

ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА

ISSN 1818-4820

УДК 616.—006

Периодическое научное издание. Выходит дважды в год

Основан в 2006 году

2/2007, Том 4

Учредитель: ГУ РОНЦ имени Н.Н.Блохина РАМН
(лаборатория иммунологии гемопоэза)

ПОЧЕТНЫЙ РЕДАКТОР

ПРОФЕССОР Б.БРАНДТ (ГАМБУРГ, ГЕРМАНИЯ)

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР Н.Н.ТУПИЦЫН

Ответственный секретарь А.В. Моженкова

Редакционная коллегия:

З.Г. Кадагидзе (зам. главного редактора)

Е.Г. Турнянская (Москва)

Е.В. Артамонова (Москва)

Ж. Брошь (Франция)

Дж. Вижденес (Франция)

Л.Ю. Гривцова (Москва)

Дж. Джаносси (Великобритания)

И.С. Долгополов (Москва)

Т.Н. Заботина (Москва)

А.М. Ковригина (Москва)

А.М. Копылов (Москва)

Л.В. Мазурок (Курган)

А.А. Михайлова (Москва)

Д.Ш. Османов (Москва)

А.И. Павловская (Москва)

С.В. Петров (Казань)

Б.В. Пинегин (Москва)

А.В. Попа (Москва)

Н.А. Пробатова (Москва)

Р.М. Рамазанова (Казakhstan)

И.Н. Серебрякова (Москва)

Г.С. Тумян (Москва)

С.А. Тюляндин (Москва)

А.В. Филатов (Москва)

М.А. Френкель (Москва)

С.А. Шинкарев (Липецк)

Е.Н. Шолохова (Москва)

А.А. Ярилин (Москва)

Адрес редакции: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24
Тел./факс 324-90-69
E-mail: imhaemo_hi@ronc.ru, www.ronc.ru/imhaemo_hi

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору за соблюдением законодательства в сфере массовых коммуникаций и охране культурного наследия.

Свидетельство ПИ № ФС 77-23551 от 06.03.2006

Свидетельство Эл № ФС 77-24174 от 19.04.2006

Подписной индекс № 36915

Отпечатано в типографии ООО «Диджитал»

Тираж 1000 экз.

При перепечатке материалов ссылка на «Иммунологию гемопоэза» обязательна

HÆMATOPOÏESIS IMMUNOLOGY

ISSN 1818-4820

UDK 616.—006

Semi-annual scientific oncoimmunological periodicals

Founded in 2006

2/2007, Vol. 4

Founder: State N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center affiliated to the Russian Academy of Medical Sciences, Russian Federation (Hæmatopoïesis Immunology Laboratory)

HONORARY EDITOR

PROF. B. BRANDT (HAMBURG, GERMANY)

EDITOR-IN-CHIEF N.N.TUPITSYN

Executive secretary A.V. Mozhenkova

Editorial Board:

Z.G. Kadagidze (Deputy Editor-in-Chief)

E.G. Turnianskaia (Moscow)

E.V. Artamonova (Moscow)

J. Brochie (France)

G. Wijdenes (France)

L.U. Grivtzova (Moscow)

G. Janossy (UK)

I.S. Dolgoplov (Moscow)

T.N. Zabolina (Moscow)

A. M. Kovrigina (Moscow)

A.M. Kopilov (Moscow)

L.V. Mazurok (Kurgan)

A.A. Mikhailova (Moscow)

D.Ch. Osmanov (Moscow)

A.I. Pavlovskaja (Moscow)

S. V. Petrov (Kazan)

B.V. Pinegin (Moscow)

A.V. Popa (Moscow)

N.A. Probatova (Moscow)

R.M. Ramzanova (Kazakhstan)

I.N. Serebriakova (Moscow)

G.S. Tumian (Moscow)

S.A. Tuliandin (Moscow)

A.V. Filatov (Moscow)

M.A. Frenkel (Moscow)

S.A. Shinkarev (Lipetz)

E.N. Sholokhova (Moscow)

A.A. Iarilin (Moscow)

Address of Editorial Office: 24, Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478. Tel/fax 324-90-69
E-mail: imhaemo_hi@ronc.ru, www.ronc.ru/imhaemo_hi

The journal is registered at the Federal Agency of Press and Mass-media of Russian Federation.

License № ФС 77-23551 от 06.03.2006

License № ФС 77-24174 от 19.04.2006

Zip-code № 36915

Published in Limited company "Digital"

Printed 1000 copies

No reproduction is permitted without reference to Journal Hæmatopoïesis immunology

СОДЕРЖАНИЕ

Юбилейный номер 5

*Н.Н. Тупицын***Гематогенно диссеминированный операбельный рак ранних стадий — одна из главных проблем онкологии (от редактора)6***Алперс И., Брандт Б***Минимальное остаточное заболевание у больных раком14***В.В. Родионов, С.В. Петров***Проблемы костномозгового метастазирования у больных раком молочной железы38***В.А. Спиридонова, С.И. Бессонов, Н.Н. Тупицын, Д.А. Широков, А.М. Копылов***ПЕРСПЕКТИВЫ АНТИЦИТОКИНОТЕРАПИИ. Получение РНК-аптамера к интерлейкину 6 человека методом SELEX . . .54***О.Б. Бжадуг, С.А. Тюляндин, Л.Ю. Гривцова, Молденхауэр Г., Брошь Ж., Н.Н. Тупицын***Клиническое значение определения циркулирующих опухолевых клеток в крови больных распространенным раком молочной железы72***Фогт У., Брандт Б., Криг Р.***INDIVICON — подход к стандартизованной индивидуализированной комплементарной онкологии102***О.В. Крохина***Иммуноцитологическая диагностика микрометастазов рака молочной железы в костный мозг116***М.П. Никулин***Минимальная резидуальная болезнь при раке желудка132**

Журнал издан при финансовой поддержке представительства Becton Dickinson в России, Шеринг-Байер (Москва), ассоциации "ИНДИВИКОН"

CONTENTS

Jubilee number 5

*N.N. Tupitsyn***Hematogenously disseminating operable cancer as a principal problem of oncology. Immunological tumor staging7***Alpers I., Brandt B.***Minimal residual disease in cancer of solid tumors15***V.V. Rodionov, S.V. Petrov***Problems of bone marrow metastases in breast cancer patients39***V.A. Spiridonova, S.I. Bessonov, N.N. Tupitsyn, D.A. Shirokov, A.M. Kopylov***THE PROSPECTS FOR ANTICYTOKINOTHERAPY. Isolation of RNA-aptamer to human interleukin-6 by SELEX technique55***O.V. Bzhadug, S.A. Tjuliandin, L. Yu. Grivtsova, Moldenhauer G., Brochier J., N.N. Tupitsyn***The prognostic value of circulating tumor cells in blood of patients with advanced breast cancer73***Vogt U., Brandt B., Krieg R.***INDIVICON, an Approach to "High-Quality" Individualized Complementary Oncology103***O.V. Krokhina***Immunocytological diagnosis of micrometastatic bone marrow involvement in patients with breast cancer117**

This journal is sponsored by Becton Dickinson-Russia, Schering Bayer-Moscow, INDIVICON association

INHALTSVERZEICHNIS

Die Jubiläumszeitschrift 150*N.N. Tupizin (Vom Redakteur)***Hämotogen disseminiertes operierbares Karzinom früherer Stadien als eines der wichtigsten Onkologieprobleme.****Immunologische Stadiumfeststellung von Tumoren 151***Iris Alpers und Prof. Dr. Burkhard Brandt***Minimale residuale Erkrankung (MRD) bei soliden Tumoren 156***V.V. Radionov, S.V. Petrov***Das Problem von Knochenmarkmetastasen bei Patientinnen mit Brustkrebs (Mammakarzinom) 169***W.A. Spiridonowa, S. Bessonow, N.N. Tupizin, D.A. Schirokow,**A.M. Kopilow***Perspektiven der antizytokintherapie 178***O.B. Bjadug, C.A. Tuljandin, L.U. Grivzova, G. Moldenhauer, J. Brochie,**N.N. Tupizin***Die klinische Bedeutung der Bestimmung von den zirkulierenden Tumorzellen bei den Patienten mit dem disseminierten Mammakarzinom . . 190***U. Vogt, B. Brandt, R. Krieg***IINDIVICON, ein Ansatz zur qualifizierten individualisierten komplementären Onkologie 208***O.W. Krochina, W.P. Letjagin, N.N. Tupizin, W.N. Blindar, W.D. Ermilowa***Immunozytologische Diagnostik der Mammakarzinommetastasen ins Knochenmark 217**

Die Zeitschrift wurde mit finanzieller Unterstützung der Vertretung der Fa. Becton Dickinson in Russland, Schering-Bayer (Moskau), Assoziation IINDIVIKON herausgegeben

Юбилейный журнал, посвященный 60-летию академика М.И.Давыдова. Мы постарались сконцентрироваться на актуальной проблеме онкологии — минимальной остаточной болезни при раке. Журнал подготовлен совместно с нашими немецкими коллегами, и профессор Б.Брандт (Гамбург, Германия) любезно согласился быть почетным редактором номера. Статьи отражают тематику докладов 4-й Российской с международным участием конференции «Иммунология гемопоэза», состоявшейся 6 июня 2007 г. В соответствии с пожеланием наших немецких коллег журнал впервые выходит на 3 языках — русском, английском и немецком.

Надеемся, что представленные статьи послужат мощным стимулом к дальнейшему развитию перспективного направления клинической онкологии — иммунологическому стадированию рака.

Главный редактор журнала «Иммунология гемопоэза»

Зав. лабораторией иммунологии гемопоэза

ГУ Российского онкологического научного центра

имени Н.Н.Блохина РАМН

доктор медицинских наук,

профессор Н.Н.Тупицын

A jubilee issue of our journal is devoted to the 60th birthday of academician M. I. Davydov. We have tried to focus on an important problem of oncology, that is minimal residual disease in cancer patients. The issue was prepared in cooperation with our German colleagues and professor B. Brandt (Hamburg, Germany) kindly consented to be a honorary editor of this issue. The presentations included in the issue reflect problems of the 4th Russian conference on hemopoiesis immunology with international participation held on June 6, 2007. In accordance with the request of our German colleagues this issue is published in three languages: Russian, English and German.

Hope that these presentations will be a strong stimulus to further advance in immunological cancer staging that is a prominent field of clinical oncology.

*N. N. Tupitsyn, M. D., Professor
Editor-in-chief, The Haematopoiesis Immunology*

Head, Hematopoiesis Immunology Laboratory

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS

От редактора
Н.Н. Тупицын

ГЕМАТОГЕННО ДИССЕМНИРОВАННЫЙ ОПЕРАБЕЛЬНЫЙ РАК РАННИХ СТАДИЙ — ОДНА ИЗ ГЛАВНЫХ ПРОБЛЕМ ОНКОЛОГИИ. ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ СТАДИРОВАНИЕ ОПУХОЛЕЙ

ГУ РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН, Москва

РЕЗЮМЕ

Диагностика гематогенного распространения эпителиальных опухолей на ранних стадиях — одна из главных проблем онкологии. Для ее решения необходима стандартизация исследований костного мозга и количественной оценки единичных изолированных метастатических клеток. В статье приводится алгоритм исследования костного мозга на наличие микрометастазов рака, позволяющий стандартизовать количественную оценку и избежать разбавления периферической крови. Мембранную гиперэкспрессию HER2/neu на клетках рака молочной железы возможно изучать люминисцентным и проточно-цитометрическим методами.

Ключевые слова: микрометастазы, костный мозг, стандартизация.

Злокачественные эпителиальные опухоли уже на самых ранних операбельных стадиях у 20–40% больных являются гематогенно диссеминированными [7].

Хирургическое удаление опухоли с лимфодиссекцией достигло апогея. Идеология и техника выполнения радикальных операций при опухолях различной локализации блестяще развиты академиком М.И.Давыдовым — школа М.И.Давыдова. Результатом явилось резкое сокращение рецидивов рака.

Однако проблема возобновления опухолевого роста у «радикально прооперированных» больных далека от своего разрешения. Собственно, ее до сих пор никто и не сформулировал как проблему. А она лежит на поверхности, и очевидность ее является обезоруживающей — процесс возобновляется из злокачественных клеток, мигрировавших до операции из первичной опухоли (пусть даже очень малого размера) с током крови в костный мозг. Эти клетки могут находиться в покоящемся «дремлющем» состоянии (dormant cells) и активизироваться, давать метастатический рост спустя годы и десятилетия после радикальной операции.

Опухолевые отсевы в костном мозге могут выглядеть как единичные разрознен-

Editorial
N.N. Tupitsyn

HEMATOGENOUSLY DISSEMINATING OPERABLE CANCER AS A PRINCIPAL PROBLEM OF ONCOLOGY. IMMUNOLOGICAL TUMOR STAGING

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

ABSTRACT

Detection of hematogeneous spread of epithelial tumors at early disease stage is an important problem of oncology. Solution of this problem involves standardization of bone marrow investigations and quantification of single isolated metastatic cells. The paper describes an algorithm for detection of micrometastatic involvement of bone marrow that helps to standardize quantification techniques and to avoid specimen dilution with peripheral blood. Luminescence and flow cytometry may be used to detect membrane Her2/neu overexpression on breast cancer cells.

Key words: micrometastasis, bone marrow, standardization.

Epithelial cancer is characterized by hematogenous dissemination already at earliest operable stages in 20 to 40% of cases [7].

Surgical tumor removal with lymph node dissection is at its zenith. Ideology and technique of radical surgery for tumors of various sites were developed magnificently by M.I. Davydov and his followers. This effort resulted in a marked reduction in cancer recurrence.

However the problem of continuing tumor growth in patients undergoing 'radical surgery' is far from being solved. Indeed, it was not even formulated as a problem so far. But it is obvious: the disease starts again from malignant cells migrating from the primary tumor (even if very small) by circulation into bone marrow before surgery. These cells may be dormant to become activated and to give rise to metastatic growth several years or even several tens of years after radical surgery.

Tumor deposits in bone marrow may look like single, isolated (solitary) cells or like cell clusters or micrometastases. These cells are also found in peripheral blood and are referred to as 'circulating tumor cells'. Such individual, single tumor cells cannot be

ные, изолированные (солитарные) клетки или их группы — микрометастазы¹. Эти клетки выявляются также в периферической крови — циркулирующие опухолевые клетки. Морфологически единичные разрозненные опухолевые клетки не определяются — требуется применение высокочувствительных иммунологических методов.

Химио- и гормонотерапия не достаточно эффективны в уничтожении изолированных диссеминированных опухолевых клеток. Иммунотерапия (герцептин) является методом выбора в Her2/neu-позитивных случаях. В целом методы эрадикации микрометастазов рака отсутствуют. Создание эффективных программ и препаратов избирательного действия (иммунологических) для устранения разрозненных диссеминированных опухолевых клеток должно быть сформулировано как одна из наиболее приоритетных задач онкологии.

Для того чтобы контролировать эффективность воздействия лекарственных средств на микрометастазы нужно, в первую очередь, стандартизовать методы количественной оценки единичных диссеминированных опухолевых клеток. Речь идет об иммунологическом стадировании рака.

Для стандартизации используют «привязку» к числу лейкоцитов либо к объему крови, в котором выявляется определенное количество опухолевых клеток, что детально освещено в статьях профессора Б. Брандта (иммуноцитология) и О.Б.Бжадуг с соавторами (проточная цитометрия) в этом номере журнала.

Я выскажу лишь некоторые соображения по поводу стандартизации исследований костного мозга, так как в данном вопросе в литературе полная неразбериха.

Алгоритм исследования костного мозга на предмет обнаружения единичных изолированных опухолевых клеток таков.

1. Забор минимального объема костного мозга (не более 0,5 мл). Убедительно доказано, что при взятии более 0,2 мл костного мозга может иметь место разбавление образца периферической кровью [8]. Технически взять 0,2 мл довольно сложно, поэтому мы рекомендуем взятие 0,5 мл (рис. 1). В литературе приводятся данные о взятии, как правило, значительно больших объемов костного мозга [4], что неизбежно связано с разбавлением периферической кровью. В случаях разбавления костного мозга кровью, судить о том, обнаружены опухолевые клетки в крови или костном мозге не представляется возможным.

2. Подсчет клеточности костного мозга и приготовление стандартных мазков костного мозга для анализа миелограммы. На основании состава миелограммы и клеточности образца делается заключение об отсутствии разбавления костного мозга периферической кровью. В статьях подобные сведения, как правило, отсутствуют.

3. Лизирование эритроцитов или выделение мононуклеарной фракции клеток костного мозга в градиенте плотности фикола.

4. Приготовление цитоцентрифужных препаратов (0,5–1 млн клеток на препарат), рис. 2. В случаях фракционирования клеток проводится повторный подсчет

detected by morphological tests, and highly sensitive immunological approaches are therefore needed.

Chemo- and hormonotherapy are not effective enough to kill isolated disseminating tumor cells. Immunotherapy (Herceptin) is the method of choice in HER2/neu-positive cases. There are no techniques to eradicate cancer micrometastases yet. Development of effective and selective (immunological) regimens and agents targeted at individual disseminating tumor cells should be established a top priority problem of oncology.

Standardization of quantification techniques for single disseminating tumor cells is needed first of all to control micrometastatic response to anticancer agents. It is the question of immunological cancer staging.

The standardization involves detection of a certain number of tumor cells in relation to WBC count or blood volume as described in detail in presentations by B. Brandt (immunocytology) and O. B. Bzhadug et al. (flow cytometry) in this issue.

Below are some of my considerations on standardization of investigations on bone marrow specimens presented in an attempt to clarify the absolute mess on this question in the literature.

Algorithm for investigation of bone marrow to detect single, isolated tumor cells is as follows.

1. Harvest a minimal bone marrow sample (not more than 0.5 ml). Harvesting more than 0.2 ml bone marrow was proven associated with peripheral blood dilution [8]. It is rather difficult technically to take 0.2 ml, so our recommendation is to take 0.5 ml (pic. 1). Reported data are usually based on study of much greater bone marrow specimens [4] which is always associated with dilution by peripheral blood. In this case one cannot know whether the detected tumor cells are derived from blood or from bone marrow.

2. Count bone marrow cellularity and prepare standard bone marrow smears for myelogram analysis. Make conclusion about whether the bone marrow specimen is not diluted with peripheral blood basing on myelogram composition and specimen cellularity. There are generally no such data in publications.

