

# ОБНАРУЖЕНИЕ ДИССЕМИНИРОВАННЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В КОСТНОМ МОЗГЕ БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

С. В. Чулкова<sup>1,2</sup>, Н. Н. Тупицын<sup>1</sup>, Т. М. Джуманазаров<sup>1</sup>, А. Д. Палладина<sup>1</sup>, Н. А. Купрышина<sup>1</sup>,  
О. А. Чернышева<sup>1</sup>, А. К. Аллахвердиев<sup>3,4</sup>, О. П. Колбацкая<sup>1</sup>, П. В. Кононец<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России;  
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. И. М. Пирогова»  
Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1а;

<sup>3</sup>ГБУЗ г. Москвы «Московский клинический научно-практический центр им. А. С. Логинова Департамента  
здравоохранения г. Москвы»; Россия, 111123 Москва, шоссе Энтузиастов, 86;

<sup>4</sup>ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России;  
Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

**Контакты:** Светлана Васильевна Чулкова [chulkova@mail.ru](mailto:chulkova@mail.ru)

**Введение.** Существуют многочисленные подтверждения того, что при ряде опухолей диссеминированные опухолевые клетки (ДОК) в костном мозге (КМ) — предшественники последующих отдаленных метастазов. Детекция ДОК при немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ) позволит получить важную информацию об особенностях метастазирования и оценить возможности выявления новых мишеней для лекарственной терапии НМРЛ.

**Цель исследования** — оценить возможность детекции ДОК в КМ у больных НМРЛ, а также проанализировать частоту поражения и взаимосвязь с клинико-морфологическими параметрами опухоли.

**Материалы и методы.** Морфологическим и иммунологическим методами изучено 62 образца КМ пациентов с НМРЛ. Проведена оценка состояния гемопоэза в зависимости от наличия поражения КМ. С помощью проточной цитометрии выполнен анализ ДОК (FACSCanto II, США, программа Kaluza Analysis v 2.1). Применялись моноклональные антитела к CD45, цитокератинам, меченные напрямую различными флуорохромами.

**Результаты.** В КМ ДОК (EPCAM<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>) были обнаружены у 43,5 % пациентов с НМРЛ (в качестве порогового значения приняли 1 клетку на 10 млн миелокардиоцитов). Наличие ДОК не коррелировало с размером опухоли, статусом лимфатических узлов, стадией опухолевого процесса. Наибольшая частота обнаружения ДОК наблюдалась при IA- и IIA-стадии и составила 60,7 % (3/5) и 58,3 % (7/12) соответственно. Поражение КМ в 45 % (15/33) случаев наблюдалось при аденокарциноме, при плоскоклеточном раке опухолевые клетки выявлены в 37 % (10/27) образцов ( $p = 0,501$ ). Установлено, что ДОК чаще выявляются при более дифференцированных опухолях ( $p = 0,023$ ). Существенных корреляций между наличием ДОК в КМ и показателями миелограммы не установлено. В 4 % случаев поражения КМ наблюдалось снижение суммы клеток гранулоцитарного роста ( $p = 0,036$ ).

**Заключение.** Установлена возможность детекции ДОК в КМ больных НМРЛ. Частота поражения КМ составила 43,5 %. ДОК выявлены даже на ранних стадиях НМРЛ. Обнаружена взаимосвязь поражения КМ и степени дифференцировки опухоли. В сравнении с плоскоклеточным раком легкого более частое поражение наблюдалось при аденокарциноме.

**Ключевые слова:** диссеминированные опухолевые клетки, костный мозг, немелкоклеточный рак легкого, морфология, проточная цитометрия

**Для цитирования:** Чулкова С. В., Тупицын Н. Н., Джуманазаров Т. М. и др. Обнаружение диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больных немелкоклеточным раком легкого. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(3):29–37.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-3-29-37



## DETECTION OF DISSEMINATED TUMOR CELLS IN THE BONE MARROW OF PATIENTS WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER

S. V. Chulkova<sup>1,2</sup>, N. N. Tupitsyn<sup>1</sup>, T. M. Djumanazarov<sup>1</sup>, A. D. Palladina<sup>1</sup>, N. A. Kupryshina<sup>1</sup>, O. A. Chernysheva<sup>1</sup>,  
A. K. Allahverdiev<sup>3,4</sup>, O. P. Kolbatskaya<sup>1</sup>, P. V. Kononetz<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovitianov St., Moscow 117997, Russia;

<sup>3</sup>Moscow Clinical Scientific and Practical Center of Moscow Department of Healthcare; 86 Shosse Entuziastov, Moscow 111123, Russia;

<sup>4</sup>Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Health of Russia;  
Build 1, 2/1 Barricadnaya St., Moscow 125993, Russia

**Introduction.** There is evidence that disseminated tumor cells (DOCs) in the bone marrow (BM) are precursors of subsequent distant metastases. The detection of DOCs in non-small cell lung cancer (NSCLC) will provide important information about the features of metastasis, as well as the possibilities of identifying new targets for the treatment of NSCLC.

**Purpose of the study** is to evaluate the possibility of detection DOCs in BM and to identify the frequency of BM involvement in patients with NSCLC.

