

## МИКРОМЕТАСТАЗЫ В КОСТНОМ МОЗГЕ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ — НОВАЯ ПРОБЛЕМА?

Е.В. Чигринова, И.И. Бокин, К.И. Жордания, Н.Н. Тупицын,  
И.В. Поддубная, В.Ю. Сельчук

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

### BONE MARROW MICROMETASTASES IN PATIENTS WITH OVARIAN CANCER: IS IT A NEW PROBLEM?

Ye.V. Chigrinova, I.I. Bokin, K.I. Zhordania, N.N. Tupitsyn, I.V. Poddubnaya, V.Yu. Selchuk  
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

*Much evidence suggests that just at the early stages of development, malignant ovarian epithelial tumors are capable for metastatic spread in 23% of cases. The most common site of metastases is the abdomen and retroperitoneal lymph nodes. The literature describes cases of bone marrow micrometastases in cancer of the rectum and stomach, in which skeletal metastases are very rare.*

*Since 2005, the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, has been studying the bone marrow from patients aged 29 to 69 years (median 45 years) who had ovarian cancer.*

*The predominant histological form of the tumor is serous carcinoma (n = 19 (82.6%)), the prevailing stage is T3-3cN0M0 (n = 20 (87.7%)).*

*Samples to be studied were taken from 16 (69.6%) patients in the postoperative period, 1 (4%) patients during chemotherapy, 4 (17.4%) after combined treatment and identification of a recurrence of the disease, and 2 (8.7%) after palliative operations.*

*Trepanobiopsy of the iliac crest was made in 15 (65%) patients; bone marrow aspiration was performed in 8 (35%).*

*A positive result (bone marrow micrometastatic cells) was obtained in 3 (20%) of the 15 patients undergone trepanobiopsy and in 4 (50%) of the 8 patients undergone bone marrow aspiration*

Многочисленные данные свидетельствуют о том, что злокачественные эпителиальные опухоли яичников даже на ранних стадиях развития способны к метастазированию в 23% случаев. Наиболее частая локализация метастазов — забрюшинные лимфатические узлы, брюшная полость. В литературе описаны случаи обнаружения микрометастазов в костном мозге при раке прямой кишки и желудка, при которых метастазы в костях скелета — большая редкость.

Рак яичников (РЯ) занимает 7-е место по частоте встречаемости среди злокачественных опухолей женщин и 3-е — непосредственно в гинекологической онкологии. Результаты лечения РЯ в настоящее время можно считать неутешительными несмотря на техническую эволюцию диагностических методов и большой выбор противоопухолевых химиотерапевтических агентов. 5-летняя выживаемость при РЯ не превышает 35% [1]. Основной причиной, приводящей к гибели пациентов, остается частое рецидивирование. Улучшение контроля над локальной болезнью не меняет результатов лечения за счет увеличения доли смертельных случаев от прогрессирования метастатической болезни. В последнее время появляется все больше исследований, доказывающих склонность РЯ к диссеминации на ранних стадиях. Так, F. Abdul-Karim и соавт. [2] и J. Dauplat [3] описывают обнаружение ими гематогенных микрометастазов (мМТС) при аутопсиях в печени, легком и костях скелета в 28% случаев уже при II стадии. Тем не менее факторы прогноза при РЯ,

как и при большинстве других опухолей эпителиальной природы, включают характеристики первичного очага (стадия по FIGO, гистологический вариант, степень дифференцировки и др.) [4]. Налицо дефицит достоверных специфических факторов риска развития метастатической болезни, необходимых для планирования продолжительности адъювантной терапии и проведения мониторинга ремиссии. Предметом нашего интереса стали частота и значение микродиссеминатов РЯ в костном мозге (КМ).