3. Lyse red blood cells or isolate mononuclear fraction of bone marrow cells in ficoll density gradient.

4. Prepare centrifuge specimens (0.5 to 1 million cells per specimen) (pic. 2). In case of cell fractionation recount myelogram by cytological specimens to assess mononuclear fraction enrichment (this is needed to present data in relation to initial myelokaryocyte concentration).

5. Perform immunological staining of cytospecimens with monoclonal antibodies (MAB) to epithelial antigens. It is important to use those MAB that do not react with bone marrow-derived hemopoietic cells. For this reason MAB to EMA (epithelial membrane antigen), DF-3 and I15D8 are not suitable [5]. We use MAB KL-1 and CAM5.2. Both luminescent [6] and enzyme immunostaining can be used to visualize tumor cells. We pre-

¹ Для удобства изложения термин «микрометастазы» будет использован в данной статье и применительно к разрозненным единичным опухолевым клеткам.

¹ Here the term 'micrometastasis' also implies single tumor cells for simplicity.

миелограммы по цитопрепаратам с целью установления степени обогащения мононуклеарной фракции (это необходимо для представления данных в расчете на исходную концентрацию миелокариоцитов).

5. Иммунологическое окрашивание цитопрепаратов моноклональными антителами (МКА) к эпителиальным антигенам. Важно использовать антитела, не реагирующие с гемопоэтическими клетками костного мозга. По этой причине МКА к ЕМА (эпителиальный мембранный антиген), DF-3 и 115D8 для выявления микрометастазов не подходят [5]. Мы используем МКА KL-1 и САМ5.2. Для визуализации опухолевых клеток, связавшихся с антителами, приемлемо как люминисцентное [6], так и иммуноферментное окрашивание. Мы отдаем предпочтение люминисцентному окрашиванию с использованием прямых конъюгатов МКА с FITC, так как в случаях использования иммунопероксидазного окрашивания есть сложности с полным блокированием эндогенной миелопероксидазы гемопоэтических клеток, а при использовании щелочнофосфатного метода возможна неспецифическая реакция плазмоцитов с щелочной фосфатазой [2].

6. Подсчет числа опухолевых клеток среди 1–10 млн миелокариоцитов костного мозга. Подсчет должен осуществляться квалифицированным морфологом.

Применение данного метода позволило получить интересные результаты, касающиеся взаимосвязи обнаружения микрометастазов в костный мозг со стадией рака молочной железы, рецепторным статусом опухоли, состоянием гемопоэтической ткани костного мозга [1], статья О.В.Крохиной в настоящем номере.

Одним из главных вопросов, связанных с тактикой лечения микрометастазов, является определение экспрессии (гиперэкспрессии) Her2/neu метастатическими клетками [3]. Особое значение для последующей терапии имеет установление мембранной экспрессии рецептора.

С этой целью мы флуоресцентно метили лекарственное средство трастузумаб и оценили реакцию с клетками рака молочной железы на свежемороженых срезах и в проточной цитометрии (рис. 3, на 3 странице обложки).

Результаты флуоресцентного окрашивания полностью совпадают с данным иммуногистохимии. Что же касается возможности выявления гиперэкспрессии Her2/neu на изолированных метастатических клетках в костном мозге методом проточной цитометрии, то для окончательного заключения на этот счет потребуются дополнительные исследования и накопление материала.

Литература/References:

1. Крохина О.В., Летьгин В.П., Тулицын Н.Н. и др. Иммуноморфологическая диагностика микрометастазов рака молочной железы в костный мозг. Маммология. — 2005. — №1. — С. 70-73.
Krokhina O.V., Letyagin V.P., Tupitsyn N.N. et al. Immunomorphological diagnostics of bone marrow breast cancer micrometastases //Mammologia. — 2005. — N1. — P. 70-73
2. Borgen E., Beiske K., Trachsel S. et al. Immunocytochemical detection of isolated epithelial cells in bone marrow: non-specific staining and contribution by plasma cells directly reactive to alkaline phosphatase. J. Pathol. — 1998. — V.185, N4. — P. 427-434.

fer luminescent staining with direct MAB-FITC conjugates because immunoperoxidase staining may render difficult full block of endogenous hemopoietic cell myeloperoxidase, while the use of alkaline phosphatase may be associated with non-specific plasmocyte reactivity with alkaline phosphatase [2].

6. Count the number of tumor cells per 1 to 10 million myelokaryocytes. The count should be made by an experienced morphologist.

This method resulted in interesting findings concerning relationship between micrometastatic bone marrow involvement and breast cancer stage, tumor receptor status, status of bone marrow hemopoietic tissue [1] (see O. V. Krokhina's presentation in this issue).

Measurement of Her2/neu expression (overexpression) on metastatic cells is an important problem in micrometastasis treatment policy [3]. Measurement of membrane receptor expression is of much importance for further treatment.

To investigate this problem we labeled trastuzumab with fluorescence to assess its reaction with breast cancer cells on fresh frozen sections and by flow cytometry (fig. 3 on cover page 3). Fluorescence staining results were absolutely the same as immunohistochemical findings. Further study and more data are needed to make a final decision on the possibility of detecting Her2/neu expression (overexpression) on individual metastatic cells in bone marrow by flow cytometry.

3. Braun S., Schlimok G., Heumos I. et al. erbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. Cancer Research. — 2001. — V.61. — P. 1890-1895.

4. Naume B., Wiedswang G., Borgen E. et al. The prognostic value of isolated tumor cells in bone marrow in breast cancer patients: evaluation of morphological categories and the number of clinically significant cells. Clin. Cancer Research. — 2004. — V.10. — P. 3091-3097.

5. Okumura A., Tajima T. Immunohistochemical detection of tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients. Japanese Journal of clinical oncology. — 1998. — V.28, N8. — P. 480-485.

6. Osborne M.P., Asina S., Wong G.Y. et al. Immunofluorescent monoclonal antibody detection of breast cancer in bone marrow: sensitivity in model system. Cancer Research. — 1989. — V.49. — P. 2510-2513.

7. Pantel K., Muller V., Auer M. et al. Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer. Clinical Cancer Research. — 2003. — V. 9. — P. 6326-6334.

8. Rego E.M., Garcia A.B., Viana S.R., Falcao R.P. Age-related changes of lymphocyte subsets in normal bone marrow biopsies. Cytometry. — 1998. — V.34, N1. — P. 22-29.



Рис. 1. Пробирки Vacutainer (BD, USA), обработанные ЭДТА, с образцами костного мозга. Адекватное количество образца в пробирках №№ 2, 3 (счет слева направо).

Pic 1. EDTA-treated Vacutainer (BD, USA) tubes with bone marrow specimens. Adequate specimen quantity in tubes Nos. 2, 3 (from left to right).

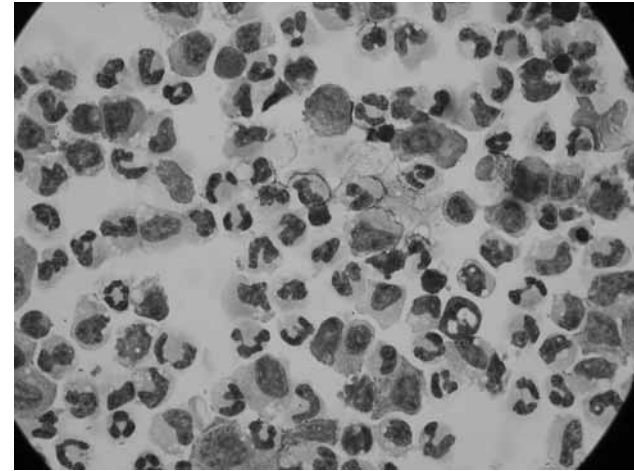


Рис. 2. Цитоцентрифужные препараты костного мозга. Полиморфный костный мозг.
Pic 2. Cytocentrifuge bone marrow specimens. Polymorphous bone marrow.

МИНИМАЛЬНОЕ ОСТАТОЧНОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ (МОЗ) У БОЛЬНЫХ РАКОМ

Институт биологии опухолей,
Медицинский центр Университета Гамбурга-Эппендорфа, Германия

Содержание

1. Введение
2. Прогностическое значение кластеров HER2-положительных циркулирующих опухолевых клеток в крови больных РМЖ
3. Частое выявление и иммунофенотипирование кластеров клеток предстательной железы в периферической крови больных раком предстательной железы
4. Циркулирующие опухолевые клетки из отдаленных, даже небольших очагов отражают асинхронный рост опухоли предстательной железы
5. Выявление циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови больных метастатическим раком молочной железы при помощи полуавтоматической системы CellSearch.

Ключевые слова: циркулирующие опухолевые клетки, рак молочной железы, рак предстательной железы, LOH, система CellSearch.

I. ВВЕДЕНИЕ

Гематогенное распространение опухолевых клеток, в частности при раке молочной железы (РМЖ) и раке предстательной железы является ранним, высокоизбирательным, неслучайным процессом, в основном обусловленным экспрессией аберрантного гена. Микрметастатические клетки присутствуют в костном мозге (КМ) или периферической крови (ПК) у 20–90% больных даже при отсутствии какого-либо поражения лимфоузлов или клинических признаков метастазов. Эти клетки могут быть устойчивыми к адьювантной химиотерапии и способны существовать в латентном состоянии в течение многих лет, после чего они образуют метастазы, определяемые в костях и других вторичных органах. Мы выделяли клетки эпителиального происхождения из ПК патентованным методом градиента плавучей плотности и иммуномагнитной сепарации и проводили иммуноцитохимический анализ.

а) Прогностическое значение HER2-положительных циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в ПК изучали у больных РМЖ, которые находились под наблюдением в течение длительного времени. Примерно у 50% больных без макрометастазов выявлено от 1 до 8 кластеров ЦОК в ПК. В качестве положительного конт-

MINIMAL RESIDUAL DISEASE (MRD) IN CANCER OF SOLID TUMORS

Institute of Tumor Biology,
University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Contents

1. Introduction
2. The prognostic value of clustered blood-borne HER2-positive circulating tumor cells in breast cancer
3. Frequent detection and immunophenotyping of prostate-derived cell clusters in the peripheral blood of prostate cancer patients
4. Asynchronous Growth of Prostate Cancer is Reflected by Circulating Tumor Cells Delivered from Distinct, even Small Foci
5. Detection of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Patients with Metastatic Breast Cancer by the semi-automated CellSearch® System.

Key words: CTC, Breast cancer, prostatic cancer, LOH, CellSearch system.

I. INTRODUCTION

Hematogeneous spread of cancer cells, esp. of breast and prostate cancer appears to be an early and highly selective, non-random process mainly characterized by aberrant gene expression. Micrometastatic cells are present in bone marrow (BM) or peripheral blood (PB) of 20-90% of the patients even in the absence of any lymph node involvement or clinical signs of overt metastases. These cells can survive adjuvant chemotherapy and persist for many years in a state of "latent dormancy" before they may eventually form overt metastases in bone and other secondary organs. For this purpose we isolated cells of epithelial origin in the PB by the patented combined buoyant density gradient and immuno-magnetic separation procedure and analyzed by immunocytochemistry.

a) The prognostic value of blood-borne HER2-positive circulating tumor cells (CTC) in PB was evaluated for breast cancer patients with a long-term follow-up. One to 8 CTCs in the peripheral blood of approx. 50% of pts. presenting no overt metastasis. As a positive control 100% pts. with metastatic disease presented positive. Healthy persons and patients operated for non-malignant diseases presented negative for CTCs. The presence and frequency of HER2-positive CTCs correlated with a significantly decreased disease-free sur-

роля использовали пробы больных метастатическим РМЖ, которые были положительными в 100% случаев. Анализ крови здоровых доноров и пациентов, оперированных по поводу незлокачественных заболеваний, дал отрицательный результат. Наличие и частота HER2-положительных ЦОК коррелировали с достоверным снижением безрецидивной выживаемости (БРВ; $p < 0,005$) и общей выживаемости (ОВ; $p < 0,05$). Интересно отметить, что у 12 больных с HER2-положительными ЦОК первичная опухоль была HER2-отрицательной по данным иммунохимического анализа и анализа методом FISH. Это исследование указывает на прогностическое значение HER2-положительных ЦОК у больных РМЖ I-III стадий. Необходимо продолжить исследования, чтобы оценить эффективность терапии, направленной на HER2-положительные клетки, в зависимости от уровней HER2-положительных ЦОК, поскольку существует вероятность, что высокие уровни HER2-положительных ЦОК отражают активность опухоли и могут служить прогностическим фактором эффективности трастузумаба.

б) Мы также выделяли PSA-положительные ЦОК из ПК у 98% больных раком предстательной железы. Эти клетки были охарактеризованы методами окрашивания на ДНК и иммуноцитохимического анализа с использованием антител для выявления специфического антигена предстательной железы (PSA), белков пролиферации (Mib-1, H1 и H3) и апоптоза (M30, c-FasR). Иммунофенотипирование и морфологическое исследование кластеров PSA-положительных клеток, происходящих из предстательной железы, в ПК больных раком предстательной железы позволило выявить две основные популяции: (1) у 35% больных раком предстательной железы выявлялись кластеры предположительно раковых клеток округлой формы, которые экспрессировали белки пролиферации, но не экспрессировали белки апоптоза; (2) во всех случаях с высокой частотой выявлялись циркулирующие кластеры клеток с измененной морфологией и экспрессией белков апоптоза.

Мы определили генетический профиль клеток из всех очагов мультифокального рака предстательной железы методом мультиплексного ПЦП-анализа на микросателлиты (D7S522, D8S522, NEFL, D10S541, D13S153, D16S400, D16S402, D16S422, D17S855). В 85% случаев рака предстательной железы ЦОК имели профиль LOH, идентичный всего одному очагу первичной опухоли. Более того, картина LOH указывала на возможность выделения ЦОК более мелкими очагами до 0,2 см³. Интересно отметить, что максимальное число LOH отмечалось на маркере D10S541 (85%), гене PTEN, который присутствовал с меньшей частотой при монофокальном раке предстательной железы (48%). Достаточно высокая частота LOH в гене BRCA1 (38%) главным образом выявлялась в тех случаях, когда в пределах 3 лет после простатэктомии развивался биохимический рецидив заболевания. Таким образом, полученные результаты дают основание считать, что ЦОК при раке предстательной железы происходят из определенных очагов первичной опухоли. Размер опухолевого очага не коррелирует с количеством клеток. Несмотря на небольшое число больных в проведенном исследовании, можно сделать предположение, что LOH на таких разных маркерах, как D10S541 и D17S855, представляет гены PTEN и BRCA1, которые могут ассоциироваться с присутствием ЦОК в ПК боль-

вival (DFS; $p < 0,005$) and overall survival (OS; $p < 0,05$). Interestingly, in 12 patients with HER2-positive CTCs the primary tumor was negative for HER2 as assessed by immunohistochemical score and FISH. For stage I-III breast cancer this study provides some evidence of a prognostic impact of HER2-positive CTCs. Future studies have to determine the outcome of patients treated with HER2-targeting therapies with respect to HER2-positive CTC-levels since it is not unlikely that high levels of HER2-positive CTCs reflect the activity of the tumor and may predict response to trastuzumab.

b) Furthermore, we isolated PSA-positive cCTCs from PB in 98% of prostate cancer pts.. Isolated cells were characterized by DNA staining and immunocytochemistry using antibodies for the detection of prostate-specific antigen (PSA), proliferation- (Mib-1, H1 and H3) and apoptosis-associated (M30, c-FasR) proteins. Immunophenotypical and morphological characterisation of PSA-positive prostate-derived cell clusters found in the peripheral blood of prostate cancer patients indicate two main populations: (1) In 35% of investigated prostate cancer patients we detected round shaped cell aggregates of probable cancer cells, expressing proliferation associated proteins, and lacking apoptosis-associated protein expression; (2) in all cases a high frequency of circulating dysmorphic cell clusters positive for apoptosis-associated protein expression was found.

Each foci from multifocal prostate cancer were profiled genetically using a multiplex PCR-based microsatellite analysis (D7S522, D8S522, NEFL, D10S541, D13S153, D16S400, D16S402, D16S422 and D17S855). In 85% of prostate cancer cases the LOH pattern of the CTCs was identical with only one focus of the primary tumor. Moreover, the LOH pattern suggested that smaller foci, down to 0.2 cm³, might deliver CTCs. Interestingly, the highest number of LOHs was observed at the marker D10S541 (85%), the PTEN gene, which was observed much less frequently in unifocal prostate cancer (48%). Furthermore, the infrequently occurring LOH in the BRCA1 gene (38%) was found mainly in cases where a biochemical recurrence was seen within 3 years after a prostatectomy. Therefore, the data might support the assumption that CTCs in prostate cancer are derived from distinct foci of a primary tumor. The size of the tumor focus is not related to the delivery of cells. Although the number of cases that were investigated in this study was small it might be suggested that the LOH at distinct markers such as D10S541 and D17S855 represent the genes PTEN and BRCA1 that might be associated with the occurrence of CTCs in the peripheral blood of patients as well as an early biochemical recurrence.

In summary, the molecular characterization of CTCs in the PB of pts. suffering from solid tumors bears the potential to become specific cancer diagnostics for therapy prediction.

II. The prognostic value of clustered blood-borne HER2-positive circulating tumor cells in breast cancer

In 1998, our group first reported isolation of circulating HER2-positive clustered tumor cells (cCTC) from the peripheral blood of breast cancer patients with organ-confined tumors by means of a combined buoyant density gradient and immuno-mag-

ных, а также с ранним биохимическим рецидивом.

Таким образом, молекулярная характеристика ЦОК в ПК больных с солидными опухолями может стать еще одним методом специфической диагностики с целью прогноза течения болезни.

II. Прогностическое значение кластеров HER2-положительных циркулирующих опухолевых клеток в крови больных РМЖ

В 1998 г. наша группа впервые опубликовала сообщение о выделении кластеров HER2-положительных циркулирующих опухолевых клеток (кЦОК) из периферической крови больных РМЖ методом разделения в комбинированном градиенте плавучей плотности и иммуномагнитной сепарации [1]. На основании наличия диссеминированных эпителиальных клеток с гиперэкспрессией HER2 в костном мозге у больных РМЖ с отдаленными метастазами на время постановки диагноза [2] была выдвинута гипотеза о том, что ЦОК, экспрессирующие HER2-онкогенный рецептор в период первичного лечения, могут служить посредниками процесса метастазирования. Эта гипотеза позже была подтверждена связью между наличием микрометастазов в костном мозге и HER2-положительными клетками.