**Materials and methods.** Morphological and immunological methods studied 62 BM samples from patients with NSCLC. DOCs analysis was performed using flow cytometry (FACSCanto II, USA, Kaluza Analysis v 2.1 software), monoclonal antibodies to CD45, cytokeratins directly labeled with various fluorochromes were used.

**Results.** DOCs (EPCAM<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>) in the BM were found in 43.5 % of patients (threshold level: 1 cell per 10 million myelocaryocytes). The presence of DOCs did not correlate with tumor size, lymph node status, stage of the tumor process. The highest detection rates of DOCs were observed at stages IA and IIA: 60.7 % (3/5) and 58.3 % (7/12) respectively. BM involvement in adenocarcinoma was observed in 45 % (15/33) cases, in squamous cell carcinoma – in 37 % (10/27) samples ( $p = 0.501$ ). It was found that DOCs are more often detected in more differentiated tumors ( $p = 0.023$ ). Significant correlations between the presence of DOCs in the BM and myelogram parameters have not been established. A decrease in the number of granulocyte germ cells was observed in 4 % of BM involvement ( $p = 0.036$ ).

**Conclusion.** The possibility of detecting DOCs in the BM of NSCLC patients has been established. BM involvement was 43.5 %. DOCs are detected even in the early stages of NSCLC. Relationship between BM involvement and the degree of tumor differentiation was found. More frequent BM involvement was observed in adenocarcinoma compared with squamous cell carcinoma of the lung.

**Key words:** disseminated tumor cells, bone marrow, non-small cell lung cancer, morphology, flow cytometry

**For citation:** Chulkova S.V., Tupitsyn N.N., Djumanazarov T.M. et al. Detection of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with non-small cell lung cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2020;19(3):29–37. (In Russ.).

## Введение

Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) — ведущая причина смертности от злокачественных опухолей в большинстве стран мира. Новейшие достижения лекарственной терапии, основанной на молекулярно-биологических характеристиках опухоли, стали большим прорывом, однако выживаемость больных НМРЛ остается по-прежнему довольно низкой. К сожалению, 5-летний рубеж переживают не более 18 % больных [1].

В настоящее время усилия ученых направлены на разработку различных стратегий повышения эффективности противоопухолевого иммунного ответа, и значительная доля научных исследований посвящена изучению иммунобиологических механизмов гематогенного метастазирования [2–4]. Предметом пристального внимания в этом контексте стали диссеминированные опухолевые клетки (ДОК), которые довольно часто обнаруживаются в костном мозге (КМ) онкологического больного [5–8]. Следует подчеркнуть, что практически у 40 % таких больных имеются ранние стадии опухолевого процесса. КМ требует очень тщательного изучения, поскольку, попадая в него, ДОК вступают во взаимодействие с новым микроокружением, от которого зависит их судьба. В ряде случаев ДОК остаются бездействующими или спящими [9]. Однако они могут избегать иммунного ответа, что в дальнейшем приводит к появлению вторичных опухолей. Существенно нарушая строго контролируемые клеточные и молекулярные меха-

низмы микроокружения, они тем самым способствуют собственному выживанию и образуют метастатическую нишу [10, 11]. Таким образом КМ становится новым прибежищем ДОК, в котором они подвергаются успешной клональной экспансии и параллельной прогрессии [2, 12]. Эти процессы приводят к приобретению ими новых фенотипических признаков. В недавней работе показана гетерогенность ДОК: они экспрессируют на своей поверхности разнообразный набор антигенов [7], что отличает их от первичной опухоли и отражает сложную архитектуру отношений между ДОК и микроокружением. Имеются данные, что ДОК в КМ могут иметь геномные профили, не связанные с первичной опухолью [13]. Это отсылает нас в эпоху, когда в 60-е годы XX в. Л. Фулдсом впервые было постулировано, что опухолевая клетка в результате опухолевой прогрессии необратимо приобретает новые черты, необходимые для ее выживания [14]. Так создаются новые возможности для дальнейших микроэволюционных изменений. Они приводят к повышению независимости роста ДОК от локальных, системных или лечебных воздействий.

На сегодняшний день имеются высокочувствительные иммунологические методы, накоплен богатый опыт детекции ДОК. Установлена возможность количественного определения ДОК и их фенотипической характеристики [7]. Поражение КМ и роль ДОК как фактора неблагоприятного прогноза показаны при раке молочной железы [6, 15], раке желудка [16], меланоме [7]. Что касается НМРЛ, данные пока противоречивы [8].

Идентификация и характеристика ДОК позволили получить важную информацию о механизмах метастазирования, что привело к лучшему пониманию молекулярных изменений и профилей, лежащих в основе лекарственной устойчивости опухолей [17]. В связи с этим ДОК рассматриваются как возможная мишень для лекарственной терапии [18], ведь вместо ожидания появления метастазов целесообразнее нацеливаться на метастатические семена еще до того, как они прорастут. Уже положено начало исследованиям, направленным на разработку схем для предотвращения активации и пролиферации ДОК, в особенности у больных с высоким риском рецидива, а также у пациентов с полным ответом на лечение. Предварительные клинические и лабораторные данные свидетельствуют об эффективности этой стратегии при раке желудка и некоторых эндокринозависимых опухолях [19].

