

ОНКОЛОГИЯ

УДК 616-006.66+611.69

МЕТОД ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ В ДИАГНОСТИКЕ ДИССЕМИНИРОВАННЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В КОСТНОМ МОЗГЕ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ*

В.В. Родионов^{1,2}, О.А. Богомолова^{1,2}, В.В. Кометова²¹Ульяновский государственный университет,²Областной клинический онкологический диспансер, г. Ульяновск

В исследование включено 38 больных раком молочной железы (РМЖ) I-IV стадий. При цитологическом исследовании костного мозга метастазы в костный мозг были выявлены лишь у 1 (2,6 %) пациентки. При гистологическом исследовании у 2 (5,2 %) пациенток были обнаружены метастазы в костный мозг, подтвержденные иммуноцитологически. Применение метода проточной цитометрии с использованием моноклональных антител к ЕрСАМ (CD326) позволило существенно повысить частоту обнаружения микрометастазов и диссеминированных опухолевых клеток. Если считать положительной реакцию при наличии одной метастатической клетки среди 1 млн миелокариоцитов, то число таких пациенток составило 8 (21,0 %) из 38. Иммунологическое исследование костного мозга у больных РМЖ может быть рекомендовано к внедрению в клиническую практику, особенно у пациенток с ранними стадиями, для оценки распространенности опухолевого процесса и оптимизации тактики лечения.

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

Введение. В структуре онкологической заболеваемости женского населения России рак молочной железы (РМЖ) устойчиво занимает первое ранговое место, составляя 20,4 % [5]. Средняя продолжительность жизни больных диссеминированным РМЖ не превышает 24 мес. По данным В. Fisher, около 35 % больных РМЖ во время выявления первичной опухоли имеют клинически определяемые метастазы, кроме того, еще 30–35 % больных имеют микрометастазы, которые в дальнейшем клинически манифестируют [7]. В итоге результаты лечения больных РМЖ остаются неудовлетворительными (прирост грубого показателя смертности за последние 10 лет составил 7,56 %) [5].

Диагностика гематогенного распространения эпителиальных опухолей на ранних стадиях – одна из основных проблем онкологии. Морфологически единичные разрозненные опухолевые клетки не определяются – требуется применение высокочувствительных иммунологических методов. К ним в настоящее время относятся иммуноцитологические (иммуноцитохимический, проточная цитометрия) и молекулярно-биологические (RT-PCR) методы. Иммунологические методы исследования костного мозга значительно различаются по своей чувствительности и специфичности, технической сложности и стоимости. Для того чтобы контролировать эффективность воздействия лекарственных средств на микрометастазы, нужно, в первую очередь, стандартизировать методы количественной оценки единичных диссеминированных опухолевых клеток. Речь идет об

* Работа поддержана государственным заданием Минобрнауки России. Шифр государственного задания 4.1219.201.

иммунологическом стадировании рака [4]. В клинической практике пока не найдено рутинных методов обнаружения микрометастазов. Методы исследования костного мозга нуждаются в дальнейшем развитии. Однако уже накапливаются данные о том, что количественное определение и характеристика диссеминированных опухолевых клеток позволяют получать важную прогностическую информацию и проводить мониторинг эффективности терапии. По мере того как методы исследования станут стандартизированными, с приемлемой чувствительностью и специфичностью, будет сделан очередной шаг к индивидуализации антиметастатической терапии [1].

В связи с тем что диссеминированные опухолевые клетки присутствуют в костном мозге в малых количествах, для увеличения чувствительности иммунологических методов исследования были разработаны методы обогащения популяции клеток-мишеней. Техника обогащения включает большую панель технологий, в основе которых лежат различные свойства диссеминированных опухолевых клеток, отличающие их от нормальных гематопоетических клеток. Стандартной процедурой считается метод градиентной сепарации Ficoll. Кроме того, большинство современных технологий основано на экспрессии молекулы адгезии эпителиальных клеток (EpCAM). Применение, в частности, метода иммуномагнитного обогащения клеток и проточной цитометрии позволяет оценивать до 50 млн миелокариоцитов у одного больного. Для сравнения: иммуноцитологически на цитоцентрифужных препаратах можно оценить обычно 1–2 млн миелокариоцитов [1].

