

ДИССЕМИНИРОВАННЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ У ПАЦИЕНТОВ С ЛЮМИНАЛЬНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Д.А. Рябчиков¹, О.А. Безнос¹, И.А. Дудина², И.К. Воротников¹, Д.А. Денчик¹,
С.В. Чулкова¹, О.А. Талипов¹, Н.Н. Тупицын¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет);
Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Денис Анатольевич Рябчиков dr.denisr@mail.ru

Введение. Существуют многочисленные подтверждения того, что диссеминированные опухолевые клетки (ДОК) в костном мозге пациентов с первичным раком молочной железы (РМЖ), в том числе и на ранних стадиях, являются предшественниками последующих отдаленных метастазов. Поэтому ДОК могут служить дополнительным маркером для оценки прогноза и понимания канцерогенеза, но существующие данные противоречивы.

Цель исследования — определить частоту выявления ДОК в костном мозге у пациентов с люминальным РМЖ, а также их связь с некоторыми клиническими и иммунофенотипическими параметрами.

Материалы и методы. Биоптаты костного мозга 65 пациентов с первичным люминальным РМЖ изучены на предмет наличия ДОК посредством акустического фокусирующего цитометра Attune. Впервые в России была повышена чувствительность метода обнаружения ДОК в костном мозге до уровня 1×10^{-7} миелокариоцитов.

Результаты. В костном мозге ДОК обнаружены у 40 % пациентов, вместе с тем полученный результат не коррелировал ни со стадией опухолевого процесса, ни со степенью злокачественности. Уровень CD8⁺-лимфоцитов у пациентов с ДОК в костном мозге был достоверно ниже и составил 39,2 % против 48,1 % у пациентов, не имеющих ДОК ($p = 0,011$). Содержание миелокариоцитов при ДОК-положительном статусе было в 1,6 раза ниже, чем при отсутствии ДОК ($p = 0,007$). Другие параметры миелограммы не имели статистически значимых различий. Более того, не было обнаружено существенных корреляций между наличием ДОК в костном мозге и иммунофенотипом опухоли молочной железы (HLA-I: $p = 0,74$; HLA-DR: $p = 0,93$; CD71: $p = 0,46$).

Заключение. Наличие ДОК в костном мозге в большей степени связано с показателями миелограммы и субпопуляцией лимфоцитов костного мозга, чем с клиническими характеристиками опухоли.

Ключевые слова: диссеминированные опухолевые клетки, костный мозг, люминальный рак молочной железы

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-53-57

DISSEMINATED TUMOR CELLS OF LUMINAL BREAST CANCER PATIENTS

D.A. Ryabchikov¹, O.A. Beznos¹, I.A. Dudina², I.K. Vorotnikov¹, D.A. Denchik¹, S.V. Chulkova¹, O.A. Talipov¹, N.N. Tupitsyn¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University);
Build. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

Introduction. There is ample evidence that disseminated tumor cells (DTC), which are found in the bone marrow (BM) of patients with breast cancer (BC), including early stages, are progenitors of subsequent distant metastasis. Therefore, BM-DTC represent an additional tool for understanding carcinogenesis and estimating prognosis. Nevertheless, the existing data are controversial.

The purpose of the study — to determine the frequency of DTC detection in BM of patients with luminal BC and also its relationship with some clinical and immunophenotypic parameters.

Materials and methods. BM biopsies of 65 luminal BC patients were analyzed for the presence of DTC by Attune Acoustic Focusing Cytometer. For the first time in Russia, the sensitivity of the DTC detection method in the BM to the level of 1×10^{-7} myelocaryocytes was increased.

Results. In BM, DTC were detected in 40 % of patients, and this finding did not correlate with stage of BC and degree of malignancy. The level of CD8⁺ lymphocytes in patients with DTC in the BM was significantly lower and amounted to 39,2 % versus 48,1 % in patients without DTC ($p = 0,011$). The content of myelocaryocytes with DTC-positive status was 1,6 times lower than in the absence of DTC ($p = 0,007$). Other parameters of the myelogram did not differ significantly. Moreover, no significant correlations were found between the presence of DTC in BM and the breast tumor immunophenotype (HLA-I: $p = 0,74$; HLA-DR: $p = 0,93$; CD71: $p = 0,46$).

Conclusion. The presence of BM-DTC is more interrelated with myelogram and subpopulation of BM lymphocytes than with the clinical characteristics of tumor.

