

ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА МИКРОМЕТАСТАЗОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В КОСТНЫЙ МОЗГ

О.В. Крохина, В.П. Летягин, Н.Н. Тупицын, В.Н. Блиндарь, А.Д. Зикиряходжаев
ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

Рак молочной железы (РМЖ) — одно из самых распространенных онкологических заболеваний у женщин. Согласно Б. Фишеру, РМЖ является системным заболеванием, и даже при клинически ранних стадиях ($T_1\text{--}T_2N_0M_0$) высока вероятность скрытой системной диссеминации опухолевого процесса [11].

В связи с многочисленными трудностями в оценке прогноза и выборе адекватной тактики лечения злокачественных новообразований одной из актуальных проблем современной онкологии стали поиск новых методов диагностики и определения стадии опухоли, а также оценка противоопухолевого иммунитета.

Обнаружение малых количеств метастатических клеток (микрометастазов) в костном мозге больных РМЖ служит показателем гематогенной диссеминации процесса и многими учеными расценивается как неблагоприятный признак, свидетельствующий о дальнейшем формировании метастазов, прежде всего в кости (Harbeck N. и соавт., 1994; Braun S., Pantel K., 2001).

Для обнаружения единичных опухолевых клеток обычных диагностических методов недостаточно. Гистологический и цитологический методы исследования выявляют злокачественные клетки в костном мозге при их достаточно большом количестве, вследствие чего обнаружение метастазов становится возможным лишь на поздних стадиях РМЖ. При гистологическом исследовании возможно выявление 1 опухолевой клетки среди 100 миелокариоцитов (Sloane J., Ormerod M., 1980; Берензон Д.Г. и соавт., 2000).

Реальное представление о степени распространенности процесса дают результаты иммуноморфологического исследования. Используя иммуноцитологический метод с применением моноклональных антител (МКА) к антигенам, экспрессируемым клетками эпителиальных опухолей и нехарактерным для гемопоэтической ткани, можно обнаружить 1 опухолевую клетку среди 1 млн миелокариоцитов.

На клетках РМЖ почти в 100% случаев экспрессированы эпителиальный мембранный антиген (ЕМА), цитокератины (СК), туморассоциированный гликопротеин (TAG-12), антиген мембран жировых глобул женского молока (НМФГ-1), панэпителиальный антиген (ЕРР-34), реже — раково-эмбриональный антиген (РЭА) и ряд других.

Развитие иммуноцитологии привело к появлению МКА к данным антигенам и открыло новые диагностические возможности для выявления единич-

ных опухолевых клеток в лимфатических узлах, костном мозге, периферической крови. Полученные МКА обладают разной чувствительностью и специфичностью. Известно, что муциноподобный раковый антиген (МСА) экспрессируется клетками гемопоэза, МКА к ЕМА перекрестно реагируют с лимфоидными клетками костного мозга (Delsol G. и соавт., 1984; Heyderman E., Macartney J., 1985). По мнению W. Janni и соавт. (2000), современным стандартом для обнаружения микрометастазов РМЖ в костный мозг являются антитела к цитокератинам.

МКА САМ 5.2 взаимодействуют с цитокератинами 7 и 8 (Cooper D. и соавт., 1985; Smedts F., 1990), а МКА к панцитокератинам KL-1 распознают цитокератины 2, 6, 8, 10, 11, 18, 19 и в меньшей степени — 5, 14, 15.

Таким образом, представлялось актуальным изучить степень диссеминации РМЖ на основании выявления микрометастазов в костный мозг, оценить эффективность различных методов диагностики метастатического поражения костного мозга, определить различия между макро- и микрометастазами, сопоставить результаты иммуноцитологического метода с другими показателями распространенности процесса, проанализировать изменения в системе кроветворения при метастатическом поражении костного мозга.

Целью настоящей работы было определение степени гематогенной диссеминации РМЖ на основании обнаружения метастатического поражения костного мозга высокочувствительными иммуноцитологическими методами с применением МКА к эпителиальным антигенам.

Материалом для исследования послужили данные клинического, морфологического и иммуноцитологического обследования 53 больных РМЖ (в I—IV стадии), находившихся на лечении в хирургическом отделении опухолей молочных желез РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в 1999—2001 гг. В исследуемую группу вошли женщины в возрасте от 27 до 72 лет.

