

О. Б. Бжадуг, Л. Ю. Гривцова, Н. Н. Тупицын, С. А. Тюляндин
**ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ В КРОВИ БОЛЬНЫХ
МЕСТНОРАСПРОСТРАНЕННЫМ И ДИССЕМИНИРОВАННЫМ РАКОМ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

НИИ клинической онкологии ГУ РОНЦ РАМН им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

Циркулирующие опухолевые клетки выявляются у 41,3% больных распространенным раком молочной железы в количестве не менее одной на миллион лейкоцитов. Количество циркулирующих опухолевых клеток не зависит от локализации и числа метастазов, а также от рецепторного статуса первичной опухоли молочной железы. Циркулирующие опухолевые клетки выявляются у больных в постменопаузе чаще, чем у пациенток в пременопаузе (у 47,8 и 26,7% соответственно, $p = 0,044$). У больных инфильтративно-дольковым раком молочной железы циркулирующие опухолевые клетки обнаруживаются достоверно чаще, чем у больных с инфильтративно-протоковым раком молочной железы (в 69,2 и 31% случаев соответственно, $p = 0,02$). Наличие микрометастазов в костный мозг не влияет на частоту выявления циркулирующих опухолевых клеток. До лечения и после него циркулирующие опухолевые клетки выявляются примерно с одинаковой частотой (в 41,3 и 45,5% случаев соответственно). Выявление циркулирующих опухолевых клеток не влияет на общую и безрецидивную выживаемость больных с распространенными стадиями рака молочной железы. При оценке динамики количества циркулирующих опухолевых клеток до системной противоопухолевой терапии (химиотерапии или гормонотерапии) и после нее оказалось, что у больных со снижением количества циркулирующих опухолевых клеток после лечения отмечена достоверно большая длительность периода до прогрессирования, чем у больных с повышением количества циркулирующих опухолевых клеток после лечения (14 и 8 мес соответственно, $p = 0,0127$). Динамика количества циркулирующих опухолевых клеток после специфического противоопухолевого лечения может служить новым объективным критерием оценки ответа на лечение и информативным фактором прогноза у больных диссеминированным раком молочной железы.

Ключевые слова: проточная цитофлюорометрия, циркулирующие опухолевые клетки, рак молочной железы.

Во многих клинических исследованиях показано, что циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) присутствуют в крови больных раком молочной железы (РМЖ) как с распространенными, так и с ранними стадиями [5; 6; 8].

Обнаружение единичных опухолевых клеток в крови и костном мозге больных РМЖ I—II стадий, даже в отсутствие метастазов в лимфатические узлы, отражает феномен прямого гематогенного распространения злокачественной опухоли, не определяемого стандартными методами диагностики.

Выявление циркулирующих в периферической крови опухолевых клеток и их характеристика у больных РМЖ имеют большое практическое значение, так как позволяют уточнить степень распространенности опухолевого процесса, определить прогноз для больной и выбрать оптимальную тактику лечения. Кроме того, единичные

опухолевые клетки, циркулирующие в периферической крови, изучаются в клинических исследованиях как прогностический фактор рецидива, а также как потенциальный маркер, позволяющий оценивать эффективность системного лечения [1; 2; 4].

По данным различных авторов, опухолевые клетки в периферической крови определяются у больных метастатическим РМЖ чаще (до 71%), чем у больных местнораспространенным (N+) (до 36,2%) и ранним (N0) РМЖ (до 30%) [2; 3; 6; 7].

Одним из наиболее информативных методов выявления микрометастазов с точки зрения клинического применения является проточная цитофлюорометрия [4], которая превосходит по чувствительности морфоцитологические методы в случаях, когда единичные опухолевые клетки не выявляются или их гистогенез вызывает сомнения. Несомненное преимущество данного метода заключается в высокой воспроизводимости, а также быстрой получении результатов исследования (общая продолжительность анализа от подготовки

пробы до получения обработанных результатов занимает не более 5 ч).

