix-Panabieres C., Pantel K. Detection and characterization of disseminating cancer cells in patients with epithelial solid malignancies // *Haematopoiesis Immunol.* — 2012. — Vol. 10, N 1. — P. 79–93.
2. Tupitsyn N. N. Hematogenously disseminating operable cancer as a principal problem of oncology. Immunological tumor staging // *Haematopoiesis Immunol.* — 2007. — Vol. 4, N 2. — P. 7–13.
3. Занкин В. В., Кометова В. В., Лазаревский М. М. Гистологическая степень злокачественности эпителиальных опухолей как фактор прогноза рецидивирования и метастазирования после радикального лечения (взгляд патоморфолога на клинические проблемы) // *Матер. VI Рос. науч.-практ. конф. «Модниковские чтения», г. Ульяновск, 22–23 окт. 2009 г.* — С. 48–50.
4. Calaluce R., Miedema B., Yesus Y. Micrometastasis in colorectal carcinoma: A review // *J. Surg. Oncol.* — 1998. — Vol. 67, N 3. — P. 194–202.
5. Immunocytological diagnosis of micrometastatic bone marrow involvement in patients with breast cancer / Krokhina O. V., Letyagin V. P., Tupitsyn N. N., Blindar V. N., Ermilova V. D. // *Haematopoiesis Immunol.* — 2007. — Vol. 4, N 2. — P. 117–131.

Поступила 22.12.2013

*Oxana Andreyevna Bogomolova¹, Nikolay Nikolayevich Tupitsyn²,
Valery Vitalyevich Rodionov³, Vlada Vladimirovna Kometova⁴,
Maria Valeryevna Rodionova⁵*

IMMUNOCYTOLOGICAL DETECTION OF DISSEMINATED TUMOR CELLS IN BONE MARROW OF BREAST CANCER PATIENTS

¹ MD, Postgraduate Student, Chair of Oncology and Radiation Diagnosis, Ulyanovsk State University
(42, ul. Lva Tolstogo, Ulyanovsk, RF, 432017)

² MD, PhD, DSc, Professor, Head, Haematopoiesis Immunology Laboratory, Clinical Oncology Research Institute,
N. N. Blokhin Cancer Research Center RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

³ MD, PhD, DSc, Professor, Head, Chair of Oncology and Radiation Diagnosis, Ulyanovsk State University
(42, ul. Lva Tolstogo, Ulyanovsk, RF, 432017)

⁴ MD, PhD, Physician, Patomorphology Department, Regional Clinical Cancer Center
(90, ul. 12 Sentyabrya, Ulyanovsk, RF, 432063)

⁵ MD, Postgraduate Student, Surgical Department No. 5, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin Cancer
Research Center RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

Address for correspondence: Bogomolova Oksana Andreyevna, app. 55, bld. 50, ul. Kirova,
Ulyanovsk, RF, 432063; e-mail: oxana.bogomolova@gmail.com

The study was performed in 50 patients with I—IV stage breast cancer. Bone marrow assessment was made prior to treatment by standard morphological methods and flow cytometry using monoclonal anti-EpCAM antibodies (CD326). Flow cytometry was conducted after immunomagnetic enrichment of cells with anti-EpCAM antibodies. The presence of one or more disseminated tumor cells per 10⁶ myelokaryocytes was established as threshold level. Standard cytological and histological study discovered bone marrow metastases in 1 (2.0%) and 2 (4.0%) of 50 patients, respectively. Flow cytometry confirmed bone marrow involvement in both cases and significantly improved detection rate of micrometastases and disseminated tumor cells to a total of 11 patients (22.0%). In our opinion flow cytometry is the method of choice for disseminated tumor cell measurement after immunomagnetic enrichment with anti-EpCAM antibodies, especially in patients with early stage breast cancer for assessment of disease advance and personalization of treatment.

Key words: breast cancer, disseminated tumor cells in bone marrow, micrometastases, flow cytometry.