

ДЕТЕКЦИЯ ДИССЕМИНИРОВАННЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В КРОВИ, КОСТНОМ МОЗГЕ И ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Проф. В. И. СТАРИКОВ, А. С. ХОДАК

DETECTION OF DISSEMINATED TUMOR CELLS IN THE BLOOD, BONE MARROW AND LYMPH NODES USING MOLECULAR-BIOLOGICAL METHODS

V. I. STARIKOV, A. S. KHODAK

Харьковский государственный медицинский университет, Украина

Приведены результаты исследования отдельных опухолевых клеток в периферической крови, костном мозге и лимфатических узлах при раке основных локализаций с помощью молекулярно-биологических методов. Показано их прогностическое значение.

Ключевые слова: молекулярно-биологические методы, микрометастазы, изолированные опухолевые клетки, периферическая кровь, костный мозг, лимфатические узлы.

The findings of the research of some tumor cells in the peripheral blood, bone marrow and lymph nodes in frequent forms of cancer using molecular biological methods are reported. Their prognostic significance is shown.

Key words: molecular-biological methods, micrometastases, isolated tumor cells, peripheral blood, bone marrow, lymph nodes.

Результаты лечения онкологических больных при ряде локализаций продолжают оставаться неудовлетворительными. Несмотря на определенные успехи как в хирургической технике, так и в адъювантной лучевой и системной химиотерапии, продолжают расти показатели смертности, обусловленной развитием метастазов, которые часто длительное время остаются невыявленными.

Одной из главных причин неблагоприятного течения заболевания является раннее распространение опухолевых клеток в кровеносном русле. Однако пока основными прогностическими факторами остаются размеры первичной опухоли, число пораженных лимфатических узлов, степень дифференцировки опухоли.

Точность определения клинической стадии заболевания лимитирована. Современное диагностическое оборудование, даже такое как магнитный резонанс — имиджинг и компьютерная томография, позволяет установить наличие опухолевого узла диаметром более 3–5 мм, что соответствует примерно 10^8 раковых клеток. Поэтому в клинической практике определение отдельных раковых клеток или их комплексов еще невозможно. Это ухудшает установление стадии опухоли и приводит к неадекватной послеоперационной адъювантной терапии.

Факторы, определяющие продолжительность латентного периода от начала диссеминации опухолевых клеток до клинической манифестации метастазов, неясны. Но уже сегодня бесспорна клиническая значимость присутствия опухолевых

клеток в лимфатических узлах, кровяном русле и костном мозге. Установлено, что большинство осевших опухолевых клеток ко времени хирургического вмешательства не являются активно пролиферирующими. Метастазы в костный мозг встречаются при опухолях различной локализации, однако наиболее характерны для рака предстательной железы, молочной железы, легкого, поджелудочной железы.

При использовании рутинной гистологической техники клиническое значение исследования костного мозга невелико. Главная причина низкой диагностической ценности метода — его низкая чувствительность: окраска гематоксилин-эозином позволяет обнаружить 1 опухолевую клетку среди 100 нормальных клеток костного мозга.

Достижения молекулярной биологии сделали возможным распознавание единичных изолированных опухолевых клеток в биологических образцах, в частности в периферической крови и костном мозге. Для этого используют иммуноцитохимический метод, полимеразную цепную реакцию (ПЦР), проточную цитометрию, метод тканевых культур.

Методы иммуногистохимии и иммуноцитохимии основаны на выявлении в мазках и срезах костного мозга или лимфатических узлов с помощью моноклональных антител (МКА) антигенов, не характерных для гемопоэтической и лимфоидной тканей, но экспрессируемых клетками солидных опухолей. Первоначально использовали МКА к эпителиальному мембранному антигену

(анти-ЭМА), а затем широкое распространение получили моноклональные антитела к цитокератинам (ЦК).