В работе представлены результаты проточно-цитофлюорометрического изучения ЦОК в периферической крови больных местнораспространенным и диссеминированным РМЖ и оценена клиническая значимость данного феномена.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованы данные клинического, морфологического, иммуноцитологического и иммуноцитофлюорометрического исследований, а также результаты лечения 65 больных местнораспространенным (первично-неоперабельным) и диссеминированным РМЖ, находившихся на лечении в ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН в период с 2001 по 2003 г.

Иммуноцитофлюорометрическое определение количества опухолевых клеток в периферической крови методом проточной цитофлюорометрии проводили с использованием моноклональных антител к эпителиальным антигенам (Egp34, BerEP4). Для иммуноцитологического определения микрометастазов в костном мозге использовали моноклональные антитела к панцитокератинам KL-1. Чувствительность метода составляет одна клетка на миллион лейкоцитов. Для идентификации и характеристики ЦОК использовали следующую панель моноклональных антител: IgG1 PerCP (контроль); CD45PerCP/IgG1FITC/IgG1PE (контроль в CD45-негативном гейте); CD45PerCP/HEA 125 PE/BerEP4FITC.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Средний возраст больных составил 53 года (от 26 до 75 лет). У 57 (87,7%) больных была определена IV стадия РМЖ; у 8 (12,3%) диагностирован местнораспространенный неоперабельный РМЖ. Большинство пациенток (47; 72,3%) находились в постменопаузе. У 26 (45,6%) больных заболевание было выявлено впервые, у 31 (54,4%) на момент включения в исследование отмечался рецидив заболевания после различных видов противоопухолевого лечения.

Химиотерапия в рамках исследования проведена на 52 (80,0%), гормонотерапия — 13 (20,0%) больным. Большинству больных (43; 66,1%) проводили химиотерапию по схеме FAC (5-фторурацил, доксорубин, циклофосфамид).

Иммуноцитофлюорометрическое исследование периферической крови до начала лечения проведено 63 больным. По окончании цикла лечения (6 курсов химиотерапии или 3-месячный курс гормональной терапии) исследование периферической крови выполнено у 21 больной.

Во всей анализируемой группе ЦОК (к позитивным случаям мы относили таковые с наличием не менее 1 ЦОК на 10^5 лейкоцитов) выявлены до лечения у 41,3% больных.

Число ЦОК колебалось от 1 до 418 на 10^6 лейкоцитов. У 28,6% больных ЦОК определялись в количестве от 11 до 100 на 10^6 лейкоцитов, у 12,7% больных — более 100 на 10^6 лейкоцитов.

По данным проточной цитофлюорометрии у больных местнораспространенным РМЖ (IIIb стадия) и у больных с отдаленными метастазами (IV стадия) ЦОК выявлялись приблизительно с одинаковой частотой (в 42,9 и 41% случаев соответственно).

При анализе частоты обнаружения и количества ЦОК в зависимости от различных клинических и морфологических характеристик опухоли в исследуемой группе больных получены следующие результаты.

Количество обнаруженных ЦОК не зависело от локализации и количества метастазов. Так, у больной с крайне диссеминированным процессом с метастазами в кости, печень, легкие, отдаленные лимфатические узлы ЦОК в крови до лечения не определялись, а у больной с местнораспространенным РМЖ было обнаружено 160 ЦОК на 10^5 лейкоцитов.

Не обнаружено зависимости между рецепторным статусом опухоли и наличием в периферической крови ЦОК. У 24 больных, у которых имелись рецепторы половых гормонов (эстрогенов и/или прогестерона) в ткани опухоли, ЦОК в периферической крови определялись чаще, чем у 18 больных, у которых рецепторы эстрогенов и прогестерона в опухоли отсутствовали, т. е. у 45,8 и 22,2% соответственно (различия не достоверны).

У 46 больных в постменопаузе клетки, несущие эпителиальные антигены, выявлялись в периферической крови чаще (47,8%), чем у 15 больных в пременопаузе (26,7%) ($p = 0,044$).