Ранее нами было проведено исследование, в котором изучался костный мозг у 50 больных РМЖ с помощью цитологического, гистологического и иммуноцитохимического методов. Из общего числа больных, включенных в исследование, микрометастазы в костный мозг были обнаружены у 19 (38 %) пациенток. Комбинация различных методов диагностики существенно не повысила вероятность выявления опухолевых клеток в костном мозге. Наиболее информативными в плане определения оккультных метастазов в

костный мозг были иммуноцитохимический (63,2 %) и гистологический (57,9 %) методы. Таким образом, чтобы максимально повысить вероятность диагностики метастазов в костный мозг, целесообразно одновременно пользоваться обоими методами. Это становится весьма актуальным для правильного стадирования опухолевого процесса и составления дальнейшего плана лечения [3].

Цель исследования. Установить степень гематогенной диссеминации у больных РМЖ на основании обнаружения диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител к эпителиальным антигенам.

Материалы и методы. В работе использованы результаты клинического, морфологического, иммуноцитологического обследования 38 больных РМЖ, находящихся на лечении в ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер» с ноября 2011 г. по настоящее время. На проведение данного исследования было получено разрешение этической комиссии ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет». Исследования проводились с соблюдением законодательства РФ, этических норм и принципов Декларации Хельсинки (1964) со всеми последующими дополнениями и изменениями, регламентирующими научные исследования на биоматериалах, полученных от людей, а также в соответствии с Международным руководством для биомедицинских исследований с вовлечением человека (International ethical guidelines for biomedical research involving human subjects) Совета международных организаций медицинских наук (CIOMS). Все первичные данные пациенток были обезличены в соответствии с требованиями п. 3 ст. 6 действующего федерального закона РФ № 152-ФЗ «О персональных данных».

В исследуемую группу вошли женщины в возрасте от 33 до 74 лет. Средний возраст составил 56 ± 10 лет. На момент постановки первичного диагноза пациентки распределились по стадиям следующим образом: I стадия была диагностирована у 3 (7,9 %) больных, IА – у 11 (29,0 %), IВ – у 3 (7,9 %), IА –

у 7 (18,4 %), ПВ – у 3 (7,9 %), ПС – у 6 (15,8 %) и IV – у 5 (13,1 %) пациенток. Наиболее частым гистологическим вариантом был инфильтративный смешанный рак (42,9 %). Отмечена достаточно высокая частота инфильтративного протокового рака (28,6 %). Реже встречались инфильтративный дольковый рак (21,4 %) и другие формы рака (медулярный, папиллярный, тубулярный) (7,1 %). Больным было проведено стандартное клиническое обследование. Исследование костного мозга до начала лечения выполнялось как стандартными цитологическим и гистологическим методами, так и методом проточной цитометрии с применением МКА к цитокератинам EpCAM (CD326). Материал для цитологического исследования и проточной цитометрии получали с помощью стерильной пункции. Объем костномозгового пунктата не превышал 0,5 мл, так как при большем объеме возможно разбавление образца периферической кровью. Проточная цитометрия проводилась на базе лаборатории иммунологии гемопоэза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАОН (руководитель – д.м.н., проф. Н.Н. Тупицын). Исследование проводилось в координатах CD45/CD326. Предварительно было проведено иммуномагнитное обогащение клеток, связывающих антитела CD326

(EpCAM). Это позволило оценивать до 50 млн миелокариоцитов у одного больного. Подсчет клеток миелограммы и их анализ производился в клинической лаборатории. Для гистологического исследования выполнялась трепанбиопсия задне-верхней ости подвздошной кости с двух сторон.

Результаты и обсуждение. При стандартном цитологическом исследовании метастазы в костный мозг были выявлены у 1 (2,6 %) из 38 больных. Это пациентка, у которой IV клиническая стадия была установлена до обнаружения метастатических клеток в костном мозге (T4N3cM1, метастазы в печень, плевру). При гистологическом исследовании трепанобиоптатов подвздошной кости у данной больной было выявлено двухстороннее поражение костного мозга (рис. 1, 2). В другом случае исходная стадия заболевания была расценена как ПС (T4N3aM0), после гистологического обнаружения метастазов в костный мозг было проведено рестадирование – стадия изменена на IV. При дополнительной остеосцинтиграфии у этой пациентки были выявлены множественные остеопластические метастазы в кости, не подтвержденные рентгенологически. У обеих пациенток метастазы в костный мозг подтверждены иммуноцитологическим методом.

