

*На правах рукописи*

Бжадуг Оксана Борисовна

**ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И КЛИНИЧЕСКОЕ  
ЗНАЧЕНИЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В  
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАСПРОСТРАНЕННЫМ  
РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

**14.00.14 – онкология**

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

Москва 2007

Работа выполнена в НИИ клинической онкологии ГУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН (директор - академик РАН и РАМН проф. М.И. Давыдов)

**Научные руководители:**

Доктор медицинских наук, профессор С.А. Тюляндин

Доктор медицинских наук, профессор Н.Н. Тупицын

**Официальные оппоненты:**

Член-корр. РАМН, доктор медицинских наук, профессор И.В. Поддубная

Доктор медицинских наук, проф. З.Г. Кадагидзе

**Ведущая организация:**

Российский Государственный Медицинский Университет им. Н.Н. Пирогова

Защита диссертации состоится “ \_\_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2007 г. на заседании диссертационного совета (К.001.017.01) ГУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН (115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН

Автореферат разослан “ \_\_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2007 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,**

Доктор медицинских наук

Ю.А. Барсуков

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы.

Заболеваемость раком молочной железы в России, как и во многих странах, продолжает расти. В структуре заболеваемости женщин рак молочной железы устойчиво занимает 1 место, при этом у 37,3% впервые заболевших женщин диагностируется III или IV стадии заболевания. Прирост заболеваемости раком молочной железы в России составил с 1999 по 2004 г. 10,6%. Результаты лечения больных раком молочной железы остаются неудовлетворительными (прирост стандартизованного показателя смертности составил 2,9%) (Давыдов М.И., Аксель Е.М., 2004).

В последние годы особое внимание уделяется более точному стадированию заболевания, а также изучению таргетной терапии рака молочной железы. Большое значение придается изучению биологически значимых характеристик заболевания, которые могут помочь при выборе наиболее эффективного вида противоопухолевого лечения.

Развитие современных технологий сделало возможным определение единичных опухолевых клеток в биоптатах костного мозга и в периферической крови (Gafforio J.J. et al., 2003). Доказано, что обнаружение на этапе постановки диагноза микрометастазов в костном мозге влияет на продолжительность безрецидивного промежутка и общую продолжительность жизни у больных РМЖ (Крохина О.В., Летягин В.П., 2002).

Клиническое значение иммунологического определения опухолевых клеток, циркулирующих в периферической крови, остается не до конца понятным (Brown S., 2005, Cristofanilli M., 2004, Molino A., 1999, Naumov G., 2004, Thurm H., 2003). Опухоли молочных желез гетерогенны по иммунофенотипу, что находит отражение в особенностях клинического течения, степени распространенности процесса, характере иммунного ответа и прогнозе заболевания (Тупицын Н.Н., 2005, Molino A., 1999, Naumov G.).

Есть все основания предполагать, что гетерогенность рака молочной железы по иммунофенотипу присуща не только первичной опухоли, но и опухолевым клеткам, циркулирующим в периферической крови. Следовательно, течение заболевания может определяться не только фактом обнаружения опухолевых клеток в периферическом кровеносном русле, но и качественным составом этих клеток. Изучение иммунофенотипа циркулирующих опухолевых клеток может быть полезным в понимании механизмов метастазирования и лекарственной устойчивости рака молочной железы.

В этой связи представляется актуальным изучение количественного и качественного состава опухолевых клеток, циркулирующих в периферической крови больных диссеминированным раком молочной железы, а также оценка клинической значимости этого феномена.

### **Цель работы.**

Целью настоящего исследования является оценка клинического значения иммунофенотипического изучения опухолевых клеток в периферической крови больных местно-распространенным и диссеминированным раком молочной железы.

### **Задачи исследования.**

В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

1. Установить количество циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови больных местно-распространенным и диссеминированным раком молочной железы иммуноцитофлуорометрическим методом с использованием моноклональных антител к мембранным панэпителиальным антигенам Egp34 и VerEp4.

2. Провести количественную оценку клеток рака молочной железы в костном мозге иммуноцитологическим методом с использованием МКА к панцитокератинам KL-1.

3. Охарактеризовать субпопуляции циркулирующих в периферической крови клеток рака молочной железы на основании экспрессии мономорфных детерминант молекул гистосовместимости II класса (HLA-DR) и рецептора апоптоза FAS/APO-1 (CD95).

4. Оценить клиническую значимость определения циркулирующих опухолевых клеток и их количества в динамике в процессе специфической противоопухолевой терапии у больных местно-распространенным и диссеминированным раком молочной железы.

### **Научная новизна.**

Впервые установлена частота обнаружения (41,3%) и охарактеризован субпопуляционный состав циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови больных местно-распространенным и диссеминированным раком молочной железы. Показано, что циркулирующие в периферической крови опухолевые клетки гетерогенны по экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DR) и рецептора CD95. В большинстве случаев отмечена выраженная пропорция HLA-DR-негативных и CD-95-негативных клеток. Выявление ЦОК наблюдается достоверно чаще при инфильтративно-дольковом раке и у больных в менопаузе. Микрометастазы в костном мозге до лечения обнаруживаются в 55% случаев рака молочной железы III-IV стадий и не имеют прямой ассоциации с наличием циркулирующих опухолевых клеток в крови. Доказано, что использование проточно-иммуноцитофлуорометрической количественной идентификации циркулирующих опухолевых клеток в крови больных раком молочной железы на основании отсутствия обще-лейкоцитарных антигенов CD45 и экспрессии мембранных панэпителиальных антигенов (BerEp4 и Egp34) с точностью 1 опухолевая клетка на 1 миллион лейкоцитов позволяет оценивать динамику ЦОК и, в комплексе со стандартными диагностическими методами, эффективность проводимой химиотерапии.

### **Научно-практическая значимость.**

Обоснована необходимость определения циркулирующих опухолевых клеток у больных раком молочной железы с целью совершенствования оценки степени распространенности рака молочной железы. Метод внедрен в клиническую практику отделения клинической фармакологии и химиотерапии НИИ КО ГУ РОНЦ им. Блохина Н.Н. РАМН. Показано, что динамика ЦОК в процессе лечения отражает эффективность лечения (продолжительность интервала без прогрессирования) и является ценным прогностическим показателем. При оценке субпопуляционного состава ЦОК отсутствие экспрессии молекул HLA-DR может служить указанием на необходимость применения индукторов экспрессии HLA-DR (например, интерферонов) в HLA-DR-негативных случаях с целью восстановления возможности распознавания микрометастазов иммунной системой организма.