Роль КМ как возможного источника гематогенного метастазирования рассматривается при многих опухолях эпителиальной природы. Действительно, КМ является органом повышенной васкуляризации и интенсивного обмена между мезенхимальной тканью межбалочных полостей (собственно гемопоэтическая ткань) и периферической кровью (ПК). Это создает оптимальные условия для осаждения циркулирующих в ПК опухолевых клеток и получения ими через постоянную перфузию ПК и непосредственно от костномозгового микроокружения необходимых факторов (гормонов, цитокинов, факторов роста и т.д.), поддерживающих жизнеспособность и стимулирующих по мере необходимости пролиферацию [5]. Опухолевые микродиссеминаты, как правило, находятся в «дремлющем» состоянии (фазе G0 клеточного цикла) и не вызывают иммунной реакции. Как было показано G. Schlimok и соавт. [6] и K. Pantel и соавт. [7], одной из причин «неуловимости» опухолевых клеток для им-

мунного надзора может быть низкая экспрессия ими молекул HLA I типа, препятствующая их распознаванию и элиминации Т-клеточным звеном иммунитета. Биологические параметры метастатических клеток создают предпосылки для формирования их резистентности к циклоспекцифичным комбинациям химиопрепаратов и, возможно, противоопухолевым вакцинам.

Совокупность факторов обеспечивает опухолевым диссеминатам благоприятные условия для персистенции в КМ, которая, как было показано, может длиться годами. Факторы, обуславливающие переход из «дремлющего» состояния в состояние активной пролиферации (клеточный цикл) и последующий транспорт активированных клеток в определенные органы вторичного метастазирования, специфические для разных опухолей, до сих пор остаются неизвестными.

Наиболее изученной моделью являются мМТС в КМ при раке молочной железы (РМЖ). На клиническом уровне прослежена статистически достоверная связь между присутствием мМТС в КМ больных РМЖ и развитием рецидива опухоли, а также выявлена положительная корреляция с другими неблагоприятными факторами прогноза, влияющими на общую выживаемость [8]. Кроме того, микрометастатические клетки в КМ при РМЖ неплохо изучены с точки зрения их биологических особенностей. В. Brandt и соавт. [9] и Н. Allgayer и соавт. [10] одними из первых сообщили об обнаружении молекулярно-биологических отличий метастатических КМ-клеток от клеток первичного опухолевого очага, например, гиперэкспрессии онкобелка c-erbB-2 или урокиназного плазменного активатора — факторов, ответственных за метастатический потенциал и ангиогенез. При РМЖ также было показано, что белки, ответственные за диссеминацию, экспрессируются на части клеток первичной опухоли на самых ранних этапах ее развития, а также почти всегда прослеживаются на циркулирующих в ПК опухолевых комплексах и единичных клетках. Эта информация служит подтверждением теории не случайного, а закономерного появления и селекции клонов с метастатическим потенциалом на самых ранних этапах развития РМЖ.

Определение костномозговых мМТС описано также при многих других опухолях эпителиальной природы (немелкоклеточный рак легких, колоректальный рак, рак предстательной железы, желудка, почки), однако их влияние на прогноз и показатели выживаемости, а также биологические характеристики самих метастатических клеток исследованы существенно хуже, чем при РМЖ.

Возвращаясь к основной теме статьи, следует в первую очередь отметить, что число работ, посвященных проблеме мМТС в КМ при РЯ, не-

лико. Два основных исследования, выполненные S. Braun и соавт. [11] (108 больных) и С. Marth и соавт. [12] (90 больных), вообще противоречат друг другу. В первом исследовании утверждается статистически достоверное отрицательное прогностическое значение мМТС в КМ, обнаруженных авторами в 30% случаев. Во второй работе, напротив, доказано отсутствие влияния мМТС в КМ (21%) и периферической крови (12%) на прогноз. Наиболее вероятной причиной противоречий может быть разница в примененных диагностических методах.

Наиболее «тонким» местом исследования любых клеточных субпопуляций в гемопоэтической ткани является этап выделения, особенно трудный при малых количествах клеток (2–3 клетки на  $2 \times 10^6$ ), что характерно для мМТС опухолей эпителиальной природы. Наилучшим методом сбора клеток из КМ или ПК на данный момент может считаться магнитная сорбция (MACS — Magnet adhesion cells sorting) [13]. Метод основан на применении моноклональных антител (МАТ) к специфическим эпитопам цитокератинового скелета эпителиальных клеток, меченных магнитной меткой с последующей сепарацией антигенпозитивных (АГ+) клеток в магнитном поле. Методика отличается высокой точностью определения количества интересующих АГ+ клеток, поскольку позволяет выделять АГ+ клетки из цельного образца КМ или ПК. Более ранний и, соответственно, более распространенный метод выделения эпителиальных опухолевых клеток включает предварительную обработку образца КМ или ПК растворами, приводящими к лизису неядерных элементов (эритроцитов, клеточных обломков). Окрашивание специфическими МАТ к интересующим клеточным эпитопам проводится вторым этапом на выделенной мононуклеарной (основной, одноклеточной, ядерной) фракции КМ. Очевидно, что при использовании второго метода часть и без того минимального количества опухолевых клеток может теряться при обработке материала КМ или ПК. Кроме того, существует проблема ложноположительных результатов, связанная со способностью некоторых гемопоэтических клеток экспрессировать эпитопы цитокератинов (СК), что может иметь место, в частности, при сопутствующих аутоиммунных или хронических воспалительных заболеваниях.