Key words: disseminated tumor cells, bone marrow, luminal breast cancer

Введение

В последние десятилетия методики диагностики и лечения онкологических заболеваний, в том числе и рака молочной железы (РМЖ), значительно улучшились, но независимо от успешности терапии первичной опухоли $\approx 25\%$ пациентов с локализованным РМЖ без участия лимфатических узлов в будущем столкнутся с системным рецидивом заболевания [1]. Следовательно, микрометастатическое гематогенное распространение, по-видимому, происходит без вовлечения региональных лимфатических узлов и вопрос о необходимости лимфаденэктомии в каждом конкретном случае должен рассматриваться индивидуально [2]. Доказано, что в организме существуют другие участки, где опухолевые клетки способны сохраняться долгое время. Специально для описания этого состояния при лейкозах был введен термин «минимальная остаточная (резидуальная) болезнь». Изначально при данном состоянии в организме у пациента остается небольшое количество лейкоэмических клеток костного мозга во время и после лечения, а также в период ремиссии. Позднее понятие минимальной остаточной болезни было расширено: сейчас оно также используется для описания состояния, при котором опухолевые клетки обнаруживаются после клинико-морфологической ремиссии при РМЖ [3].

Исследованиями подтверждено, что именно диссеминированные опухолевые клетки (ДОК) находятся в костном мозге у пациентов с РМЖ и являются предшественниками последующих метастазов и перспективными маркерами [4, 5]. Мы считаем, что анализ ДОК, их микроокружения, особенностей первичной опухоли позволит лучше понять неизученное явление «опухолевого покоя», характеризующееся клинико-морфологической ремиссией между резекцией первичной опухоли и гематогенным метастатическим рецидивом РМЖ, который может произойти более чем через 10 лет [6, 7].

Цель исследования — определить частоту выявления ДОК в костном мозге у пациенток с люминальным РМЖ, а также связь этих клеток с некоторыми клиническими и иммунофенотипическими параметрами.

Материалы и методы

Материалами исследования стали образцы костного мозга, которые были получены при пункции грудины (стеральной пункции) во время плановой операции, проведенной в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В отдельных случаях использованы одномоментные пункции грудины и гребня подвздошной кости. В исследование вошли 65 пациенток с диагнозом РМЖ люминального А или В типа, хирургическое вмешательство

которым было проведено не позднее 2015 г. Иммунологические исследования костного мозга, а также подсчет клеток миелограммы и их анализ проведены в лаборатории иммунологии гемопоэза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Для определения иммунологических характеристик костного мозга и наличия в нем ДОК использовали как стандартные цитологические методы, так и иммунофлуоресцентный анализ с применением моноклональных антител к цитокератинам CAM 5.2 (Becton Dickinson, США) и KL-1 (Immunotech, Франция).

В проведенном исследовании впервые в России мы применили метод проточной цитометрии, что позволило увеличить пороговое значение до 1×10^{-7} миелокариоцитов. С этой целью мы использовали высокоскоростной проточный цитометр Attune с революционной технологией акустической фокусировки клеток для многопараметрического анализа клеточной суспензии [8].

Результаты

У 26 из 65 пациентов с люминальным РМЖ были обнаружены ДОК, в нашем исследовании частота выявления таких клеток в костном мозге составила 40 %. По данным мировой литературы, этот показатель варьирует от 13,2 до 42 % в зависимости от методов исследования и критериев включения пациентов [9].

S. Braun и соавт. (2005) провели крупный анализ 9 независимых исследований, целью которого было изучение прогностической значимости присутствия ДОК в костном мозге у пациентов с РМЖ [4]. Оказалось, что пациенты с ДОК-положительным статусом имели более крупные по размеру и в большинстве случаев рецептор-негативные опухоли, а также у них чаще выявлялись метастазы в лимфатических узлах ($p < 0,001$ для всех переменных). По результатам этого анализа наличие ДОК в костном мозге было расценено как важный прогностический неблагоприятный фактор: показатели общей, безрецидивной и обусловленной заболеванием выживаемости были значительно ниже в исследуемой группе. Другой крупный метаанализ, проведенный I. Funke и соавт. (1998), также выявил прямую корреляцию ДОК-положительного статуса с безрецидивной выживаемостью [10].

В 2005 г. О.В. Крохиной и соавт. на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России было выявлено, что частота обнаружения ДОК в костном мозге у пациенток с РМЖ составляет 45,3 % [11]. Авторы установили взаимосвязь между наличием ДОК и рецепторным статусом опухоли: при отсутствии рецепторов эстрогенов и прогестерона ДОК были обнаружены у 84,6 % пациенток, при наличии рецепторов эстрогенов — у 28,6 %, при наличии рецепторов прогестерона — у 25 %. Статистически

достоверной связи между ДОК-положительным статусом и степенью злокачественности, степенью дифференцировки, размером опухолевого узла, маммографическими признаками распространенности опухоли, наличием лимфогенных метастазов установлено не было. А. Molino и соавт. (1997) не обнаружили связи между поражением костного мозга и такими прогностическими факторами, как размер опухоли, метастазы в лимфатические узлы и гормональный статус [12].

