

УДК 618.19-006.6-033.2:616.419

*Беришвили А.И., Тупицын Н.Н., Лактионов К.П., Левкина Н.В., Кочоян Т.М., Керимов Р.А.***ОСОБЕННОСТИ МИКРОМЕТАСТАЗИРОВАНИЯ
ОТЕЧНО-ИНФИЛЬТРАТИВНОЙ ФОРМЫ РМЖ В КОСТНЫЙ МОЗГ***РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация***Беришвили Александр Ильич, к.м.н., с.н.с., хирургического отделения опухолей женской репродуктивной системы***Адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(495) 226-48-23**e-mail:** aberishvili@yandex.ru

Статья поступила 14.12.2010., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

ОИФ РМЖ является редкой и крайне агрессивной формой рака. Из-за малого количества больных с данной патологией и их гетерогенности практически отсутствуют крупные рандомизированные исследования, посвященные изучению микрометастазирования рака в костный мозг, а также его влиянию на безрецидивную и общую выживаемость больных ОИФ РМЖ. Установленная нами при иммуноцитологическом исследовании частота микрометастатического поражения костного мозга при ОИФ РМЖ в 7 раз выше, чем при стандартном цитологическом исследовании (36,8% vs 5,3%). Не выявлено взаимосвязи между гистологическим строением опухоли, ее рецепторным статусом и частотой микрометастазирования в костный мозг ОИФ РМЖ. Нами не получено статистически достоверных различий в результатах БРВ и ОВ больных ОИФ РМЖ при наличии или отсутствии микрометастазов в костный мозг.

Ключевые слова: отечно-инфильтративная форма рака молочной железы, микрометастазы в костный мозг, безрецидивная выживаемость, общая выживаемость.

*Berishvili A.I., Tupizin N.N., Laktionov K.P., Levkina N.V., Kochoyan, T.M., Kerimov R.A.***BONE NARROW METASTASES
IN INFLAMMATORY BREAST CANCER***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Resume**

IBC is both the least frequent and the most aggressive form of epithelial breast cancer. Because of small number of patients and their heterogeneity, micrometastatic bone narrow involvement in IBC is not investigated in randomized trials and little is known about its influence on disease-free survival and overall survival. In immunocytological study micrometastatic bone narrow involvement was 7 times higher than in standard cytological examination (36,8% vs 5,3%). We found no correlation between histological types of IBC, its hormone receptor status and micrometastatic bone narrow involvement. Our data demonstrated no influence of micrometastatic bone narrow involvement on DFS and OS of patients with IBC.

Key words: inflammatory breast cancer, micrometastatic bone narrow involvement, disease-free survival, overall survival.

Введение

В настоящее время правильное стадирование рака молочной железы вместе с другими факторами прогноза является определяющим фактором в выборе тактики лечения больных РМЖ. Исследование костного мозга на предмет метастатического поражения до настоящего времени зачастую оставалось за пределами стандартного онкологического обследования. Сегодня пришло время расширить рамки стандартно выполняемых тестов и включить в арсенал используемых методов диагностики исследование костного мозга, который представляет собой идеальную мишень для гематогенного метастазирования опухолей.

Из-за низкой частоты ОИФ РМЖ практически отсутствуют крупные рандомизированные исследования, посвященные изучению микрометастазирования рака в костный мозг, а также его влиянию на БРВ и ОВ больных ОИФ РМЖ.

Обнаружение малых количеств метастатических клеток в костном мозге больных РМЖ служит показателем гематогенной диссеминации процесса и многими учеными рассценивается как неблагоприятный

признак, свидетельствующий о дальнейшем формировании метастазов, прежде всего в кости [1–3].

Существуют диаметрально противоположные точки зрения относительно связи между выявлением опухолевых клеток в костном мозге и основными факторами риска, такими как размер опухоли и поражение регионарных лимфоузлов.

Так, I. Diel et al. [4] обнаружили связь между метастатическим поражением костного мозга и размером опухоли ($p < 0,001$), состоянием регионарных лимфоузлов ($p = 0,001$), степенью злокачественности ($p = 0,002$) и постменопаузальным статусом больных ($p = 0,01$). Исследователи из London Ludwig Cancer Institute установили, что наличие EMA⁺ клеток в костном мозге тесно связано с поражением регионарных лимфоузлов, перитуморальной сосудистой инвазией и размерами первичного опухолевого очага [3].