Установлен ряд особенностей гемопоэза у онкологических больных [20], что может служить основанием для более глубокого понимания поведения ДОК в условиях костномозгового микроокружения.

Таким образом, изучение КМ при НМРЛ и возможности детекции ДОК представляет существенный интерес. Анализ ДОК и их взаимосвязи с клинико-морфологическими характеристиками опухоли позволит глубже понять закономерности опухолевого роста и оценить возможности выявления новых мишеней для лекарственной терапии.

**Цель исследования** – оценить возможность детекции ДОК в КМ у больных НМРЛ, а также проанализировать частоту поражения и взаимосвязь с клинико-морфологическими параметрами опухоли.

#### Материалы и методы

В данное исследование были включены 62 больных НМРЛ, которые получали лечение в условиях ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2018 по 2019 г. Возраст больных варьировал от 17 до 80 лет, средний возраст составил 63 года. В исследовании участвовали 48 (77,4 %) мужчин и 14 (22,6 %) женщин. Всем больным было выполнено хирургическое пособие, за исключением 1 случая, в котором провели биопсию. В табл. 1 представлено распределение больных по стадиям.

Согласно данным патоморфологического заключения у 27 (43,5 %) больных диагностирован плоскоклеточный рак, у 33 (53,3 %) пациентов – аденокарцинома, в 2 (3,2 %) случаях – другие гистологические формы. Преобладали опухоли умеренно дифференцированные (G2) – 50 % ( $n = 31$ ), высокодифференцированные опухоли (G1) наблюдались в 6,5 % ( $n = 4$ ), низкая степень дифференцировки (G3) отмечена в 32 % случаев ( $n = 20$ ) (рис. 1). В 7 случаях G не определено.

**Таблица 1.** Распределение больных немелкоклеточным раком легкого по стадиям

Table 1. The distribution of patients with non-small cell lung cancer in stages

Стадия Stages	Число больных Number of patients	%
IA	5	8,2
IB	13	21,0
IIA	12	19,5
IIB	9	14,5
IIIA	13	21,0
IIIB	4	6,5
IV	6	9,7
<i>Всего Total</i>	62	100

Образец КМ получен путем стеральной пункции во время хирургического вмешательства. Объем костномозгового пунктата не превышал 1,0 мл, поскольку при большем объеме возрастала вероятность разбавления образца периферической кровью. Изучение КМ проводилось 2 методами: морфологическим и иммунологическим. Морфологическое исследование выполнялось на 6 стеклах, окрашенных по методу Романовского. Подсчет миелограммы и поиск опухолевых клеток осуществлялись одновременно 2 морфологами. Для иммунологической оценки наличия ДОК в КМ использовались моноклональные антитела к цитокератинам EPCAM (Becton Dickinson, США) и KL-1 (Immunotech, Франция), CD45, меченные напрямую различными флуорохромами: FITC, PE, V500, V450, PerCP. Сбор клеток проводили на проточном цитометре FACSCanto II, США. Анализировали результаты с помощью программы Kaluza Analysis v 2.1 (Beckman Coulter, USA). Оценивалось 20 млн миелокариоцитов (или все клетки образца). ДОК выявлялись по отсутствию экспрессии общего лейкоцитарного антигена CD45 в сочетании с экспрессией EPCAM или KL-1.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием пакета IBM-SPSS Statistics v. 18.



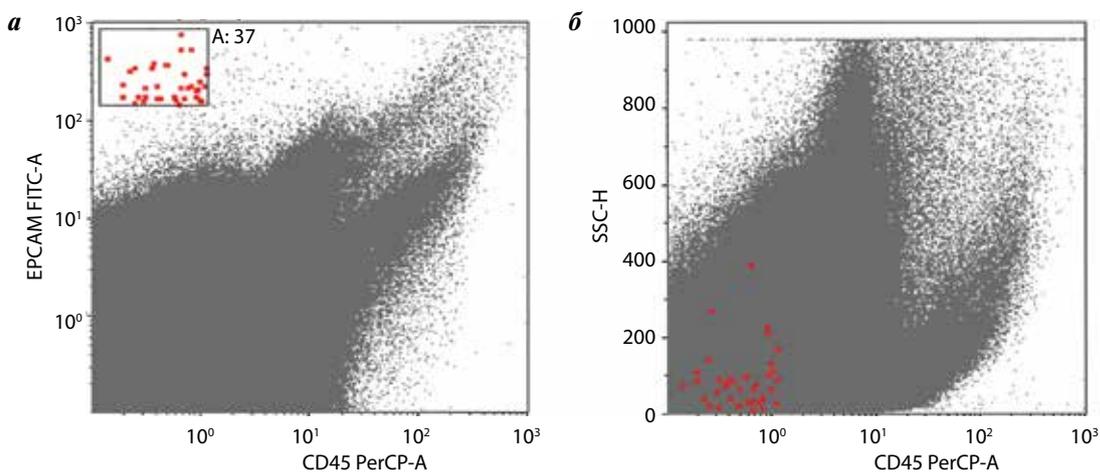
**Рис. 1.** Степень дифференцировки опухоли