В проведенном нами исследовании не было установлено статистически значимой связи ДОК-положительного статуса опухоли с ее размером, стадией РМЖ и степенью злокачественности. Интересно отметить, что минимальная частота обнаружения ДОК наблюдалась при I степени злокачественности (25 %), а максимальная — при II степени злокачественности (43,1 %). Сравнение уровня экспрессии Ki-67 с частотой выявления ДОК в костном мозге не показало статистически значимой разницы: у пациентов с ДОК-положительным статусом средний уровень экспрессии Ki-67 составил $38,8 \pm 5,2$ %, с ДОК-отрицательным — $38,5 \pm 4,1$ % ($p = 0,97$). Полученные данные указывают на то, что клинико-морфологические характеристики опухоли не являются определяющими для диссеминации опухолевых клеток в костный мозг, но при этом их наличие является важным независимым фактором.

Именно поэтому следующий этап работы был посвящен сравнению уровней Т- и В-лимфоцитов, НК-клеток и их субпопуляций в костном мозге у пациентов с люминальным РМЖ в зависимости от статуса ДОК. В результате оказалось, что единственной субпопуляцией костномозговых лимфоцитов, статистически значимо связанной с ДОК, были клетки CD8⁺. Их уровень у пациентов с ДОК в костном мозге был достоверно ниже и составил 39,2 % против 48,1 % у пациентов, не имеющих ДОК, при $p = 0,011$ (табл. 1). Этим обусловлено достоверно более высокое значение иммунорегуляторного индекса у пациентов с ДОК-положительным статусом ($p = 0,025$). Полученные данные могут иметь важное научное и клиническое значение.

В исследовании Е.В. Артамоновой (2003) продемонстрировано, что иммунофенотипические особенности клеток РМЖ взаимосвязаны с уровнями местных иммунных реакций (субпопуляциями интратуморальных лимфоцитов), клиническим течением и прогнозом заболевания [13]. В работе показано, что инфильтрация опухоли клетками иммунной системы происходит главным образом за счет Т-лимфоцитов (CD4 и CD8) и отрицательно коррелирует с размером опухоли, наличием регионарных метастазов и стадией заболевания. F. Pages и соавт. (2009) также доказали, что наличие CD8⁺-лимфоцитов в первичных

опухолях молочной железы коррелирует с уменьшением метастатической инвазии и повышением общей выживаемости [14]. В нашем исследовании не выявлена корреляция между наличием ДОК и уровнями инфильтрации первичной опухоли плазмочитами, Т-, CD4⁺-, CD8⁺-клетками, общей лейкоцитарной инфильтрацией (CD45) и макрофагальной инфильтрацией (CD163).

Роль данных клеток в костном мозге была изучена позже: в нескольких исследованиях показано, что костномозговые CD8⁺-, CD4⁺- и Т-клетки выполняют защитную роль, предотвращая появление метастатических очагов [15]. Это подтверждает гипотезу об иммунологической памяти и опухолевом покое в костном мозге, в то же время результаты наших изысканий наводят на мысль о том, что ДОК и CD8⁺-лимфоциты находятся в постоянном взаимодействии. Благодаря этому взаимодействию возможны как появление отдаленного метастазирования и прогрессирование заболевания (преобладание эффектов ДОК), так и полный контроль и ремиссия РМЖ (преобладание эффектов CD8⁺-лимфоцитов).

Мы не обнаружили статистически значимой связи между другими субпопуляциями лимфоцитов в костном мозге или в первичной опухоли и наличием ДОК. Но в зарубежных и отечественных источниках встречается информация, указывающая на корреляцию между уровнями CD16⁺CD56⁺-, CD3⁺-, CD4⁺-, CD4⁺CD25⁺-, CD19⁺- и CD19⁺CD5⁺-лимфоцитов и клиническими и молекулярно-генетическими характеристиками первичной опухоли [16–20]. Наши данные представлены в табл. 1.