Учитывая недостаточное количество и противоречивость имеющихся на сегодня литературных данных, посвященных мМТС в КМ при РЯ, мы решили провести собственное исследование с целью определения частоты костномозговой диссеминации РЯ и возможного влияния на прогноз. На первом этапе помимо общего определения числа случаев мМТС мы решили определить диа-

ностическое преимущество исследования материалов трепанобиоптата и аспирата КМ. Работа является проспективным неоконченным исследованием, и представленные в статье результаты могут рассматриваться только как предварительные.

#### Материалы и методы

В исследование были включено 22 пациента, страдающих РЯ. Возраст больных составлял от 29 до 69 лет (медиана 45 лет). Основными критериями отбора были эпителиальная природа злокачественной опухоли яичников, а также стабильный соматический статус, позволяющий провести аспирацию и трепанобиопсию КМ.

Большинство пациенток имели продвинутой III стадию процесса и серозный гистологический вариант (табл. 1). Взятие материала было случайным и проводилось на разных этапах клинического наблюдения: у 1 (5%) больной — в дооперационном периоде, у 17 (77%) — в послеоперационном и у 4 (18%) — при рецидиве.

Трепанобиоптат КМ исследовался в 15 (68%) случаях, аспират — в 7 (32%) случаях. Обе процедуры выполнялись под местной анестезией новокаиновокаиновой смесью (0,5 и 2% соответственно) или 7% раствором пропиндола. Трепанобиопсию выполняли моноклатерально из задних верхних остей гребней подвздошных костей, аспирацию КМ производили из тела или рукоятки грудины. Трепанобиоптат КМ считался годным для иммуноморфологического анализа при длине столбика не менее 1,5 см. Аспират забирали в объеме, не превышающем 0,7 мл, для исключения разбавления ПК. Трепанобиоптат КМ подвергали рутинным гистологическим проводкам по протоколам, принятым в отделении патоморфологии опухолей человека РОНЦ РАМН. Гистологическое исследование трепанобиоптата КМ проводилось на срезах с парафиновых блоков, окрашенных гематоксилин-эозином и пикрофуксином. Для иммунофенотипирования трепанобиоптатов КМ использовали сочетание иммунофлуоресцентного и иммуноферментного методов на депарафинированных срезах. В качестве иммунологических маркеров для клеток эпителиального происхождения применяли панцитокератин клон KL-1, смесь СК №8, 18, 19 (антитело CAM5.2), а также антитела к СК №7 и №20, пан-Т-клеточный антиген CD3, маркер плазматических клеток CD138, комбинированное антитело к легким цепям иммуноглобулинов  $\kappa/\lambda$ . Иммуногистохимическое окрашивание и оценку результатов проводили на серии не

менее 10 срезов. Цитологическое исследование пунктата выполняли на мазках, окрашенных по методу Романовского — Гимзы, иммунофенотипирование аспирата КМ — методом проточной цитофлуориметрии (ПЦ) на приборе FACSscan с двух- и трехцветным мечением, используя прямые конъюгаты моноклональных антител KL-1 и CAM 5.2 с флуорохромами типа FITC (флуоресцеин-изотиоцианат), PE (фикоэритрин).