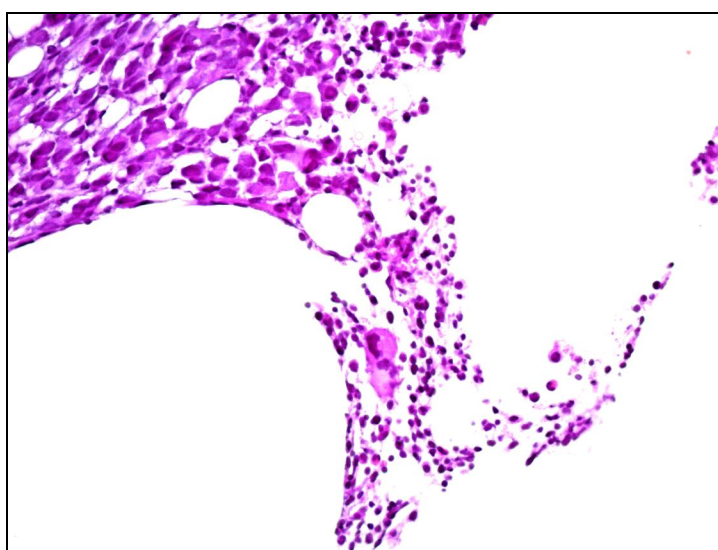


Рис. 1. Микрофото места инвазии клеточного костного мозга подвздошной кости слева опухолевыми клетками инфильтрирующего рака молочной железы у больной М., 53 лет. Окраска гематоксилином и эозином; ув. $\times 400$

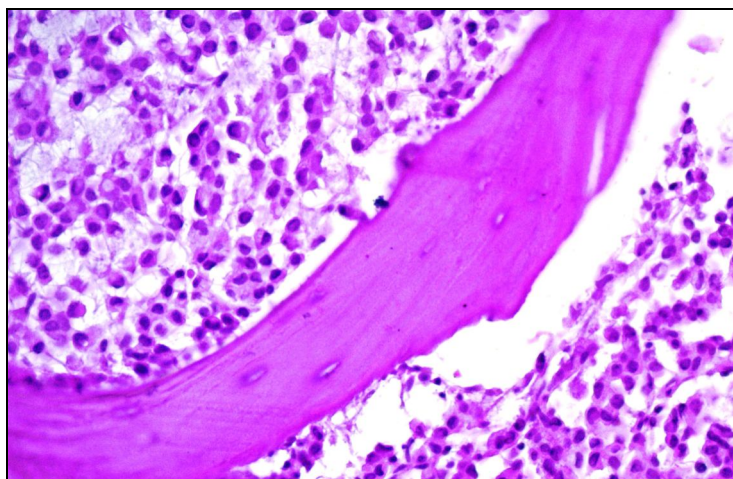


Рис. 2. Микрофото метастаза инфильтрирующего рака молочной железы в костный мозг подвздошной кости справа с тотальным его замещением у больной М., 53 лет. Окраска гематоксилином и эозином; ув. $\times 400$

Кроме того, у 8 из 38 больных в трепано-биоптатах были обнаружены единичные плазматические клетки или микроочаговое их скопление, что является косвенным признаком поражения костного мозга. При проточной цитометрии у 2 из этих 8 пациентов были обнаружены микрометастазы.

Единичные эпителиальные (опухолевые) клетки в образцах костного мозга были выявлены у 35 (92,1 %) из 38 пациенток с помощью проточной цитометрии с применением моноклональных антител ЕрСАМ (CD326). Важно то, что количество опухолевых клеток, определяемых иммуноцитологически, было очень низким и в 77,1 % случаев составило менее 1 клетки на 1 млн миелокариоцитов. Лишь у 8 (22,9 %) из 35 больных было выявлено от 1 до 10 (в одном случае – 44) эпителиальных клеток на 1 млн миелокариоцитов. У 1 из 8 пациенток была диагностирована I стадия заболевания, у трех пациенток – II стадия. У остальных четырех пациенток была установлена IV стадия РМЖ (T4N3cM1), при этом у двух из них было выявлено метастатическое поражение костного мозга в трепанобиоптатах.

Если считать положительной реакцию при наличии одной метастатической клетки среди 1 млн мононуклеарных клеток (МНК) костного мозга (сумма количества лимфоцитов, моноцитов и плазматических клеток), то число таких пациенток составило 31 (88,6 %) из 35. При этом только у 4 (11,4 %) из

35 больных число клеток было не менее 10. У трех больных было выявлено наибольшее число клеток на 1 млн МНК – 32, 35 и 330 соответственно.