Fig. 1. The degree of tumor differentiation

### Результаты и обсуждение

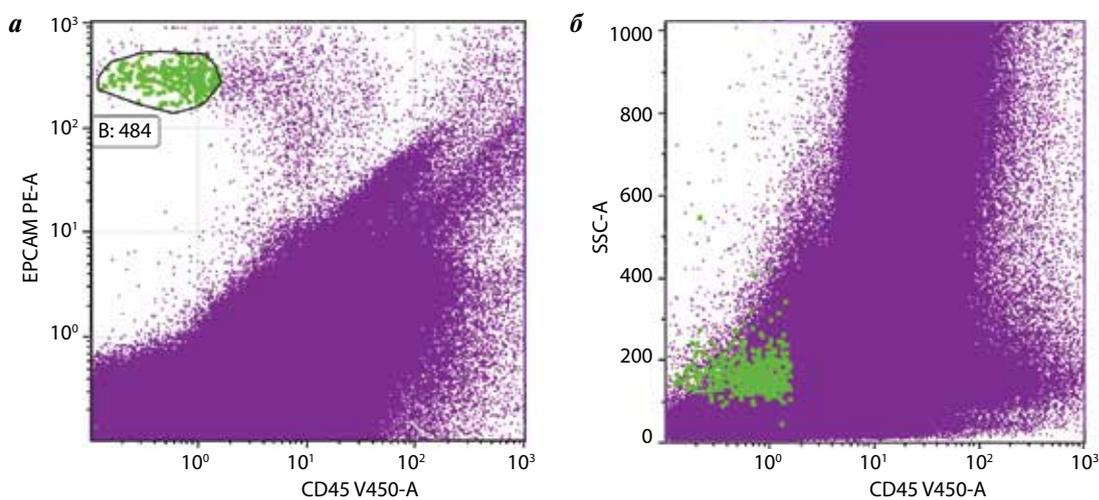
В морфологический анализ пунктатов КМ были включены подсчет миелограммы и поиск опухолевых клеток. Морфологически ДОК в КМ выявлены только в 1 из 62 случаев. При иммунологической оценке наличия ДОК в КМ за пороговый уровень была принята 1 опухолевая клетка на 10 млн миелокариоцитов. С учетом заданного порогового значения на основании яркой экспрессии EPCAM и отсутствия экспрессии CD45, ДОК (CD45<sup>-</sup> EPCAM<sup>+</sup>) выявлены в 43,5 % образцов КМ ( $n = 27$ ) (рис. 2).

Одна эпителиальная (опухолевая) клетка среди 10 млн миелокариоцитов в образцах КМ выявлена у 9 (14 %) больных. В остальных случаях количество опухолевых клеток, определяемых иммуноцитологически, варьировало от 2 до 242. Четкий кластер опухолевых клеток (микрометастаз) диагностирован у 2 (3,2 %) из 62 больных НМРЛ. Наибольшее количество ДОК в КМ наблюдалось у больного со стадией ПА (T2aN1M0) плоскоклеточного рака легкого (рис. 3). Морфологически микрометастазы у этих 2 больных не установлены.



**Рис. 2.** Выявление диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больного немелкоклеточным раком легкого методом проточной цитометрии: а – в гейте А диссеминированные опухолевые клетки наблюдались на основании экспрессии EPCAM (ось Y) и отсутствия CD45 (ось X); б – отсутствие экспрессии CD45 (ось X) и низкие характеристики бокового светорассеяния SSC (ось Y) диссеминированных опухолевых клеток

**Fig. 2.** Detection disseminated tumor cells in the bone marrow of non-small cell lung cancer patients by flow cytometry: a – in gate A disseminated tumor cells was observed based on the expression of EPCAM (Y axis) and the absence of CD45 (X axis); б – shows the absence of CD45 expression (X axis) and low lateral light scattering characteristics SSC (Y axis) disseminated tumor cells



**Рис. 3.** Диссеминированные опухолевые клетки (ДОК) в костном мозге больного Ж. На данном рисунке показан пример обнаружения кластера ДОК немелкоклеточного рака легкого: а – ДОК (484 клетки) наблюдались на основании яркой экспрессии EPCAM в гейте А (ось Y) и отсутствия CD45 (ось X) в сочетании с низкими характеристиками бокового светорассеяния SSC ДОК (цитограмма б – ось Y)

**Fig. 3.** Disseminated tumor cells (DTCs) in the bone marrow of patient Zh. This figure shows an example of the detection of DTCs cluster non-small cell lung cancer: a – DTCs (gate A – 484 cells) were observed based of the bright expression of EPCAM (Y axis) in) and the absence of CD45 (X axis) in combination with low lateral light scattering characteristics SSC (cytogram б – Y axis)

**Таблица 2.** Поражение костного мозга больных немелкоклеточным раком легкого в зависимости от распространенности опухолевого процесса

Table 2. Bone marrow involvement in patients with non-small cell lung cancer depending on the tumor spread