При анализе частоты обнаружения ЦОК у больных с различными гистологическими формами РМЖ оказалось, что у больных инфильтративно-дольковым РМЖ ЦОК в периферической крови определялись чаще, чем у больных инфильтративно-протоковым РМЖ (69,2 и 31% соответственно, $p = 0,02$).

У больных с микрометастазами в костном мозге частота выявления ЦОК в периферической крови составила 22,7% (5 антиген-позитивных случаев из 22 исследований), а у больных без микрометастазов в костном мозге — 44,5% (8 антиген-позитивных случаев из 18 исследований). Однако различия были не достоверными.

При анализе частоты выявления ЦОК в периферической крови в зависимости от локализации отдаленных метастазов взаимосвязь не обнаружена, хотя было показано, что чаще всего ЦОК определяются в крови у больных с метастазами только во внутренние органы: у 14 из 27 больных (51,9%). В группах больных с метастазами только в кости и с метастазами в кости и во внутренние органы клетки, несущие антигены, в периферической крови выявлялись одинаково часто — в 31,3% (у 5 из 16 больных) и 30,8% (у 4 из 13 больных) случаев соответственно.

По данным анализа, ЦОК у больных распространенным РМЖ выявляются как до лечения, так и после него примерно с одинаковой частотой (41,3 и 45,5% соответственно). Это не противоречит данным литературы: в исследовании, выполненном N. Xenidis [8], после завершения адъювантной химиотерапии микрометастазы в периферической крови были обнаружены даже у больных с I и со II стадиями процесса. Это свидетельствует о том, что для изучения механизмов метастазирования важно не просто выявлять ЦОК в крови до лечения и после него, но и оценивать их количество, динамику содержания ЦОК в крови на фоне лечения, а также изучать характеристики опухолевых клеток, которые продолжают циркулировать в периферической крови несмотря на проведенную противоопухолевую терапию.

В нашем исследовании иммуноцитологическое исследование ЦОК в периферической крови в динамике было проведено у 21 больной. В большинстве случаев анализ проводили по завершении химиотерапии или после 3-месячного курса гормонотерапии. У 2 больных исследование было проведено в связи с прогрессированием заболевания.

Количество ЦОК, выявленных до лечения и после него, существенно не различалось между группами: от 11 до 100 клеток, несущих антиген, до лечения выявлено у 18 из 63 (28,6%) больных, после лечения — у 6 из 23 (26%), более 100 опухолевых клеток до лечения выявлено у 8 из 63 (12,7%), после лечения — у 5 из 23 (21,7%).

При анализе влияния ЦОК на прогноз для больных в исследуемой группе оказалось, что наличие опухолевых клеток в периферической крови больных РМЖ III—IV стадий не влияло на продолжительность безрецидивного периода и общую продолжительность жизни. Возможно, это связано с тем, что на прогноз в группе больных диссеминированным РМЖ большее влияние оказывают другие факторы, такие, как рецепторный статус опухоли, возраст пациентки, а также локализация метастазов, количество зон поражения и тактика лечения. Так, наличие ЦОК в периферической крови до лечения влияло на общую продолжительность жизни только в подгруппе больных с метастатическим поражением костей (прогностически наиболее благоприятной). При наличии метастазов только в кости медиана общей продолжительности жизни у пациенток в отсутствие ЦОК на момент начала противоопухолевой терапии была почти в 2 раза больше, чем у больных с наличием ЦОК на момент начала лечения (21,5 и 11 мес соответственно, $p = 0,06$).