S. Braun et al. [1] указали на наличие корреляции между обнаружением микрометастазов в костном мозге и ОИФ РМЖ, размером опухолевого очага, обширным поражением регионарных лимфоузлов (для каждого фактора $p < 0,0001$) и степенью злокачественности ($p = 0,0044$).

В настоящее время отсутствует единая точка зрения относительно роли и места иммуноцитологического исследования в диагностике микрометастазов ОИФ РМЖ, а также их прогностическом влиянии на БРВ и ОВ данной категории больных, что и послужило целью настоящего исследования.

Материал и методы

Совместно с лабораторией иммунологии гемопоза нами проведено проспективное исследование микрометастатического поражения костного мозга у 19 больных ОИФ РМЖ, получавших лечение в хирургическом отделении опухолей женской репродуктивной системы РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в 2003–2005 гг. В исследуемую группу вошли женщины в возрасте от 29 до 73 лет. Средний возраст пациенток составил 52 года.

Распределение по стадиям:

T₄N₁M₀ – 10 (52,6%) больных,

T₄N₂M₀ – 4 (21,0%) больных,

T₄N₃M₀ – 2 (10,5%) больных,

T₄N₂M₁ – 3 (15,8%) больных.

Первичная ОИФ РМЖ выявлена у 6 (31,6%) больных, вторичная ОИФ РМЖ – у 13 (68,4%) больных. Стернальная пункция выполнялась всем больным до начала лечения. Исследование выполнялось как стандартным цитологическим методом, так и иммуноцитологическим методом с использованием реакции иммунофлуоресценции с применением моноклональных антител к цитокератинам CAM 5.2 (Becton Dickinson, США) и KL-1 (Immunotech, Франция). При проведении исследования методом проточной цитофлуориметрии использована тройная флуоресцентная метка CD45-EМА-CD326.

Положительной считали реакцию при наличии опухолевых клеток, причем за пороговые значения нами принимались 2 или не менее 10 метастатических клеток среди 1 млн. миелокариоцитов.

При использовании МКА к цитокератинам пораженные клетки выявлялись по наличию яркого специфического цитоплазматического флуоресцентного свечения (рис.).

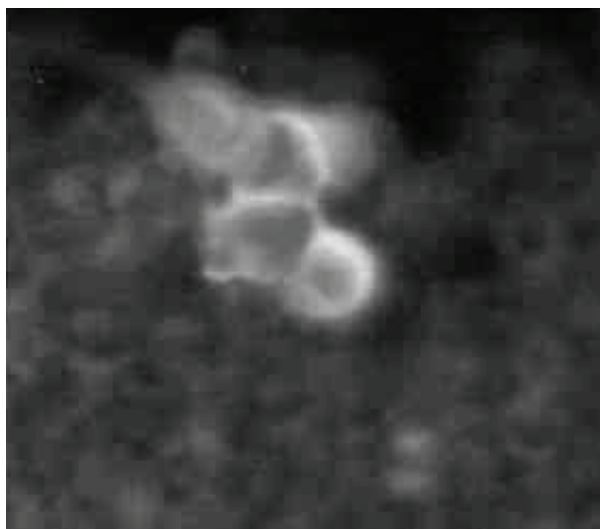


Рис. Комплекс метастатических клеток в костном мозге. Цитоцентрифужный препарат. Окраска МКА KL-1. × 400.

При иммунофенотипировании выделяли 3 типа взаимодействия антител с опухолевыми клетками:

- *Отрицательная реакция* (–) – менее 10% антигенположительных опухолевых клеток.
- *Мозаичная реакция* (+/–) – антиген присутствовал на части (от 10 до 80%) опухолевых клеток.
- *Мономорфная реакция* (+) – антиген экспрессируется большинством (более 80%) опухолевых клеток.

При иммунофенотипировании иммунокомпетентных клеток в гистологических срезах опухоли выделяли 3 типа иммунных реакций:

- *Отрицательная реакция* – антигенположительные клетки не определяются или определяются небольшое их количество в препарате.
- *Умеренная реакция* – умеренное количество антигенположительных клеток, расположенных разрозненно или мелкими группами.
- *Выраженная реакция* – множество антигенположительных клеток в срезах, могут встречаться крупные группы и инфильтраты из этих клеток.