### **Апробация работы.**

Состоялась 20 марта 2007 года на совместной научной конференции с участием с участием отделения клинической фармакологии и химиотерапии, централизованного клиничко-лабораторного отдела, отделения химиотерапии, отделения химиотерапии и комбинированных методов лечения злокачественных опухолей, отделения диагностики опухолей, отделения реконструктивной и сосудистой хирургии НИИ клинической онкологии ГУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина.

### **Публикации.**

По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы, из них 1 в зарубежной печати.

### **Объем и структура диссертации.**

Диссертационная работа изложена на 177 страницах машинописного текста и состоит из введения, 6 глав, обсуждения и заключения, выводов и перечня литературы. Текст иллюстрирован 42 таблицами, 24 рисунками и клиническими примерами. Библиографический список содержит 22 отечественных и 102 иностранных источника.

### **Содержание работы.**

#### Характеристика больных и методы исследований

С 2001 по 2003 гг. в исследование включено 65 больных местно-распространенным (первично-неоперабельным) и метастатическим раком молочной железы. У большинства больных (87,7%) была установлена IV стадия рака молочной железы ( $n = 57$ ); из них у 45,6 % ( $n = 26$ ) заболевание было выявлено впервые, у 54,4% больных ( $n = 31$ ) был выявлен рецидив заболевания после различных видов противоопухолевого лечения. У восьми больных (12,3%) был диагностирован местно-распространенный неоперабельный рак молочной железы.

Средний возраст больных составил 53 года (26 - 75 лет).

Большинство больных находились в состоянии менопаузы (72,3%).

У всех больных диагноз злокачественной опухоли молочной железы был верифицирован морфологически: гистологическим методом - у 47 больных (72,3 %), цитологическим методом – у 18 больных (27,7%). Наиболее часто встречалась инфильтративно-протоковая форма рака – у 30 больных (63,8%), дольковый инфильтративный рак у 13 больных (27,6% ), другие формы рака – у 4 больных (8,5%).

Определение рецепторов стероидных гормонов чаще проводилось иммуногистохимическим методом, в отдельных случаях – биохимическим методом. Исследование рецепторного статуса опухоли молочной железы было проведено 43 больным. Рецепторы эстрогенов и прогестерона (РЭ+РП+) выявлены на опухолевых клетках у 10 больных (23,3%). У 18

(41,9%) больных клетки опухоли не содержали рецепторов эстрогенов и прогестерона (РЭ-РП-), у 15 (34,8%) больных был обнаружен один рецептор стероидных гормонов (РЭ+РП- или РЭ-РП+).

### **Системное лечение.**

Большинству больных (80%) проводилась химиотерапия. Лечение гормональными препаратами получали 13 пациенток (20%).

Химиотерапия по схеме FAC проведена 40 больным. В эту группу вошли как больные, которым проведена только химиотерапия по схеме FAC (n = 32), так и больные, которым на первом этапе была проведена химиотерапия по схеме FAC, после чего была назначена гормонотерапия тамоксифеном (n = 11).

Химиотерапия таксанами (паклитаксел 175 мг/м<sup>2</sup> 1 раз в 21 день или доцетаксел 75 мг/м<sup>2</sup> 1 раз в 21 день) была проведена 6 больным (10,9%): двоим из них - в связи с прогрессированием рака молочной железы после адъювантной химиотерапии с включением антрациклинов, четверым больным - в качестве 2 линии химиотерапии (после 1 линии химиотерапии с включением антрациклинов).

Гормональная терапия проводилась 13 больным. Тамоксифен 20 мг в сутки, как правило, назначался больным (n = 10) с благоприятным прогнозом (пациенткам в менопаузе, с положительными рецепторами половых гормонов, с длительным безрецидивным интервалом). Летрозол 2,5 мг в сутки был назначен 1 больной, получавшей тамоксифен адъювантно, и 2 больным в качестве второй линии гормонотерапии при прогрессировании заболевания на фоне приема тамоксифена.

### **Методы выявления опухолевых клеток**

#### **в периферической крови и костном мозге.**

Всем больным проводилось иммунологическое исследование периферической крови и костного мозга с целью выявления циркулирующих

опухолевых клеток до лечения и, части больных, по окончании цикла лечения, или при прогрессировании заболевания. Иммунологическое исследование материала проводили в лаборатории иммунологии гемопоэза Централизованного клинико-лабораторного отдела НИИ КО ГУ РОНЦ имени Н.Н.Блохина РАМН.

При оценке циркулирующих эпителиальных клеток в периферической крови нами использованы прямые конъюгаты моноклональных антител (МКА). Использованы МКА фирмы Becton Dickinson (США). МКА HEA-125 любезно предоставлены G. Moldenhauer (Германия), флуоресцентное мечение этих антител осуществлено R. Jones (HMDS, Великобритания).

Подсчет количества ЦОК осуществляли иммуноцитофлуориметрическим методом с использованием двойной флуоресцентной метки. Клетки окрашивали МКА к общелейкоцитарному антигену CD45 и МКА к общеэпителиальным мембранным антигенам Egp34 (МКА HEA 125), Ver-EP4 (МКА Ver-EP4). Использовали CD45-FITC или CD45-PerCP, HEA125-FITC или HEA125-PerCP, Ver-EP4-FITC. Разницы в чувствительности флуорохромов не выявлено. Уровни неспецифического связывания оценивали по изотипическим контролям с соответствующей флуорохромной меткой.

Панель моноклональных антител для оценки количества эпителиальных клеток, циркулирующих в периферической крови при раке молочной железы:

- I.
  1. IgG1 PerCP
  2. CD45 PerCP IgG1 FITC
  3. CD45 PerCP HEA 125 FITC или CD45 PerCP VerEP4 FITC
- II.
  1. IgG1 FITC
  2. CD45 FITC IgG1 PerCP
  3. CD45 FITC HEA 125 PerCP

При сборе образца на проточном цитофлуориметре накапливали максимально возможное количество клеточных событий в пределах CD45-негативной фракции клеток с низкими уровнями бокового светорассеяния (SSC) (рисунок 1А), при этом через детектор проходило не менее 1000000 клеточных событий.