Кластеры HER2-положительных циркулирующих опухолевых клеток (кЦОК) выявлялись в ПК примерно у 50% больных с I–III стадиями заболевания. В кЦОК-положительных пробах в среднем выявляли 4 (от 1 до 8) кластера на пробу. Кластеры содержали от 2 до 30 клеток. В таблице 1 представлена частота HER2-положительных кЦОК на одну пробу. В качестве положительного контроля использовали образцы крови больных первичным метастатическим раком (IV стадия), все из которых имели HER-положительные кЦОК. Отрицательным контролем служили образцы крови, полученные у доноров без онкологических заболеваний: все они не содержали HER2-положительных кЦОК.

Связь определения HER2-позитивных ЦОК со стадией, степенью злокачественности, рецепторами гормонов и иммуногистохимическим статусом

Показана статистически достоверная связь наличия HER-положительных кЦОК с большим размером опухоли (показатель pT), отрицательным статусом РЭ, более низкой степенью дифференцировки и инвазией лимфатических сосудов. Показано также наличие HER2-положительных кЦОК в крови у всех больных отечно-инфильтративной карциномой и первичной стадией M+. Не выявлено статистически значимых корреляций со статусом лимфоузлов (показатель pN), статусом РП и скоростью пролиферации (Ki-67). При этом мы обнаружили достоверное несоответствие между выявлением HER2-положительных кЦОК и статусом HER2 соответствующей первичной опухоли: у 12 больных с HER2-положительными кЦОК первичная опухоль имела отрицательный статус HER2, т.е. число HER2-положительных клеток в первичной опухоли было менее 10%. Также не выявлено связи между наличием HER2-положительных кЦОК и экспрессией РЭФР, мутацией p53 и экспрессией bcl-2.

netic separation technique [1]. Against the background that breast cancer patients with distant metastasis at diagnosis had disseminated HER2-overexpressing epithelial cells in the bone marrow [2], the hypothesis was generated that at the time of primary treatment circulating tumor cells expressing the HER2-oncogenic receptor might be intermediates for the metastasis process. This assumption is further supported by the association between bone marrow micrometastases and the occurrence of HER2-positive cells.

Predominantly, HER2-positive circulating clustered tumor cells (cCTC) were detected in the peripheral blood of approx. 50% of stage I–III patients. In samples positive for cCTCs, the mean number of clusters per sample was 4 (range 1–8). The clusters contained 2 to 30 cells. Tab. 1 presents the frequency of HER2-positive cCTCs detected per sample. As positive controls all patients suffering from primary metastasis cancer (stage IV) presented with HER2-positive cCTCs. For negative control blood from persons not suffering from cancer was investigated without the detection of HER2-pos. cCTCs.

Table 1

Identification and number of c-erbB2-positive circulating tumor cells (single vs. clustered CTCs)

Single c-erbB2-positive CTCs	Number per sample	Patients n (%)
	0	26 (74.3%)
	1	3 (8.6%)
	2	3 (8.6%)
	3	1 (2.9%)
	4	2 (5.7%)
	No	26 (74.3%)
	Yes	9 (26.5%)
Clustered c-erbB2-positive CTCs	Number per sample	Patients n (%)
	0	18 (51.4%)
	1	4 (11.4%)
	2	2 (5.7%)
	3	3 (8.6%)
	4	3 (8.6%)
	7	1 (2.9%)
	8	4 (11.4%)
	0	18 (51.4%)
	1–4	12 (34.3%)
	≥5	5 (14.3%)
	No	18 (51.4%)
	Yes	17 (48.6%)

Таблица 1
Идентификация и число c-erbB2-положительных циркулирующих опухолевых клеток (отдельные ЦОК и кластеры ЦОК)

	Число на одну пробу	Число больных (%)
	Отдельные c-erbB2-положительные ЦОК	0
1		3 (8,6%)
2		3 (8,6%)
3		1 (2,9%)
4		2 (5,7%)
Нет		26 (74,3%)
Есть		9 (26,5%)
	Число на одну пробу	Число больных (%)
	Кластеры c-erbB2-положительных ЦОК	0
1		4 (11,4%)
2		2 (5,7%)
3		3 (8,6%)
4		3 (8,6%)
7		1 (2,9%)
8		4 (11,4%)
0		18 (51,4%)
1-4		12 (34,3%)
≥5		5 (14,3%)
Нет	18 (51,4%)	
Есть	17 (48,6%)	

Выявление циркулирующих опухолевых клеток в активной фазе клеточного цикла

Циркулирующие опухолевые клетки больных с положительным результатом анализа на HER2-положительные кЦОК дополнительно исследовали методом иммуногистохимического окрашивания с использованием моноклонального антитела к Ki-67 для определения активной фазы клеточного цикла. Присутствие Ki-67 определяли при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа, как показано на рис. 1. В пробах двух больных выявлялись отдельные Ki-67-положительные HER2-положительные клетки, однако в кластерах такие клетки не встречались. На основании этого наблюдения можно сделать вывод, что в периферической крови больных могут присутствовать HER2-положительные клетки в активной фазе, однако это довольно редкое явление.

Связь между наличием HER2-положительных кЦОК и выживаемостью

Показана достоверная корреляция наличия и числа HER2-положительных кЦОК или обоих факторов со снижением безрецидивной и общей выживаемости. Результаты анализа выживаемости в зависимости от HER2-положительных кЦОК показаны в табл. 2; на рис. 2 приводятся соответствующие кривые Каплана—Мейера.

Наличие HER2-положительных кЦОК также достоверно коррелировало с частотой метастазирования в отдаленные органы и смертью, связанной с онкологиче-

Relationship of the detection of HER2-positive CTCs to staging, grading, hormone receptors and immunohistochemical status

HER2-positive cCTCs have been associated with larger tumor size (pT stage), negative ER status, worse histological differentiation, and lymphovascular invasion, significantly. Furthermore, in the blood of all patients with an inflammatory carcinoma and the patients staged primarily M+ HER2-positive cCTCs were found. There was no significant correlation with lymph node status (pN stage), PR status or proliferation rate (Ki-67). However, we observed a significant discrepancy between the detection of HER2-positive cCTCs and the HER2 status of the corresponding primary tumor: in 12 patients with HER2-positive cCTCs the primary tumor showed a negative score for HER2 indicating that the amount of Her2 positive cells in the primary tumor fall below 10%. We observed no correlations between HER2-positive cCTCs and EGFR expression, p53 mutation, and bcl-2 expression.

Detection of circulating tumor cells in the active phase of the cell cycle

Circulating tumor cells of the Her2-positive cCTC patients were additionally stained immunocytochemically with Ki-67 monoclonal antibody to define an active cell cycle phase. The presence of Ki-67 was visualized by confocal laser scanning microscopy as shown in figure 1. Ki-67 positive Her-2-positive single cells were detected in separations from two patients but no clustered cells. From this it could be stated that there are Her2-positive cells in the active phase of the cell cycle in the peripheral blood of the patients but it could be assumed to be a rare event.

Association between presence of HER2-positive cCTCs and survival

A significant correlation between the presence and frequency of HER2-positive cCTCs and both, a decreased disease-free and overall survival, was observed. Results on survival analysis with respect to HER2-positive cCTCs are summarized in tab. 2; pic. 2 shows the corresponding Kaplan-Meier curves.

Table 2

Survival with respect to presence of circulating c-erbB2-positive tumor cells

c-erbB2-positive CTCs		DFS months (95% CI)	<i>P</i> ^a	OS months (95% CI)	<i>P</i> ^a
Single cells	No	112 ± 9 (94;130)	0.018	117 ± 8 (100;133)	0.032
	Yes	46 ± 14 (19;74)			
Clustered cells	No	124 ± 7 (110;139)	0.007	125 ± 7 (110;139)	0.024
	Yes	60 ± 11 (38;83)			
	0	124 ± 7 (110;139)	0.003	125 ± 7 (110;139)	0.021
	1-4	72 ± 13 (46;97)			
	≥ 5	32 ± 16 (1;62)			

^a log-rank test.

Таблица 2

Выживаемость в зависимости от циркулирующих с *erbB2*-положительных опухолевых клеток

с- <i>erbB2</i> -положительные ЦОК		БРВ, мес (95% ДИ)	<i>p</i> ^a	ОВ, мес (95% ДИ)	<i>p</i> ^a
Отдельные клетки	Нет	112+9 (94;130)	0,018	117+8 (100;133)	0,032
	Есть	46+14 (19;74)		78+22 (36;121)	
Кластеры клеток	Нет	124+7 (110;139)	0,007	125+7 (110;139)	0,024
	Есть	60+11 (38;83)		89+15 (60;117)	
	0	124+7 (110;139)	0,003	125+7 (110;139)	0,021
	1-4	72+13 (46;97)		80+12 (57;103)	
≥5	32+16 (1;62)	61+29 (4;118)			

^a лог-ранговый критерий

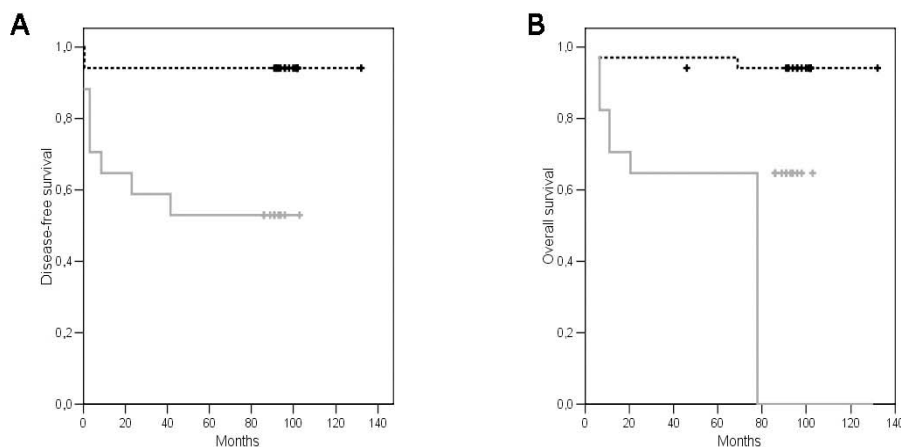


Рис.2. Кривые выживаемости больных первичным РМЖ. Кривые построены по методу Каплана-Мейера для безрецидивной (БРВ) и общей выживаемости (ОВ) в зависимости от наличия и частоты циркулирующих HER2-положительных опухолевых клеток в периферической крови. Черной пунктирной линией представлена выживаемость больных, в крови которых не выявлены HER2-положительные опухолевые клетки. Серой линией представлена выживаемость больных с циркулирующими HER2-положительными опухолевыми клетками.

Рис. 2: Survival curves of patients with primary breast cancer. Kaplan-Meier estimates for disease-free (DFS) and overall survival (OS) with respect to presence and frequency of circulating HER2-positive tumor cells in the peripheral blood. The black dashed line represent patients in whom no HER2-positive tumor cell was detected. The grey curve shows survival of patients with circulating HER2-positive tumor cells

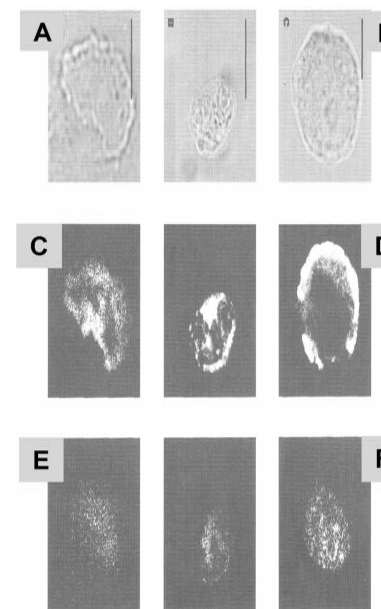


Рис. 1. Анализ кЦОК из крови пациентов (слева) и SKBR3-клеток (справа) с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа. Показаны изображения с пропусканием света (А, В), а также HER2 (С, D) и Ki-67 (Е, F). Используемые в качестве положительного контроля ЦОК и SKBR3 имели сходные картины экспрессии ядерного белка пролиферации Ki-67. Размер вертикальных линий 10 мкм.

Рис. 1. Confocal laser scanning microscopy analysis of CTCs from a patient's blood (left) and SKBR3 cells (right). Transmission light images (A, B), as well as Her2 (C, D) and Ki-67 (E, F) are shown. CTC and SKBR3 as a positive control showed similar expression patterns of nuclear proliferation protein Ki-67. The bars represent 10 μm.

Accordingly, detection of HER2-positive cCTCs correlated significantly with the incidence of distant metastasis and tumor-related death. In particular, HER2-positive cCTCs have been detected in the blood samples of all four patients who subsequently developed bone metastases. To evaluate the independent prognostic value of HER2-positive cCTCs for DFS and OS multivariate survival analysis was performed. Presence of HER2-positive CTCs (yes vs. no), pT stage (pT1-2 vs pT3-4), lymph node status (pN0 vs. pN+), histologic grading (G1 vs. G2-3), ER- and PR-status (positive vs. negative) were entered as covariates. Only tumor size (pT) was an independent prognostic marker (p=0.004). Presence of HER2-positive CTCs almost reached statistical significance (p=0.060).

The presence of HER2-positive cCTCs in patients with non-metastatic breast cancer might be a specific indicator of occult metastasis. In view of a hematogenous metastatic tumor cell spread, prognostic markers are needed which differentiate breast cancer

ским заболеванием. Так, HER2-положительные кЦОК присутствовали в крови всех четырех больных, у которых впоследствии развились метастазы в кости. Для определения независимой прогностической роли HER2-положительных кЦОК в отношении БРВ и ОВ проведен многофакторный анализ выживаемости. В качестве связанных переменных использовали наличие HER2-положительных ЦОК (есть/нет), значение показателя pT (pT1-2/pT3-4), статус лимфоузлов (pN0/pN+), гистологическую стадию (G1/G2-3), статус РЭ и РП (пол./отр.). Единственным независимым прогностическим маркером оказался размер опухоли (pT). Наличие HER2-положительных ЦОК практически вплотную подошло к уровню статистической достоверности ($p=0,060$).

Наличие HER2-положительных ЦОК у больных РМЖ без метастазов может быть специфическим индикатором микрометастазов. Учитывая гематогенный характер метастатического распространения опухоли, необходимо вести поиск прогностических маркеров для стратификации больных РМЖ по группам риска и назначения терапии в зависимости от индивидуальной степени риска для конкретной больной. кЦОК могут служить суррогатным маркером наличия микрометастазов еще до того, как метастазы достигнут степени, угрожающей жизни. Также, наличие диссеминированных опухолевых клеток (ДОК) в костном мозге после адьювантной терапии может отражать неблагоприятный исход системного лечения [3-5]. Однако, частый забор костного мозга для анализа на скрытые опухолевые клетки представляет значительное неудобство, и больные РМЖ, которые в других отношениях здоровы, могут не согласиться на частое проведение аспирации. Тогда как забор периферической крови — более простая процедура и больше подходит для долгосрочных исследований. Наш метод обладает высокой чувствительностью в отношении HER2-положительных кЦОК не только у пациентов с метастатическим процессом, но и заболеванием I и II стадий, когда эти клетки отражают невыявленное распространение опухоли, что позволяет использовать их в качестве суррогатного маркера для прогноза течения заболевания [6; 7]. Кроме того, выявление HER2-положительных ЦОК может влиять на выбор метода лечения, что подтверждается сообщениями о том, что ЦОК отражают эффект системной терапии [8]. Прогностическое и предсказательное значение кЦОК также подтверждается тем, что для их характеристики, например, методом иммуногистохимического анализа, используется общепринятый прогностический маркер — экспрессия HER2.

Оценку экспрессии HER2 методом иммуногистохимического анализа в опухоли молочной железы применяют для назначения терапии гуманизированными моноклональными антителами, такими как трастузумаб, которая достоверно повышает безрецидивную и общую выживаемость [9; 10]. Однако в настоящее время определение экспрессии HER2 по анализу ткани является разовой процедурой, тогда как выявление HER2-положительных кЦОК позволяет проводить оценку статуса HER2 в режиме реального времени на протяжении всего клинического течения болезни. Мы обнаружили достоверное несоответствие между наличием HER2-положительных кЦОК и статусом HER2 соответствующей первичной опухоли: у 12 больных

patients for individually-based risk-adapted therapy. cCTCs might represent a surrogate marker for micrometastatic disease before a metastasis becomes life threatening. Also, the presence of disseminated tumor cells in bone marrow (DTC) after adjuvant treatment may reflect an adverse outcome of the systemic treatment [3-5]. However, since frequent bone-marrow aspirations for the search of occult tumor cells is uncomfortable and may not easily be accepted by otherwise healthy breast cancer patients, sampling peripheral blood may be more suitable, in particular for longitudinal studies. Since our technique detects HER2-positive cCTCs highly sensitive not only in patients with metastatic disease, but also in those with stage I and II cancer, these cells might represent an undetected spread of the tumor and serve as surrogate markers for prognosis estimates [6; 7]. Furthermore, the detection of HER2-positive cCTCs might influence treatment decisions which are in accordance with reports indicating CTCs to reflect the outcome of systemic treatment [8]. Besides, the characterization of the cCTCs using e.g. immunocytochemistry for an established prognostic marker such as HER2 expression underlines their conceivable prognostic and predictive importance.

The HER2 immunohistochemical score of breast carcinomas is used to guide therapy decisions for the application of humanized monoclonal antibodies such as Trastuzumab leading to a significantly improved disease-free and overall survival [9; 10]. However, to date, determination of the HER2 score by tissue testing is an one-time event. The detection of HER2-positive cCTCs might serve to enable a "real-time" assessment of the HER2 status during the clinical course of disease. We observed a discrepancy between the detection of HER2-positive cCTCs and the HER2 score of the corresponding primary tumor: in 12 patients with HER2-positive cCTCs the primary tumor presented with a score less than +3 and/or no detection of amplification by FISH. It has also been reported that a significant percentage of patients with HER2-negative primary tumors develop high concentrations of serum HER2 during tumor progression supporting the possibility that HER2 gene amplification can be acquired during progression of the cancer [11]. The data give support for the detection of circulating HER2-positive tumor cells by this new method to assess and to monitor the "real-time HER2 status" and to detect early evidence of occult metastatic disease.

References

1. Brandt B, Roetger A, Heidl S, Jackisch C, Lelle RJ, Assmann G, Zanker KS. Isolation of blood-borne epithelium-derived c-erbB-2 oncoprotein-positive clustered cells from the peripheral blood of breast cancer patients. *Int J Cancer* 1998;76:824-8.
2. Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmuller G. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:1419-24.
3. Lambrechts AC, van Veer LJ, Rodenhuis S. The detection of minimal numbers of contaminating epithelial tumor cells in blood or bone marrow: Use, limitations and future of RNA-based methods. *Ann Oncol* 1998; 9:1269-76.
4. Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:1113-24.