Четкий кластер опухолевых клеток – микрометастаз – при проведении проточной цитометрии был диагностирован у 4 (10,5 %) из 38 пациенток. При этом в 3 случаях из 4 число клеток в образцах костного мозга было очень низким и составило менее одной клетки на 1 млн миелокариоцитов (рис. 3).

Таким образом, метод проточной цитометрии позволил диагностировать микрометастазы у 11 (28,9 %) из 38 больных.

Полагая, что обнаружение одной изолированной опухолевой клетки может быть диагностически незначимым, ряд исследователей попытались количественно определить «критическую» опухолевую нагрузку, превышение которой достоверно было бы связано с ростом частоты рецидива заболевания. Было показано, что количество рецидивов рака молочной железы резко возрастает при обнаружении в костном мозге 10 или 15 изолированных опухолевых клеток [6]. В нашем исследовании не была прослежена общая и безрецидивная выживаемость в связи с небольшим сроком исследования. Однако одна больная с IV стадией РМЖ, у которой были подтверждены микрометастазы в костный мозг, погибла от прогрессирования заболевания во время проведения ей второго курса химиотерапии.

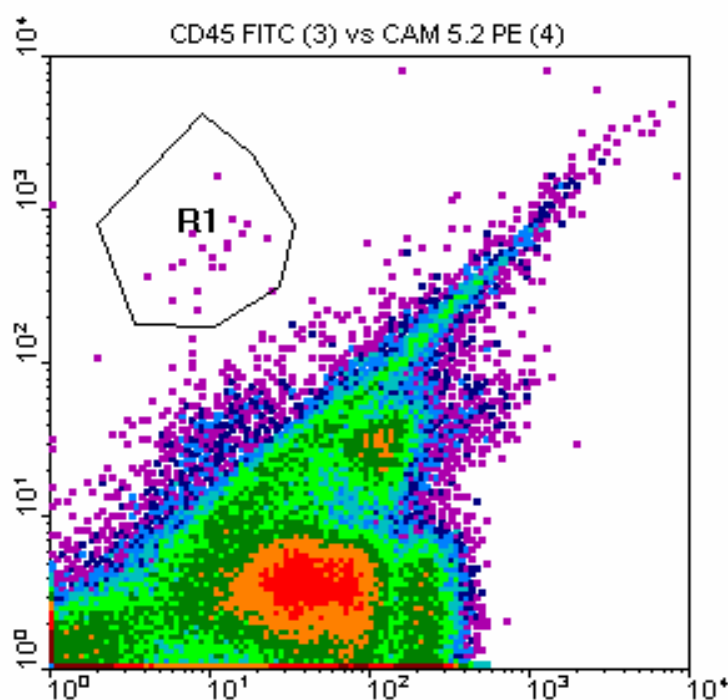


Рис. 3. Цитограмма больной раком молочной железы Б., 74 лет, IV стадия, с микрометастазом в костном мозге, выявленным методом проточной цитометрии.

Область R1 – это кластер из 20 CD45-негативных клеток (ось абсцисс), положительных в реакции с антителами к молекуле адгезии эпителиальных клеток EpCAM (CD326) (ось ординат)

В работе [2] было сделано предположение, что к наиболее ранним проявлениям реакции костного мозга на присутствие отдельных опухолевых клеток можно отнести следующие изменения кроветворения по данным миелограмм: гипоклеточность костного мозга, скопления плазматических клеток, наличие крупных клеток с гиперхромным ядром и множественными нуклеолами, повышение лейко-эритробластического отношения, повышенные средние значения количества моноцитов и лимфоцитов.

В исследуемой нами группе пациенток были обнаружены следующие изменения в миелограммах: снижение клеточности костного мозга (в 28,9 % случаев), повышение, а также снижение лейко-эритробластического соотношения (в 21,0 и 18,4 % случаев соответственно), повышенные значения количества моноцитов (в 44,7 %), лимфоцитов (в 39,5 %) и плазматиков (в 15,8 %). У 5 (13,1 %) пациенток из 38 были обнаружены единичные недифференцированные клетки неясного происхождения, возможно, негемопозитической

природы. У 2 из этих 5 больных были выявлены микрометастазы в костном мозге. Поскольку все эти изменения кроветворения с различной частотой имелись у пациенток и с микрометастазами, и без них, мы пока не можем утверждать об ассоциации этих признаков с присутствием отдельных опухолевых клеток в костном мозге.