Цитограмма 1А демонстрирует выбор области анализа по экспрессии CD45 антигена. По оси ординат выбран показатель уровней гранулярности клеток (SSC), по оси абсцисс (FL-3- детектор) экспрессия CD45 антигена (CD45 PerCP). Область R1 - это CD45-негативные клетки, включая циркулирующие клетки рака молочной железы.

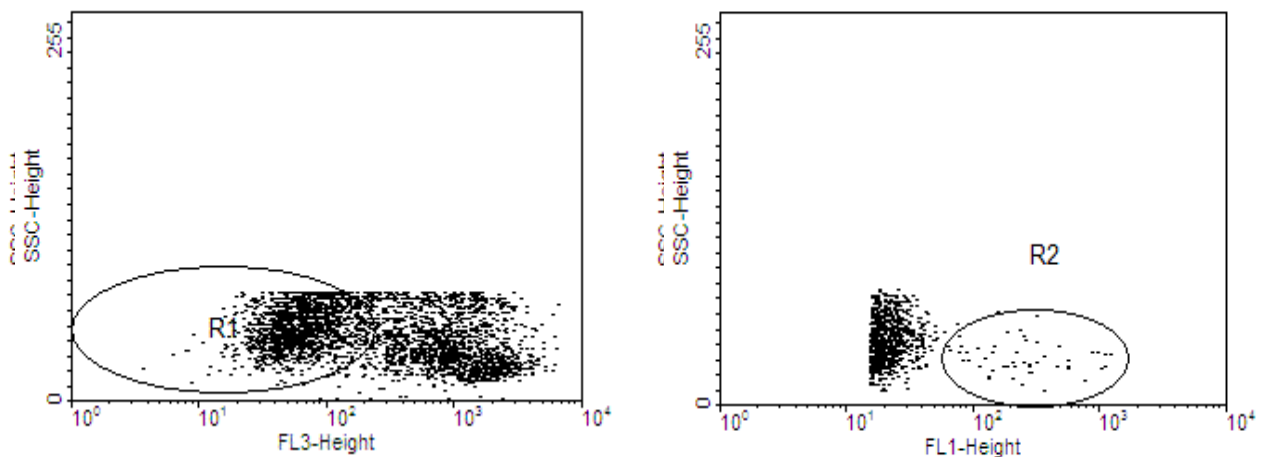
На цитограмме 1Б представлены только клетки области R1, среди них присутствует четкая популяция клеток (область R2) с яркой экспрессией антигена Egp34, выявляемая FITC-мечеными МКА HEA 125. Количество HEA125+ клеток в данном образце составило 27 клеток на 1млн всех клеток образца за вычетом 1 клетки, попавшей в область R2 в изотипическом контроле.

Рисунок 1.

Выявление циркулирующих опухолевых клеток в крови больной раком молочной железы методом проточной цитофлуориметрии. Двойная флуоресцентная метка (пояснения в тексте).

А

Б



При определении субпопуляций циркулирующих опухолевых клеток использовали тройную флуоресцентную метку, в панель добавляли моноклональные антитела к антигенам CD95 и HLA-DR.

Панель МКА при оценке субпопуляций ЦОК выглядела следующим образом:

1. IgG1 PerCP
2. CD45 PerCP/IgG1FITC
3. CD45 PerCP/HEA 125 FITC/IgG1 PE
4. CD45 PerCP/HEA 125 FITC/CD95 PE
5. CD45 PerCP/HEA 125 FITC/HLA-DR PE

При анализе субпопуляционного состава опухолевых клеток также накапливали CD45-негативные события, далее выбирали гейт опухолевых клеток (R2 на рисунке 1Б), и в этом гейте оценивали процентное содержание HLA-DR<sup>+</sup> и CD95<sup>+</sup> клеток. Следует сказать, что при оценке популяций важно набрать как можно больше событий в области опухолевых клеток, что возможно только при условии очень высокой клеточности образца или выраженном метастатическом процессе.

### **Цитоморфологическое и иммунологическое исследование костного мозга.**

Клетки костного мозга получали при пункции, которую осуществляли в области грудины (стерильная пункция). Объем костномозгового пунктата обычно составлял от 0,3 до 0,7 мл (при большем объеме возможно разбавление образца периферической кровью).

Цитоморфологическое исследование.

Из аспирата костного мозга сразу после взятия готовили мазки обычным способом, проводили их окраску по Романовскому-Гимзе и подсчет миелограммы.

Иммуноцитологическое исследование.

Из выделенных клеток костного мозга готовили цитоцентрифужные препараты (1 миллион клеток на лунку). Для выявления опухолевых клеток использовали МКА KL-1 к панцитокератинам, любезно предоставленные J. Brochier (Франция).

Подсчет опухолевых клеток проводили на 1 млн миелокариоцитов костного мозга дважды у каждого больного. Учитывали как единичные антиген-позитивные клетки, так и комплексы антиген-позитивных клеток.

### **Статистическая обработка полученных данных.**

Выживаемость больных (время до прогрессирования и общая выживаемость) анализировали в соответствии с методом Каплана-Мейера и сравнивали по лог-ранг тесту.

Для сравнения качественных признаков использовался  $\chi^2$ -тест с поправкой Ейтца на непрерывность при таблицах сопряжения 2x2 или точный критерий Фишера при малых выборках. Во всех случаях применялся 95% доверительный интервал и двусторонний P.

### **Результаты.**

Выявление микрометастазов рака молочной железы в периферической крови методом проточной цитофлуориметрии.

С целью обнаружения циркулирующих опухолевых клеток у 65 больных выполнено 85 иммунологических исследований периферической крови.

Выявление и определение количества опухолевых клеток в периферической крови проводили методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител к мембранным панэпителиальным антигенам Egp34 и BerEP4.

Поскольку единства мнений о значении количества опухолевых клеток, циркулирующих в периферической крови больных на разных этапах системного лечения, и связи этого показателя с известными морфологическими, клиническими и прогностическими характеристиками рака молочной железы в современной литературе нет, мы посчитали целесообразным провести детальный количественный анализ полученных данных.