с HER2-положительными КЦОК первичная опухоль имела иммуногистохимическую оценку экспрессии HER2 ниже +3 и/или в опухоли не выявлялась амплификация гена методом FISH. Имеются сообщения о том, что у значительного процента больных с HER2-отрицательными первичными опухолями в процессе прогрессирования заболевания в сыворотке определяются высокие уровни HER2, что подтверждает возможность появления генной амплификации в процессе прогрессирования раковой опухоли [11]. Эти данные свидетельствуют в пользу выявления циркулирующих HER2-положительных опухолевых клеток нашим новым методом для оценки и мониторинга статуса HER2 в режиме реального времени и выявления ранних признаков микрометастазов.

Литература

1. Brandt B, Roetger A, Heidl S, Jackisch C, Lelle RJ, Assmann G, Zanker KS. Isolation of blood-borne epithelium-derived c-erbB-2 oncoprotein-positive clustered cells from the peripheral blood of breast cancer patients. *Int J Cancer* 1998;76:824-8.
2. Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmuller G. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:1419-24.
3. Lambrechts AC, van Veer LJ, Rodenhuis S. The detection of minimal numbers of contaminating epithelial tumor cells in blood or bone marrow: Use, limitations and future of RNA-based methods. *Ann Oncol* 1998; 9:1269-76.
4. Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:1113-24.
5. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Qvist H, Janbu J, Kvalheim G, Nesland JM, Naume B. Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2004;10:5342-8.
6. Terstappen LW, Rao C, Gross S, Weiss AJ. Peripheral blood tumor cell load reflects the clinical activity of the disease in patients with carcinoma of the breast. *Int J Oncol* 2000;17:573-8.
7. Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis Ch, Apostolaki S, Malamos N, Kakolyris S, Kotsakis A, Xenidis N, Reppa D, Georgoulas V. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol* 2002;20:3404-12.
8. Smith BM, Slade MJ, English J, Graham H, Luchtenborg M, Sinnott HD, Cross NC, Coombes RC. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol* 2000;18:1432-9.
9. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-92.
10. Scientific Symposium at the ASCO Annual Meeting 2005: Advances in Monoclonal Antibody Therapy for Breast Cancer.
11. Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S, Beitsch P, Khan A, Euhus D, Osborne C, Frenkel E, Hoover S, Leitch M, Clifford E, Vitetta E, Morrison L, Herlyn D, Terstappen LW, Fleming

5. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Qvist H, Janbu J, Kvalheim G, Nesland JM, Naume B. Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2004;10:5342-8.
6. Terstappen LW, Rao C, Gross S, Weiss AJ. Peripheral blood tumor cell load reflects the clinical activity of the disease in patients with carcinoma of the breast. *Int J Oncol* 2000;17:573-8.
7. Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis Ch, Apostolaki S, Malamos N, Kakolyris S, Kotsakis A, Xenidis N, Reppa D, Georgoulas V. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol* 2002;20:3404-12.
8. Smith BM, Slade MJ, English J, Graham H, Luchtenborg M, Sinnott HD, Cross NC, Coombes RC. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol* 2000;18:1432-9.
9. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-92.
10. Scientific Symposium at the ASCO Annual Meeting 2005: Advances in Monoclonal Antibody Therapy for Breast Cancer.
11. Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S, Beitsch P, Khan A, Euhus D, Osborne C, Frenkel E, Hoover S, Leitch M, Clifford E, Vitetta E, Morrison L, Herlyn D, Terstappen LW, Fleming T, Fehm T, Tucker T, Lane N, Wang J, Uhr J. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:9393-8.
12. German Patent DE 102 17 102 A1 "Verfahren zur Charakterisierung von Primartumoren", 2002.
13. International Patent application PCT/EP03/04037 (Veröffentlichungsnummer WO 03/087405 A2) "Methods for characterizing primary tumors", 2003.
14. Griwatz C, Brandt B, Assmann G, Zanker KS. An immunological enrichment method for epithelial cells from peripheral blood. *J Immunol Methods* 1995;183:251-65.
15. Brandt B, Junker R, Griwatz C, Heidl S, Brinkmann O, Semjonow A, Assmann G, Zanker KS. Isolation of prostate-derived single cells and cell clusters from human peripheral blood. *Cancer Res* 1996;56:4556-61.

III. Frequent detection and immunophenotyping of prostate-derived cell clusters in the peripheral blood of prostate cancer patients

A provocative discussion initiated by data from long-term clinical studies concerning diagnosis and surgical treatment of prostate cancer (PCa) has been going on in the literature [1]. A clear distinction between PCa with a favourable clinical outcome and PCa likely to develop metastases or recurrences following treatment is still difficult. For this reason, attempts have been made to identify tumour cells in the blood of patients for estimating a patient's metastatic risk.

Phenotypical data show that the primary tumour is relatively heterogeneous in terms of the expression of proliferation-associated markers (MIB-1) and apoptosis-induced DNA fragmentation [2]. This indicates asynchronous growth of prostate tumours and, as one

T, Fehm T, Tucker T, Lane N, Wang J, Uhr J. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:9393-8.

12. German Patent DE 102 17 102 A1 "Verfahren zur Charakterisierung von Primartumoren", 2002.

13. International Patent application PCT/EP03/04037 (Veröffentlichungsnummer WO 03/087405 A2) "Methods for characterizing primary tumors", 2003.

14. Griwatz C, Brandt B, Assmann G, Zanker KS. An immunological enrichment method for epithelial cells from peripheral blood. J Immunol Methods 1995;183:251-65.

15. Brandt B, Junker R, Griwatz C, Heidl S, Brinkmann O, Semjonow A, Assmann G, Zanker KS. Isolation of prostate-derived single cells and cell clusters from human peripheral blood. Cancer Res 1996;56:4556-61.

III. Частое определение и иммунофенотипирование кластеров клеток предстательной железы в периферической крови больных раком предстательной железы

В литературе продолжается дискуссия, начало которой было положено данными длительных клинических исследований в области диагностики и хирургического лечения рака предстательной железы (РП) [1]. До сих пор трудно найти четкие различия между РП с благоприятным клиническим исходом и РП, который вероятнее всего будет метастазировать или рецидивировать после лечения. По этой причине продолжают попытки выявить опухолевые клетки в крови больных РП для оценки потенциального риска метастазирования. Данные фенотипирования показывают, что первичная опухоль характеризуется относительной гетерогенностью по экспрессии маркеров пролиферации (MIB-1), и фрагментации ДНК, индуцированной апоптозом [2]. Это указывает на асинхронный характер роста опухолей предстательной железы и, как следствие, на то, что клетки, поступающие в кровеносную систему, имеют разный потенциал выживания и роста в органах метастазирования. Эту гипотезу подтверждает тот факт, что число изменений по данным ПЦР-анализа микросателлитов повышается по мере прогрессирования рака. Повышение числа мутаций в первичной опухоли в процессе метастазирования повышает вероятность диверсификации роста и выживаемости [3].

Для дальнейшей оценки жизнеспособности клеточных популяций, выявленных в периферической крови больных РП, мы провели анализ с окрашиванием на маркер пролиферации Mib-1 (Ki-67) и H1/H3 [10] и маркеры апоптоза рецептор c-Fas и M30 (цитокератиновые фрагменты, ассоциирующиеся с апоптозом, Leers 1999 [4]). Оказалось, что небольшая часть популяции кластеров интактных клеток, которая встречалась с меньшей частотой, имела положительную реакцию на маркеры Mib-1 и H1/H3. Ни в одном из кластеров интактных клеток не выявлено окрашивание на c-Fas или M30. При окрашивании на маркеры c-Fas или M30 определялись признаки стадии апоптоза диморфных клеток (ДК).

consequence, suggests that the cells delivered into blood circulation may have various potential for cell survival and growth at secondary sites. This hypothesis is further supported by the fact that the number of alterations obtained by microsatellite-PCR rises with progression of the cancer. The increase of mutations in the primary tumour as it undergoes metastasis enhances the probability for diversification in growth and survival [3].

Table 3

Number of patients with cell clusters and counts of blood-borne cell clusters staining positive for prostate-specific antigen and cytokeratin in 1 l EDTA-blood of 68 patients with prostate cancer

Type of cell cluster	CC	DC	DC with nuclei	IC
Number of patients with cell clusters (%)	67 (98%)	67 (98%)	48 (71%)	24 (35%)
Average count of clusters standard deviation	16495 ± 19070	16274 ± 18916	1577 ± 3007	221 ± 691
Range of counts of clusters per patient positive for blood-borne cell clusters	20–5400	20–5400	60–1080	20–193
DC = cell clusters containing only dysmorphic cells; IC = cell clusters of small, round, intact cells; CC = any type of circulating prostate-derived cell clusters				

To evaluate further the viability of the cell populations found in the peripheral blood of PCa patients, we subjected them to staining with the proliferation marker Mib-1 (Ki-67) and H1/H3 [10] and apoptosis-associated markers c-Fas receptor and M30 (apoptosis associated cytokeratin fragments, Leers 1999) [4]. Thereby, a minor portion of the less frequent population of intact cell clusters turned out to be positive for the proliferation marker Mib-1 and H1/H3. None of the intact cell clusters we observed stained positive for c-FasR or M30. When we stained with the markers c-FasR and M30 we found evidence for the apoptotic stage of the dysmorphic cells (DC).

References

1. Aus G, Abbou CC, Pacik D, Schmid HP, van Poppel H, Wolff JM, Zattoni F. EAU Working Group on Oncological Urology. EAU guidelines on prostate cancer. Eur Urol. 2001 Aug;40(2):97-101.
2. Bonkhoff H, Fixemer T, Hunsicker I, Remberger K. Simultaneous detection of DNA fragmentation (apoptosis), cell proliferation (MIB-1), and phenotype markers in routinely processed tissue sections. Virchows Arch 1999; 434(1):71-3.
3. Saric T, Brkanac Z, Troyer DA, Padalecki SS, Sarosdy M, Williams K, Abadesco L, Leach RJ, O'Connell P. Genetic pattern of prostate cancer progression. Int J Cancer 1999; 81(2): 219-24.
4. Leers MP, Kolgen W, Bjorklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, Bjorklund P, Ramaekers FC, Bjorklund B, Nap M, Jornvall H, Schutte B. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. J Pathol 1999; 187:567–72.

Таблица 3

Число больных с кластерами клеток и число клеточных кластеров с положительной окраской на специфический антиген простаты и цитокератин в крови 11 из 68 больных раком простаты

Тип клеточных кластеров	КК	ДК	ДК с ядрами	ИК
Число больных с клеточными кластерами (%)	67 (98%)	67 (98%)	48 (71%)	24 (35%)
Среднее число кластеров ($M \pm m$)	16495+19070	16274+18916	1577+3007	221+691
Диапазон числа кластеров на одного больного с клеточными кластерами	20–5400	20–5400	60–1080	20–193
<small>ДК — кластеры клеток, содержащие только дисморфные клетки; ИК — кластеры мелких, округлых, интактных клеток; КК — любой тип циркулирующих кластеров клеток простаты</small>				

Литература

1. *Aus G, Abbou CC, Pacik D, Schmid HP, van Poppel H, Wolff JM, Zattoni F.* EAU Working Group on Oncological Urology. EAU guidelines on prostate cancer. *Eur Urol.* 2001 Aug;40(2):97-101.
2. *Bonkhoff H, Fixemer T, Hunsicker I, Remberger K.* Simultaneous detection of DNA fragmentation (apoptosis), cell proliferation (MIB-1), and phenotype markers in routinely processed tissue sections. *Virchows Arch* 1999; 434(1);71-3
3. *Saric T, Brkanac Z, Troyer DA, Padalecki SS, Sarosdy M, Williams K, Abadesco L, Leach RJ, O'Connell P.* Genetic pattern of prostate cancer progression. *Int J Cancer* 1999;. 81(2); 219-24
4. *Leers MP, Kolgen W, Bjorklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, Bjorklund P, Ramaekers FC, Bjorklund B, Nap M, Jormvall H, Schutte B.* Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol* 1999; 187;567-72.

IV. Циркулирующие опухолевые клетки из явных, даже небольших очагов отражают асинхронный рост рака предстательной железы

Рак предстательной железы является гетерогенным заболеванием, что в частности обусловлено наличием множественных очагов в операционном материале 50-76% больных, перенесших радикальную простатэктомию. Однако, клиническое и прогностическое значение этого явления пока не установлено. Разные очаги карциномы предстательной железы могут различаться по морфологическому характеру роста, поэтому можно предположить, что отдельные очаги одной карциномы предстательной железы могут также иметь различную биологическую природу [1]. Первичные опухоли имеют довольно гетерогенную структуру по экспрессии маркеров пролиферации, таких как Ki-67, и фрагментации ДНК, индуцированной апоптозом, что указывает на асинхронный рост опухоли предстательной железы (см. выше). Исследование микросателлитов на микрообразцах тканей позволило опреде-

IV. Asynchronous Growth of Prostate Cancer is Reflected by Circulating Tumor Cells Delivered from Distinct, even Small Foci

Prostate cancer is a heterogeneous disease particularly regarding its multifocality which has been reported in 50-76% of all cases of radical retropubic prostatectomy (RRP) specimens. However, the clinical and prognostic significance of this finding is still unclear. Different foci of prostate carcinoma can differ in their morphological growth pattern, suggesting that separated foci of a given prostate carcinoma might also have a different tumor biology [1]. Primary tumors show a rather heterogeneous expression of proliferation-associated markers such as Ki-67 and apoptosis-induced DNA fragmentation demonstrating the asynchronous growth of a prostate tumor (see above). Microsatellite-based studies on microdissected tissue resulted in the identification of areas in the primary tumor with different alterations associated with a distinct histological differentiation [2; 3; 4].

We investigated multifocal prostate tumors and PSA-positive CTCs in the peripheral blood of 20 patients using multiplex PCR. From those, 55–5400 cCTCs were isolated from 50 ml blood. Nine polymorphic microsatellite markers were used for the comparison of the LOH pattern from the different tumor foci and circulating tumor cell clusters (CTC). The highest numbers of LOH in the primary tumors (PT) and cCTCs were shown for the marker D10S541 (92% resp. 85%), followed by D13S153 (82% resp. 76%) and D16S422 (86% resp. 71%). D17S855 (BRCA1, 39 resp. 39%) showed the lowest LOH frequency. However, 4 of the 5 cases with a biochemical recurrence within 3 years revealed a D17S855 LOH in the CTC and PT. The highest frequency of LOH was seen in foci that were not identical in their genomic pattern to the cCTCs. As such for D8S258 the difference in the number of LOHs between non-spreading foci in the primary primary tumor and the CTCs was 29% (79% vs. 50%). Only in one case did both of the two foci of the primary tumor show identical LOH compared to that of the CTCs. In one instance, neither of the two tumor foci showed an identical alteration pattern with the CTC. The investigated prostate cancer foci in 9 cases were of approximately the same size while in 11 cases they were of very different size. The smallest foci only had a volume of approx. 0.2 cm³. A correlation between the numbers of cCTCs and the t-PSA level, tumor staging as well as differentiation could not be found. Biochemical recurrence only occurred in this study in cases with lower numbers of CTCs (55 — 750 CTCs per 50 ml; mean = 330).

Our study shows that the cCTCs were most likely derived only from one distinct focus and that other foci from the same tumor sometimes have additional LOH. Only in one of the investigated cases did both foci show identical LOH patterns, while in one case we were not able to identify the dispersing focus in the primary tumor. Interestingly, Qian et al. [5] were able to show by fluorescence in-situ hybridisation (FISH) that small foci of the primary tumor can metastasize and that usually one or more foci shared the same chromosomal aberrations with the corresponding metastases. Indeed, here we were able to demonstrate in 6 cases that in multifocal prostate cancer a small focus, of only 0.2 cm³ in size, may have been the more likely culprit to have delivered the cCTCs than the larger focus. Interestingly, the highest number of LOHs was observed at the marker D10S541 (85%),

лить области первичной опухоли, имеющие различные изменения, которые ассоциируются с определенной степенью гистологической дифференцировки [2; 3; 4].

Мы исследовали мультифокальные опухоли предстательной железы и PSA-положительные ЦОК в периферической крови 20 больных методом множественной ПЦР. У этих больных в 50 мл крови определялось от 55 до 5400 кЦОК. Для сравнения картины LOH (Loss Of Heterozygosity, потеря гетерозиготности) в разных очагах опухоли и кластеров циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) применяли 9 полиморфных маркеров микросателлитов. С наиболее высокой частотой LOH выявлялась в первичной опухоли (ПО) и кЦОК для маркеров D10S541 (92% и 85% соответственно), затем в порядке уменьшения частоты для маркеров D13S153 (82% 76% соответственно) и D16S422 (86% и 71% соответственно). Частота LOH была наименьшей при использовании D17S855 (BRCA1, 39% и 39% соответственно). Однако у 4 из 5 больных, у которых зарегистрирован биохимический рецидив в первые 3 года, выявлялась LOH D17S855 в ЦОК и ПО. Максимальная частота LOH наблюдалась в очагах, которые по своему геному не были идентичными кЦОК. Так, для D8S258 разница в числе LOH между нераспространяющимися очагами в первичной опухоли и ЦОК составила 29% (79% и 50%). Всего в одном случае оба из двух очагов в первичной опухоли имели идентичный профиль LOH с ЦОК. В одном случае ни один из двух опухолевых очагов не имел такую же картину изменений, как в ЦОК. У 9 больных в нашем исследовании очаги в опухоли предстательной железы были примерно одного размера, а в остальных 11 случаях имели разный размер. Минимальный размер очага составил всего 0,2 см³. Мы не выявили корреляции между числом кЦОК и уровнем t-PSA, стадией и степенью дифференцировки опухоли. В этом исследовании биохимический рецидив зарегистрирован только в случаях с низким числом ЦОК (55–750 ЦОК на 50 мл; в среднем 330).

Наше исследование показало, что кЦОК происходили вероятнее всего из одного четко определенного очага, и что другие очаги в той же опухоли часто имеют дополнительные LOH. Всего в одном случае оба очага имели идентичный профиль LOH, а еще в одном случае мы не смогли выявить диссеминирующий очаг в первичной опухоли. Интересно отметить, что Qian et al [5], используя метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), показали, что небольшие очаги первичной опухоли могут метастазировать и что один и более очагов имели те же хромосомные aberrации, что и соответствующие метастазы. В нашем исследовании мы также показали, что в 6 случаях мультифокального рака предстательной железы мелкий очаг размером всего 0,2 см³ являлся более вероятным источником кЦОК, чем более крупные опухоли. Интересно отметить, что максимальное число LOH было обнаружено для маркера D10S541 (85%), гена PTEN, который изменяется при монофокальном раке предстательной железы значительно реже (48%). Далее, довольно частая LOH гена BRCA1 (38%) была выявлена в 4 из 5 случаев с биохимическим рецидивом, развившемся в первые 3 года после простатэктомии.