Стадия Stage	Диссеминированные опухолевые клетки Disseminated tumor cells				Всего Total	
	Отсутствуют Absent		Присутствуют Present			
	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%
IA	2	40,0	3	60,0	5	100,0
IB	8	61,5	5	38,5	13	100,0
IIA	5	41,7	7	58,3	12	100,0
IIB	5	55,6	4	44,4	9	100,0
IIIA	9	69,2	4	30,8	13	100,0
IIIB	3	75,0	1	25,0	4	100,0
IV	3	50,0	3	50,0	6	100,0
<i>Всего Total</i>	35	56,5	27	43,5	62	100,0

**Примечание.** Статистическая значимость:  $p = 0,475$ .  
Note. Statistical significance:  $p = 0,475$ .

При использовании порогового уровня «1 клетка на 1 млн миелокариоцитов» ДОК выявлены в 4 (6,65 %) образцах КМ. При этом в 2 случаях наблюдалась II стадия НМРЛ, в равной степени аденокарцинома и плоскоклеточный рак. При использовании порогового уровня «1 клетка на 100 тыс. миелокариоцитов» наличие ДОК в КМ установлено в 1 случае, как уже было упомянуто, у больного с IIA-стадией (T2aN1M0).

Нами не установлено достоверной связи между наличием ДОК в КМ (1 клетка на 10 млн миелокариоцитов) и возрастом, полом больных. В работе проведен анализ взаимосвязи поражения КМ и клинико-морфологических характеристик первичной опухоли. Частота обнаружения ДОК в КМ в зависимости от стадии опухолевого процесса представлена в табл. 2. Как видно, даже на начальных стадиях среди миелокариоцитов присутствуют опухолевые клетки. Данный факт свидетельствует о раннем процессе гема-

**Таблица 3.** Частота выявления диссеминированных опухолевых клеток в зависимости от размера первичной опухоли

Table 3. Frequency of detection of disseminated tumor cells depending on the size of the primary tumor

Стадия Stage	Диссеминированные опухолевые клетки Disseminated tumor cells				Всего Total		
	Отсутствуют Absent		Присутствуют Present				
	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%	
pT	T1	2	28,6	5	71,4	7	100,0
	T2	21	56,8	16	43,2	37	100,0
	T3	7	63,6	4	36,4	11	100,0
	T4	5	71,4	2	28,6	7	100,0
<i>Всего Total</i>	35	56,5	27	43,5	62	100,0	

тогенного микрометастазирования. Наибольшая частота обнаружения ДОК наблюдалась при IA- и IIA-стадиях и составила 60,7 и 58,3 % соответственно.

Далее нами проанализирована связь между размером первичной опухоли, количеством пораженных лимфоузлов и наличием ДОК в КМ (табл. 3). Подавляющее большинство ДОК-положительных случаев (71,4 %, 5 из 7) наблюдалось при стадии T1. При стадии T2 частота поражения КМ составляла 43,2 %. При больших размерах опухоли ДОК выявлялись реже: 36,4 и 28,6 % соответственно при стадиях T3 и T4 ( $p = 0,130$ ). Достоверной зависимости ДОК-статуса от размеров опухоли не выявлено.

В нашем исследовании в тех случаях, когда регионарные лимфатические узлы были интактны, в 46,4 % (13 из 28) образцов КМ обнаруживались ДОК. Поражение КМ при N1 наблюдалось у 42,1 % (8 из 19) больных, а при N2 и N3 – в 33,3 % (4 из 12) и 100 % (2 из 2) случаев соответственно, при этом отличия были статистически незначимы. Следует обратить внимание, что в исследовании преобладали больные с поражением лимфатических узлов (53 %).

Отдаленные метастазы (M1) в исследовании установлены в 6 случаях. Поражение КМ наблюдалось при этом у 50 % (3 из 6) больных. У этих пациентов количество выявленных опухолевых клеток составило в среднем 5 на 10 млн миелокариоцитов.

Оценка наличия ДОК в КМ в зависимости от гистологического вида опухоли обнаружила, что поражение КМ чаще наблюдалось при аденокарциноме

**Таблица 4.** Поражение костного мозга в зависимости от гистологического типа немелкоклеточного рака легких

Table 4. Bone marrow involvement depending on the histological type of non-small cell lung cancer

Гистологический вид опухоли Histological type of tumor	Диссеминированные опухолевые клетки Disseminated tumor cells				Всего Total	
	Отсутствуют Absent		Присутствуют Present			
	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%
Плоскоклеточный Squamous	17	63,0	10	37,0	27	100,0
Аденокарцинома Adenocarcinoma	18	54,5	15	45,5	33	100,0
<i>Всего</i> <i>Total</i>	35	58,3	25	41,7	60	100,0

(45,5 %) (табл. 4). При плоскоклеточном раке опухолевые клетки выявлены в 37 % образцов. Различия недостоверны:  $p = 0,501$ .