Была сопоставлена различная чувствительность метода иммуноцитофлуориметрического выявления ЦОК: 1 клетка на 1 млн лейкоцитов и 1 клетка на 100 000 лейкоцитов. При анализе с точностью 1 клетка на миллион лейкоцитов частота выявления ЦОК составила 47,6%, а при анализе с точностью 1 клетка на 100 000 лейкоцитов частота выявления ЦОК составила 41,3%.

Для повышения точности исследования и исключения единичных случайных событий, количество антиген-позитивных клеток  $\leq 10$  на миллион лейкоцитов было решено принимать за негативный результат, т.е. в группу позитивных больных относили только пациентов с заведомо позитивным результатом исследования (более 10 ЦОК на 1 миллион лейкоцитов).

Частота выявления ЦОК у больных местно-распространенным и диссеминированным РМЖ составила до лечения 41,3%.

У больных местно-распространенным раком молочной железы и у больных с отдаленными метастазами циркулирующие опухолевые клетки методом проточной цитометрии выявляются приблизительно с одинаковой частотой: у 3 из 7 (42,9%) и 21 из 56 больных (41%) соответственно.

В таблице 1 показано распределение больных в зависимости от количества ЦОК, выявленных с помощью моноклональных антител к панэпителиальным антигенам.

Таблица 1.

Количественная характеристика ЦОК в периферической крови больных местно-распространенным и диссеминированным РМЖ до начала системного лечения.

Анализируемые группы (кол-во ЦОК/млн лейкоцитов крови)	Частота случаев	
	Количество	Процент
1 группа (0 – 10 клеток)	37	58,7%
2 группа (11 – 100 клеток)	18	28,6%
3 группа (> 100 клеток)	8	12,7%

Как видно из таблицы, ЦОК в большинстве случаев (69,2%) обнаружены в умеренном количестве (от 11 до 100 на миллион лейкоцитов), лишь у 30,8% больных (8 из 26) выявлено более 100 ЦОК на миллион лейкоцитов.

Наиболее часто ЦОК обнаруживали у больных с метастазами только во внутренние органы: у 14 из 27 больных (51,9%). У этих больных высокое содержание ЦОК (более 100 на миллион лейкоцитов) отмечено чаще всего 15% случаев (таблица 2). В группе больных с метастазами только в кости и с метастазами и в кости, и во внутренние органы ЦОК выявлены с одинаковой частотой – 31,3% (у 5 из 16 больных) и 30,8% (у 4 из 13 больных) соответственно. Взаимосвязи между признаками (наличие ЦОК и локализация метастазов) не установлено ( $P = 0,25$ ).

Таблица 2.

Частота выявления ЦОК в периферической крови больных раком молочной железы с различной локализацией метастазов.

Признак	Метастазы только в кости (n = 16)	Метастазы в кости и внутренние органы (n = 14)	Метастазы только во внутренние органы (n = 27)
Наличие ЦОК	5/16 (31,3%)*	4/14 (30,8%)	14/27 (51,9%)
≥ 100 ЦОК	2/16 (12,5%)	1/14 (7,7%)	4/27 (14,8%)

\* количество (процент)

### **Взаимосвязь между наличием ЦОК, морфологическими и прогностическими характеристиками рака молочной железы.**

ЦОК выявлены чаще у больных с наличием одного или двух рецепторов стероидных гормонов в ткани опухоли ( $n = 24$ ), чем у больных с отрицательным рецепторным статусом ( $n = 18$ ) – 45,8% и 22,2% соответственно. Однако взаимосвязь между признаками не была статистически значимой ( $p = 0,11$ ).

У больных в менопаузе ЦОК выявлены в периферической крови чаще – 47,82%, чем у больных с сохраненной менструальной функцией ( $n = 15$ ) – 26,7%. Взаимосвязь между признаками ( $\chi^2$ ) статистически значима ( $p=0,045$ ).

При инфильтративном дольковом РМЖ ЦОК в периферической крови обнаружено чаще, чем у больных протоковым инфильтративным РМЖ (69,2% и 31% соответственно). Взаимосвязь между признаками ( $\chi^2$ ) статистически значима ( $p = 0,02$ ).

### **Динамика ЦОК у больных РМЖ в процессе лечения.**

Иммуноцитофлуорометрическое исследование периферической крови в динамике было проведено 19 больным.

Частота выявления ЦОК после лечения составила 45,5%.

Таким образом, у большей части больных после проведения системного противоопухолевого лечения в периферической крови продолжали циркулировать опухолевые клетки.

Противоопухолевый эффект терапии был оценен у 17 пациенток. У 12 больных (71%) динамика количества опухолевых клеток (до и после лечения) совпадала 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 количество опухолевых клеток снижалось по сравнению с начальным уровнем.

В таблице 3 представлено количество ЦОК у больных раком молочной железы до и после лечения и эффект лечения.

Таблица 3.

Количество ЦОК в динамике у больных раком молочной железы до и после лечения и оценка лечебного эффекта по клиническим данным и данным объективных методов обследования

N	Кол-во ЦОК до лечения	Кол-во ЦОК после лечения	Динамика ЦОК	Эффект лечения по клиническим и рентгенологическим данным
1.	10	2	=	СЗ
2.	3	104*	↑	ПР
3.	0	25	↑	СЗ
4.	11	0	↓	Неизвестен
5.	37	500	↑	СЗ
6.	20	2	↓	СЗ
7.	56	7	↓	СЗ
8.	7	4	=	ПР
9.	0	48	↑	ПЗ
10.	0	0	=	ЧР
11.	418	204	↓	СЗ
12.	21	10	↓	ЧР
13.	234	50	↓	СЗ
14.	167	0	↓	ЧР
15.	7	27	↑	ЧР
16.	3	17	↑	Неизвестен
17.	0	5	=	СЗ
18.	0	8	=	СЗ
19.	0	22 **409	↑	ЧР ПЗ

↓ - снижение количества ЦОК, ↑ - повышение количества ЦОК, = - количество ЦОК не изменилось (изменения в пределах 0-10 клеток считали «=»)

\* - исследование выполнено через 1,5 месяца после неoadъювантной химиотерапии, оперативного удаления опухоли молочной железы и лучевой терапии

\*\* - повторное исследование при прогрессировании РМЖ

## **Влияние циркулирующих опухолевых клеток на прогноз больных местно-распространенным и диссеминированным РМЖ**

Для того чтобы оценить, влияет ли наличие до лечения циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови больных распространенным раком молочной железы на прогноз, были изучены время до прогрессирования и общая продолжительность жизни во всей анализируемой группе и в подгруппах больных.