Статистическая обработка данных выполнена с помощью электронных таблиц Microsoft Excel и пакета прикладных программ Statistica for Windows v.6.0 (StatSoft Inc., США). Достоверность различий признаков в сопоставляемых группах оценивали с использованием t-критерия Стьюдента (ДИ не менее 95%, $p < 0,05$). Показатели выживаемости вычисляли методом построения таблиц дожития по Kaplan-Meier.

Результаты

В репродуктивном периоде находились 8 (42,1%) больных, в менопаузе – 11 (57,9%) женщин. Ранее беременели, рожали 18 (94,7%) пациенток, а 1 (5,3%) страдала бесплодием.

По гистологическому строению чаще встречался инфильтративный протоковый рак (ИПР) – у 13 (68,4%), реже – инфильтративный дольковый рак (ИДР) (6 (31,6%) больных).

Следует пояснить, что в работе мы использовали два термина: макро- и микрометастазы. Под макрометастазами нами подразумевались метастазы, выявляемые при цитологическом или гистологическом исследовании, а под микрометастазами – метастазы, выявляемые при иммуноцитологическом исследовании.

Макрометастазы выявлены с помощью цитологического метода у 1 (5,3%) больной, а микрометастазы с пороговым значением 2 и более опухолевых клеток – у 7 (36,8%) и с пороговым значением 10 и более опухолевых клеток – у 5 (26,3%) больных. Считается, что пороговая опухолевая нагрузка в 10 и более опухолевых клеток в костном мозге резко увеличивает вероятность возникновения отдаленных метастазов. Примечательно, что с помощью реакции иммунофлуоресценции с применением моноклональных антител нами выявлялись даже единичные эпителиальные клетки в костном мозге больных ОИФ РМЖ, что, несомненно, отражает высокую чувствительность данной методики по сравнению со стандартным цитологическим исследованием. Таким образом, применение иммуноцитологического исследования позволяет в 5–7 раз повысить эффективность диагностики метастазов в костный мозг по сравнению со стандартным цитологическим исследованием, что, в свою очередь, позволяет адекватно стадировать и индивидуализировать тактику лечения больных ОИФ РМЖ.

Нами исследован ряд клинико-морфологических признаков на предмет установления возможной связи с частотой развития микрометастазов при пороговой частоте более 2 опухолевых клеток.

Микрометастазы выявлены у 7 (36,8%) больных, микрометастазы отсутствовали у 12 (63,2%) больных ОИФ МЖ. При анализе частоты развития микрометастазов в зависимости от гистологического строения опухоли статистически достоверных различий не получено: из 12 больных без поражения костного мозга у 4 (33,3%) выявлен ИДР, у 8 (66,7%) – ИПР, аналогичная тенденция отмечается и у больных с микрометастатическим поражением костного мозга – 2 (28,6%) и 5 (71,4%) больных соответственно ($p=0,8$).

Анализ частоты развития микрометастазов в зависимости от рецепторного статуса опухоли также не выявил статистически достоверных различий. Так, из 12 больных без метастатического поражения у 6 (50,0%) были эстрогенпозитивные опухоли, а еще у 6 (50,0%) – эстрогеннегативные опухоли, а из 7 больных с метастатическим поражением эстрогенпозитивные опухоли отмечены у 2 (28,6%), а эстрогеннегативные – у 5 (71,4%) больных ($p=0,3$).

Аналогичная тенденция обнаружена и по рецепторам прогестерона: из 12 пациенток без микрометастатического поражения костного мозга у 3 (25,0%) были прогестеронпозитивные опухоли, у 9 (75,0%) – прогестероннегативные, а в группе пациенток с метастатическим поражением костного мозга – 3 (42,9%) и 4 (57,1%) соответственно ($p=0,4$).

Анализ в зависимости от HER-2/неу статуса опухоли показал в группе пациенток без метастатического поражения следующие результаты: HER-2/неу 0 выявлялся у 5 (41,7%) пациенток, HER-2/неу 1+ – у 4 (33,3%), HER-2/неу 2+ – у 2 (16,7%), HER-2/неу 3+ – у 1 (8,3%) пациентки, а в группе пациенток с микрометастазами – у 2 (28,6%), 1 (14,3%), 0 и 4 (57,1%) пациенток соответственно ($p=0,085$).