Связь динамики содержания ЦОК с эффектом лечения по клиническим и рентгенологическим данным оценена у 19 больных. У 12 (75%) больных динамика количества опухолевых клеток (до лечения и после него)

совпала с клинической и рентгенологической оценкой состояния болезни, т. е. при прогрессировании заболевания количество опухолевых клеток в периферической крови возрастало, а при стабилизации заболевания или частичной регрессии — снижалось по сравнению с начальным уровнем. В то же время при увеличении или в отсутствие уменьшения количества ЦОК, несмотря на хороший клинический эффект (полная или частичная регрессия опухоли), отмечалось прогрессирование заболевания в короткие сроки после окончания противоопухолевой терапии (5—9 мес). У больных с уменьшением количества ЦОК после полихимиотерапии наблюдалась достоверно большая продолжительность периода без прогрессирования по сравнению с таковым у больных с повышением уровня ЦОК после лечения (14 и 8 мес соответственно, $p = 0,0127$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные позволяют нам утверждать, что динамика содержания ЦОК в процессе химиотерапии является дополнительным объективным критерием оценки эффективности лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cristofanilli M., Budd G., Ellis M. et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer // *N. Engl. J. Med.* — 2004. — Vol. 35. — P. 781—791.
2. Gafforio J. J., Serrano M. J., Sanches-Rovira P. et al. Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis // *Int. J. Cancer.* — 2003. — Vol. 2, N 107. — P. 984—990.
3. Giatromanolaki A., Koukourakis M., Kakolyris S. et al. Assessment of highly angiogenic and disseminated in the peripheral blood disease in breast cancer patients predicts for resistance to adjuvant chemotherapy and early relapse // *Int. J. Cancer.* — 2004. — Vol. 10, N 108. — P. 620—627.
4. Gross H. J., Verwer B., Houck D. et al. Model study detecting breast cancer cells in peripheral blood mononuclear cells at frequencies as low as // *PNAS.* — 1995. — Vol. 92. — P. 537—541.
5. Manhani A. R., Manhani R., Soares H. P. et al. CK-19 expression by RT-PCR in the peripheral blood of breast cancer patients correlates with response to chemotherapy // *Breast Cancer Res. Treat.* — 2001. — Vol. 66, N 3. — P. 249—254.
6. Schoenfeld A., Kruger K. N., Gomm J. et al. The detection of Micrometastasis in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19 // *Eur. J. Cancer* — 1999. — Vol. 33, N 6. — P. 854—861.
7. Stathopoulou A., Vlachonikolis D., Mavroudis D. et al. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance // *J. Clin. Oncol.* — 2002. — Vol. 16. — P. 3404—3412.
8. Xenidis N., Vlachonikolis I., Mavroudis D. et al. Peripheral Blood circulating cytokeratin-19 mRNA-positive cells after the completion of adjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer // *Ann. Oncol.* — 2003 — N 1. — P. 849—855.

Поступила 03.05.2007

O. B. Bzhadug, L. Yu. Grivtsova, N. N. Tupitsyn, S. A. Tjulandin
**CIRCULATING TUMOR CELLS IN PATIENTS WITH LOCALLY ADVANCED
AND METASTATIC BREAST CANCER**

Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin RCRC RAMS, Moscow

Circulating tumor cells, at least one per million leukocytes, are found in 41.3% of patients with advanced breast cancer. Number of circulating tumor cells is not related to location or the number of metastases or receptor status of the primary breast tumor. Circulating tumor cells are isolated in menopausal patients more frequently than in premenopausal women (47.8% vs 26.7%, respectively, $p=0.044$). Patients with infiltrative lobular disease present with circulating tumor cells significantly more frequently than those with infiltrative ductal cancer (69.2% vs 31%, respectively; $p=0.02$). Bone marrow involvement has no impact on frequency of circulating tumor cell isolation. Circulating tumor cells are detected with similar frequency before and after treatment (41.3% vs 45.5%, respectively). The presence of circulating tumor cells in patients with advanced breast cancer has no effect on overall or disease-free survival rates. Analysis of changes in the number of circulating tumor cells before versus after systemic anticancer therapy (chemotherapy or hormonal therapy) demonstrated that patients in whom the number of circulating tumor cells decreased after treatment had a longer time to progression as compared to patients with the number of circulating tumor cells increasing after treatment (14 vs 8 months, respectively; $p=0.0127$). Changes in the number of circulating tumor cells after specific anti-cancer treatment may be used as a new, objective indicator of response and an informative factor of prognosis in patients with metastatic breast cancer.

Key words: flow cytometry, circulating tumor cells, breast cancer.