Метод ПЦР базируется на обратнотранскрип-тазной полимеразной цепной реакции и предназначен для обнаружения в образце ткани заданной матричной РНК (мРНК). Исследование наличия раковых клеток в крови и костном мозге с помощью ПЦР заключается в поиске мРНК опухолевых антигенов (ЦК, ракового эмбрионального антигена — РЭА, простатического специфического антигена — ПСА), экспрессируемых опухолевыми клетками. Наряду с этим ПЦР позволяет определять гены, мутации которых специфичны для опухолевых клеток, например, гены *ERB B*, *p 53* и *k-ras*. При этом чувствительность ПЦР при выявлении опухолевых клеток составляет 1 на 1 млн нормальных клеток костного мозга, а «гнездная» ПЦР достигает чувствительности 1 на 20–25 млн клеток.

Для обнаружения опухолевых клеток методом проточной цитометрии взвесь клеток (крови, костного мозга) обрабатывают мечеными красителем антителами к опухолевым антигенам и пропускают через цитофлюориметр, который автоматически распознает и подсчитывает окрашенные клетки. Метод позволяет обнаружить 1 опухолевую клетку среди 10–100 тыс. нормальных клеток костного мозга.

При исследовании костного мозга методом клеточных культур в питательную среду помещают образцы, полученные при аспирационной биопсии. Нормальные клетки костного мозга в отсутствие привычного для них микроокружения не будут пролиферировать. Если же в среде сформируются вторичные колонии, то это будет свидетельствовать о наличии в костном мозге опухолевых клеток, способных к автономному росту.

Благодаря внедрению этих методов в лабораторную практику, в последние годы в печати появилось много сообщений об обнаружении в костном мозге больных раком изолированных опухолевых клеток. Этот термин предложен К. Pantel et al. [1] в 1995 г. вместо использовавшегося ранее термина «микрометастазы», причем подобная замена обоснована, так как первоначально «микрометастаз» обозначал кластер опухолевых клеток менее 2 мм, а новые методы позволяют обнаружить отдельные опухолевые клетки, а не их конгломераты.

Наибольшее число исследований по определению опухолевых клеток в крови и костном мозге проведено у больных раком молочной железы (РМЖ). В то же время значение определения опухолевых клеток в периферической крови больных РМЖ изучено недостаточно, хотя первые сообщения по этому вопросу появились более 20 лет назад. Для обнаружения циркулирующих эпителиальных клеток применяются два основных метода: иммуноцитологический и ПЦР.

По данным различных авторов, опухолевые

клетки в периферической крови определяются у больных метастатическим РМЖ чаще (до 71%), чем у больных местнораспространенным (N+) (до 36,2%) и ранним (N₀) РМЖ (до 30%) [2]. Y. Aerts [3] с помощью ПЦР определял солитарные эпителиальные клетки (ЦК 19) в периферической крови примерно у 30% больных РМЖ I–II стадии и более чем у 70% больных с IV стадией процесса.

Результаты одного из первых исследований, посвященных определению и характеристике циркулирующих в периферической крови опухолевых клеток с помощью проточной цитометрии, были опубликованы в 1998 г. [4]. В исследовании с помощью моноклональных антител к цитокератинам была исследована периферическая кровь 30 больных РМЖ и 13 здоровых добровольцев. Оказалось, что у больных контрольной группы количество эпителиальных клеток в периферической крови колебалось от 0 до 5 (в среднем 1,5–1,8), в группе больных РМЖ без метастазов в лимфоузлы среднее количество обнаруженных эпителиальных клеток составило 15,9–17,4, в группе с метастазами в лимфоузлы 47,4–52,3, а в группе больных с отдаленными метастазами — 122–140 клеток на 20 мл периферической крови. Другими словами, количество циркулирующих эпителиальных клеток статистически достоверно коррелировало с распространенностью заболевания. Имеются сообщения о том, что опухолевые клетки при РМЖ встречаются даже при раке *in situ* [5], в этом исследовании не было обнаружено корреляции между наличием злокачественных эпителиальных клеток в периферической крови и размером первичной опухоли, степенью сосудистой инвазии и вовлечением лимфатических узлов. По данным Н. А. Перадзе [6], присутствие опухолевых клеток эпителиальной природы в периферической крови не зависит от стадии РМЖ.