Заключение. Возможность выявления единичных опухолевых клеток в костном мозге вследствие большей чувствительности является главным преимуществом метода проточной цитометрии в диагностике диссеминированных опухолевых клеток рака молочной железы в костном мозге по сравнению с морфологическими методами исследования (11 (28,9 %) и 2 (5,2 %) случая выявления из 38 соответственно). Следовательно, метод проточной цитометрии позволяет более точно судить о степени гематогенной диссеминации РМЖ в костный мозг, чем стандартные морфологические методы. В то же время обнаружение малого количества опухолевых клеток данным иммуноцитоло-

гическим методом сложно трактовать в тех случаях, где они не формируют четкого кластера. При наличии такого кластера микрометастазы могут быть констатированы даже при наличии менее 1 опухолевой клетки на 1 млн миелокарицитов. Пока остается неясным диагностически значимое пороговое значение количества единичных опухолевых клеток в костном мозге у больных РМЖ. Нет четких данных о том, какова «критическая» опухолевая нагрузка костного мозга, превышение которой было бы связано с ростом частоты рецидива заболевания. На основании анализа миелограмм пока не удалось выявить косвенные признаки присутствия опухолевых клеток рака молочной железы. Работа в данном направлении будет продолжена.

Представленные нами данные демонстрируют необходимость внедрения в клиническую практику иммунологического исследования костного мозга, особенно на ранних стадиях рака молочной железы, для оценки распространенности опухолевого процесса. Методы исследования костного мозга нуждаются в дальнейшем развитии, а оценка значимости обнаружения диссеминированных опухолевых клеток и микрометастазов в костном мозге возможна после анализа результатов общей и безрецидивной выживаемости у данных больных.

Авторы заявляют об отсутствии каких бы то ни было конфликтов интересов с кем бы то

ни было в отношении идеи, планирования, выполнения и опубликования результатов настоящего исследования и их последующего использования в коммерческих или иных целях.

1. Аликс-Панабиер К., Пантел К. Выявление и характеристика диссеминированных раковых клеток при солидных эпителиальных опухолях // Иммунология гемопоэза. М., 2012. Т. 10, № 1. С. 78–93.

2. Иммуноцитологическая диагностика микрометастазов рака молочной железы в костный мозг / О. В. Крохина [и др.] // Иммунология гемопоэза. М., 2007. Т. 4, № 2. С. 116–131.

3. Родионов В. В. Петров С. В. Проблемы костномозгового метастазирования у больных раком молочной железы // Иммунология гемопоэза. М., 2007. Т. 4, № 2. С. 38–54.

4. Тупицын Н. Н. Гематогенно диссеминированный операбельный рак ранних стадий – одна из главных проблем в онкологии. Иммунологическое стадирование опухолей // Иммунология гемопоэза. М., 2007. Т. 4, № 2. С. 6–13.

5. Чиссов В. И., Старинский В. В., Петрова Г. В. Злокачественные новообразования в России в 2011 году (заболеваемость и смертность). М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А.Герцена» Минздрава России, 2013. 289 с.

6. Calaluce R., Miedema B., Yesus Y. Micro-metastasis in colorectal carcinoma: A review // J. of Surgical Oncology. 1998. Vol. 67. Iss. 3. P. 194–202.

7. Neoplasms of the breast / B. Fisher [et al.] // Cancer medicine. 1993. P. 1706–1774.

FLOW CYTOMETRY METHOD IN DIAGNOSTICS OF DISSEMINATED TUMOR CELLS IN BONE MARROW IN BREAST CANCER PATIENTS

V.V. Rodionov^{1,2}, O.A. Bogomolova^{1,2}, V.V. Kometova²

¹Ulyanovsk State University,
²Regional Clinical Cancer Center, Ulyanovsk

Cytological, histological as well as immunocytological – by means of flow cytometry method, using monoclonal antibodies EpCAM (CD326) – bone marrow study was done in 38 patients with breast cancer. Standard cytological examination revealed bone marrow involvement in 1 case (2,6 %). Histological examination revealed bone marrow involvement in 2 of 38 cases (5,2 %). Flow cytometry method confirmed bone marrow involvement in both cases and significantly increased the rate of micrometastases and disseminated tumor cells detection. If to consider positive result in case when one or more single cells with panepithelial markers were found in 1 mln. of myelokaryocytes, the number of such patients were 8 (21,0 %) of 38. Immunological study of bone marrow can be recommended to introduction in clinical practice, especially in early stages of breast cancer patients for optimization of treatment.

Keywords: breast cancer, disseminated tumor cells in bone marrow, flow cytometry.