Таким образом, наши данные четко подтверждают предположение о том, что кЦОК при раке предстательной железы происходят из разных очагов в пределах од-

the PTEN gene, which is much less frequently affected in monofocal prostate cancer (48%). Furthermore, the infrequently occurring LOH in the BRCA1 gene (38%) was found in 4 of the 5 cases with a biochemical recurrence within 3 years of a prostatectomy.

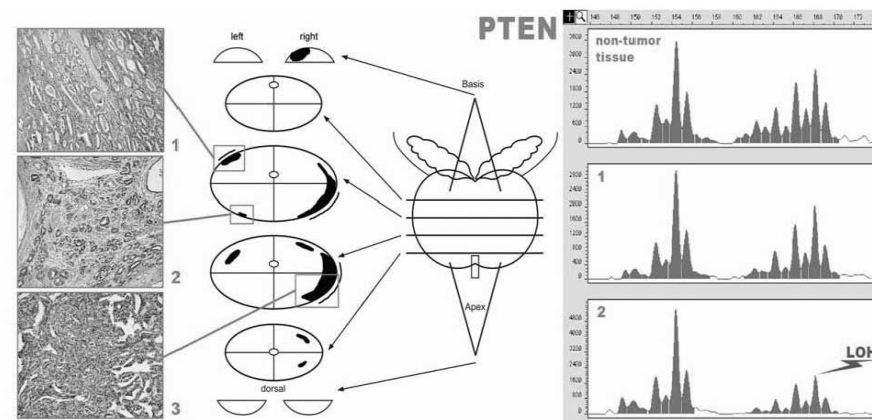


Рис. 3. Топографическая карта простаты с опухолевыми очагами разного размера, разной формы, степени мультифокальности и разным расположением по отношению к капсуле и хирургическому краю (справа) и образцы исследованных очагов после окраски гематоксилином-эозином: 1: очаг 6 окраска по Gleason 3+3; очаг 9 окраска по Gleason 3+4; очаг 24 окраска по Gleason 4+4 (увеличение x10). Определение LOH в маркере PTEN методом микросателлитной ПЦР.

Pic. 3: Topographic map of the prostate of patient including the different foci of the tumor dimensions, shape, multifocality and relation to capsule and surgical margins (right side) as well as hematoxylin-eosin stained sections of the investigated foci: 1: focus 6 Gleason 3+3, focus 9 Gleason 3+4, focus 24 Gleason 4+4 (objective magnification 10?). Demonstration of the determination of an LOH in the PTEN marker by microsatellite PCR.

In summary, our data strongly support the assumption that cCTCs in prostate cancer derive from distinct foci within the primary tumor. The size of the tumor focus is not related to the delivery of cells to the bloodstream. Even small foci, down to 0.2 cm³ in size, showed a conceivable significant release of CTCs. Although the number of cases that were investigated in this study was small, it is suggested here that the LOH at distinct markers such as D10S541 and D17S855 which represent the genes PTEN and BRCA1 might be associated with the occurrence of CTCs in the peripheral blood of patients and also an early biochemical recurrence. Sequencing of PTEN and BRCA1 in prostate cancer showing an LOH in these genes might reveal new markers for the early detection of recurrent prostate cancer.

ной первичной опухоли. Размер опухолевого очага не связан с поступлением клеток в кровоток. Даже мелкие очаги размером до 0,2 см³ выделяли в кровь значительное число кЦОК. Несмотря на небольшое число случаев в нашем исследовании, можно сделать предположение, что ЛОН, выявленная на различных маркерах, таких как D10S541 D17S855, которые представляют гены PTEN и BRCA1, может ассоциироваться с наличием ЦОК в периферической крови больных, а также ранним биохимическим рецидивом. Секвенирование генов PTEN и BRCA1 при раке предстательной железы, демонстрирующее ЛОН в данных генах, позволяет выявить новые маркеры для раннего выявления рецидива рака предстательной железы.

Литература

1. Cheng L, Bostwick DG, Li G. et al. Allelic imbalance in the clonal evolution of prostate carcinoma. *Cancer* 1999; 85: 2017-22.
2. Takimoto Y, Shimazui T, Akaza H. et al. Genetic heterogeneity of surgically resected prostate carcinomas and their biopsy specimens is related to their histologic differentiation. *Cancer* 2001; 91: 362-70.
3. Arora R, Koch MO, Eble J N. et al. Heterogeneity of Gleason grade in multifocal adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 2004; 100: 2362-6.
4. Konishi N, Nakamura M, Kishi M. et al. Genetic mapping of allelic loss on chromosome 6q within heterogeneous prostate carcinoma. *Cancer Sci* 2003; 94: 764-8.
5. Qian J, Bostwick DG, Takahashi S. et al. Chromosomal anomalies in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 1995; 55: 5408-14.

V. Выявление циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови больных метастатическим раком молочной железы при помощи полуавтоматической системы CellSearch

Клиническое определение ЦОК пока не нашло распространения в обычной клинической практике по нескольким причинам. Главная причина заключается в том, что отсутствие стандартизированных автоматизированных технологий требует применения трудоемких процедур подготовки образцов и обуславливает значительные различия в результатах исследования как в разных, так и в одной и той же лаборатории. Кроме того, для окрашивания и анализа образцов для иммунохимического исследования в целях выявления этих редких явлений в крови и костном мозге используют разные реагенты и методы, что приводит к различиям в специфичности и чувствительности. И наконец, несмотря на то, что периферическая кровь, благодаря неинвазивному характеру забора, является идеальным материалом для выявления ЦОК, присутствие ЦОК в периферической крови уступает по клинической значимости выявлению диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге.

Значительный прогресс в этой области наметился благодаря разработке автоматизированной системы обогащения и иммуноцитохимического выявления ЦОК CellSearch; Veridex; [1]. Эта система состоит из пробирки CellSave (Immunicon, Huntington Valley, PA) для хранения и транспортировки проб крови, набора для выявления эпителиальных клеток CellSearch (Veridex), содержащего все необходимые

References

1. Cheng L, Bostwick DG, Li G. et al. Allelic imbalance in the clonal evolution of prostate carcinoma. *Cancer* 1999; 85: 2017-22.
2. Takimoto Y, Shimazui T, Akaza H. et al. Genetic heterogeneity of surgically resected prostate carcinomas and their biopsy specimens is related to their histologic differentiation. *Cancer* 2001; 91: 362-70.
3. Arora R, Koch MO, Eble J N. et al. Heterogeneity of Gleason grade in multifocal adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 2004; 100: 2362-6.
4. Konishi N, Nakamura M, Kishi M. et al. Genetic mapping of allelic loss on chromosome 6q within heterogeneous prostate carcinoma. *Cancer Sci* 2003; 94: 764-8.
5. Qian J, Bostwick DG, Takahashi S. et al. Chromosomal anomalies in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 1995; 55: 5408-14.

V. Detection of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Patients with Metastatic Breast Cancer by the semi-automated CellSearch® System

The clinical use of CTCs has not been implemented for routine clinical practice for several reasons. Most notably, the lack of standardization and automation of the technology has required the use of laborious sample preparation procedures with corresponding high intra- and inter-laboratory differences in results. Furthermore, different reagents and methods are used for the staining and evaluation of immunocytochemically prepared slides in search of these rare events in blood and bone marrow, which can lead to differences concerning specificity and sensitivity. Finally, although peripheral blood is an ideal source for the detection of CTCs because of the noninvasive sampling procedure, the clinical significance of CTCs in peripheral blood is less clear than that for DTCs in bone marrow.

Important progress in this field arose from the development of an automated enrichment and immunocytochemical detection system for CTCs (CellSearch; Veridex; [1]). This system consists of a CellSave sample tube (Immunicon, Huntingdon Valley, PA) for preserving and transporting blood samples, the CellSearch Epithelial cell kit (Veridex) containing all of the reagents and consumables for conducting the test, CellSearch control cells (Veridex) for assuring proper performance on a daily or run-to-run basis, an automated instrument for adding reagents and washing cells (AutoPrep; Veridex), and a semiautomated microscope for scanning and reading results (CellSpotter Analyzer; Veridex).

Using this system, Cristofanilli et al. showed in a prospective study that CTC detection provided significant prognostic information for patients with metastatic breast cancer [2; 3]. Similar to the primary setting in bone marrow, detecting elevated numbers of CTCs in peripheral blood in the metastatic setting of breast cancer is accompanied by a decreased disease-free and overall survival. There are also several reports about the detection of CTCs in patients with primary breast cancer, however, mostly with lower frequencies and varying results concerning both the number of positive patients and the number of CTCs in individual patients [4-8]. Thus, measurement of CTC levels might have considerable potential to influence therapeutic strategies for breast cancer patients. For this purpose, a reliable method that is easy to perform and reproducible in different laboratories is urgently needed. Furthermore, standardization and automation of this method are piv-

реактивы и расходные материалы для проведения анализа, контрольных клеток CellSearch (Veridex) для проведения анализа ежедневно или периодически, автоматического прибора для добавления реактивов и промывания клеток (AutoPrep; Veridex) и полуавтоматического микроскопа для сканирования и анализа результатов (CellSpotter Analyzer; Veridex).

Используя эту систему при проведении проспективного исследования, Cristofanilli с соавт. показали, что выявление ЦОК дает важную прогностическую информацию при метастатическом РМЖ [2;3]. Аналогично анализу костного мозга при первичном раке, выявление повышения числа ЦОК в периферической крови при метастатическом РМЖ ассоциировалось со снижением безрецидивной и общей выживаемости. Также опубликован ряд сообщений о выявлении ЦОК у больных первичным РМЖ, однако в большинстве работ — с более низкой частотой и разными результатами как по числу больных с положительным тестом, так и по числу ЦОК у отдельных больных [4-8]. Таким образом, определение уровней ЦОК представляется перспективным диагностическим методом при выборе тактики лечения больных РМЖ. Для этого крайне необходим надежный, простой метод с хорошей воспроизводимостью результатов в разных лабораториях. Для внедрения в клиническую практику и использования в многоцентровых исследованиях большое значение имеют стандартизация и автоматизация такого метода.

Система CellSearch зарегистрирована Администрацией по пищевым продуктам и лекарственным препаратам США для применения в обычной клинической практике при метастатическом РМЖ, тем не менее необходима независимая апробация этого нового метода в условиях стандартной практики. В связи с этим целью данного многоцентрового исследования являлась апробация аналитических возможностей системы CellSearch в диагностике метастатического РМЖ в клинических условиях. Основными задачами исследования являлись определение точности теста, возможности адекватно контролировать преданалитические факторы, которые могут влиять на надежность результатов анализа, и проверка рабочих показателей системы CellSearch в клинических условиях, в том числе качества пробирок для забора крови CellSave, контроля CellSearch и набора реактивов для выявления эпителиальных клеток CellSearch. Данные апробации в трех независимых лабораториях и высокая степень совпадения результатов подтвердили надежность этой системы для определения содержания ЦОК и показали, что система может успешно применяться для оценки эффективности терапии у больных метастатическим РМЖ в условиях обычной клинической практики. Наши данные показали также, что образцы можно транспортировать при комнатной температуре и при этом уровни ЦОК остаются стабильными не менее 72 ч, что облегчает транспортировку образцов для проведения анализа в центральных лабораториях или отдаленных центрах.

Исследование образцов крови на наличие ЦОК при помощи системы CellSearch можно проводить в рамках многоцентровых клинических исследований. Кроме того, эта система является надежным инструментом для проведения стандартного диагностического обследования больных метастатическим РМЖ в клинической лаборатории.

otal to ensure high-throughput analyses as a precondition for clinical application and multicenter studies.

The Cell Search system has been cleared by the U.S. Food and Drug Administration for routine clinical use in metastatic breast cancer patients, but independent validation of this new technology in the routine setting is lacking. Therefore, the aim of the present multicenter study was to validate the analytic performance of the CellSearch system for clinical use in patients with metastatic breast cancer. The main objectives of this study were to validate accuracy and precision of the test, determine if pre-analytic variables that might affect the reliability of the test result are adequately controlled, and to verify the clinical performance claims for the CellSearch system, including CellSave blood collection tubes, CellSearch controls, and CellSearch Epithelial cell kit reagents.

Validation data from three independent laboratories and high inter-instrument accordance confirm the reliability of this system for CTC measurements and show that the system is a suitable tool for the routine assessment of therapeutic efficacy in metastatic breast cancer patients. Furthermore, our data show that samples can be shipped at room temperature, and that CTC counts are stable for at least 72 h, which facilitates testing at central laboratories or remote sites requiring transportation.

The examination of blood samples for CTCs with the CellSearch system is possible in a multicenter setting in clinical trials. Furthermore, the system is a robust tool for the routine assessment of metastatic breast cancer patients in the clinical laboratory.

Литература/References

1. Kagan M, Howard D, Bendele T, et al. Circulating tumor cells as cancer markers, a sample preparation and analysis system. In: Diamandis EP, Fritsche HA, Lilja H, Chan DW, Schwarz M, editors. Tumor markers: physiology, pathobiology, technology and clinical applications. Washington (DC): AACC Press; 2002. p 495-8.
2. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. N Engl J Med 2004;351:781-91
3. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. J Clin Oncol 2005;23:1420-30
4. Muller V, Stahmann N, Riethdorf S, et al. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. Clin Cancer Res 2005;11:3678-85.
5. Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Schneider U, Schunemann S, Hoffken K. Quantification of the response of circulating epithelial cells to neoadjuvant treatment for breast cancer: a new tool for therapy monitoring. Breast Cancer Res 2005;7:R975-79.
6. Kahn HJ, Presta A, Yang LY, et al. Enumeration of circulating tumor cells in the blood of breast cancer patients after filtration enrichment: correlation with disease stage. Breast Cancer Res Treat 2004;86:237-7.
8. Witzig TE, Bossy B, Kimlinger T, et al. Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients using immunomagnetic enrichment and digital microscopy. Clin Cancer Res 2002;8:1085-91.

ПРОБЛЕМЫ КОСТНОМОЗГОВОГО МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Областной клинический онкологический диспансер, Ульяновск
Клинический онкологический диспансер МЗ РТ, Казань

РЕЗЮМЕ

Микрометастазы в костный мозг в среднем диагностируются у 30–35% больных раком молочной железы. Для определения опухолевого поражения костного мозга используются различные методы исследования — цитологический и гистологический методы, иммуноцитохимическое исследование, полимеразная цепная реакция, методы проточной цитометрии и клеточных культур. В настоящей работе у 50 больных раком молочной железы произведено исследование костного мозга с помощью цитологического, гистологического и иммуноцитохимического методов. Подавляющее большинство (74%) составили пациентки с метастатическим процессом. От общего числа больных, включенных в исследование, микрометастазы в костный мозг были обнаружены у 19 (38%) пациенток. Комбинация различных методов диагностики существенно не повысила вероятность выявления опухолевых клеток в костном мозге. В то время как гистологический и иммуноцитохимический методы в самостоятельном варианте показали достаточно высокую информативность. Микрометастазы в костный мозг не имеют каких-либо клинических проявлений, вместе с тем, в общем анализе крови зарегистрированы статистически достоверные ускорение СОЭ и снижение уровня гемоглобина.

Ключевые слова: рак молочной железы, костный мозг, микрометастазы.

При различных злокачественных опухолях обнаружение отдельных опухолевых клеток в костном мозге приобретает важное значение, т.к. субклинические микрометастазы являются индикатором диссеминации опухолевого процесса и предшественниками отдаленных метастазов. В течение 5 лет после хирургического лечения метастазирование наступает почти у половины больных с локализованным раком молочной железы (РМЖ). Даже среди пациентов без метастазов в регионарные лимфатические узлы, приблизительно у 1/3 в дальнейшем происходит диссеминация процесса. При первом рецидиве опухолевые очаги в костном мозге с помощью стандартных диагностических процедур выявляются у 23% пациентов, причем после аутопсии умерших от метастатического РМЖ этот показатель увеличивается до 80% [18].

PROBLEMS OF BONE MARROW METASTASES IN PATIENTS WITH BREAST CANCER

Regional Clinical Cancer Center, Ulianovsk
RF HM Clinical Cancer Center, Kazan

ABSTRACT

Bone marrow micrometastases are found on the average in 30–35% of breast cancer patients. A variety of tests are applied to detect bone marrow involvement including cytology, histochemistry, immunocytochemistry assays, polymerase chain reaction, flow cytometry and cell culture techniques. We studied bone marrow from 50 breast cancer patients by cytology, histology and immunocytochemistry. Most patients (74%) had metastatic disease. Bone marrow micrometastases were found in 19 (38%) cases. Study by several methods in combination failed to improve tumor cell detection in bone marrow. While histological or immunohistochemical tests alone had a rather high informative value. Bone marrow micrometastases had no clinical signs though significant increase in ESR and decrease in hemoglobin levels were found in patients' blood.

Key words: breast cancer, bone marrow, micrometastases.

Detection of single tumor cells in bone marrow of cancer patients is of much importance because subclinical micrometastases are indicators of tumor dissemination and precursors of distant metastases. About half of patients with local breast cancer (BC) develop metastases within 5 years following surgical treatment. Disease advance is reported in one third of regional lymph node negative cases. Bone marrow involvement is detected by standard techniques in 23% of cases at first recurrence, while post mortem examination of patients with metastatic BC discovers bone marrow involvement in 80% of cases [18].