B. Smith et al. [7] оценивали количество циркулирующих эпителиальных клеток на фоне системной химиотерапии (CMF, FEC, такотер, тамоксифен, анастрозол) у больных диссеминированным РМЖ. Оказалось, что опухолевые клетки в периферической крови определяются более чем у половины больных распространенным РМЖ, и содержание их в периферической крови изменяется в зависимости от эффективности проводимой химио- или гормонотерапии. Это исследование показало, что солитарные эпителиальные клетки в периферической крови могут использоваться для мониторинга больных, получающих системную химиотерапию или гормонотерапию.

Отдельные опухолевые клетки в крови были выявлены и при других злокачественных новообразованиях, например, от 33,3 до 50% больных раком поджелудочной железы [8], от 15,8 до 40% при раке желудка, от 5,8 до 26,7% при раке прямой кишки [9]. Исследование наличия изолированных опухолевых клеток методом ПЦР в мокроте и периферической крови больных раком легкого

представлено в работе [10]. Во всех указанных источниках опухолевые клетки определялись в периферической крови при отсутствии отдаленных метастазов (M₀).

Большая часть исследований посвящена изучению наличия опухолевых клеток в КМ. Этот факт нельзя считать неожиданным, так как показано, что стромальные клетки костного мозга предотвращают апоптоз опухолевых клеток, усиливают их пролиферацию, модулируют дифференцировку, выделяя интерлейкины-3 и 6, и ростовые факторы (Г-КСФ; ГМ-КСФ, М-КСФ). Опухолевые клетки в свою очередь синтезируют интерлейкин-1β и фактор некроза опухоли α, индуцируя синтез стромальных цитокинов и, таким образом, замыкая петлю паракринной регуляции.

Считают, что большая часть опухолевых клеток в КМ имеет ограниченный пролиферативный потенциал, чем, возможно, и объясняется резистентность микрометастазов к адьювантной терапии. В эксперименте на животных моделях показано, что покоящееся состояние единичных опухолевых клеток в КМ обеспечивает первичная опухоль: при ее удалении опухолевые клетки начинают активно пролиферировать и развиваются до клинически определяемых метастазов.

Изучение КМ на наличие метастатических клеток РМЖ у 52 больных показало, что методом световой микроскопии при стандартном цитологическом исследовании метастазы были выявлены у 2 из 52 больных (3,85%), а с помощью иммуноцитологического метода — у 28 из 52 (53,8%). Отмечена прямая корреляция между частотой выявления метастазов и степенью распространенности опухоли от I к IV стадии (от 40 до 62,5%) [11].

Данные 20 исследований, проведенных у 2494 больных РМЖ, свидетельствуют о том, что частота выявления микрометастазов в КМ колеблется от 2 до 48% и в среднем составляет 35% [12]. При первом рецидиве метастазы в КМ с помощью стандартных диагностических процедур выявляются у 23% больных метастатическим РМЖ, причем этот показатель увеличивается до 80% после аутопсии [13].

Опухолевые клетки в КМ были выявлены методом иммуноцитохимии у 39,4% больных раком поджелудочной железы при отсутствии отдаленных метастазов (M₀). Пациенты, у которых выявлены опухолевые клетки в КМ, имели меньшую медиану выживаемости, чем больные, у которых опухолевые клетки не были обнаружены: медиана выживаемости составила 7,5 и 14 мес соответственно. У 36% больных с опухолевыми клетками в КМ развились отдаленные метастазы, которые были диагностированы инструментальными методами [5].

К. Pantel et al. [14] описали результаты исследования костного мозга на наличие метастазов у 82 больных немелкоклеточным раком легкого иммуногистохимическим методом с использованием МКА к ЦК-18, метастазы были диагностированы у 22% пациентов. Через 13 мес после операции

частота рецидива опухоли у больных этой группы составила 66,7%, а в контрольной группе 36,6%. Основываясь на данных статистического анализа, авторы установили, что изолированные опухолевые клетки являются независимым критерием прогноза при немелкоклеточном раке легкого.

В работах других авторов, посвященных иммуногистохимическому исследованию аспириатов КМ, была отмечена достоверная негативная прогностическая значимость наличия микрометастазов у оперированных больных с I–II стадиями рака в отношении безрецидивной выживаемости [15].