Распространенность процесса оценивали в соответствии с Международной классификацией злокачественных опухолей по системе TNM, а также клинической классификацией по стадиям (Иллюстрированное руководство по TNM, Атлас классификации злокачественных опухолей, 1998). У большинства больных была IIIb стадия (28,3%), на 2-м месте по частоте были больные с IIa стадией (22,6%). IIb стадия установлена в 18,9% случаев, IV стадия —

в 15,1%, I стадия — в 9,4%. Наименьшее число больных было в IIIa стадии (5,7%).

В репродуктивном возрасте находились 23 (43,4%) пациентки, в состоянии перименопаузы — 8 (15,1%), в менопаузе — 22 (41,5%).

Наиболее частым гистологическим вариантом был инфильтративный протоковый рак (39,6%). Отмечена достаточно высокая частота инфильтративного долькового рака (32,1%). Остальные гистологические формы (смешанный, тубулярный, медулярный, слизистый и папиллярный рак) встречались реже.

При морфологическом исследовании у всех пациенток было дано детальное описание тканей, окружающих опухоль и регионарный лимфатический аппарат, определены инвазия опухолевых клеток в лимфатические сосуды, наличие круглоклеточной инфильтрации, очагов некроза в опухоли. Степень злокачественности опухоли оценена у 39 больных. В большинстве случаев (74,4%) обнаружена II степень злокачественности, реже — III степень (23,1%) и лишь в 2,5% случаев отмечена I степень злокачественности.

Степень дифференцировки опухоли оценена у 51 больной при цитологическом исследовании пунктата. Высокодифференцированный рак установлен у 4 (7,8%) больных, умереннодифференцированный — у 31 (60,8%), низкодифференцированный — у 16 (31,4%).

В зависимости от стадии заболевания больным проводились различные методы комплексного, комбинированного, хирургического лечения. Оперативное вмешательство выполнено 47 пациенткам: 37 (69,8%) — радикальная мастэктомия с сохранением обеих грудных мышц, 8 (15,1%) — радикальная резекция молочной железы, 2 (3,8%) — двусторонняя радикальная мастэктомия. У 6 (11,3%) пациенток хирургического лечения не было (5 женщин получили консервативную терапию, 1 отказалась от оперативного вмешательства).

Неoadъювантная терапия проведена 14 (26,4%) больным, из них у 13 в предоперационном периоде применялась химиолучевая терапия, у 1 — только химиотерапия. Адъювантная терапия выполнена 43 (81,1%) больным. В послеоперационном периоде проводились химиотерапия (34%), гормонотерапия (11,3%), лучевая терапия (7,6%) и их сочетания.

Клетки костного мозга получали при пункции, которая выполнялась всем 53 больным до начала лечения (хирургического, неoadъювантного, консервативного).

Пункцию осуществляли в области грудины (стернальная пункция). В отдельных случаях проводили одномоментную пункцию грудины и гребня подвздошной кости.

Исследование костного мозга выполняли как стандартным цитологическим методом, так и иммуноцитологическим: реакция иммунофлюоресценции с применением МКА к цитокератинам CAM 5.2 («Becton Dickinson», США) и KL-1 («Immunotech», Франция). Положительной считали реакцию при

наличии 1 метастатической клетки среди 1 млн миелокариоцитов. При использовании МКА к цитокератинам метастатические клетки легко обнаруживаются среди миелокариоцитов по наличию яркого специфического цитоплазматического флюоресцентного свечения. Подсчет клеток миелограммы и их анализ выполнен в клинической лаборатории.

Метастазы, выявляемые при цитологическом исследовании костного мозга, обозначались как макromетастазы. Термин «микromетастазы» использовался нами применительно к метастазам, определяемым иммуноцитологическим методом. Безусловно, это лишь одна из разновидностей микromетастазов в широком смысле этого слова. Изначально термином «микromетастазы» обозначали кластер опухолевых клеток диаметром менее 2 мм, однако при иммуноцитологическом исследовании с применением МКА удается определить отдельные, «окультные» раковые клетки, а не только их кластеры.

При стандартном цитологическом исследовании метастазы в костный мозг были обнаружены у 2 из 53 (3,77%) больных. У одной из них IV клиническая стадия была установлена до обнаружения метастатических клеток в костном мозге ($T_4N_2M_1$ — конгломерат лимфатических узлов в подмышечной области, метастазы в лимфатические узлы эпигастриальной области, парааортальные лимфатические узлы, печень). У другой пациентки исходная стадия заболевания была расценена как $T_2N_0M_0$ (IIa), после цитологического обнаружения метастазов в костный мозг стадия изменена на IV.