Среднее количество СК+ эпителиальных клеток для МТС-положительных аспиратов составило  $2 \times 10^{12}$  (при анализе в CD45-негативном гейте) и 1–2 клетки в поле зрения при ув. 400 для ма-

Таблица 1. Распределение больных в зависимости от гистологического варианта опухоли и стадии TNM

| Характеристика                          | Число больных<br>абс. | %  |
|-----------------------------------------|-----------------------|----|
| Гистологический вариант аденокарциномы: |                       |    |
| серозная                                | 18                    | 81 |
| светлоклеточная                         | 1                     | 5  |
| эндометриоидная                         | 3                     | 14 |
| Стадия:                                 |                       |    |
| T1aN0M0                                 | 2                     | 9  |
| T1bN0M0                                 | 1                     | 5  |
| T3N0M0                                  | 11                    | 50 |
| T3cN0M0                                 | 8                     | 38 |

териала трепанобиоптатов. Во всех МТС-положительных трепанобиоптатах КМ СК+ клетки были представлены единичными разрозненными формами, расположенными между элементами нормального гемопоэза (рис. 1). Кроме того, в большинстве трепанобиоптатов КМ отмечались увеличение количества Т-клеток с тенденцией к формированию рыхлых скоплений, а также реактивный поликлональный ( $\kappa/\lambda$ ) плазмцитоз (рис. 2).

Сводные данные морфоиммунологического исследования КМ представлены в табл. 2.

#### Результаты и обсуждение

Предварительный анализ полученных результатов показал, что при рутинном морфологическом исследовании стандартно окрашенных препаратов трепанобиоптатов и подсчете миелограммы на мазках аспирата ни в одном случае патологические элементы, подозрительные в отношении метастатического поражения КМ, обнаружены не были. Метастатические СК+ клетки были выявлены только при проведении иммунологического исследования (ПЦ для аспиратов и иммуногистохимическое исследование для трепанобиоптатов КМ) с применением анти-СК-МАТ. АГ+ клетки в аспиратах определялись практически в 2 раза чаще, чем в трепанобиоптатах — 43 против 20%. При сопоставлении ММТС+ материала КМ и стадии процесса во всех позитивных случаях имела место III стадия опухолевого процесса (FIGO).

### Данные исследования трепанобиоптатов КМ

При исследовании стандартно окрашенных препаратов трепанобиоптатов в трети наблюдений обращали на себя внимание присутствие рыхлых лимфоидных мелкоклеточных инфильтратов, а также увеличенная пропорция плазматических клеток с преимущественной паракапиллярной локализацией и тенденцией к образованию небольших скоплений по 4–5 клеток. Оба типа изменений были вероятностно трактованы на уровне световой микроскопии как реактивные, что впоследствии было доказано с помощью иммуногистохимического анализа (см. «Материалы и методы»).

Реактивная лимфоплазмноклеточная инфильтрация гемопоэтической ткани в срезах трепанобиоптатов КМ имела место в трех случаях с СК+ клетками. Анализ клинических данных пациенток поз-

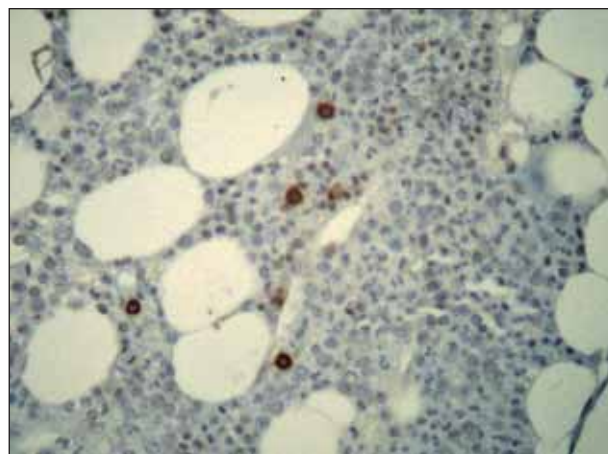


Рис. 1. СК+ клетки (СК №7) на срезе трепанобиоптата КМ. Иммуногистохимическое исследование, ув. 400