При анализе частоты поражения КМ в зависимости от степени дифференцировки опухоли установлена связь ( $p = 0,023$ ) с данным признаком (табл. 5). Как видно из таблицы, наибольшая частота выявления ДОК отмечена при высокодифференцированном раке (G1). При низкой дифференцировке ДОК выявлялись у 8 из 20 больных, что составило 40 %. Аналогичные данные получены в исследовании W. Sienel и соавт., в котором ДОК значительно чаще (32 %) выявлялись в КМ при более дифференцированных опухолях (G1–G2), чем при опухолях с низкой дифференцировкой (4 %) G3–G4,  $p = 0,03$  [21].

Таким образом, по результатам анализа взаимосвязи ДОК-статуса и морфологических характеристик опухоли оказалось, что поражение КМ преимущественно наблюдается при более дифференцированных опухолях. Последний факт весьма интересен и требует более глубокого изучения в большей когорте. Возможно, пациенты НМРЛ с подобными типами опухолей будут нуждаться в иной схеме терапии.

Согласно имеющимся данным об особенностях гранулоцито- и эритропоэза у онкологических больных, у которых выявлены ДОК, нами также проведена оценка показателей миелограмм больных НМРЛ в зависимости от наличия поражения КМ и от количества обнаруженных в нем опухолевых клеток. При анализе средних значений достоверных отличий в группах с наличием и отсутствием ДОК в КМ не выявлено. Однако обращает на себя внимание более низкая клеточность при поражении КМ. В исследо-

**Таблица 5.** Частота выявления диссеминированных опухолевых клеток в зависимости от степени дифференцировки опухоли

Table 5. Frequency of detection of disseminated tumor cells depending on the degree of tumor differentiation

Степень дифференцировки опухоли The degree of tumor differentiation	Диссеминированные опухолевые клетки Disseminated tumor cells				Всего Total	
	Отсутствуют Absent		Присутствуют Present			
	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%
Низкая G3 Low G3	12	60,0	8	40	20	100,0
Умеренная G2 Moderate G2	20	64,5	11	35,5	31	100,0
Высокая G1 High G1	0	0,0	4	100,0	4	100,0
<i>Всего</i> <i>Total</i>	32	60,4	23	39,6	55	100,0

вании Д.А. Рябчикова и соавт. при раке молочной железы показано, что при ДОК-положительном статусе содержание миелокариоцитов в 1,6 раза достоверно ниже, чем при отсутствии ДОК [6]. Также нельзя не отметить, что лейкоэритронормобластическое соотношение более высокое при наличии поражения КМ, хотя различия статистически незначимы. Подобный факт, но с достоверным отличием, отмечен в исследовании КМ при меланоме [7].

Изучив таблицы сопряженности признаков, мы отметили, что в группе больных НМРЛ, у которых имелось поражение КМ, только в 4 % случаев наблюдалось снижение суммы клеток гранулоцитарного ростка ( $p = 0,036$ ) по сравнению с группой без ДОК (12,5 %). Аналогичные результаты получены в исследовании по меланоме, но в большем количестве случаев [7]. Возможно, что выявленные закономерности касаются более поздних стадий, поскольку в нашем исследовании преобладали больные с ранними стадиями. Промиелоциты были снижены у 72 % больных НМРЛ при наличии ДОК, а при отсутствии – у 84,4 %. Снижение уровня миелоцитов наблюдалось лишь в 8 % случаев при поражении КМ против 18,8 %. У подавляющего большинства (68 %) больных, в КМ которых установлено наличие ДОК, был снижен индекс созревания гранулоцитов.

Что касается эритроидного ростка, то в 44 % ДОК-положительных случаев у больных НМРЛ отмечено снижение полихроматофильных форм по сравнению с ДОК-отрицательными (56,3 %). Уровень оксифильных нормобластов был повышен в 72 % образцов КМ, в котором присутствовали ДОК, а при отрицательных случаях – в 58,1 %. При этом

в 24 % ДОК-положительных случаев сумма клеток эритроцитарного ростка была снижена, а лейкоэритронормобластическое соотношение повышено более чем у половины больных: 14 (56 %) из 25.

Отдельно был проведен анализ показателей миелограмм в тех случаях, в которых ДОК выявлены на 1 млн миелокарицитов. Статистически значимых отличий при этом с ДОК-отрицательным статусом не установлено. Однако следует отметить, что клеточность у 3 (75 %) больных с поражением КМ была в норме, у всех наблюдалось повышение количества бластных клеток, миелоциты в 3 случаях были в норме. Повышение оксифильных форм отмечено у 3 (63,5 %) больных, повышение индекса созревания эритроцитов – у 75 % против 66 %. Лейкоэритронормобластическое соотношение в образцах с поражением КМ было повышено в 50 % случаев (против 60 %).

Резюмируя проведенный анализ наличия взаимосвязи гранулоцито- и эритроцитопозеза, следует отметить, что есть тенденция к перестройке костномозгового микроокружения ДОК, однако не все описанные наблюдения носили достоверный характер. Тем не менее полученные факты необходимо принять во внимание и подвергнуть дальнейшему изучению, поскольку в нашем исследовании преобладали большие НМРЛ ранних стадий и количество выявленных ДОК у большинства пациентов не превышало 10 на 20 млн миелокарицитов. Возможно, изменение в КМ ДОК происходит длительно и зависит также от количества ДОК и их активности. ДОК в КМ могут оставаться бездействующими, приобретая фенотип покоя, и, таким образом, не оказывать влияния на микроокружение. Уже изучены отдельные молекулярные генетические механизмы, обеспечивающие такой фенотип ДОК в КМ [23]. Кроме того, важно учитывать, что гетерогенность популяции ДОК также может определять степень изменений гемопоэза.