Использование МКА CAM 5.2 и KL-1 позволило во всех случаях подтвердить наличие цитологически выявленных метастазов в костном мозге и существенно повысить частоту их обнаружения при иммуноморфологическом исследовании. Так с применением иммуноцитологического метода диагностики метастазы в костный мозг были выявлены у 24 (45,3%) больных.

Важно, что в нашем исследовании количество опухолевых клеток, определяемых иммуноцитологически, было очень низким: от 1 до 12 среди 1 млн миелокариоцитов. Лишь у 2 из 28 больных иммуноцитологически было обнаружено 20 опухолевых клеток и у 1 больной — 45 клеток в 1 млн миелокариоцитов. Возможность выявления единичных опухолевых клеток является главной причиной большей чувствительности иммуноцитологии (по сравнению с цитологическим исследованием) и ее основным преимуществом.

Частота иммуноцитологического обнаружения микromетастазов в костный мозг возрастала от I к IV стадии РМЖ (от 40 до 62,5%).

Связь между овариально-менструальной функцией и наличием микromетастазов РМЖ в костный мозг была достоверной ($p=0,031$). Среднее количество метастатических клеток в костном мозге больных репродуктивного возраста оказалось в 3 раза выше, чем у больных в менопаузе.

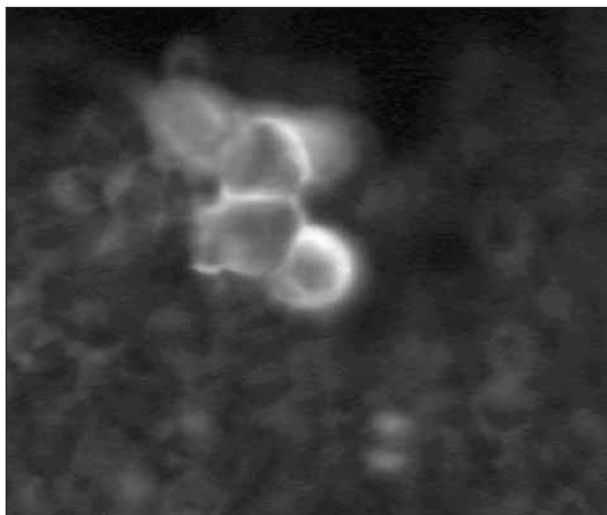


Рис. 1. Комплекс метастатических клеток в костном мозге. Цитоцентрифужный препарат. Окраска МКА KL-1. Ув. 400

Установлена взаимосвязь между присутствием в костном мозге опухолевых клеток и рецепторным статусом опухоли. При отсутствии в опухоли рецепторов эстрогенов (РЭ-) микрометастазы в костный мозг наблюдались в 62,1% случаев, а при их наличии (РЭ+) — в 28,6% ($p=0,039$) (рис. 2).

Выявлена также достоверная связь ($p=0,02$) между отсутствием в опухоли рецепторов прогестерона (РП-) и метастазированием РМЖ в костный мозг — в 76,9% случаев, в то время как при РП+ они встречались в 3 раза реже: у 25% больных (рис. 3).

При отсутствии в опухоли рецепторов и эстрогенов и прогестерона (РЭ-РП-) у 84,6% больных в костном мозге имелись микрометастазы РМЖ. Среднее количество злокачественных клеток в костном мозге больных с указанной опухолью было в 6,4 раза выше, чем у больных с опухолью РЭ+РП+ (соответственно $5,89 \pm 1,37$ и $0,92 \pm 0,77$; $p < 0,05$). Таким образом, наличие в костном мозге метастатических клеток РМЖ взаимосвязано с негативным статусом опухоли по рецепторам эстрогенов и прогестерона.

Нами проанализирована связь между присутствием в костном мозге опухолевых клеток и биологическими характеристиками первичной опухоли.

Обнаружена статистически достоверная взаимосвязь между круглоклеточной инфильтрацией и микрометастазами ($p=0,023$). Под круглоклеточной инфильтрацией понимают инфильтрацию опухоли лимфоцитами, макрофагами, плазматическими клетками. При выраженной круглоклеточной инфильтрации опухоли (++ и ++++) злокачественные клетки в костном мозге определены у 83,3% пациенток, а при умеренной и слабой — соответственно у 58,3 и 33,3%.