Медиана общей продолжительности жизни составила 21,7 месяцев (от 2 до 51 месяцев).

Как известно, продолжительность жизни больных распространенным РМЖ во многом зависит от локализации метастазов (висцеральные или только костные метастазы), а также от количества зон поражения. Были проанализированы отдаленные результаты лечения в подгруппах больных с различной локализацией метастазов. Наличие ЦОК до лечения не оказывало влияния на продолжительность времени до прогрессирования ( $p=0,7$ ), но влияло на общую продолжительность жизни ( $p=0,06$ ) только в подгруппе больных с метастатическим поражением костей (с наиболее благоприятным прогнозом в группе больных диссеминированным РМЖ). В этой группе медиана общей продолжительности жизни была почти в 2 раза длиннее у больных с отсутствием ЦОК до начала лечения. Результаты анализа времени до прогрессирования и общей продолжительности жизни в группах больных с различной локализацией метастазов представлены в таблице 4.

Таблица 4.

Время до прогрессирования и общая продолжительность жизни у больных с разной локализацией метастазов в зависимости от наличия или отсутствия ЦОК до лечения

	Наличие ЦОК	Медиана ВДП, мес.	P (log-rank test)	Медиана ОВ, мес.	P (log-rank test)
Метастазы только в кости, (n = 14)	+	7	P = 0,7	11	P = 0,06
	-	8		21,5	
Метастазы в кости и внутренние органы, (n = 13)	+	6,5	P = 0,34	15,5	P = 0,55
	-	5		13	
Метастазы только во внутренние органы, (n = 27)	+	8	P = 0,26	27	P = 0,1
	-	7,5		13,5	

У больных с метастазами во внутренние органы ЦОК в периферической крови до лечения не оказывали влияния на продолжительность интервала без прогрессирования ( $p=0,26$ ) и общую продолжительность жизни ( $p=0,1$ ).

При изучении общей продолжительности жизни и времени до прогрессирования в зависимости от наличия циркулирующих опухолевых клеток в крови после системного лечения вся группа больных была поделена на 2 подгруппы: ЦОК-позитивную (более 10 клеток на миллион клеток крови) и ЦОК-негативную. Оказалось, что медиана времени до

прогрессирования в ЦОК-негативной (после проведения системного лечения) группе была в 2 раза выше, чем в ЦОК-позитивной группе, однако различия статистически недостоверны ( $p = 0,31$ ).

У больных из ЦОК-негативной группы отмечены незначительные преимущества в общей продолжительности жизни (различия статистически недостоверны,  $p = 0,89$ ). Полученные результаты отражены в таблице 5.

Таблица 5

Время до прогрессирования и общая продолжительность жизни больных РМЖ в зависимости от наличия ЦОК в периферической крови после проведения системного лечения

Показатель выживаемости	ЦОК-негативная группа	ЦОК-позитивная группа	P (log-rank test)
Медиана времени до прогрессирования, мес. (n = 20)	15 (n = 12)	7,5 (n = 8)	P=0,31
Медиана выживаемости, мес. (n = 20)	23,5 (n = 12)	17,5 (n = 8)	P=0,89

Медиана общей продолжительности жизни больных с высоким уровнем ЦОК (более 100 клеток/млн) была меньшей, чем в случаях наличия 10-100 ЦОК (15 и 21 мес. соответственно), однако различия статистически не достоверны.

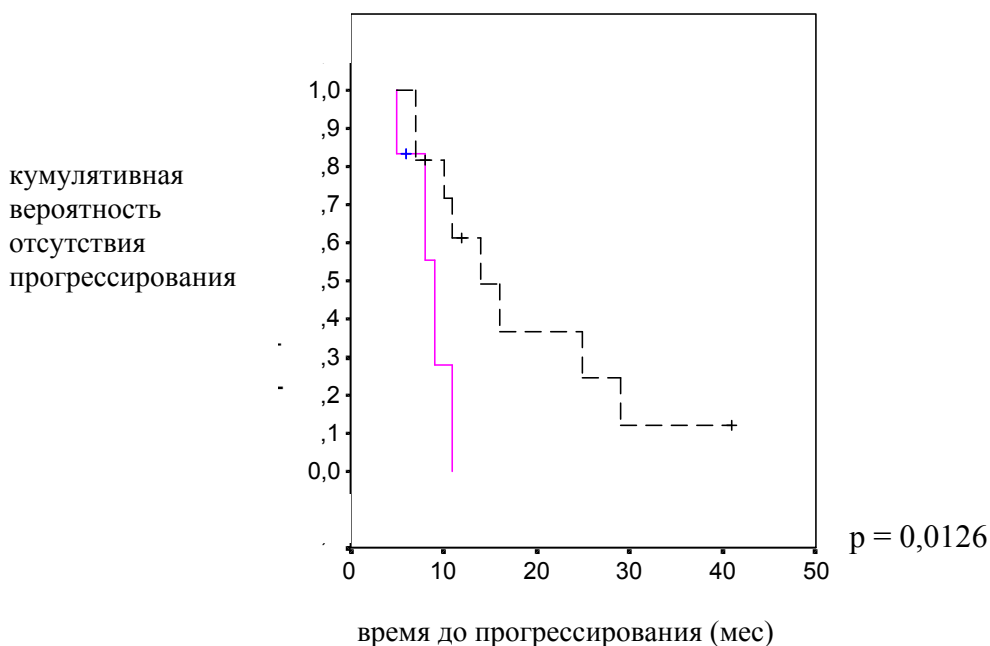
С целью ответа на вопрос, возможен ли мониторинг эффективности химио/гормонотерапии с помощью количественного анализа ЦОК, были проанализированы результаты лечения больных в зависимости от динамики ЦОК до и после лечения.

Динамика циркулирующих опухолевых клеток оценена у 19 больных, у 16 из них оценены показатели выживаемости. У 31,3% больных (5 из 16) количество ЦОК повысилось после лечения, у 68,7% (11 из 16) - количество ЦОК снизилось или осталось неизменным.

У больных с отсутствием нарастания количества ЦОК после лечения отмечаются преимущества в продолжительности времени до прогрессирования ( $p = 0,0126$ , Log-rank test) перед больными, у которых количество ЦОК нарастало или оставалось неизменным (рисунок 2).