Обращает на себя внимание большой разброс данных о частоте микрометастазирования в КМ при раке легкого у различных авторов — от 21,9 до 59,7%, что, возможно, связано с разными методиками исследований и забора аспириатов КМ (от одного до четырех из подвздошной кости и/или ребер).

Имеются сообщения, указывающие на зависимость частоты обнаружения микрометастазов в КМ от гистологического варианта рака легкого. Так, при плоскоклеточном раке поражение КМ было отмечено у 20,9%, а при железистом — у 66,7% больных. На более поздних стадиях рака легкого частота поражения КМ увеличивалась [16]. На основании полученных результатов авторы делают вывод о том, что большое количество циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови больных является независимым фактором неблагоприятного прогноза.

Приведенные данные указывают на то, что обнаружение микрометастазов в костном мозге и периферической крови у больных РМЖ скорее всего свидетельствует о высокой злокачественности процесса и дает возможность выделить группу больных с высоким риском рецидива. Кроме того, состояние костного мозга и периферической крови может использоваться для мониторинга больных, получающих химиотерапию, с целью оценки ее эффективности.

С помощью молекулярно-биологических методов исследования в настоящее время определяют наличие отдельных опухолевых клеток не только в периферической крови и костном мозге, но и в удаленных лимфатических узлах. Как известно, метод световой микроскопии имеет свой предел и в большинстве наблюдений не позволяет обнаружить в препарате единичные опухолевые клетки. Поражение регионарных лимфатических узлов является независимым прогностическим фактором при ряде заболеваний. Гиподиагностика приводит к занижению стадии и выбору неадекватного лечения. Даже при увеличении числа исследованных срезов одного и того же лимфатического узла на 20–30% возрастает количество положительных ответов. Это диктует необходимость применения более чувствительных молекулярно-биологических методов диагностики.

В серии исследований с использованием иммуногистохимии и ПЦР установлено, что у 53–73%

больных имеются отдельные опухолевые клетки в гистологически туморнегативных лимфатических узлах [17]. Некоторые авторы сообщают также о клинической релевантности этих результатов в прогнозе выживаемости [18].

Проведено исследование метастазов в регионарные лимфатические узлы у 93 больных немелкоклеточным раком легкого, оперированных радикально. Исследован 471 медиастинальный лимфатический узел иммуногистохимически с использованием моноклональных антител Veg-Ep 4, которые распознают антиген 17-1A на поверхности эпителиальных клеток. Исследованные узлы ранее при световой микроскопии были расценены как интактные. Метастатические клетки в лимфатических узлах были выявлены у 20 из 73 больных (27%) с предварительным N₀ статусом. Метастазы были представлены в виде одиночных «рассеянных» опухолевых клеток, или маленьких кластеров, содержащих до 3 опухолевых клеток в синусах или лимфоидной ткани. Выживаемость больных с микрометастазами соответствовала выживаемости больных с pN₂ [19].

Аналогичные результаты были получены и в других исследованиях. В них было показано, что наличие метастазов является негативным прогностическим признаком в отношении общей и безрецидивной выживаемости, причем в основном за счет развития гематогенных метастазов [20].

Микрометастазы в лимфатических узлах обнаружены у 9,4% больных раком желудка с помощью традиционных гистологических методик, а при иммуноцитохимическом исследовании — у 17,6% пациентов. Авторы сделали вывод, что присутствие микрометастазов в лимфатических узлах является обязательным фактором, который нужно учитывать при определении прогноза у больных раком желудка [17]. J. Cai et al. [21] у 13% больных раком желудка в лимфатических узлах определили метастазы при окраске гематоксилином-эозином и у 34% — при иммуногистохимическом исследовании. Примечательно, что у 25% больных метастазы были выявлены в лимфатических узлах, в которых обычными методами раковые клетки обнаружены не были.