Статистически достоверной связи между наличием микрометастазов РМЖ в костный мозг и обнаружением комплексов злокачественных клеток в

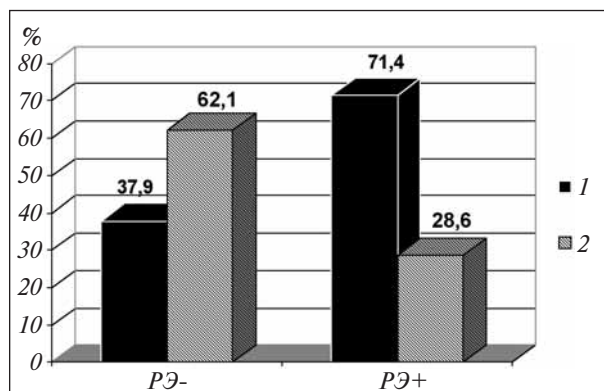


Рис. 2. Распределение больных РМЖ в зависимости от статуса рецепторов эстрогенов в опухоли и иммуноцитологического выявления микрометастазов в костный мозг

1 — больные без метастазов в костный мозг, 2 — с метастазами (здесь и на рис. 3)

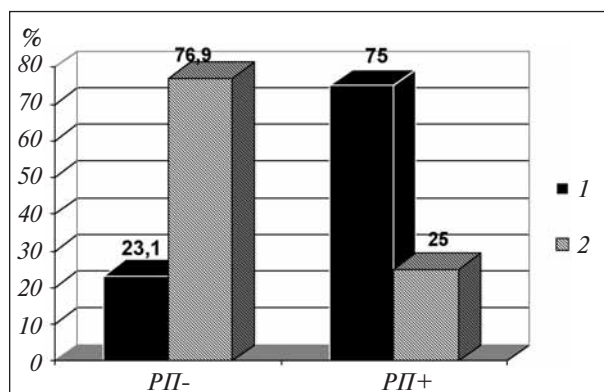


Рис. 3. Распределение больных РМЖ в зависимости от статуса рецепторов прогестерона в опухоли и выявления микрометастазов в костный мозг

лимфатических шелях молочной железы, некрозом опухоли, степенью ее злокачественности, степенью дифференцировки, размером опухолевого узла, маммографическими признаками распространенности опухоли, а также ее локализацией в молочной железе не выявлено.

Отсутствовала связь между микрометастазированием РМЖ в костный мозг и наличием лимфогенных метастазов в регионарные лимфатические узлы (индексом N, наличием конгломератов, количеством пораженных метастазами лимфатических узлов, прорастанием капсулы лимфатического узла опухолью).

Представлялось интересным оценить наличие корреляции между метастазами в костный мозг и статусом лимфатических узлов у больных РМЖ.

В нашем исследовании метастазирование РМЖ в костный мозг и в регионарные лимфатические узлы не было взаимосвязано. При любом индексе N частота выявления микрометастазов составляла 52—53%. Обнаружение при гистологическом исследовании прорастания капсулы лимфатического узла опухолью, реактивной гиперплазии лимфоидных и гистиоцитарных элементов синусов, конгломерата

метастазов не увеличивало частоту выявления микрометастазов в костном мозге. На наш взгляд, полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что лимфогенный и гематогенный пути метастазирования являются независимыми и равноценными, а опухолевые клетки могут попадать в кровоток, минуя аксиллярные лимфатические узлы.

Анализ результатов радиоизотопного исследования костей у больных РМЖ не выявил достоверной взаимосвязи между метастатическим поражением костей по данным скинтиграфии и частотой обнаружения микрометастазов в костном мозге.

Иммуноцитологическая детекция опухолевых клеток в костном мозге и рентгенологическое обнаружение метастазов в кости не были взаимосвязаны ни в одной из групп.

Нами было изучено состояние кроветворения у больных с макрометастазами, микрометастазами и без опухолевого поражения костного мозга. У 2 пациенток с макрометастазами РМЖ в костный мозг, подтвержденными цитологическим и иммуноцитологическим методами, наблюдалась выраженная реакция системы кроветворения в виде гипоплазии костного мозга. Содержание миелокариоцитов и мегакариоцитов в костном мозге обеих пациенток было снижено. У одной из них гранулоцитарный и эритроидный ростки были относительно сохранены, однако среди клеток красного ряда преобладали оксифильные формы (24%; норма — 0,8—5,6%). У другой пациентки эритроидный росток был представлен единичными клетками (4,9%; норма — 14,5—26,5%), резко увеличено отношение лейкоцитов и эритробластов (15,0; норма — 2,1—4,5), понижен индекс созревания нейтрофилов, повышено количество моноцитов и лимфоцитов.