Bone marrow involvement was reported for the first time in 1834 when this state was referred to as 'cancer diathesis' [1]. In 1908 Ryall called tumor involvement of bone marrow 'cancer infection' [26]. Beginning from the 1980's the problem of carcinomyelomatosis has been drawing much attention though the terminology uncertainty still continues. Oncologists use different terms when speaking of bone marrow metastasis, such as 'micrometastases', 'occult metastases', 'minimal residual disease', 'isolated tumor cells', 'disseminated epithelial cells' [4]. We consider most acceptable the position of a German scientists' group headed by Paul Hermanek (1999) [15] who propose to make a distinction between micrometastases and isolated tumor cells (ITC). Micrometastases should be

Первое сообщение об обнаружении метастазов опухоли в костный мозг относится к 1834 г.; тогда это состояние получило название «раковый диатез» [1]. В 1908 г. Ryall характеризует опухолевое поражение костного мозга, как «раковая инфекция» [26]. Начиная с 1980-х г.г. к проблемам канцеромиеломатоза обращено самое пристальное внимание, но путаница в терминологии, тем не менее, сохраняется. Говоря о метастазах в костный мозг, ученые прибегают к самым разным терминам — микрометастазы, оккультные метастазы, минимальная резидуальная болезнь, изолированные опухолевые клетки, диссеминированные эпителиальные клетки [4]. Нам наиболее приемлемой кажется позиция группы немецких ученых, под руководством Paul Hermanek (1999) [15]. Эти авторы предлагают выделять микрометастазы и изолированные опухолевые клетки (ИОК). Речь о микрометастазах необходимо вести в тех случаях, когда произошла имплантация опухолевых клеток во «вторые органы» и определяется картина экстравазации, пролиферации клеток опухоли с частой стромальной реакцией. Но главной отличительной чертой являются размеры очага. В случае микрометастазов размер кластера в отличие от изолированных опухолевых клеток достаточно велик, но не превышает 2 мм. ясность в терминологии нужна, прежде всего, для правильного стадирования опухолевого процесса, и, соответственно, для корректного лечения. Если мы имеем дело с ИОК в костном мозге, то это состояние классифицируется как M0(i+) или M0 (mol+) в зависимости от метода исследования, а опухолевый процесс, соответственно, не может быть отнесен к IV стадии заболевания. Напротив, микрометастазы в костный мозг обозначаются как pM1(mi), таким образом, опухолевый процесс должен быть отнесен к IV стадии заболевания [15].

По данным разных авторов ИОК в костном мозге диагностируются в среднем у 30–35% больных раком молочной железы [5; 6; 11; 14; 24]. От чего зависит частота выявления ИОК в костном мозге?

Как показали результаты исследования О.В. Крохиной и соавт. (2002), существует вероятность обнаружения метастатических клеток в костном мозге больных раком молочной железы при различных стадиях заболевания [2]. Причем процент выявления метастазов возрастает от I к IV стадии. Наибольший процент микрометастазов отмечен при IV стадии РМЖ (62,5%), наименьший — при IIIa стадии, что, по-видимому, объясняется малым числом больных в данной группе.

Отдаленные метастазы в значительной степени ассоциированы с опухолевым поражением костного мозга. Причем частота поражения костного мозга во многом зависит от локализации отдаленных метастазов. В работе М. Osborne (1994) микрометастазы в костный мозг обнаруживались у 38% пациенток с IV стадией рака молочной железы при наличии метастазов в кости, у 20% больных с внекостными отдаленными метастатическими очагами и у 10% больных с первично операбельным раком молочной железы [21]. В одной из своих работ S. Braun и соавторы, при обследовании 33 больных РМЖ с висцеральными метастазами, обнаружили опухолевые клетки в костном мозге у 13 пациенток. В то же время микрометастазы в костный мозг были диагностированы у 18 из 19 больных с метастазами в кости и у 48 из 55 пациенток с одновременным метастатическим поражением скелета и висцеральных органов [7].

meant in cases with tumor implantation into 'second sites' and the pattern of extravasation, tumor cell proliferation with frequent stromal reaction, however it is the focus size that is their distinctive feature. In case of micrometastases the cell cluster is rather large as compared to isolated cells though is not more than 2 mm. Terminological clearness is needed first of all for accurate disease staging and correct treatment. The presence of ITC in bone marrow is classified as M0(i+) or M0 (mol+) depending upon study technique, and the disease cannot be staged IV. On the opposite, bone marrow micrometastases are classified as pM1 (mi) and the disease should therefore be staged IV [15].

Bone marrow ITC are found in 30–35% of BC patients [5; 6; 11; 14; 24]. What factors influence the frequency of ITC detection in bone marrow?

As demonstrated by O.V.Krokhina et al. (2002) there is a certain probability to detect tumor cells in bone marrow [2] which is increasing from stage I to IV disease. Percentage of micrometastasis-positive cases was the highest in stage IV BC (62.5%) and the lowest in stage IIIa which might be due to few cases studied.

Distant metastasis is to a considerable degree associated with bone marrow involvement, its frequency depending on sites of distant metastasis. M.Osborn (1994) reported detection of bone marrow micrometastases in 38% of patients with stage IV BC having bone metastases vs 10% of patients with operable primary BC [21]. S.Braun et al. examined 33 BC patients with visceral metastases to find bone marrow micrometastases in 13 cases. Bone marrow involvement was found in 18 of 19 women with bone metastases and in 48 of 55 patients with bone and visceral metastases [7].

More recently S.Braun (2005) made a meta analysis of 9 largest studies including a total of 4703 BC patients [9]. Comparison of patients with vs without bone marrow involvement demonstrated that the patients with bone marrow micrometastases had a greater tumor size, poorer tumor differentiation, higher risk of regional lymph node involvement and more frequent negative tumor receptor status.

The following techniques are useful to detect bone marrow involvement:

1. Cytology and histology studies detect tumor cells (only if they are present in a sufficient number) in less than 4% of cases. Histology mainly finds true micrometastases. While it is difficult (if at all possible) to discover single tumor cells [25]. The following techniques demonstrate higher sensitivity to ITC:

2. Immunocytochemical (ICC) analysis uses monoclonal antibodies to detect antigens that are not characteristic of hematopoietic tissue while being expressed on cells of solid tumors [10; 23]. Monoclonal antibodies to epithelial membrane antigen (EMA), cytokeratins (CK) and tumor-associated glycoprotein 12 (TAG 12) are used to detect BC ITC in bone marrow. The use of monoclonal antibodies to the above-mentioned antigens provides detection of 1 or 2 cancer cells per million normal bone marrow cells. ICC sensitivity may be limited by low antigen expression on tumor cells. In this case it is useful to apply an antibody panel to increase the sensitivity. However, this approach is associated with decreased specificity since MABs to EMA are known to react easily with lymphoid or early myeloid bone marrow cells, and CK-8- and CK-18-positive cells are found at a frequency of 2?5 per million cells in bone marrow of normal donors. ICC test may therefore be false-positive in 2–10% of healthy donors. It should also be mentioned that there are vari-

В следующей своей работе, S. Braun (2005) провел мета-анализ 9 наиболее крупных исследований, включающих в общей сложности 4703 больных раком молочной железы [9]. При сравнении групп пациенток с опухолевым поражением костного мозга и без него, больные с микрометастазами в костный мозг имели больший размер опухолевого очага, более низкую степень дифференцировки, большую вероятность поражения регионарных л/узлов и более частый отрицательный рецепторный статус опухоли.

Для выявления опухолевого поражения костного мозга могут быть использованы следующие методы исследования:

1. Цитологический и гистологический методы позволяют обнаружить опухолевые клетки (только при их достаточно большом количестве) менее, чем у 4% больных. С помощью гистологического метода чаще всего выявляются истинные микрометастазы. Единичные же метастатические клетки методом световой микроскопии обнаружить либо сложно, либо невозможно [25]. Повышение чувствительности выявления ИОК достигается при использовании следующих методов исследования.

2. Иммуноцитохимический метод (ИЦХ) основан на выявлении в мазках костного мозга с помощью моноклональных антител антигенов, нехарактерных для гемопоэтической ткани, но экспрессируемых клетками солидных опухолей [10;23]. Для иммунодетекции ИОК рака молочной железы в костном мозге используют моноклональные антитела к эпителиальному мембранному антигену (ЕМА), цитокератинам (СК), туморассоциированному гликопротеину 12 (TAG 12). Используя методику, основанную на применении моноклональных антител к указанным антигенам, возможно выявление 1-2 клеток рака в 1 млн. нормальных клеток костного мозга. Чувствительность иммуноцитохимического исследования может ограничиваться низким уровнем экспрессии антигенов опухолевыми клетками. В этом случае логичным представляется использование панели АТ для повышения чувствительности метода. Однако такой подход неизбежно приводит к снижению специфичности метода, поскольку известно, что МКА к ЕМА перекрестно реагируют с лимфоидными и ранними миелоидными клетками костного мозга, а СК-8 и СК-18-позитивные клетки встречаются в количестве 2-5 на 1 млн. костном мозге здоровых людей. Поэтому иммуноцитохимический метод может дать ложно-положительный результат у 2-10% здоровых людей. Немаловажен тот факт, что на сегодняшний день в мире используется много коммерческих МКА с разной чувствительностью и специфичностью, что не позволяет стандартизировать метод и затрудняет сравнение результатов, полученных разными группами исследователей.

3. Полимеразная цепная реакция (RT-PCR) предназначена для обнаружения в образце ткани заданной матричной РНК. Данная методика заключается в поиске мРНК некоторых генов (цитокератинов, РЭА), экспрессируемых метастатическими клетками, или поиске мРНК генов, мутации которых специфичны для опухолевых клеток (например, генов ERB B2, p53, и k-ras и др.). По мнению ряда авторов, ПЦР является более чувствительной методикой для выявления микрометастазов рака молочной железы, чем ИЦХ. Вместе с тем, недостатком ПЦР является оценка генетической информации, а не наличия тех или иных живых клеток.

ous commercial MABs with different sensitivity and specificity that are used in ICC analysis which makes difficult standardization of the test and comparison of findings of different authors.

3. Polymerase chain reaction (RT-PCR) detects matrix RNA in tissue specimens. The technique is aimed to find mRNA of specific genes (cytokeratins, CEA) expressed on metastatic tumor cells or mRNA of genes with mutations specific of tumor cells (e.g. ERB B2, p53, k-ras, etc.). Some authors believe PCR to be more sensitive in detection of BC micrometastases than ICC. Although PCR has the disadvantage of seeking for genetic information rather than for live cells. In view of this, when analyzing bone marrow after chemotherapy the investigator should make sure that the RNA is derived from a live rather than from a dead tumor cell. Besides, RNA may not always be extracted from formalin-fixed paraffin-embedded specimens which makes difficult retrospective analysis.

4. To detect tumor cells in bone marrow by flow cytometry suspension of tumor cell is treated with stained antibodies to tumor antigens and the stained cells are then recognized and counted automatically by cytofluorimeter. The technique detects 1 tumor cell per 10,000-100,000 normal bone marrow cells. The significant disadvantage of flow cytometry is the need to isolate a considerable amount of live tumor cells from bone marrow which is not always possible. Besides, specificity of the technique is not quite clear yet.

5. To study bone marrow by cell culture technique aspiration biopsy specimens are placed into a growth medium. Normal bone marrow cells cannot proliferate without habitual microenvironment. If secondary colonies are found in the medium it means the presence of tumor cells able to grow autonomously. The use of cell culture technique is limited by technical difficulty and high cost.

We have assessed diagnostic value of several techniques used to detect tumor involvement of bone marrow.

MATERIALS AND METHODS

The study was performed in 50 BC patients managed at the Ulianovsk Regional Cancer Center of whom 37 (74%) patients had metastatic and 13 (26%) had locally advanced disease. Bone marrow study was performed by cytology, histology and immunocytochemistry (ICC). Specimens for cytology and ICC assays were obtained by aspiration of 8-10 ml bone marrow from posterior superior iliac spines. Specimens for histology study were taken by bone marrow trephine biopsy from the same areas. ICC of bone marrow was made at the Laboratory for Immunohistochemical Diagnosis of Tumors, Clinical Cancer Center of the Republic of Tatarstan. The analysis was made using monoclonal antibodies to cytokeratins PAN, clone MNF 116, DAKO. Positive test was defined as detection of 1 metastatic cell per million myelokaryocytes. In ICC-positive cases we also determined tumor cell receptor status and proliferative activity by reactivity with a proliferation-associated marker Ki-67, clone BS6, Pharmingen.

Mathematical analysis of findings was made using a standard Microsoft Excel 2000 tool. Significance of differences in comparison of patient numbers was assessed by chi-squared test, and Student's t-test was used to compare means.

В связи с этим при исследовании костного мозга, полученного после проведения курса химиотерапии, нужно быть уверенным, что обнаруженная РНК получена из живой, а не из погибшей опухолевой клетки. Кроме того, РНК не всегда экстрагируются из образцов, фиксированных в формалине и залитых в парафин, что затрудняет ретроспективный анализ.

4. Для обнаружения опухолевых клеток в костном мозге методом проточной цитометрии взвесь опухолевых клеток 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. Большим недостатком проточной цитометрии является необходимость выделения из костного мозга значительного числа живых опухолевых клеток, что не всегда возможно. Кроме того, до настоящего времени специфичность метода недостаточно высока.

5. При исследовании костного мозга методом клеточных культур в питательную среду помещают образцы, полученные при аспирационной биопсии. Нормальные клетки костного мозга при отсутствии привычного для них микроокружения пролиферировать не будут. Если же в среде сформируются вторичные колонии, то это будет свидетельствовать о наличии в костном мозге опухолевых клеток, способных к автономному росту. Немаловажным фактором, ограничивающим использование культурального метода, является его техническая сложность и высокая стоимость.

Для определения диагностической ценности различных методов выявления опухолевого поражения костного мозга мы провели собственное исследование.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 50 больных раком молочной железы, проходивших лечение в Ульяновском областном клиническом онкологическом диспансере. От общего числа больных метастатический процесс был диагностирован у 37 пациенток (74%), местнораспространенный — у 13 (26%). Костный мозг исследовался с помощью цитологического, гистологического и иммуноцитохимического методов (ИЦХ). Материал для цитологического и иммуноцитохимического методов получали путем аспирационной пункции 8–10 мл костного мозга из задне-верхних остей подвздошных костей с обеих сторон. Для гистологического исследования дополнительно из этих же точек выполнялась трепан-биопсия костного мозга. Иммуноцитохимическое исследование костного мозга проводилось на базе лаборатории иммуногистохимической диагностики опухолей клинического онкологического центра республики Татарстан. Для анализа были использованы моноклональные антитела к цитокератинам — «PAN», клон MNF 116, DAKO. Положительной считали реакцию при наличии 1 метастатической клетки на 1 млн. миелокарицитов. В случае обнаружения с помощью иммуноцитохимического метода микрометастазов в костный мозг, дополнительно определялись рецепторный статус и пролиферативная активность опухолевых клеток с использованием маркера пролиферации Ki-67, клон BS6, Pharmingen.

RESULTS

Nineteen (38%) of the 50 BC patients presented with bone marrow micrometastases. The bone marrow involvement was detected most frequently (12/19) by ICC. Bone marrow micrometastases were detected by histology in 10 and by cytology in 5 cases. Unexpectedly, combinations of diagnostic techniques failed to improve detection of bone marrow micrometastasis with only 2 (10.5%) cases being positive by both ICC and histology, 3 (15.8%) by both cytology and UCC and 2 (10.5%) by all the three techniques together. While either histology or ICC alone demonstrated a rather high informative value, with bone marrow involvement discovered in 6 (31.6%) and 5 (26.3%) patients respectively.

Of the 12 cases with bone marrow involvement detected by ICC all had receptor-negative tumor cells and low Ki-67 expression.

Bone metastases were discovered in half (45%) of patients free from bone marrow involvement versus more than two thirds (76.5%) of those with bone marrow micrometastases. Interestingly, 4 of 15 (26.7%) patients with non-skeletal metastases were bone marrow-positive. Frequency of bone marrow involvement was the lowest (2/19) in cases with locally advanced BC.

We attempted to find out whether micrometastases affected bone marrow function. For this purpose peripheral blood count was made in patients enrolled in this study (table).

Table

Complete blood count in patients with vs without bone marrow micrometastases

Test	BM (-) (n=31)	BM (+) (n=19)	p
Hemoglobin, g/l Normal (115–145) Anemia (<115)	27 (87.1%) 4 (12.9%)	12 (63.2%) 7 (36.8%)	0.047
White blood cells, $\times 10^9/l$ Normal (4.0–8.8) Leukopenia (<4.0)	25 (80.6%) 6 (19.4%)	14 (73.7%) 5 (26.3%)	0.564
Platelets, $\times 10^9/l$ Normal (180–320) Thrombopenia (<180)	2 (6.5%) 29 (93.5%)	0 19 (100%)	0.065
ESR, mm/h <30 ≥30–39	20 (64.6%) 11 (35.4%)	2 (10.5%) 17 (89.5%)	<0.001

Our study demonstrated that bone marrow involvement was accompanied by suppression of red cell production ($p < 0.05$) while having no effect on granulocyte or platelet hemopoiesis as confirmed by hemoglobin level and white cell and platelet counts. Anemia was found in micrometastasis-positive patients two times more frequently than in the control. Of interest is a highly significant increase in ESR in the group with bone marrow

Для математической обработки данных использовался стандартный пакет программы Microsoft Excel 2000. В качестве критерия достоверности для сравнения числа пациентов применялся χ^2 , а для сравнения средних значений -t-критерий (Стьюдента).

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

От общего числа больных, включенных в исследование, микрометастазы в костный мозг были обнаружены у 19 (38%) пациенток. Наиболее часто опухолевое поражение костного мозга диагностировалось с помощью иммуноцитохимического метода — у 12 пациенток из 19. С использованием гистологического метода микрометастазы в костный мозг выявлены у 10 больных, а с помощью цитологического — у 5. Как ни странно, комбинация различных методов диагностики не повысила вероятность обнаружения микрометастазов в костном мозге — только у 2 больных (10,5%) опухолевое поражение было выявлено как при ИЦХ, так и при гистологическом исследовании, у 3 (15,8%) — одновременно с помощью цитологического и ИЦХ, у 2 (10,5%) — с использованием всех трех диагностических методов. В то время как гистологический и иммуноцитохимический методы в самостоятельном варианте показали достаточно высокую информативность. С помощью этих методов микрометастазы в костный мозг были диагностированы у 6 (31,6%) и 5 (26,3%) пациенток соответственно.

Из 12 больных, у которых микрометастазы в костный мозг были обнаружены с помощью ИЦХ, во всех случаях опухолевые клетки были рецептор-негативными и имели низкую экспрессию антигена Ki-67.

У пациенток без микрометастазов в костный мозг метастазы в кости клинически диагностировались практически у половины больных (45%), в то время как в группе с микрометастазами поражение скелета встречалось более чем у 2/3 пациенток (76,5%). Обращает на себя внимание тот факт, что микрометастазы в костный мозг были выявлены у 4 из 15 больных с неместными метастазами (26,7%). Наиболее редко (в 2 случаях из 19) микрометастазы в костный мозг обнаруживались у больных с местнораспространенным раком молочной железы.

В процессе нашей работы мы попытались выяснить влияют ли микрометастазы на функцию костного мозга. В этих целях был проведен анализ периферической крови у больных, включенных в исследование (табл.).