Нами проведен анализ иммунофенотипов опухоли и рассмотрена их связь с развитием микрометастазов у 10 больных ОИФ РМЖ. Исследовали экспрессию на опухолевых клетках молекул гистосовместимости I и II классов, трансферринового рецептора CD71, MUC-1, общелейкоцитарных антигенов – ЕрСАМ или панцитокератинов (KL-1).

Из 5 больных без микрометастазов при анализе иммунофенотипов по HLA-I у 2 (40,0%) отмечалась отрицательная реакция, у 1 (20,0%) – мозаичная, у 2 (40,0%) – мономорфная реакция, а из 5 больных с микрометастазами распределение составило 2 (40,0%); 2 (40,0%) и 1 (20,0%) соответственно ($p=0,7$).

Аналогично не получено статистически достоверных различий распределения по HLA-II по выраженности реакции, которое составило 2 (40,0%); 2 (40,0%); 1 (20,0%) и 2 (40,0%); 1 (20,0%); 2 (40,0%) при отсутствии или наличии микрометастазов соответственно ($p=0,7$).

Анализ по MUC-1 показал, что из 5 больных без микрометастазов у 1 (20,0%) отмечена мозаичная реакция, у 4 (80,0%) – мономорфная, а из 5 больных с микрометастазами у 1 (20,0%) отмечена отрицательная реакция, у 1 (20,0%) – мозаичная, у 3 (60,0%) больных – мономорфная реакция ($p=0,5$).

При изучении CD71 и в подгруппе без микрометастазов и в подгруппе с микрометастазами выявлено одинаковое распределение реакций: у 1 (20,0%) пациентки мозаичная реакция, а у 4 (80,0%) – мономорфная ($p=0,7$). Сопоставление проведено также с уровнями инфильтрации опухоли субпопуляциями лимфоцитов и макрофагами.

При изучении интратуморальных макрофагов (МКА D11) в подгруппе 4 пациенток без микрометастазов у 3 (75,0%) отмечена незначительная инфильтрация, у 1 (25,0%) – умеренная, а в подгруппе 4 пациенток с микрометастазами у 1 (25,0%) пациентки отмечена незначительная реакция, у 1 (25,0%) – умеренная и у 2 (50,0%) пациенток – выраженная реакция ($p=0,2$).

Статистически достоверные различия получены при исследовании CD7, где из 5 больных без микрометастазов у 4 (80,0%) отмечено практически полное отсутствие Т-клеток в опухолевой ткани, а у 1 (20,0%) – выраженная Т-клеточная инфильтрация, тогда как из 5 больных с микрометастазами у 4 (80,0%) выявлена умеренная и у 1 (20,0%) – выраженная реакция ($p=0,018$).

Данная тенденция просматривалась и для CD45, где у 5 пациенток распределение было следующим: 2 (40,0%); 2 (40,0%) и 1 (20,0%), а из 5 пациенток с микрометастазами у 1 (20,0%) отмечена умеренная, а у 4 (80,0%) – выраженная инфильтрация ($p=0,055$).

Для CD4 таких тенденций не выявлено. Так, при исследовании CD4 из 5 пациенток без микрометастазов у 4 (80,0%) отмечена умеренная реакция, у 1 (20,0%) – выраженная, а из 4 пациенток с микрометастазами – у 1 (25,0%) и у 3 (75,0%) соответственно ($p=0,1$).

Исследование CD8 показало, что в подгруппе без микрометастазов практически полное отсутствие инфильтрации имело место у 3 (60,0%) больных, умеренная реакция – у 1 (20,0%) и выраженная – у 1 (20,0%), а в подгруппе с микрометастазами – у 1 (25,0%); 2 (50,0%) и 1 (25,0%) больной соответственно ($p=0,4$).

Для CD16 различия также не достигали статистически значимых и было установлено, что в подгруппе без микрометастазов у всех 5 (100,0%) пациенток отсутствовали данные клетки, а в подгруппе с микрометастазами – у 3 (60,0%) пациенток реакция CD16-клеток отсутствовала, а 2 (40,0%) – а у 2 была умеренной ($p=0,2$). Нами проведен анализ БРВ и ОВ больных ОИФ РМЖ с и без микрометастазов в костный мозг.