Рисунок 2.

Время до прогрессирования у больных РМЖ в зависимости от динамики уровня ЦОК после проведения противоопухолевой терапии (пунктир – отсутствие нарастания ЦОК, сплошная линия – увеличение количества ЦОК).



На общую продолжительность жизни снижение или повышение количества ЦОК после лечения не влияло.

### **Иммунологическое обнаружение опухолевых клеток в костном мозге больных РМЖ III, IV стадии**

Выполнены иммуноцитологические исследования пунктатов костного мозга у 42 больных раком молочной железы. Костный мозг исследовали иммуноцитологическим методом флуоресцентной микроскопии с помощью моноклональных антител к панцитокератинам KL-1. Одновременно в полученных мазках костного мозга производили подсчет миелограммы.

В группе больных метастатическим раком молочной железы иммунологическое исследование костного мозга до начала лечения проведено 36 больным. KL-1-позитивные клетки у этих пациентов были обнаружены у 21 больной (58,7%). Их количество варьировало от 1 до 464 на 1 миллион миелокариоцитов: от 1 до 10 опухолевых клетки выявлено у 16, от 11 до 100 клеток – у 4, более 100 клеток – у 2 больных. При стандартном цитологическом исследовании метастазы в костный мозг были выявлены у 5 больных диссеминированным раком молочной железы (13,9%).

В группе больных местно-распространенным раком молочной железы иммунологическое исследование костного мозга до начала лечения проведено 6 больным, KL-1-позитивные клетки обнаружены у 2 больных (33,3%). В одном случае было обнаружено 12 опухолевых клеток на 1 миллион клеток костного мозга, в другом случае – 1 клетка. При цитологическом исследовании метастазов в костный мозг у этих больных не выявлено.

Частота выявления микрометастазов в костный мозг не зависела существенным образом от локализации метастазов: у больных с метастазами только во внутренние органы она составила 63,6%, а у больных с метастазами только в кости – 61,5%.

Иммуноцитологическое исследование костного мозга после окончания системного лечения проведено 11 больным. Солитарные опухолевые клетки были обнаружены в 27,3 % случаев (у 3 больных).

Динамика содержания опухолевых клеток в костном мозге отражена в таблице 6.

Таблица 6.

Содержание опухолевых клеток в костном мозге у больных РМЖ до и после системного противоопухолевого лечения.

№	Количество KL-1- позитивных клеток/млн миелокариоцитов		Время забора костного мозга (II пробы)	Эффект лечения
	I проба	II проба		
1.	12	0	После 6 курсов FAC	ПЭ
2.	0	0	После 6 курсов FAC	СЗ
3.	0	0	После 6 курсов FAC	ЧР
4.	1	0	После 6 курсов FAC и операции (РМЭ)	ПР
5.	0	0	через 3 месяца после 6 курсов FAC	ПЗ
6.	1	0	После 6 курсов FAC	ЧР
7.	416	418	Через 3,5 месяца после приема тамоксифена	СЗ
8.	50	0	После 8 курсов FAC	ЧР
9.	2	4	После 5 курсов FAC	ЧР
10.	5	5	После 6 курсов FAC	СЗ
11.	2	0	После 8 курсов FAC	ЧР

Из таблицы видно, что у всех больных при эффективном лечении (частичная или полная регрессия опухоли), а также при стабилизации заболевания количество опухолевых клеток в костном мозге уменьшилось или осталось неизменным, т.е. совпадало с оценкой эффекта лечения с помощью объективных методов.

В таблице 7 отражены результаты анализа времени до прогрессирования и общей продолжительности жизни в группах больных с наличием и отсутствием поражения костного мозга по данным иммуноцитологического и цитологического исследования. Общая продолжительность жизни оценена у 39 больных (у 33 - IV стадия, у 6 – IIIВ стадия РМЖ); время до прогрессирования оценено у 37 больных (у 31 – IV стадия, у 6 больных – IIIв стадия).

Таблица 7.

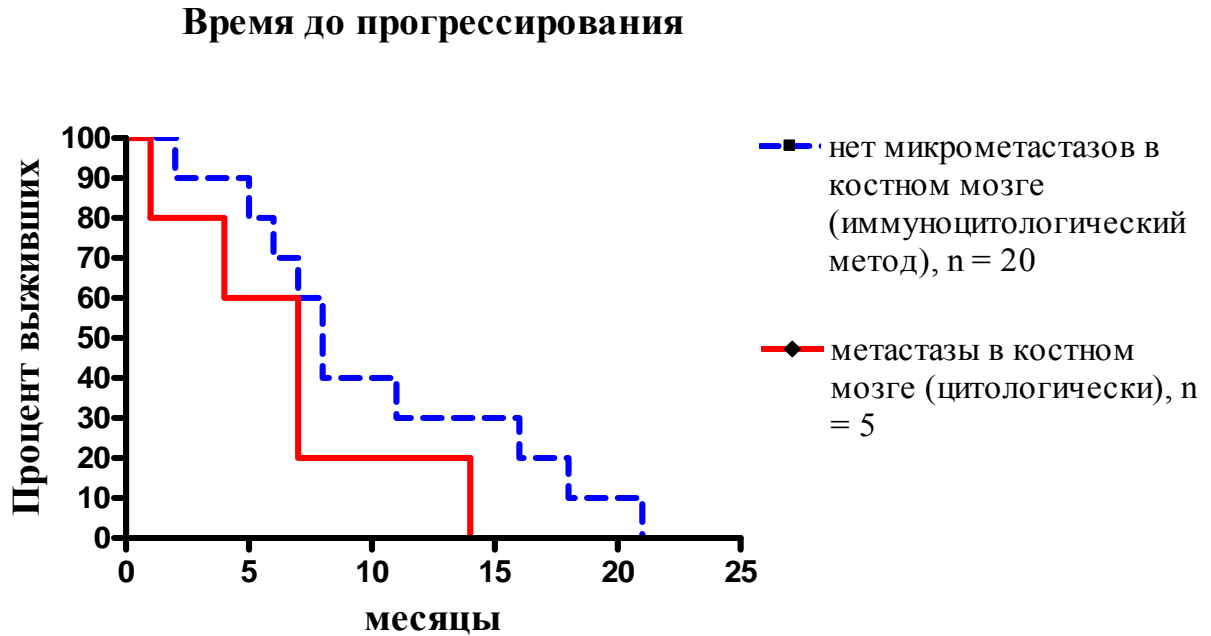
Время до прогрессирования и общая продолжительность жизни больных РМЖ в зависимости от опухолевого поражения костного мозга по данным иммуноцитологического и цитологического методов исследований