В дальнейшем нами были изучены иммунофенотип опухоли и уровень ее инфильтрации различными клетками иммунной системы у пациентов с люминальным РМЖ при ДОК-положительном и ДОК-отрицательном статусах. На сегодняшний день совершенно точно известно, что потеря молекул HLA-I при опухолевой прогрессии — один из главных механизмов «ускользания» опухолевых клеток от иммунного ответа Т-киллеров [21]. В нашем исследовании мы оценили соотношение маркеров HLA-1, HLA-DR, CD71 при люминальном А и В, HER2-позитивном и трижды негативном типах РМЖ, а затем попытались установить их связь со статусом ДОК пациента с люминальным РМЖ (табл. 2). Однако ни по одному из анализируемых параметров статистически значимых различий не получено. При сравнении соотношений маркеров HLA-1, HLA-DR, CD71 со статусом ДОК пациентов с РМЖ люминальных А и В типов статистически значимых различий также не было найдено. Безусловно, эта тема требует более глубокого изучения, но на данном этапе предварительно можно сказать, что наличие ДОК не зависит от степени экспрессии HLA-DR, HLA-1, CD71.

Таблица 1. Средние уровни различных субпопуляций лимфоцитов в костном мозге в зависимости от статуса ДОК

Показатель	Статус ДОК	n	Среднее	p
CD16CD56	отрицательный	16	8,7706	>0,05
	положительный	9	8,2367	
CD3	отрицательный	20	62,3125	>0,05
	положительный	13	60,1508	
CD4	отрицательный	21	38,4671	>0,05
	положительный	15	43,3020	
CD8	отрицательный	20	48,1825	0,011
	положительный	16	39,2144	
CD4/CD8	отрицательный	19	0,8821	0,025
	положительный	15	1,2040	
CD4CD25	отрицательный	20	3,1390	>0,05
	положительный	14	3,6636	
CD19	отрицательный	19	16,5932	>0,05
	положительный	13	18,2162	
CD19CD5	отрицательный	21	8,4867	>0,05
	положительный	12	7,4850	

Примечание. Здесь и в табл. 2: n — число пациентов; p — вероятность ошибки; ДОК — диссеминированные опухолевые клетки.

На следующем этапе исследования было проведено сравнение миелограмм в зависимости от наличия ДОК в костном мозге и выявлено статистически значимое различие по уровню миелокариоцитов. У пациенток с ДОК-положительным статусом этот уровень был в 1,6 раза ниже и составил $57,5 \pm 6,5$ тыс/мкл против $94,9 \pm 11,6$ тыс/мкл у больных с ДОК-отрицательным статусом ($p = 0,007$). Остальные показатели и их соотношения не имели статистически значимой разницы у пациентов с различными статусами ДОК.

Заключение

Общие результаты указывают на ценность определения статуса ДОК у пациентов с люминальным РМЖ, а также на возможность использования этого показателя в качестве терапевтической мишени для лечения заболевания и профилактики его рецидивов.

Статистически значимой связи между статусом ДОК и клиническими характеристиками опухоли выявлено не было. Частота обнаружения ДОК составила 40 % и не отличалась при люминальных А и В типах опухоли, что указывает на более глубокие молекулярно-генетические и иммунологические взаимоотношения между ДОК костного мозга, иммунной системой организма и первичной опухолью.

При изучении микроокружения ДОК в костном мозге мы пришли к выводу, что баланс между $CD8^+$ -лимфоцитами и ДОК — один из возможных механизмов персистирования ДОК и опухолевого покоя. В связи с этим стратегией будущего в лечении и профилактике РМЖ станет терапия, нацеленная на уничтожение ДОК и активацию $CD8^+$ -лимфоцитов в костном мозге.

У пациентов с разными статусами ДОК не были обнаружены статистически значимые различия в экспрессии первичной опухолью HLA-DR, HLA-I, CD71, а также в степени инфильтрации костного мозга клетками иммунной системы. Данная тема требует более глубокого изучения и проведения новых клинических исследований.

Наши исследования подтвердили значимость ДОК у пациентов с люминальным РМЖ и расширили представления о понимании механизмов канцерогенеза и отдаленного метастазирования. Следует отметить, что наличие ДОК в костном мозге в большей степени зависит от показателей костномозгового микроокружения и уровня $CD8^+$ -лимфоцитов, чем от клинических характеристик и особенностей самой опухоли. В перспективе (при достижении 5-летней выживаемости пациентов) планируется изучение вышеописанной исследуемой группы на предмет зависимости показателей отдаленной выживаемости от статуса ДОК и иммунофенотипа опухоли.