Проведенный анализ показал, что метастатическое поражение костного мозга сопровождается подавлением красного ростка кроветворения ($p < 0,05$) и не влияет на гранулоцитарный и тромбоцитарный ростки, что подтверждают показатели гемоглобина, лейкоцитов и тромбоцитов. Анемия в группе микрометастазов встречалась почти в 2 раза чаще, чем в контрольной группе. Обращает на себя внимание высокодостоверное увеличение СОЭ в группе больных с микрометастазами в костный мозг ($p < 0,001$). Средний показатель СОЭ в группе больных без микрометастазов в костный мозг составил 23,5 мм/час (17,5 29,5), в то время как в группе с метастатическим поражением костного мозга он достигал 51,7 мм/час (44,2 59,2) ($p < 0,001$).

involvement ($p < 0,001$). Mean ESR in patients free from bone marrow micrometastases was 23.5 mm/h (range 17.5 to 29.5) versus 51.7 mm/h (range 44.2 to 59.2) ($p < 0,001$) in micrometastasis-positive cases.

DISCUSSION

Basing on our findings the conclusion may be made that bone marrow involvement is rather frequent (38%) in BC patients. Proportion of patients with bone marrow metastasis rises to 59.1% among cases with bone disease.

ICC (63.2%) and histology (57.9%) are most informative tests as to detection of occult bone marrow metastases. Therefore a combination of these two techniques seems to be optimal in the diagnosis of bone marrow involvement. Trepan biopsy and histologic study of bone marrow are also needed to assess disease size in bone marrow in order to define whether it is micrometastasis or isolated tumor cells which is necessary for correct classification of disease and treatment decision.

Although bone marrow micrometastases are known to have no clinical manifestations we detected a significant increase in ESR and decrease in hemoglobin levels in positive cases. These tests may therefore be considered most sensitive in suspects for bone marrow involvement.

As demonstrated by our study occult tumor cells in bone marrow have low proliferative activity, i.e. are dormant.

While discussing the problem of bone marrow micrometastasis it is useful to overview the problem of metastasis in general basing on the literature and our own data.

The problem that faces oncology today is the treatment of distant metastases rather than of the primary tumor, because it is distant metastases that are the main cause of cancer death. 80% of BC patients die from disease generalization within 20 years of follow-up, distant metastasis playing a much greater role as the cause of death than regional recurrence. What is the role of bone marrow in metastasis? We think that bone marrow plays the key role in both bone and non-bone metastasis. Why do we think so?

As soon as a tumor cell penetrates into circulation it may give rise to metastasis. Circulating tumor cells become sensitive to various host defense mechanisms including lysis due to the effect of lymphocytes, monocytes and natural killers. Tumor cells may undergo mechanical destruction due to eddying blood flow or sticking in capillaries. Study of isotope-labeled tumor cells demonstrated that only one per thousand circulating tumor cells is viable. As little as 0.1% of tumor cells reach capillaries of specific body sites and give rise to distant metastases [3]. Lungs are the first barrier in the cells' way. Most tumor cells overcome this barrier which is confirmed by high frequency of bone metastasis without lung involvement. Bone marrow is the next barrier.

Stephen Paget wrote in 1889 that bones were affected in a special way in breast cancer which could not be explained by the theory of tumor embolization only [22]. He hypothesized that specific properties of affected tissues were determinant in this process and made thus a basis for the theory of 'soil and semen', so popular today.

On the one hand, properties of the 'semen', i.e. a tumor cell, play a certain role in metastasis. As demonstrated by Japanese researchers, some BC cell lines, in particular H-31 can

Таблица
Показатели общего анализа крови у больных с наличием и отсутствием микрометастазов в костный мозг

Показатель	КМ (-) (n=31)	КМ (+) (n=19)	p
Гемоглобин, г/л • норма (115-145) • анемия (<115)	27 (87,1%) 4 (12,9%)	12 (63,2%) 7 (36,8%)	0,047
Лейкоциты, $\times 10^9$ /л • норма (4,0-8,8) • лейкопения (<4,0)	25 (80,6%) 6 (19,4%)	14 (73,7%) 5 (26,3%)	0,564
Тромбоциты, $\times 10^9$ /л • норма (180-320) • тромбоцитопения (<180)	2 (6,5%) 29 (93,5%)	0 19 (100%)	0,065
СОЭ, мм/час: • <30 • $\geq 30-39$	20 (64,6%) 11 (35,4%)	2 (10,5%) 17 (89,5%)	<0,001

ОБСУЖДЕНИЕ

На основании представленных данных можно сделать вывод, что микрометастазы в костный мозг достаточно часто (38% случаев) встречаются у больных РМЖ. Вероятность опухолевого поражения костного мозга возрастает до 59,1% при метастатическом поражении скелета.

Наиболее информативными в плане определения оккультных метастазов в костный мозг являются иммуноцитохимический (63,2%) и гистологический (57,9%) методы. Таким образом, чтобы максимально повысить вероятность диагностики метастазов в костный мозг, целесообразно одновременно пользоваться обоими методами. Выполнение трепан-биопсии костного мозга и проведение гистологического исследования необходимо еще для того, чтобы оценить размеры опухолевого очага в костном мозге, и, таким образом, решить, с чем мы имеем дело — с микрометастазами или с изолированными опухолевыми клетками. Что становится весьма актуальным для правильной классификации опухолевого процесса и составления дальнейшего плана лечения.

Несмотря на то, что микрометастазы в костный мозг не имеют каких-либо клинических проявлений, в общем анализе крови зарегистрированы статистически достоверные ускорение СОЭ и снижение уровня гемоглобина. Таким образом, можно считать, что именно эти показатели являются наиболее чувствительными у больных с подозрением на опухолевое поражение костного мозга.

Вместе с тем, как показало наше исследование, оккультные опухолевые клетки, обнаруженные в костном мозге обладают низкой пролиферативной активностью, т.е. они находятся как бы в «дремлющем» состоянии.

Обсуждая проблему микрометастазов в костный мозг, хотелось бы через призму литературных данных и собственных результатов, по-новому взглянуть на проблему метастазирования в целом.

Проблема современной онкологии заключается не в лечении первичного очага, а в терапии отдаленных метастазов, которые являются основной причиной гибели

release proteolytic substances such as collagenase, beta-3-integrin that destroy osteocytes and help tumor cells to penetrate into bones [19; 20].

On the other hand, bone tissue together with bone marrow form a rich 'soil' for tumor growth. The sinusoid structure inside bone marrow is known to fit better for generation of metastasis foci than arteriovenous capillaries. However, the spleen that also has a sinusoid structure is not frequently affected. Therefore, the tumor cell environment is of much importance for metastasis development.

Bones are a good place due to 'rich deposits' of many growth factors such as transforming growth factor (TGF-beta), insulin-like growth factors (IGF), platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF), bone morphogenetic protein (BMP) that together with collagen fragments attract tumor cells and the latter start circulating in bone marrow [12; 13]. A part of tumor cells populating bone marrow give rise to bone marrow metastases. That is why bones are the most common site of metastasis. Other tumor cells continue to stay in bone marrow in a dormant state as demonstrated by low Ki-67 expression. Low proliferative activity of tumor cells in bone marrow makes the situation still worse since these cells do not respond to systemic chemotherapy. This phenomenon accounts for lack of effect of adjuvant or even high-dose chemotherapy on elimination of bone marrow micrometastases [8; 16; 17]. After a certain time (several years or decades) tumor cells penetrate from bone marrow into circulation again to give rise to distant metastases in other sites.

The conclusion may therefore be made that bone marrow is a depot of tumor cells and plays a key role in metastasis to distant sites.

онкологических больных. За 20-летний период наблюдения 80% больных РМЖ умирает от генерализации процесса, причем отдаленные метастазы имеют более важное значение как причина смерти больных, чем регионарные рецидивы. Какая же роль в процессах метастазирования отводится костному мозгу? На наш взгляд — ключевая. И не только в случае костного метастазирования, но также и в случае не-костного. На чем основано данное предположение?

Как только у опухолевой клетки в первичном очаге появляется возможность интравазации и она попадает в кровоток, появляется потенциальная возможность метастазирования. В кровяном русле опухолевые клетки становятся чувствительными к различным защитным механизмам со стороны хозяина, включая лизис за счет лимфоцитов, моноцитов и естественных киллеров. Кроме того, происходит механическое повреждение опухолевых клеток в процессе завихрения крови и застревания в капиллярах. Исследования с инъекцией опухолевых клеток, меченных изотопами, подтвердили тот факт, что лишь одна из тысячи опухолевых клеток, достигающих циркуляторного русла, является жизнеспособной. Выживает лишь 0,1% опухолевых клеток, которые, задерживаясь в капиллярной сети отдельных органов, дают начало развитию отдаленных метастазов [3]. Первым органом, который встает на пути этих клеток, являются легкие. Причем, большая часть опухолевых клеток успешно преодолевает этот рубеж, о чем косвенно свидетельствует высокая частота костных метастазов без поражения легких. Следующим барьером является костный мозг.

В 1889 году Stephen Paget, излагая модель формирования костных метастазов, отметил: «Для меня вполне очевидно, что при раке молочной железы кости поражаются специальным путем, который не может быть объяснен только одной теорией опухолевой эмболизации» [22]. Он предположил, что свойства тканей, в которых развиваются метастазы, были определяющими в этом процессе, и тем самым заложил основу так популярной в настоящее время теории «почвы и семени».

С одной стороны, для процессов метастазирования определенную роль играют свойства «семени», т.е. опухолевой клетки. Как показали результаты исследований ряда японских ученых, клеточные линии рака молочной железы, в частности Н-31, способны вырабатывать протеолитические вещества, такие как коллагеназа, бета-3-интегрин, разрушающие слой остеоцитов и помогающие проникновению опухолевых клеток в кость [19; 20].

С другой стороны, костная ткань вместе с костным мозгом является «плодородной почвой» для опухолевого роста. Известно, что синусоидальная структура внутри костного мозга больше «подходит» для образования метастатических очагов, чем простая артерио-венозная капиллярная сеть. Однако селезенка, также имеющая синусоидальную структуру, только в редких случаях поражается метастазами. Таким образом, большое значение для развития метастазов играет среда, которая окружает опухолевые клетки.

Кость является благоприятным местом из-за «богатых залежей» многих факторов роста, таких как трансформирующий фактор роста бета (TGF-beta), инсулиноподобные факторы роста (IGFs), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), фактор ро-

ста фибробластов (FGF), костный морфогенетический белок (BMP), который вместе с коллагеновыми фрагментами притягивают клетки опухоли, и они начинают циркулировать в костном мозге [12; 13]. Часть опухолевых клеток, осевших в костном мозге, даёт начало развитию костных метастазов. Именно поэтому метастазы в кости скелета занимают первое место в структуре метастазирования. Другая часть опухолевых клеток продолжает находиться в костном мозге в «дремлющем» состоянии, о чем свидетельствует низкая экспрессия в них антигена Ki-67. Низкая пролиферативная активность опухолевых клеток в костном мозге еще больше усугубляет ситуацию, т.к. такие клетки плохо поддаются системному воздействию химиопрепаратов. Отсюда неудачи адьювантной, и даже высокодозной химиотерапии, в попытках элиминации микрометастазов в костный мозг [8; 16; 17]. Через определенный промежуток времени — может пройти несколько лет или десятков лет — опухолевые клетки из костного мозга вновь попадают в кровеносное русло и приводят к развитию метастазов в других органах.

Подводя итог вышеизложенному, можно сделать вывод, что костный мозг является депо опухолевых клеток и играет ключевую роль в процессах отдаленного метастазирования.

Литература/References

1. Берензон Д.Г., Колосков А.В., Тарасов В.А. Поражение костного мозга при солидных опухолях // Гематол. и трансфузиол., 2000. — Т. 45, №5. — С. 35-37.
2. Berenson D.G., Koloskov A.V., Tarasov V.A. Bone marrow involvement in solid tumors // Hematol. and transfusiol. — 2000. — V.45, N5. — P. 35-37. (In Russian)
3. Крохина О.В., Лetyagin В.П., Тупицын Н.Н. и соавт. Рак молочной железы. Микрометастазы в костный мозг // Вестник Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН. — 2002. — Т. 3 — С. 15-20.
4. Krokhnina O.V., Letyagin V.P., Tupitsyn N.N. et al. Breast cancer. Bone marrow micrometastases // Journal of N.N. Blokhin Russian cancer Research Center RAMS. — 2002. — V.3. — P.15-20. (In Russian)
5. Моисеенко В.М. «Естественная история» рака молочной железы // Практическая онкология: избранные лекции. Под редакцией С.А.Тюляндина и В.М. Моисеенко С.-Пб:ЦентрТомм-2004. — С. 27.
6. Moiseenko V.M. «Natural history» of breast cancer // Practical oncology: selected lectures. Eds. S.A. Tuliandin and V.M. Moiseenko. St.-Petersburg: CentrTomm. — 2004. — P. 27. (In Russian)
7. Benoy I.H., Salgado R., Elst H. et. al. Relative microvessel area of the primary tumor, and not lymph node status, predicts the presence of bone marrow micrometastases detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients with clinically non-metastatic breast cancer // Breast Cancer Res. — Vol. 7 — P. 210-219.
8. Berger U., Bettelheim R., Mansi J.L. et al. The relationship between micrometastases in the bone marrow, histopathologic features of the primary tumor in breast cancer and prognosis // Am. J. Clin. Pathol. — 1988. - Vol. 90. — P 1-6.
9. Braun S., Muller M., Hepp F. et al. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status // J. Natl. Cancer Inst. — 1998. — Vol. 90. — P. 1099-1100.

7. Braun S., Pantel K., Muller P. et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II or III breast cancer // *N Engl. J. Med.* — 2000. — Vol. 34, № 2. — P. 525-533.
8. Braun S., Kantenich C., Janni W. et al. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients // *J. Clin. Oncol.* — 2000. — Vol. 18, №1. — P. 80-86.
9. Braun S., Vogl F.D., Naume B., Janni W. et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer // *N. Engl. J. Med.* — 2005. — Vol. 353. — P. 793-802.
10. Brugger W., Buhring H.J., Grunebach F. et al. Expression of MUC-1 epitopes on normal bone marrow: implications for the detection of micrometastatic tumor cells // *J. Clin. Oncol.* — 1999. — Vol.17. — P. 1535-1544.
11. Diel I.J., Kaufmann M., Costa S.D. et al. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status // *J. Natl. Cancer Inst.* — 1996. — Vol. 88. — P 1652-1664.
12. Duffy M.J. The role proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis // *Clin. Exp. Metastasis.* — 1992. — Vol. 10. — P. 145-155.
13. Ellis V., Pyke C., Eriksen J. et al. The urokinase receptor: involvement in cell surface proteolysis and cancer invasion // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 1992. — Vol. 667. — P. 13-31
14. Funke I., Schraut 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.
15. Hermanek P., Hutter R.V.P., Sobin L.H., Wittekind C. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis // *Cancer.* — 1999. — Vol. 86. — P. 2668-2673.
16. Hempel D., Muller P., Oruzio D., et al. Adoptive immunotherapy with monoclonal antibody 17-1A to reduce minimal residual disease in breast cancer patients after high-dose chemotherapy // *Blood.* — 1997. — 90. — P.379B (abstr. 4454).
17. Hohaus S., Funk L., Brehm M., et al. Persistence of isolated tumor cells in patients with breast cancer after sequential high-dose therapy with peripheral blood stem cell transplantation // *Blood.* — 1996. — 88. — P. 128A (abstr. 501).
18. Kamby K., Guldhammer B., Vejborg I. et al. The presence of tumor cells in bone marrow at the time of first recurrence of breast cancer // *Cancer.* — 1987.- Vol. 60. — P.1306-1312.
19. Kitazawa S., Maeda S. Development of skeletal metastases // *Clin. Orthop.* — 1995. — Vol. 312. — P. 45-50.
20. Ohishi K., Fujita N., Morinaga Y., Tsuruo T. H-31 human breast cancer cells stimulate type I collagenase production in osteoblast-like cells and induce bone resorption // *Clin. Exp. Metastasis.* — 1995. — Vol. 13(4). — P. 287-295.
21. Osborne M., Rosen P. Detection and management of bone marrow micrometastases in breast cancer // *Oncology.* — 1994. — Vol. 8. — P. 25-36.
22. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of breast // *Lancet.* — 1889. — 1. — P. 571-573
23. Pantel K., Schlimok G., Angstwurm M. et al. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow // *J. Hematother.* — 1994. — P 165-173.

24. Redding H.W., Coombes R.C., Monaghan P. et al. Detection of micrometases in patients with primary breast cancer // *Lancet* 1983;ii:1271-1274.
25. Ridell B., Landys K. Incidence and histopathology of metastases of mammary carcinoma in biopsies from the posterior iliac crest // *Cancer.* — 1979. — Vol.44. — P. 1782-1788.
26. Ryall C. The technique of cancer operations, with reference to the danger of cancer infections // *BMJ.* — 1908. — Vol. 2. — P. 1005-1008.

*В.А. Спиридонова¹, С.И. Бессонов², Н.Н. Тупицын³, Д.А. Широков³,
А.М. Копылов^{1,2}*

ПЕРСПЕКТИВЫ АНТИЦИТОКИНОТЕРАПИИ Получение РНК-аптамера к интерлейкину-6 человека (hIL-6) методом SELEX

¹Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского
Государственного Университета,

²Химический факультет Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова,

³ГУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН

РЕЗЮМЕ

С помощью метода SELEX используя комбинаторную библиотеку РНК с рэндомизированным участком в 30 нуклеотидов и степенью сложности 1015 вариантов, была проведена селекция к hIL-6 в буфере, имитирующем солевой состав крови.

Для селекции с помощью аффинной хроматографии hIL-6 был иммобилизован на BrCN-активированной сефарозе, при этом hIL-6 сохранил нативную конформацию участка связывания моноклональными антителами В-Е8, что показано люминисцентной микроскопией.

Нами в результате 14 циклов селекции был выделен РНК-аптамер, специфически связывающий hIL-6. Определена первичная структура аптамера, по алгоритму Зукера, предсказана возможная вторичная структура. ArhIL-6.9 специфично связывает hIL-6 с кажущейся константой диссоциации 316 ± 130 нМ.

Ключевые слова: интерлейкин 6, аптамеры, gp130.