Показатель выживаемости	Больные без микрометастазов в костный мозг (KL-1 = 0/млн)	Больные с микрометастазами в костный мозг (KL-1 $\geq$ 1/млн)	Больные с цитологически верифицированным и метастазами в костный мозг
Медиана времени до прогрессирования, мес.	11 (n – 17)	10,5 (n = 15)	7 (n = 5)
Медиана общей продолжительности жизни, мес.	19,5 (n – 17)	21 (n – 17)	11 (n = 5)

Из таблицы 7 видно, что при иммуноцитологическом подтверждении наличия микрометастазов в костном мозге показатели времени до прогрессирования и общей продолжительности жизни существенно не различались между позитивной и негативной группами. Имеются преимущества у группы больных без микрометастазов перед группой с метастазами в костный мозг (доказанными цитологическим методом) – медиана времени до прогрессирования у них на 4 месяца длиннее ( $p = 0,03$ , рисунок 3).

Рисунок 3.

Время до прогрессирования у больных с метастазами в костный мозг, доказанными цитологическим методом и у больных без микрометастазов (по данным иммуноцитологического исследования)



У больных с наличием опухолевых клеток в костном мозге по данным иммуноцитологического исследования частота выявления ЦОК составила 22,7% (5 из 22), а у больных без микрометастазов в костном мозге – 44,5% (8 из 18). Однако сопряженности признаков не установлено ( $p > 0,05$ ).

### **Субпопуляции опухолевых клеток, циркулирующих в периферической крови больных раком молочной железы.**

Изучению иммунофенотипа микрометастазов костном мозге посвящено множество исследований. Показано, что единичные опухолевые клетки в костном мозге экспрессируют антигены главного комплекса гистосовместимости I класса, молекулы адгезии ЕpСАМ, рецепторы еrb-B2 и трансферрина, маркеры пролиферации (Ki-67, p-120), гены MAGE-1,2,3/6,4,12, пролиферативные маркеры Ki-67 и p120. Сообщения о характеристике циркулирующих в периферической крови опухолевых клеток немногочисленны (Cristofanilli M., 2005).

Мы изучили экспрессию на ЦОК молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) II класса – HLA-DR и рецептора CD95, входящей в систему Fas-Fas L, опосредующую клеточный апоптоз.

В большинстве изученных случаев количество циркулирующих опухолевых клеток было достаточно выраженным и только у 3 пациенток из 17 их число было менее 10 ЦОК на миллион лейкоцитов крови (таблица 8).

Таблица 8.

Субпопуляции опухолевых клеток периферической крови больных РМЖ до начала системной химиотерапии.

№	Кол-во ЦОК/млн лейкоцитов	%% HLA-DR+ HEA125+ ЦОК	%% CD95+ HEA125+ ЦОК	Кол-во HLA-DR+ ЦОК/млн лейкоцитов	Кол-во CD95+ ЦОК/млн лейкоцитов
1	63	22,0	3,6	14	2
2	30	72,7	0,0	22	0
3	18	26,2	42,2	5	8
4	7	33,0	66,0	2	5
5	76	52,0	0,0	40	0
6	38	5,3	0,0	2	0
7	92	8,1	4,0	8	4
8	5	42,3	0,0	2	0
9	20	54,5	44,0	11	9
10	160	0,0	22,0	0	35
11	4	42,0	0,0	2	0
12	11	81,8	-	9	-
13	23	0,0	3,0	0	1
14	135	0,0	0,0	0	0
15	307	11,4	1,2	35	3
16	13	64,0	22,0	8	3
17	167	23,5	-	39	-

Частота экспрессии молекулы HLA-DR на ЦОК составила 82% (у 14 из 17 больных). Средний процент HLA-DR+ циркулирующих опухолевых клеток составил  $31,6 \pm 6,4\%$  при медиане 26,2% и значительном разбросе значений от 0,0 до 81,8%.

Частота экспрессии молекулы CD95 на ЦОК составила 33%. Средний процент CD95+ циркулирующих опухолевых клеток составил  $14,8 \pm 5,73\%$ ,

при медиане 3,3% и разбросе значений от 0 до 66,0%. В четырех случаях из 15 (26,6%) экспрессия антигена на циркулирующих опухолевых клетках составила от 20 до 50% и только в одном случае процент CD95-позитивных опухолевых клеток превысил 50% (66,0%).

После проведения химиотерапии субпопуляционный состав циркулирующих опухолевых клеток оценили у 6 больных. Во всех 6 случаях изучили экспрессию на ЦОК (HEA-125+) молекулы главного комплекса гистосовместимости 2 класса (HLA-DR) и рецептора CD95, таблица 9.

Таблица 9.

Субпопуляции опухолевых клеток периферической крови больных РМЖ после проведения системной химиотерапии.

№	Кол-во ЦОК/млн лейкоцитов	%% HLA-DR+ ЦОК	Кол-во HLA-DR+ ЦОК/млн лейкоцитов	%% CD95+ HEA125+ клеток	Кол-во CD95+ ЦОК/млн лейкоцитов
1	10	44,6	5	11,3	1
2	17	6,0	1	6,0	1
3	27	15,7	4	3,8	1
4	50	3,0	2	0,0	0
5	204	17,0	35	6,9	14
6	409	5,0	21	4,0	16

Как видно из таблицы 9, количество ЦОК у пациенток данной группы в большинстве случаев было достаточно выраженным и превышало 10 клеток на миллион оцененных клеток периферической крови. Субпопуляционный состав опухолевых клеток был разнородным, однако не было отмечено случаев экспрессии антигенов на более 50% опухолевых клеток.

По сравнению с данными до лечения (см. таблицу 8) средний процент ЦОК с иммунофенотипом HLA-DR+HEA125+ был практически в 2 раза ниже и составил  $15,2 \pm 6,33$  ( $p = 0,06$ ). Медиана также была значительно ниже и составляла 10,8 %, при разбросе значений от 3,0 до 44,6%.