Анализ выживаемости при пороговом значении более 2 метастатических клеток не выявил статистически достоверных различий в БРВ и ОВ больных ОИФ РМЖ в зависимости от наличия или отсутствия микрометастазов в костный мозг.

Установлено, что средняя БРВ больных без микрометастазов составила $20,3 \pm 3,6$ мес. (95%-ный ДИ, 13,3–27,2 мес.) с медианой $15 \pm 3,1$ мес., а у больных с микрометастазами – $25,1 \pm 3,5$ мес. (95%-ный ДИ, 18,3–31,9 мес.) с медианой $24 \pm 2,1$ мес. ($p=0,7$) Средняя ОВ больных без микрометастазов составила $23,7 \pm 3,5$ мес. (95%-ный ДИ, 16,8–30,5 мес.), медиана не достигнута, а у больных с микрометастазами – $24,4 \pm 3,8$ мес. (95%-ный ДИ, 16,9–31,9 мес.) с медианой $24 \pm 2,2$ мес. ($p=0,8$)

Обсуждение

Следует отметить, что в современной литературе практически отсутствуют работы по изучению микрометастазирования ОИФ РМЖ в костный мозг. Это во многом объясняется низкой частотой данной нозологической патологии, а также недостаточным внедрением иммуноцитологического метода с использованием реакции иммунофлуоресценции с применением моноклональных антител к цитокератинам в повседневную онкологическую практику.

Один из первых исследователей метастатического поражения КМ W. Redding (1983) использовал антитела против ЕМА и выявил клетки РМЖ в КМ на момент выполнения хирургического вмешательства у 28% больных при отсутствии очевидных отдаленных метастазов [5]. По данным ряда авторов, частота микрометастазов, выявленных иммуноцитохимическим методом, возрастает с увеличением стадии [6; 7]. В работе M. Osborne et al. [8] микрометастазы в КМ обнаруживались у 38% пациенток с IV стадией РМЖ при наличии метастазов в кости, у 20% больных с неместными отдаленными метастазами и у 10% больных с первично операбельным раком молочной железы. Проведенное нами пилотное проспективное исследование показало высокую эффективность иммуноцитологического исследования КМ у больных ОИФ РМЖ по сравнению со стандартным цитологическим исследованием. В частности обнаружено, что частота микрометастатического поражения КМ, выявляемая при иммуноцитологическом исследовании, в 7 раз выше, чем при стандартном цитологическом исследовании (36,8 vs 5,3%). Аналогичные результаты получены и в исследовании О. Крохиной и соавт. [7]. Частота микрометастазирования ОИФ РМЖ в КМ в нашем исследовании составила 36,8%, что совпадает с данными отечественных и зарубежных авторов [2; 6; 9]. Особый интерес представляют исследования по изучению прогностического влияния метастазов в КМ на показатели БРВ и ОВ. Ряд ученых считает, что такая связь существует [2; 4; 10; 11], другие придерживаются диаметрально противоположной точки зрения [5; 12]. J. Mansi et al. [11] отметили существенное сокращение продолжительности безрецидивного периода у больных с микрометастазами в костный мозг в течение 28-месячного периода наблюдения. При медиане наблюдения 76 мес. многофакторный статистический анализ показал, что у больных с микрометастазами в костный мозг увеличивается вероятность развития костных ($p < 0,01$) и других отдаленных метастазов ($p < 0,001$), а также сокращается общая выживаемость ($p < 0,005$). Многофакторный анализ с использованием 6-летнего и более чем 12-летнего сроков клинического наблюдения показал, что наличие ЕМА⁺ клеток в КМ является независимым основополагающим прогностическим фактором наравне с размером опухоли, степенью злокачественности и состоянием региональных лимфоузлов.