У больных РПЖ при использовании иммуноцитохимических и молекулярно-биологических методов также обнаруживали опухолевые клетки в лимфатических узлах в тех случаях, когда при обычном гистологическом исследовании их не выявляли. M. J. Demeure et al. [22] исследовали регионарные лимфатические узлы с учетом того факта, что в 90–95% случаев в клетках РПЖ

определяют мутацию кодона 12 K-ras. С помощью метода ПЦР, направленного на выявление мутированного онкогена K-ras, авторы обнаружили опухолевые клетки (по крайней мере, в одном из лимфатических узлов) у 73% больных РПЖ в стадии T1 — 2N₀M₀. На значение исследования лимфатических узлов с целью выявления метастазов указывают P. Magistrelli et al. [23] и G. Vepassai et al. [24], которые установили, что размер первичной опухоли и состояние лимфатических узлов при РПЖ являются более значимыми прогностическими факторами.

Было установлено, что наличие ЦК-положительных клеток в лимфатических узлах больных немелкоклеточным раком легкого в стадии I было независимым фактором неблагоприятного прогноза, а присутствие раковых клеток в КМ этих пациентов не имело статистически значимой связи с выживаемостью [20].

Таким образом, установление клинического значения отдельных опухолевых клеток является одной из важных проблем современной онкологии. Что означает присутствие микроскопических метастазов? В большинстве случаев оно определяет неблагоприятный прогноз, однако подобный ответ не является полным и тем более исчерпывающим, поскольку большинство одиночных метастатических клеток-эмболов не дают начало развитию истинных метастазов. Остается неясной природа взаимоотношений этих изолированных клеток с присущими им характеристиками с другими факторами, определяющими процессы рецидивирования или метастазирования. Вероятно, наличие единичных опухолевых клеток в лимфатических узлах уже является индикатором генерализации опухоли.

Приведенные данные литературы свидетельствуют о том, что современная классификация злокачественных опухолей по стадиям вряд ли может считаться оптимальной, так как она основана в большей степени на анатомии, чем на патофизиологии опухоли. По-видимому, существует необходимость внедрения в клиническую практику молекулярно-биологических методов исследования крови, КМ и лимфатических узлов, особенно на ранних стадиях развития заболевания, для уточнения степени распространенности опухолевого процесса.

В то же время молекулярно-биологические методы исследования крови, костного мозга и лимфатических узлов нуждаются в дальнейшем развитии, а сам феномен существования изолированных опухолевых клеток — в тщательном изучении.

Литература

1. Immunocytochemical detection of isolated tumor cells in bone marrow of patients with untreated stage prostatic cancer / K. Pantel, C. Aingherr, J. Kollermann et al. // Eur. J. Cancer.— 1995.— Sep; 31A (10):1627–32.
2. Molecular detection of Cytokeratin — 19 — Positive Cells in the Peripheral Blood of Patients With Operable Breast Cancer: Evaluation of Their Prognostic Significance / A. Stathopoulou, D. Vlachonikolis, D. Mavroudis et al. // J. Clin. Oncol.— 2002— 16:3404–12.