Средний процент ЦОК с иммунофенотипом CD95+HEA125+ был также значительно ниже, чем в группе больных до лечения и составил  $5,3 \pm 1,53$  ( $p = 0,02$ ). Однако медиана значений практически не отличалась от таковой до лечения и составила 5,0%. Разброс значений в данной группе был незначительным 0,0-11,3%.

Обращает на себя внимание тот факт, что при большом количестве циркулирующих опухолевых клеток (при распространенном РМЖ) или при увеличении в периферической крови количества ЦОК (например, при прогрессировании заболевания) снижается процент опухолевых клеток, экспрессирующих оба антигена (HLA-DR и CD95) и преобладают негативные по этим антигенам клетки. Это позволяет сделать предположение о том, что при утрате опухолевой клеткой антигенов HLA-DR и CD95, она приобретает больший метастатический потенциал, т.к. становится «невидимой» для клеток иммунной системы (CD4 T-клеток), и не может быть уничтожена механизмами CD95-зависимого апоптоза.

## **ВЫВОДЫ**

1. Циркулирующие в периферической крови опухолевые клетки выявляются у 41,3% больных диссеминированным раком молочной железы на основании наличия мембранных панэпителиальных антигенов (Egp34, VerEp4) при отсутствии экспрессии CD45; они характеризуются низкими показателями гранулярности и гетерогенны по размеру
2. Циркулирующие в периферической крови клетки рака молочной железы гетерогенны по экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DR) и рецептора CD95. В большинстве случаев отмечается выраженная пропорция HLA-DR-негативных и CD95-негативных клеток, что свидетельствует о неспособности презентировать опухоли-ассоциированные пептиды

CD4+ Т-лимфоцитам и невозможности реализации клеточной гибели путем CD-95-опосредованного апоптоза.

3. Циркулирующие опухолевые клетки в периферической крови больных РМЖ IIIb-IV стадий достоверно чаще выявляются при инфильтративно-дольковом раке по сравнению с инфильтративно-протоковым раком (69,2% и 31%,  $p = 0,02$ ) и у больных в менопаузе (47,8% и 26,7%,  $p = 0,045$ ).
4. Обнаружение клеток рака молочной железы в периферической крови больных РМЖ IIIb-IV стадий не имеет прямой ассоциации с наличием иммуноцитологически выявляемых микрометастазов в костном мозге.
5. Микрометастазы в костном мозге до лечения обнаруживаются в 54,8% случаев рака молочной железы IIIb-IV стадий. Наличие микрометастазов в костном мозге больных на момент начала лечения не влияет на продолжительность интервала без прогрессирования и общую продолжительность жизни в этой группе больных. Морфологически доказанное метастатическое поражение костного мозга при диссеминированном раке молочной железы достоверно ухудшает показатели выживаемости без прогрессирования по сравнению с больными без метастазов в костном мозге ( $p = 0,03$ ).
6. Общая продолжительность жизни больных РМЖ с метастазами в кости (при отсутствии висцеральных метастазов) и наличием ЦОК в периферической крови до начала лечения меньше, чем у больных без ЦОК (11 и 21,5 месяцев соответственно,  $p = 0,06$ ). Взаимосвязи наличия ЦОК с продолжительностью времени до прогрессирования у больных раком молочной железы IIIb-IV стадий не установлено.
7. Динамика содержания циркулирующих опухолевых клеток в процессе химиотерапии в 71% случаев совпадает с клинической оценкой эффективности лечения. При нарастании количества

циркулирующих опухолевых клеток, несмотря на хороший клинический эффект (полная или частичная регрессия опухоли) отмечено прогрессирование заболевания в короткие сроки после окончания противоопухолевой терапии.

8. Динамика содержания циркулирующих опухолевых клеток в процессе химиотерапии является дополнительным, объективным критерием эффективности лечения. У больных без увеличения количества циркулирующих опухолевых клеток после проведения полихимиотерапии, наблюдается достоверно более длительная продолжительность интервала без прогрессирования по сравнению с больными, у которых в динамике отмечалось повышение уровня циркулирующих опухолевых клеток,  $p = 0,0126$ .

### **Список сокращений**

1. РМЖ – рак молочной железы
2. ЦОК – циркулирующие опухолевые клетки
3. млн – миллион
4. ПЦР – полимеразная цепная реакция
5. МКА – моноклональные антитела
6. ЦК – цитокератины
7. АТ – антитела
8. АГ – антигены
9. ПХТ – полихимиотерапия
- 10.ПЭ – полный эффект
- 11.ЧР – частичная регрессия
- 12.СЗ – стабилизация заболевания
- 13.ПЗ – прогрессирование заболевания
- 14.РЭ – рецепторы эстрогенов
- 15.РП – рецепторы прогестерона
- 16.ОВ – общая выживаемость

- 17.ВДП – время до прогрессирования
- 18.FITC – флуоресцеин-изотиоцианат
- 19.РЕ – фикоэритрин
- 20.PerCP – пиридинин-хлорофилл

#### Список опубликованных работ

1. O. V. Bzhadug, S. A. Tjulandin, L. J. Andreeva, G. Moldenhauer, N. N. Tupitsyn. Immunologic identification and characterization of single tumor cells in peripheral blood and bone marrow of patients with metastatic breast cancer. Educational and Abstract book of the ESMO Summer Educational Conference, 2003, 14: abstract 54, p.52.
2. О.Б. Бжадуг, Н.Н. Тупицын, С.А. Тюляндин. Значение выявления микрометастазов в периферической крови и костном мозге у больных раком молочной железы. Современная онкология. 2004. -Том 6, №4, с. 149-154.
3. О.Б. Бжадуг. Рак молочной железы. Значение выявления микрометастазов в периферической крови и костном мозге. Иммунология гемопоза (ISBN 5-9534-0052-7). – М.: Издательская группа ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 2005 (ISBN5-9534-0052-7), вып. 2, с.78-111.
4. О.Б. Бжадуг, Л.Ю. Гривцова, Н.Н. Тупицын, С.А. Тюляндин. Циркулирующие опухолевые клетки в крови больных местно-распространенным и диссеминированным раком молочной железы. Вестник Российского онкологического научного центра имени Н.Н.Блохина РАМН, № 3, 2007, с.19-22.