Данные об изменениях гемопоэза КМ, полученные в других исследованиях, несомненно, свидетельствуют о том, что миело- и эритропоэз участвуют в опу-

холевом процессе, и их перестройка вполне вероятно способствует длительной персистенции ДОК в КМ.

### Заключение

Идентификация ДОК и возможность их характеристики позволяют получить важную информацию о механизмах метастазирования, лучше понять изменения, лежащие в основе лекарственной устойчивости опухоли. С учетом растущей роли иммунотерапии НМРЛ анализ ДОК, их взаимодействие с иммунными клетками, местом генерации которых служит КМ, становятся предметом интенсивных исследований.

В данной работе установлена возможность детекции ДОК у больных НМРЛ. Выявление поражения КМ проводилось на основании отсутствия экспрессии общего лейкоцитарного антигена CD45 в сочетании с экспрессией ЕРСАМ или KL-1. Частота выявления ДОК у больных НМРЛ составила 43,5 %, что сопоставимо с результатами детекции ДОК при других опухолях. При этом она была выше на ранних стадиях опухолевого процесса. Данный факт свидетельствует, что процесс гематогенного микрометастазирования – раннее событие в опухолевой прогрессии НМРЛ. В отдельных случаях установлены четкие кластеры ДОК в КМ. При аденокарциноме частота выявления ДОК в КМ больных НМРЛ была выше. Установлена связь поражения КМ со степенью дифференцировки опухоли. Изложенные факты представляются интересными и требуют дальнейшего изучения с целью оценки прогностической значимости ДОК при НМРЛ и анализа выбора ресурсов иммунотерапии.

Доказанная взаимосвязь поражения КМ с неблагоприятным прогнозом при ряде опухолей, а именно с плохой общей и безрецидивной выживаемостью, нацеливает ученых на разработку стратегий, направленных на предотвращение активации и пролиферации ДОК. Таким образом, на сегодняшний день ДОК рассматриваются как перспективная мишень для лекарственной терапии и НМРЛ не является исключением.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. American Cancer Society. Cancer Fact and Figures. 2018.
2. Sai B., Xiang J. Disseminated tumor cells in bone marrow are the source of cancer relapse after therapy. *J Cell Mol Med* 2018;22:5776–86. DOI: 10.1111/jcmm.13867.
3. Pein M., Hongu T., Riedel A. et al. Metastasis-initiating cells induce and exploit a fibroblast niche to fuel malignant colonization of the lungs. *Nat Commun* 2020;11(1):1494. DOI: 10.1038/s41467-020-15188-x.
4. Маркина И.Г., Тупицын Н.Н., Михайлова И.Н., Демидов Л.В. Гематогенное метастазирование опухолей: ключевые моменты и эволюционирующие парадигмы. *Иммунология гемопоэза* 2018;6(1):109–32. [Markina I.G., Tupitsyn N.N., Mikhailova I.N., Demidov L.V. Hematogenous tumor metastasis: key points and evolving paradigms. *Immunologiya gemopoeza = Hematopoiesis Immunology* 2018;6(1):109–32. (In Russ.)].
5. Тупицын Н.Н. Костный мозг онкологического больного: стадирование опухолей, гемопоэз, иммунная система. *Иммунология гемопоэза* 2018;16(2):10–54. [Tupitsyn N.N. Bone marrow of a cancer patient: staging of tumors, hematopoiesis, immune system. *Immunologiya gemopoeza =*