Литература

1. Braun S. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II or III breast cancer / S. Braun, K. Pantel, P. Muller et al. // N. Engl. J. Med. – 2000. – Vol. 34. – № 2. – p. 525-33.
2. Harbeck N. Tumor cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up / N. Harbeck, M. Untch, L. Pache et al. // Br. J. Cancer. – 1994. – Vol. 69. – p. 566-71.
3. Pantel K. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow / K. Pantel, G. Schlimok, M. Angstwurm et al. // J. Hematother. – 1994. – Vol. 3. – p. 165-73.
4. Diel I. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status / I. Diel, M. Kaufmann, S. D. Costa et al. // J. Natl. Cancer Inst. – 1996. – Vol. 88. – p. 1652-64.
5. Redding W. Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer / W. Redding, R. Coombes, P. Monaghan P. et al. // Lancet. – 1983. – Vol. 2. – p. 271-74.
6. Берензон Д.П. Поражение костного мозга при солидных опухолях / Д.П. Берензон, А.В. Колосков, В.А. Тарасов // Гематология и трансфузиология. – 2000. – Т. 45., №5 – с. 42–6.
7. Крохина О.В. Иммуноцитологическая диагностика микрометастазов рака молочной железы в костный мозг / О. В. Крохина, В. П. Лелягин, Н. Н. Тупицын и др. // Иммунология гемопоза. – 2007. – Т. 4., №2. – с. 116–30.
8. Osborne M. Detection and management of... / M. Osborne, P. Rosen // Oncology. – 1994. – Vol. 8. – p. 25-36
9. Funke I. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated / I. Funke, W. Schraut // J. Clin. Oncol. – 1998. – Vol. 16. – p. 557–66.
10. Landys K. Prognostic value of bone marrow biopsy in operable breast cancer patients at the time of initial diagnosis: results of a 20-year median follow-up / K. Landys, S. Persson, J. Kovarik et al. // Breast Cancer Res. Treat. – 1998. – Vol. 49. – p. 27-33.
11. Mansi J. Outcome of primary breast cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up / J. Mansi, H. Gogas, J. Bliss et al. // Lancet. – 1999. – Vol. 354. – p. 197-202
12. Schwartz G. Induction chemotherapy followed by breast conservation for locally advanced carcinoma of the breast / G. Schwartz, C. Birchansky, L. Komarnicky et al. // Cancer. – 1994. – Vol. 73 (2). – p. 362–9.
13. Braun S. et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer // N. Engl. J. Med. – 2005. – Vol. 353. – p. 793-802.

В одном из проспективных исследований S. Braun et al. изучали состояние КМ 552 первичных больных РМЖ с I-III стадиями заболевания с использованием антител к цитокератинам [1]. Метастазы в КМ были диагностированы у 199 больных (36%). Как показали результаты исследования, наличие опухолевых клеток в КМ после 4 лет наблюдения было ассоциировано с высоким риском развития отдаленных метастазов и увеличением смертности от прогрессирования заболевания ($p < 0,001$), но не с риском развития местного рецидива ($p = 0,77$). Одновременно многофакторный регрессионный анализ показал, что наличие метастатических клеток в КМ является прогностическим фактором неблагоприятного прогноза независимо от состояния региональных лимфоузлов. Поражение КМ встречалось так же часто при метастазах в региональные лимфоузлы, как и без таковых ($p = 0,13$).

А метаанализ результатов лечения и наблюдения 2494 больных РМЖ не выявил убедительных доказательств независимой прогностической роли метастатического поражения КМ в отношении показателей общей и БРВ [13]. Однако необходимо отметить ряд ограничений данного анализа, таких как, например, существенно отличающиеся между собой методы диагностики опухолевых клеток в КМ. Обнаружение микрометастазов в костном мозге, а соответственно и прогностическая значимость данного фактора во многом зависят от множества технических причин, таких как выбор антител, лабораторного оборудования, кроме того, имеет значение число исследуемых клеток, так же как и количество пациентов, включенных в исследование.

В проведенном нами исследовании статистически достоверных различий в результатах ОВ и БРВ больных ОИФ РМЖ при наличии или отсутствии микрометастазов в КМ не получено. Подводя итог вышесказанному, следует отметить, что с позиции современных представлений о биологии опухоли представляется безусловно целесообразным ввести в клиническую практику исследования КМ для выявления диссеминации опухолевого процесса, а для более детального изучения различных клинико-морфологических и биологических особенностей микрометастазирования РМЖ в КМ необходимо проведение крупного мультицентрового проспективного исследования.