3. A real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reactions (RT-PCR) to detect breast carcinoma cells in peripheral blood / J. Aerts, W. Wynendaele, Paridaens et al. // *Annals of Oncology*. 2001; 12:39–46.
4. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood / E. Racila, D. Euhus, A. J. Weiss et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.—1998, April 14; 4589:45–94.
5. The detection of Micrometastasis in the Peripheral Blood and Bone Marrow of patients with Breast Cancer Using Immunohistochemistry and reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction for Keratin 19 / A. Schoenfeld, K. N. Kruger, J. Gomm et al. // *Eur. J. Cancer*.— 1999; 33 (b).
6. *Перадзе Н. А.* Бесцитоканова мобілізація стовлових гемопоетических кліток у больних раком молочної залози: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Москва, 2004.— 18 с.
7. Response of Circulating Tumor Cells to Systemic Therapy in Patients With Metastatic Breast Cancer: Comparison of Quantative Polimerase. Chain Reaction and Immunocytochemical Techniques / B. M. Smith, M. J. Slade, J. English et al. // *J. Clin. Oncol*.— 2000; 7:1432–9.
8. *Осинский Д. С.* Комплексне лікування хворих на поширений нерезектабельний рак підшлункової залози із застосуванням внутрішньо-артеріальної хіміотерапії та променевої терапії: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Киев, 2004.— 20 с.
9. Detection of cancer cells in mesenteric vein and peripheral vessels by measuring telomerase activity in patients with colorectal cancer / H. Nozawa, T. Watanabe, T. Ohnishi et al. // *Surgery*.— 2003; 134:791–798.
10. Sensitive detection of rare cancer cells in sputum and peripheral blood samples of patients with lung cancer by preoprogprspecific RT-PCR / J. Lacroix, H. D. Becker, S. M. Woerner et al. // *Int. J. Cancer*.— 2001; 92:1–8.
11. *Крохина О. В., Летяги В. П., Тулицин Н. Н.* Рак молочной железы. Микрометастазы в костный мозг // *Вестн. РОНЦ им. Н. Н. Блохина*.— 2002.— № 3.— С. 15–20.
12. *Funke I., Schaut W.* Meta-Analyses of Studies on Bone Marrow Micrometastases: An Independent Prognostic Impact Remains to Be Substantiated // *J. Clin. Oncol*.— 1998.— Vol. 16.— P. 557–566.
13. *Литвиненко О. О., Шалімов С. О., Калюта О. М.* Роль вивчення показників кісткомозкового кровотворення у хворих на рак молочної залози // *Укр. мед. альманах*.— 2005.— Т. 8, № 3 (додаток).— С. 65–66.
14. Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer / K. Pantel, J. R. Izbicki, M. Angstwurm et al. // *Cancer Res*.— 1993.— Vol. 53.— P. 1027–1031.
15. Detection of occult bone marrow micrometastases in patients with operable lung carcinoma / R. J. Cote, E. J. Beattie, B. Chaiwun et al. // *Ann. Surg*.— 1995.— Vol. 222.— P. 415–423.
16. Трепанобиопсия костного мозга у больних немелкоклеточным раком легкого / Х. С. Усманов, В. А. Тарасов, Ю. К. Шаров и др. // *Матер. IX российского онкологического конгресса*.— Москва, 2005.— С. 174.
17. Prognostic significance of immunohistochemical micrometastases in node negative gastric cancer patients / L. E. Harrison, J. K. Choe, M. Goldstein et al. // *J. Surg. Oncol*.— 2000; 73:153–7.
18. Prognostic implications of routine, immunohistochemical, and molecular staging in respectable pancreatic adenocarcinoma / M. Niedergethman, M. Rexin, R. Hildenbrand et al. // *Am. J. Surg. Pathol*.— 2002; 26:1578–87.
19. Mode of spread in the early phase of lymphatic metastasis in non-small cell lung cancer: significance of nodal micrometastasis / J. R. Izbicki, B. Passlick, S. B. Hosch et al. // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*.— 1996.— Vol. 112.— P. 623–630.
20. Prognostic impact of micrometastatic tumor cells in the lymph nodes and the bone marrow of patients with completely resected stage I non-small lung cancer / T. Osaki, T. Oyama, C. D. Gu et al. // *J. Clin. Oncol*.— 2002; 20:2930–2936.
21. Micrometastasis in lymph nodes of mucosal gastric cancer / J. Cai, M. Ikeguchi, S. Tsujitani et al. // *Gastric Cancer*.— 2000; 3:91–96.
22. Adenocarcinoma of the Pancreas: Detection of occult metastases in regional lymph nodes by a polymerase chain reaction-based assay / M. J. Demeure, K. M. Doffek, R. A. Komorowski, S. D. Wilson // *Cancer*.— 1998; 83:1328–1334.
23. Prognostic factors after surgical resection for pancreatic carcinoma / P. Magistrelli, A. Antinoli, A. Crucitti et al. // *J. Surg. Oncol*.— 2000; 74:36–40.
24. Factors influencing survival after resection for ductal adenocarcinoma of the head of the pancreas / G. Benassai, M. Mastroilli, G. Quarto et al. // *J. Surg. Oncol*.— 2000; 74:212–218.

Поступила 27.03.2007.