- Hematopoiesis Immunology 2018;16(2):10–54. (In Russ.).
6. Рябчиков Д.А., Безнос О.А., Дудина И.А. и др. Диссеминированные опухолевые клетки у пациентов с люминальным раком молочной железы. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(1):53–7. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-53-57. [Ryabchikov D.A., Beznos O.A., Dudina I.A. et al. Disseminated tumor cells in patients with luminal breast cancer. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal 2018;17(1):53–7. (In Russ.).]
  7. Chernysheva O., Markina I., Demidov L. et al. Bone marrow involvement in melanoma. Potentials for detection of disseminated tumor cells and characterization of their subsets by flow cytometry. Cells 2019;8(6):627. DOI: 10.3390/cells8060627.
  8. Pantel K., Alix-Panabieres C. Bone marrow as a reservoir for disseminated tumor cells: a special source for liquid biopsy in cancer patients. Bonekey Rep 2014;3:584. DOI: 10.1038/bonekey.2014.79.
  9. Dasgupta A., Lim A.R., Ghajar C.M. Circulating and disseminated tumor cells: harbingers or initiators of metastasis? Mol Oncol 2017;11:40–61. DOI: 10.1002/1878-0261.12022.
  10. Zarrer J., Haider M.-T., Daniel J. et al. Pathological crosstalk between metastatic breast cancer cells and the bone microenvironment. Biomolecules 2020;10(2):337. DOI: 10.3390/biom10020337.
  11. Price T.T., Burness M.L., Sivan A. et al. Dormant breast cancer micrometastases reside in specific bone marrow niches that regulate their transit to and from bone. Sci Transl Med 2016;8(340):340ra73. DOI: 10.1126/scitranslmed.aad4059.
  12. Klein C.A. Parallel progression of primary tumours and metastases. Nat Rev Cancer 2009;9(4):302–12. DOI: 10.1038/nrc2627.
  13. Demeulemeester J., Kumar P., Møller E.K. et al. Tracing the origin of disseminated tumor cells in breast cancer using single-cell sequencing. Genome Biol 2016;17:250. DOI: 10.1186/s13059-016-1109-7.
  14. Foulds L. The natural history of cancer. J Chronic Dis 1958;8(1):2–37. DOI: 10.1016/0021-9681(58)90039-0.
  15. Тупицын Н.Н. Циркулирующие и диссеминированные раковые клетки при раке молочной железы и раке яичников. Онкогинекология 2013;(1):12–8. [Tupitsyn N.N. Circulating and disseminated tumor cells in breast cancer and ovarian cancer. Onkoginekologiya = Oncogynecology 2013;(1):12–8. (In Russ.).]
  16. Бесова Н.С., Обаревич Е.С., Давыдов М.М. и др. Прогностическое значение диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больных диссеминированным раком желудка до начала противоопухолевой терапии. Фарматека 2017;17(350):62–6. [Besova N.S., Obarevich E.S., Davydov M.M. et al. The prognostic value of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with disseminated gastric cancer before the start of antitumor therapy. Farmateka 2017;17(350):62–6. (In Russ.).]
  17. Mohme M., Riethdorf S., Pantel K. Circulating and disseminated tumour cells – mechanisms of immune surveillance and escape. Nat Rev Clin Oncol 2017;14(3):155–67. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.144.
  18. Ghajar C.M. Metastasis prevention by targeting the dormant niche. Nat Rev Cancer 2015;15(4):238–47. DOI: 10.1038/nrc3910.
  19. Nicolini A., Rossi G., Ferrari P., Carpi A. Minimal residual disease in advanced or metastatic solid cancers: the G0–G1 state and immunotherapy are key to unwinding cancer complexity. Semin Cancer Biol 2020;S1044–579X(20):30075–4. DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.03.009.
  20. Tupitsyn N.N., Mkrtychan V.A., Palladina A.D. et al. Bone marrow lymphocyte populations of innate immunity in breast cancer patients. GJMR-F 2020;20(2):20–2.
  21. Sielen W., Mecklenburg I., Dango S. et al. Detection of MAGE-A transcripts in bone marrow is an independent prognostic factor in operable non-small-cell lung cancer. Clin Cancer Res 2007;13(13):3840–7. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2507.
  22. Johnson R.W., Finger E.C., Olcina M.M. et al. Induction of LIFR confers a dormancy phenotype in breast cancer cells disseminated to the bone marrow. Nat Cell Biol 2016;18(10):1078–89. DOI: 10.1038/ncb3408.

#### Вклад авторов

С.В. Чулкова: написание текста рукописи, анализ данных;  
 Н.Н. Тупицын: дизайн исследования, анализ данных и рукописи;  
 П.В. Кононец, А.К. Алахвердиев: анализ рукописи;  
 Т.М. Джуманазаров: сбор материала, обзор публикаций, оформление рукописи;  
 А.Д. Палладина, О.А. Чернышева: получение и анализ данных; обзор публикаций;  
 О.П. Колбацкая, Н.А. Купрышина: анализ костного мозга, подготовка рукописи, перевод.

#### Authors' contributions

S.V. Chulkova: writing manuscript text, data analysis;  
 N.N. Tupitsyn: research design, data analysis and manuscript;  
 P.V. Kononetz, A.K. Allakhverdiev: manuscript analysis;  
 T.M. Djumanazarov: data collection, review of publications, manuscript design;  
 A.D. Palladina, O.A. Chernysheva: receiving and analyzing data, review of publications;  
 O.P. Kolbatskaya, N.A. Kupryshina: bone marrow analysis, manuscript preparation, translation.

#### ORCID авторов/ORCID of authors

С.В. Чулкова/S.V. Chulkova: <https://orcid.org/0000-0003-4412-5019>  
 Н.Н. Тупицын/N.N. Tupitsyn: <https://orcid.org/0000-0003-3966-128X>  
 Т.М. Джуманазаров/T.M. Djumanazarov: <https://orcid.org/0000-0001-5029-1406>  
 А.К. Алахвердиев/A.K. Allakhverdiev: <https://orcid.org/0000-0001-8378-2738>  
 О.П. Колбацкая/O.P. Kolbatskaya: <https://orcid.org/0000-0001-8493-9012>

**Конфликт интересов.** Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.  
**Financing.** The study was performed without external funding.

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики**

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

**Compliance with patient rights and principles of bioethics**

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 27.04.2020. Принята к публикации: 30.06.2020.  
Article submitted: 27.04.2020. Accepted for publication: 30.06.2020.