В группе больных с микрометастазами в 2 раза чаще отмечено снижение клеточности костного мозга (53,6%), чем у пациенток без метастатического поражения костного мозга (28%; $p<0,05$).

Косвенными признаками присутствия опухолевых клеток в костном мозге можно считать скопления 3—5 плазматических клеток и обнаружение крупных клеток с гиперхромным ядром и множест-

венными нуклеолами, отличающихся от нормальных клеток костного мозга.

Скопления плазматических клеток не типичны для нормальной миелограммы. У 100% больных, в пунктатах которых регистрируются такие скопления, иммуноцитологически выявлены микрометастазы в костный мозг. Таким образом, обнаружена достоверная связь между наличием в костном мозге скоплений плазматических клеток и обнаружением микрометастазов ($p=0,001$).

Содержание моноцитов и лимфоцитов в костном мозге при наличии микрометастазов повышено. Так, количество моноцитов повышалось в 4 раза чаще у больных с опухолевым поражением костного мозга, чем у пациенток без метастазов. Среднее их значение составило соответственно 2,3 и 1,7 ($p<0,05$). Содержание лимфоцитов в костном мозге у больных с микрометастазами было достоверно выше, чем при отсутствии его опухолевого поражения (соответственно $13,9\pm 0,98$ и $10,7\pm 0,5$; $p<0,01$). Не исключено, что увеличение этого показателя носило относительный характер. Можно предположить, что подобные изменения служат наиболее ранним проявлением реакции костного мозга на присутствие отдельных опухолевых клеток.

В анализах периферической крови не выявлено статистически достоверных различий в содержании эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, гемоглобина, уровне гематокрита и других показателей крови у больных с микрометастазами РМЖ в костный мозг и у пациенток без метастатического его поражения.

Представленные нами данные демонстрируют необходимость внедрения в клиническую практику иммуноморфологического исследования костного мозга, особенно на ранних стадиях заболевания, для уточнения степени распространенности опухолевого процесса. Применение иммуноцитологического метода с использованием МКА к цитокератинам CAM 5.2 и KL-1 дает преимущества в обнаружении единичных опухолевых клеток в костном мозге больных РМЖ, что может явиться одним из основополагающих критериев прогноза и служить показанием для назначения адъювантной химиотерапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берензон Д.Г., Колосков А.В., Тарасов В.А. // Гематология и трансфузиология. — 2000. — Т.45. — №5. — С. 35—37.
2. Моисеев В.М., Семиглазов В.Ф., Тюляндин С.А. Современное лекарственное лечение местнораспространенного и метастатического рака молочной железы. — Санкт-Петербург, 1997. — С.176—177.
3. Braun S., Kentenich C., Janni W. et al. // J. Clin. Oncol. — 2000. — 18: 80—86.
4. Burchill S.A., Bradbury M.F., Pittman K. et al. // Brit. J. Cancer. — 1995. — Vol.71. — P. 278—281.
5. Come S.E., Shnipper L.E. // The Breast Cancer. — Philadelphia—New York. — 1995. — P.847—853.
6. Coombs R.S., Redding W.H., Monaghau P. et al. // Lancet. — 1983. — №2. — P.1271.
7. Cote R.J., Rosen P.P., Lesser M.L. // J. Clin. Oncol. — 1991. — 9:1749.
8. Dearnaley D., Imrie S. et al. // J. Roy Soc. Med. — 1983. — 76. — №5. — P.359—364.
9. Diel I.G., Kaufmann M., Goerner R. et al. // J. Clin. Oncol. — 1992. — Vol. 10. — P.1534—1539.
10. Durhsen U., Hossfeld D.K. // Ann. Hematol. — 1996. — Vol.73. — P.53—70.
11. Fisher B. // Cancer. — 1977. — Vol.40. — P.574—587.
12. Gerber B., Krause A., Muller H. et al. // J. Clin. Oncol. — 2001. — 19: 960—971.
13. Reichman B.S., Osborne M.P. // The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases. — Philadelphia. — 1998. — Section XXI — ch.70. — P.1299—1302.
14. Schoenfeld A., Kruger K.H., Gomm J. et al. // Eur. J. Cancer. — May, 1997. — 33(6): 854—861.
15. Unal E., Camlibel M. et al. // J. Exp. Clin. Cancer Res. — 1994. — 13,2. — P.165—168.