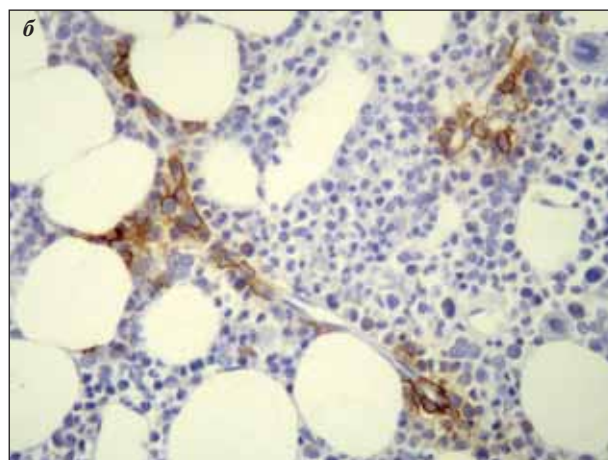
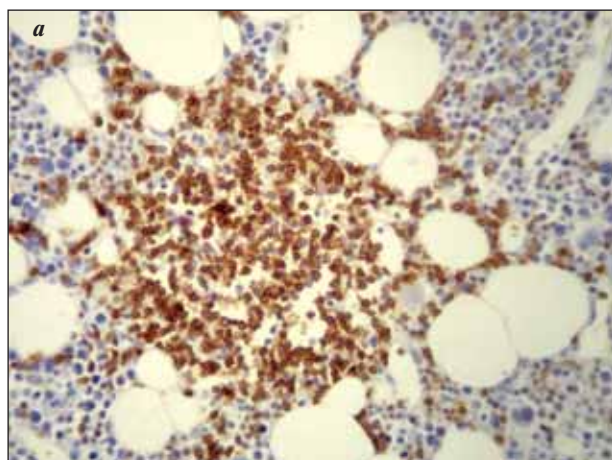


Рис. 2. Срез трепанобиоптата КМ. Иммуногистохимическое исследование, ув. 400:

а — окраска на пан-Т-клеточный антиген CD3. Рыхлое реактивное Т-клеточное скопление; б — увеличенная пропорция плазматических клеток зрелого вида (специфический маркер CD138), расположенных паракапиллярно (признак реактивного состояния гемопоэтической ткани)

волил исключить во всех наблюдениях сочетанную острую бактериальную или вирусную инфекцию. На этом основании можно предположить, что несмотря на толерантность иммунной системы к покоящимся опухолевым клеткам интрамедуллярная диссеминация опухоли все же провоцирует определенное реактивное состояние иммунной системы.

### Исследование аспирата КМ

СК+ клетки были обнаружены в трех из семи исследованных аспиратов КМ при помощи ПЦ (см. табл. 2). Помимо собственно определения АГ+ клеток важной опцией ПЦ была возможность подсчета их абсолютного числа. В среднем

их количество составило 2–3 клетки на  $6 \times 10^6$  элементов мононуклеарной фракции КМ, что полностью совпало с литературными данными. Для исключения ложноположительных результатов (аберрантная экспрессия СК гемопоэтическими клетками) сбор СК+ клеток проходил в CD45-негативном гейте (CD45 представляет собой общий лейкоцитарный антиген, маркерный для всех клеток гемопоэтического происхождения).

### Сравнение диагностической ценности аспирата и трепанобиоптата КМ

- Аспират представляет собой нативную клеточную взвесь с сохраненной антигенной структу-

Таблица 2. Сводные данные исследования КМ

| Тип материала  | Морфологическое исследование | МТС+ | Иммунофенотипирование | МТС+, % |
|----------------|------------------------------|------|-----------------------|---------|
| Аспират        | 7                            | 0    | 7                     | 3 (43)  |
| Трепанобиоптат | 15                           | 0    | 15                    | 3 (20)  |

рой эпителиев, в частности эпителиев цитокератинового скелета. Трепанобиопат представляет собой материал, прошедший гистологические проводки, калечащие и меняющие антигенные структуры клеток, что может приводить к ложноотрицательным/ложноположительным результатам при иммуногистохимическом анализе.

- Аспират, в отличие от трепанобиоптата, доступен для иммунологического исследования методом ПЦ. ПЦ позволяет одновременно анализировать антигенную коэкспрессию, например, коэкспрессию CD45 (общий лейкоцитарный антиген) и исследуемых СК, для исключения ложноположительных результатов. Кроме того, возможен анализ экспрессии метастатическими клетками любых маркерных комбинаций — циклассоциированных антигенов, факторов роста, белков — продуктов гиперэкспрессии онкогенов (например, экспрессия Her-2/neu на СК+ клетках при РМЖ и т.д.). При иммуногистохимическом анализе существует возможность использования только двойной МАТ-метки, однако и это сопряжено с существенными методическими сложностями.