Таблица 2. Распределение образцов люминального РМЖ в зависимости от наличия ДОК и экспрессии HLA-DR, HLA-I, CD71

Статус	HLA-DR		HLA-I		CD71	
	негативный (n = 25)	позитивный (n = 16)	негативный (n = 26)	позитивный (n = 16)	негативный (n = 25)	позитивный (n = 16)
ДОК-отрицательный	64 %	36 %	38,5 %	61,5 %	36 %	64 %
ДОК-положительный	62,5 %	37,5 %	43,8 %	56,3 %	25 %	75 %
p	0,93		0,74		0,46	

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;365:1687–717. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)66544-0.
2. Воротников И.К., Чхиквадзе Н.В., Рябчиков Д.А. и др. Лимфаденэктомия при раке молочной железы: за и против. *Злокачественные опухоли* 2016;(2):37–42. DOI: 10.18027/2224-5057-2016-2-37-42.
3. Hartkopf A.D., Wallwiener M., Hahn M. et al. Simultaneous Detection of Disseminated and Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer Patients. *Cancer Res Treat* 2016;48(1):115–24. DOI: 10.4143/crt.2014.287.
4. Braun S., Vogl F.D., Naume B. et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:793–802. DOI: 10.1056/NEJMoa050434.
5. Beznos O.A., Artamonova E.V., Tupitsyn N.N. Disseminated tumor cell subpopulations: approaches to identification and clinical significance. *Haematopoiesis Immunology* 2016; 14(1):73–9.
6. Uhr J.W., Pantel K. Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:12396–400. DOI: 10.1073/pnas.1106613108.
7. Chambers A.F., Groom A.C., MacDonald I.C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002;2:563–72. DOI: 10.1038/nrc865.
8. Давыдов М.И., Тупицын Н.Н., Григорьева Т.А. и др. Метод проточной цитометрии в оценке минимального поражения костного мозга у больных раком. *Иммунология гемопоза* 2014;12(1):8–17.
9. Wölfl U., Müller V., Pantel K. Disseminated tumor cells in breast cancer: detection, characterization and clinical relevance. *Future Oncol* 2006; 2(4):553–61. DOI: 10.2217/14796694.2.4.553.
10. Funke I., Schraut W. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastasis: an independent prognostic impact remains to be substantiated. *J Clin Oncol* 1998;16(2):557–66. DOI: 10.1200/JCO.1998.16.2.557.
11. Крохина О.В., Летягин В.П., Тупицын Н.Н. и др. Иммуноморфологическая диагностика микрометастазов рака молочной железы в костный мозг. *Опухоли женской репродуктивной системы* 2005;(1):70–3.
12. Molino A., Pelosi G., Turazza M. et al. Bone marrow micrometastases in 109 breast cancer patients: correlations with clinical and pathological features and prognosis. *Breast Cancer Res Treat* 1997;42:23–30. PMID: 9116315.
13. Артамонова Е.В. Роль иммунофенотипирования опухолевых клеток в диагностике и прогнозе рака молочной железы. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2003.
14. Pages F., Galon J., Dieu-Nosjean M.C. et al. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 2010;29:1093–102. DOI: 10.1038/onc.2009.416.
15. Capietto A.-H., Faccio R. Immune regulation of bone metastasis. *Bonekey Rep* 2014;3:600. DOI: 10.1038/bonekey.2014.95.
16. Григорьева Т.А., Безнос О.А., Тупицын Н.Н. Субпопуляции лимфоцитов костного мозга больных раком молочной железы. *Опухоли женской репродуктивной системы* 2015;(2): 52–5. DOI: 10.17650/1994-4098-2015-11-2-52-55.
17. Biylgi O., Karagöz B., Türken O. et al. CD4⁺CD25^{high}, CD8⁺CD28⁺ cells and thyroid autoantibodies in breast cancer patients. *Cent Eur J Immunol* 2014;39(3):338–44. DOI: 10.5114/ceji.2014.45945.
18. Bedri S., Mohamed M., Sarwath H., Sastry K. Characterization and quantification of tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer* 2014;2(Suppl 1):P9. DOI: 10.1186/2051-1426-2-S1-P9.
19. Rathore A.S., Kumar S., Konwar R. et al. An Indian CD3⁺, CD4⁺ & CD8⁺ tumour infiltrating lymphocytes (TILs) are predictors of favourable survival outcome in infiltrating ductal carcinoma of breast. *J Med Res* 2014;140(3):361–9. PMID: PMC4248382.
20. Ellinidi V.N., Anikeeva N.V., Goncharova O.A., Krasnozhen D.A. Natural killer cells (CD56, CD16) as a factor of local antitumor immunity in breast cancer. *Voprosy onkologii* 2005;51(4):447–9. PMID: 16308976.
21. Kaneko K., Ishigami S., Kijima Y. et al. BMC Clinical implication of HLA class I expression in breast cancer. *Cancer* 2011;11:454. DOI: 10.1186/1471-2407-11-454.