- Одним из наиболее важных параметров является количество клеточных событий в образце КМ, доступных для иммуноморфологического исследования. Для ПЦ аспирата этот показатель равен примерно 1012 элементов, для трепанобиоптата — 12 000 (среднее количе-

ство клеток в серии из 10 срезов при нормоклеточном КМ). Приготовление и иммуногистохимическое окрашивание более 10 срезов трепанобиоптатов представляется крайне затратным материально и технически.

- При исследовании аспирата методом ПЦ возможен также параллельный субпопуляционный анализ лимфоцитов КМ для определения иммунного статуса, выделения и сравнительного количественного анализа хелперных и супрессорных лимфоидных популяций.

Таким образом, целесообразно принять за более достоверные результаты исследования аспиратов КМ. Основной вывод первого этапа работы заключается в нецелесообразности анализа материала трепанобиоптатов КМ для иммуногистохимического поиска микрометастатических диссеминатов при РЯ. С учетом этого для мМТС+ случаев РЯ принимается за 43% и, как было показано, соответствует III клинической стадии. В дальнейшем планируются завершение исследования КМ на микрометастазирование, ретроспективная оценка влияния мМТС+ на показатели выживаемости и продолжительность безрецидивного периода по сравнению с контрольной (без мМТС) группой при РЯ. Результаты проведенных исследований клеточных культур и анализ лимфоидных популяций в КМ и причин иммунной толерантности будут представлены в последующих публикациях.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аксель Е.М. Статистика злокачественных опухолей яичника. В кн.: Е.М. Аксель, В.П. Казаченко, Т.И. Ушакова. Современные экспериментальные и клинические подходы к диагностике и рациональному лечению рака яичников. М.; 2001.
2. Abdul-Karim F.W., Kida M., Wentz W.B. et al. Bone metastasis from gynecologic carcinomas: A clinicopathologic study. *Gynecol Oncol* 1990;39:108—14.
3. Dauplat J., Hacker N.F., Nieberg R.K. et al. Distant metastases in epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 1987;60:1561—6.
4. Жордания К.И. Злокачественные новообразования яичников. Энциклопедия клинической онкологии. М., Издательская группа ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН; 2004. с. 427—41.
5. Bain B.J., Clark D.M., Lampert I.A., Wilkins B.S. Bone marrow pathology. L., Blackwell Science; 2001.
6. Schlimok G., Funke I., Bock B. et al. Epithelial tumor cells in bone marrow of patients with colorectal cancer: immunocytochemical detection, phenotypic characterization, and prognostic significance. *J Clin Oncol* 1990;8:831—7.
7. Pantel K., Schlimok G., Kutter D. et al. Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells. *Cancer Res* 1991;51:4712—5.
8. Braun S., M.D., Pantel K., Müller P. et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000;342(8):525—33.
9. Brandt B., Roetger A., Heidl S. et al. Isolation of blood-borne epithelium-derived c-erbB-2 oncoprotein oncoprotein-positive clustered cells from the peripheral blood of breast cancer patients. *Int J Cancer* 1998;76:824—8.
10. Allgayer H., Heiss M.M., Riesenberger R. et al. Urokinase plasminogen activator receptor (uPA-R): one potential characteristic of metastatic phenotypes in minimal residual tumor disease. *Cancer Res* 1997;57:1394—9.
11. Braun S., Schindlbeck C., Hepp F. et al. Occult tumor cells in bone marrow of patients with locoregionally restricted ovarian cancer predict early distant metastatic relapse. *J Clin Oncol* 2001;19(2):368—75.
12. Marth C., Kiscic J., Kaem J. et al. Circulating tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with ovarian carcinoma do not predict prognosis. *Cancer* 2002;94(3):707—12.
13. Martin V.M., Siewert C., Scharl A. et al. Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS. *Exp Hematol* 1998;26(3):252—64.

**Уважаемые коллеги!**

Подписаться на журнал «ОПУХОЛИ ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ» на 2007 г. можно в любом отделении связи.

Подписной индекс в каталоге «Почта России» — 12286.