Список сокращений:

IL-6 — интерлейкин-6

hIL-6 — интерлейкин-6 человека

OSM — онкостатин М

VEGF — фактор роста эндотелия сосудов

bFGF — основной фактор роста фибробластов

ArhIL-6 — РНК-аптамер к интерлейкину-6 человека

BCA — бычий сывороточный альбумин

ПЦР — полимеразная цепная реакция

ВВЕДЕНИЕ

Одним из подходов для лечения минимальной остаточной болезни при опухолях является антицитокинотерапия, то есть блокада действия цитокинов и ряда других факторов, способных вызывать, ростовое или антиапоптотическое действие в отношении опухолевых клеток. Классическим примером может служить действие

*V.A. Spiridonova¹, S.I. Bessonov², N.N. Tupitsyn³, D.A. Shirokov³,
A.M. Kopylov^{1,2}*

THE PROSPECTS FOR ANTICYTOKINOTHERAPY Isolation of RNA-aptamer to human interleukin-6 by SELEX technique

¹ A.N.Belozersky Physicochemical Biology Institute, M.V.Lomonosov Moscow State University,

² Chemical Department, M.V.Lomonosov Moscow State University, Moscow

³ State N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center affiliated to the Russian Academy of Medical Sciences, Russian Federation

ABSTRACT

SELEX approach was used to select aptamers to human interleukin-6 (hIL-6) in a buffer solution mimicking blood saline composition using an RNA combinatory library with a 30-nucleotide random region at complexity of 1015 variants.

The selection procedure included immobilization of hIL-6 on BrCN-activated sepharose by affinity chromatography with hIL-6 preserving native conformation of B-E8 monoclonal antibody binding site as demonstrated by luminescent microscopy.

Fourteen selection cycles resulted in isolation of an RNA aptamer specifically binding hIL-6. The aptamer primary structure was determined and a presumptive secondary structure was developed by Zuker's algorithm. ArhIL-6 specifically bound hIL-6 with an apparent dissociation constant 316 ± 130 nM.

Key words: Human Interleukin 6, aptamers, gp130.

Список сокращений:

IL-6 — interleukin-6

hIL-6 — human IL-6

OSM — oncostatin M

VEGF — vascular endothelial growth factor

bFGF — basic fibroblast growth factor

ArhIL-6 — RNA aptamer to hIL-6

BCA — bovin serum albumin

ПЦР — polymerase chain reaction

INTRODUCTION

Anticytokinotherapy, i.e. inhibition of cytokines and some other factors associated with tumor cell growth or antiapoptosis is a useful approach to the treatment of minimal residual disease in cancer patients. Interleukin-6 (IL-6) that is the main growth factor in multiple myeloma can be a classical example. This cytokine is involved in progression of both multiple myeloma and some epithelial tumors.

интерлейкина 6, являющегося основным ростовым фактором для клеток множественной миеломы. Этот цитокин участвует в прогрессии не только множественной миеломы, но и ряда эпителиальных опухолей.

Рецепторы IL-6 экспрессируются на множестве типов клеток. Специфический рецептор gp80 не имеет цитоплазматической части. Это мембранный белок, который экспонирован на клеточной мембране или присутствует в растворимой форме. Универсальный рецептор для всех цитокинов группы IL-6 — gp130 отвечает за передачу сигнала от IL-6 с мембраны в цитоплазму клеток и ассоциирован с JAK-киназой [1].

В структуре IL-6 картированы 3 района, отвечающих за взаимодействие с рецепторами: одно место контакта с gp80 и два места контакта с gp130. Только в составе комплекса с gp80 IL-6 способен взаимодействовать с gp130. [2;3]. Комплекс gp80-IL-6 взаимодействует с gp130, при этом происходит димеризация двух молекул gp130 и образуется гексамерный комплекс, состоящий из двух молекул IL-6, двух молекул gp80 и двух молекул gp130. Образование комплекса активирует JAK-киназы, которые фосфорилируют остатки тирозина в факторе STAT3. В результате каскада реакций происходит активация целого ряда генов связанных с активацией роста и антиапоптотическими эффектами при различных заболеваниях [3].

При множественной миеломе наиболее распространенным способом блокады действия цитокина в клинике является применение моноклональных антител, из которых наиболее эффективными, разрешенными в клинике, являются антитела B-E8, полученные J.Wijdenes (Франция). Эти антитела нейтрализуют биологическое действие ИЛ-6. Наиболее эффективными антителами оказались в элиминации остаточных (резидуальных) клеток множественной миеломы. Современные программы лечения множественной миеломы включают высокодозную химиотерапию с трансплантацией стволовых гемопоэтических клеток. Именно в сочетании с этим методом применяются в настоящее время с лечебной целью МКА B-E8. Смысл данного подхода состоит в том, что после высокодозной химиотерапии стромальные клетки костного мозга продуцируют огромные количества интерлейкина 6. Он в свою очередь оказывает антиапоптотическое действие на поврежденные химио- (мелфалан) и гормонотерапией (дексаметазон) опухолевые клетки, таким образом эти клетки выживают, сводя эффект лечения на нет. Антитела нейтрализуют ИЛ-6 и его антиапоптотическое действие, тем самым способствуя достижению полной ремиссии у больных. Подобный подход применялся и в Онкоцентре, а наибольшее распространение получил во Франции.

Мы задались вопросом, могут ли быть получены аптамеры к ИЛ-6, способные блокировать активность цитокина — интерлейкина 6?

Метод SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment) является относительно новым, но уже мощным методом получения аптамеров к различным мишеням [4–10]. Аптамеры (от лат. *artus* — подходящий) — молекулы, отобранные из комбинаторных библиотек нуклеиновых кислот, обладающие высокими сродством и специфичностью к своим мишеням. Метод SELEX нашел широкое применение для получения аптамеров к самым разным веществам. Получены аптамеры к белкам, нуклеиновым кислотам, антибиотикам, сахарам и многим другим органическим соединениям [11–20].

IL-6 receptors are expressed on many cell types. Specific receptor gp80 has no cytoplasmic domain. This is a membrane protein that is expressed on cell membrane or exists in soluble form. The common receptor of the whole IL-6 family, gp130, is responsible for IL-6 signal transmission from the membrane to cell cytoplasm and is associated with JAK-kinase [1].

IL-6 molecule contains 3 regions responsible for interaction with receptors: one contact site for gp80 and two contact sites for gp130. IL-6 can interact with gp130 only as a part of a complex with gp80 [2;3]. Reaction of the gp80-IL-6 complex with gp130 results in dimerization of two gp130 molecules and generation of a hexamer complex consisting of two IL-6 molecules, two gp80 molecules and two gp130 molecules. The complex generation leads to activation of JAK-kinase that phosphorylates tyrosine residues in STAT3. Thus triggered reaction cascade results in activation of several genes associated with growth activation and antiapoptotic effects in a variety of diseases [3].

In multiple myeloma the most common anticytokine therapy involves administration of monoclonal antibodies (MAB) B-E8 produced by J.Wijdenes (France) is the most effective MAB approved for clinical use. These antibodies neutralize IL-6 biologic activity and are most efficient in elimination of multiple myeloma residual cells. Recent regimens for the treatment of multiple myeloma include high-dose chemotherapy with hemopoietic stem cell transplant, and B-E8 therapy. Rationale of this method is as follows. After high-dose chemotherapy bone marrow stromal cells produce large amounts of IL-6. The cytokine produces antiapoptotic effect on tumor cells damaged as a result of chemotherapy (melfalan) and hormonotherapy (dexamethasone) to help these cells survive thus canceling the treatment effect. MAB neutralizes IL-6 and its antiapoptotic effect to promote complete response. This approach was applied in the N.N.Blokhin RCRC and most widely used in France.

We attempted to answer the question, whether it is possible to produce aptamers to IL-6 able to inhibit its cytokine activity?

SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment) is a rather new but powerful technique to obtain aptamers to various targets [4–10]. Aptamers (Latin *aptus*, appropriate) are molecules selected from combinatorial libraries of nucleic acids that demonstrate high affinity and specificity to their targets. The SELEX technique is widely used to obtain aptamers to a broad range of substances. Investigators have isolated aptamers to proteins, nucleic acids, antibiotics, sugars and many other organic compounds [11–20].

Aptamers may be considered functional analogs of MABs. Complexes of aptamers with their targets are compatible by strength with antigen-antibody conjugates.

Isolation of aptamers originally lacking nucleic acid binding capacity is a rather difficult problem.

RNA aptamers to basic fibroblast growth factor (bFGF) and vascular epithelial growth factor (VEGF) have been isolated [21–24]. The fact that they have a heparin-binding site makes the problem of their isolation easier. Non-RNA-binding proteins, VEGF and bFGF, contain regions with a potentially high affinity to polyanions,

Аптамеры можно считать функциональными аналогами моноклональных антител. Комплексы аптамеров с их мишенями сопоставимы по прочности с комплексами антиген-антитело.

Получение аптамеров к белкам, исходно не связывающим нуклеиновые кислоты является достаточно сложной задачей.

Были получены аптамерные РНК к таким факторам, как основной фактор роста фибробластов (bFGF) и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [21–24]. Задачу облегчало, что они имеют гепарин-связывающий район. VEGF и bFGF, являясь по своей природе РНК-несвязывающими белками, содержат районы, имеющие потенциально высокое сродство к полианионам, в том числе РНК. Эта особенность и определила успех SELEX к этим белкам.

Другим ростовым фактором, к которому были получены аптамеры на основе РНК, является онкостатин М (OSM) [25]. OSM, как и IL-6, не является гепарин-связывающим белком, т.е. не имеет исходного сродства к нуклеиновым кислотам, как к полианионам. Тем не менее, аптамеры, полученные к нему, обладают достаточно высоким сродством и специфичностью.

Целью настоящей работы является получение аптамерных РНК к IL-6 человека (hIL-6). Получение аптамеров к hIL-6 позволит более эффективно изучать механизмы взаимодействия IL-6 с рецепторами и его системы передачи сигнала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Иммобилизация hIL-6 на BrCN-Сефарозе

Смолу промывали 1 мМ раствором HCl из расчета 200 мл кислоты на 1 г сухой бромциан-активированной Сефаразы (BrCN-activated Sepharose 4B, Amersham-Pharmacia), далее промывали буфером для связывания 20 мМ HEPES-KOH (pH = 7,6), 1 мМ MgCl₂, 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl. Затем смолу инкубировали с двухкратным объемом раствора hIL-6 с таким расчетом, чтобы концентрация иммобилизованного hIL-6 на смоле составляла не менее 10 мМ.

Прямым методом определения емкости смолы по hIL-6 является определение количества белка с помощью аминокислотного анализа. В пробе содержалось 7,0–7,3 мкг белка, что соответствует 100 % иммобилизация. Емкость смолы по белку составляла 1 мкмоль hIL-6/мл из расчета мол. массы IL-6 21 кД.

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда, используя БСА (бычий сывороточный альбумин) как стандарт [26].

Определение степени иммобилизации

BrCN-активированную сефарозу, с иммобилизованным на ней hIL-6 инкубировали в фосфатном буфере (PBS), содержащем 1 % BSA и 0,01 % NaN₃. Затем добавляли моноклональные антитела В-Е8 (любезно предоставлены J.Wijdenes, Франция) к hIL-6 до концентрации 25 мкг/мл. После этого инкубировали с FITC-меченой антисывороткой против Ig мыши (НПЦ «Медбиоспектр», Москва.), добавленной до концентрации 25 мкг/мл. Флуоресценцию детектировали визуально

including RNA. This feature was determinant for the success of SELEX in isolation of aptamers to these proteins.

There are also RNA aptamers to another growth factor, oncostatin M (OSM) [25]. Like IL-6 OSM is not a heparin-binding protein, i.e. it has no original affinity to nucleic acids as polyanions. However, aptamers to this molecule have rather high affinity and specificity.

The purpose of this study was to isolate RNA aptamers to hIL-6. Aptamers to hIL-6 may be used to further improve our understanding of mechanisms of IL-6-receptor interaction and IL-6 signalling.

MATERIALS AND METHODS

hIL-6 Immobilization on BrCN sepharose

Resin was washed with 1 mM HCl solution containing 200 ml HCl per g dry bromine cyan-activated sepharose (BrCN-activated Sepharose 4B, Amersham-Pharmacia), then washed with binding buffer containing 20 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 1 mM MgCl₂, 140 mM NaCl, 5 mM KCl. Then the resin was incubated with double volume hIL-6 solution to ensure an least 10 mM concentration of immobilized hIL-6 on resin.

Protein measurement by amino acid assay is a direct method to determine hIL-6 capacity of resin. The specimen contained 7.0 to 7.3 mcg protein, i.e. demonstrated a 100% immobilization. Protein capacity of the resin was 1 mcmol hIL-6 for IL-6 with a 21 kD molecular weight.

Protein concentration was measured by Bradford technique using bovine serum albumin (BSA) as a standard [26].

Determining degree of immobilization

BrCN-activated sepharose with immobilized hIL-6 was incubated in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% BSA and 0.01% NaN₃. Then MAB B-E8 (kindly supplied by J.Wijdenes, France) was added to hIL-6 to a 25 mcg/ml concentration. After that the solution was incubated with FITC-labeled antiserum to mouse Ig (Medbiospecter, Moscow) added as required to a concentration 25 mcg/ml. Fluorescence was detected visually using an AXIOPLAN-2 (Carl Zeiss, Germany) microscope at 520 nm under light illumination at a 495 nm wavelength.

RNA library

We chose a 30-nucleotide random sequence. This sequence allowed at least 4³⁰ = 10¹⁸ variants and selection of winner aptamers. Besides, a short aptamer may have a more stable structure. The RNA simplest structural element, a pin with a short stalk and a small loop, requires about 10 to 20 nucleotide residues.

The starting single-stranded DNA library containing a degenerate sequence and flanked by restriction sites and primers was synthesized chemically. The flanking portions were 18 and 43 nucleotide residues in length.

The next oligonucleotides were synthesized by a solid-phase technique using an AP-380B (Applied Biosystems) synthesizer. Cryptic nucleoside β-cyanethylphospho-

в поле микроскопа AXIOPLAN-2 (Carl Zeiss, Германия) при 520 нм при облучении светом с длиной волны 495 нм.

Библиотека РНК

Нами была выбрана длина рандомизированной последовательности в 30 нуклеотидов. Разнообразие вариантов такой последовательности составляло не менее $4^{30}=10^{18}$ вариантов, что позволяло отобрать аптамеры-«победители». К тому же аптамер небольшой длины может обладать более стабильной структурой. Простейший структурный элемент РНК — это шпилька с коротким стеблем и небольшой петлей — требует около 10–20 нуклеотидных остатков.

Исходная библиотека одноцепочечной ДНК, содержащая вырожденную последовательность и фланкирующая сайтами рестрикции и праймерами, синтезируется химически. Фланкирующие части имеют длину 18 и 43 нуклеотидных остатков.

Следующие олигонуклеотиды были синтезированы твердофазным способом на автоматическом синтезаторе AP-380B (Applied Biosystems). Были использованы защищенные β -цианэтилфосфоамидиты нуклеозидов (Pharmacia). Разделение проводили на колонках Waters HPLC system.

Транскрипцию проводили в объеме 50–100 мкл в буфере 40 мМ Трис-НСl (рН=8,0), 6 мМ $MgCl_2$, 10 мМ DTT, 100 мМ NaCl, 2 мМ спермидин. В реакцию вводили: rATP, rGTP, rCTP до конечной концентрации 2 мМ, rUTP до концентрации 0,5 мМ; 1,5–3 мкл $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-rUTP}$ с удельной активностью 600 МБк/мл (г. Обнинск); 5–15 мкг ДНК; 20–40 единиц активности ингибитора рибонуклеазы (Fermentas, Литва); 50–100 единиц активности T7 РНК полимеразы (Fermentas, Литва). Реакцию проводили в течение 3,5 часов при 35°C.

РНК очищали в денатурирующем 8% полиакриламидном геле (7 М мочевины). РНК детектировали автордиографией. Зону, отвечающую полноразмерному продукту длиной 80 нуклеотидов, элюировали из геля и РНК экстрагировали смесью фенол-хлороформ и осаждали спиртом. Количество РНК определяли спектрофотометрически при 260 нм. Удельное мечение РНК составляло 7–12 тыс. имп/мин/пмоль. Радиоактивность РНК измеряли по Черенкову на счетчиках Tracor Analytic, Франция.

Реакцию обратной транскрипции проводили в объеме 30 мкл в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl (рН = 8,3), 4 мМ $MgCl_2$, 50 мМ KCl, 10 мМ DTT, 0,2 мМ dNTP, 30 пкмоль праймеров, и 10 единиц активности обратной транскриптазы M.MuLV I (Fermentas, Литва) в течение 1 часа при 42°C. Матрицей служила РНК, элюированная со смолы.

Полимеразную цепную реакцию проводили в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl, (рН = 8,8), 2 мМ $MgCl_2$, 0,1 мМ DTT, 0,2 мМ dNTP, 0,7 мкМ праймеров, 0,1 % BSA, 10 пикомоль кДНК и 20 единиц активности Taq-полимеразы (Fermentas, Литва). Амплификацию проводили с помощью термоциклера Perkin Elmer Cetus в течение 25 циклов по схеме: денатурация — 30 сек., 95°C, отжиг праймеров — 30 сек., 65°C, элонгация — 30 сек., 72°C.

roamidites (Pharmacia) were used. Waters HPLC system columns were used for separation.

Transcription was carried out in 50–100 μ l buffer with 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 6 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 100 mM NaCl, 2 mM spermidine. The following agents were added: rATP, rGTP, rCTP to a final concentration 2 mM, rUTP to a final concentration 0.5 mM, 1.5–3 μ l $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-rUTP}$ with a specific activity 600 MBq/ml (Obninsk), 5–15 μ g DNA, 20–40 activity units of ribonuclease inhibitor (Fermentas, Lithvonia), 50–100 activity units of T7 RNA polymerase (Fermentas, Lithvonia). The reaction continued 3.5 h at 35°C.

RNA was purified in 8% polyacrylamide gel denaturant (7 M urea). RNA was detected by autoradiography. Elution of a region corresponding to full-size 80-nucleotide product from the gel and RNA extraction were achieved using phenol-chloroform mixture, RNA was precipitated with alcohol. RNA was measured by spectrophotometry at 260 nm. RNA specific labeling was 7,000–12,000 pulses per min per pmol. RNA radioactivity was measured by Cherenkov's technique using Tracor Analytic (France) counters.

Reaction of reverse transcription was carried out in 30 μ l buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 4 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 10 mM DTT, 0.2 mM dNTP, 30 μ M cDNA and 20 activity units of Taq-polymerase (Fermentas, Lithvonia). Amplification, 25 cycles, was conducted using a Perkin Elmer Cetus thermocycler, by the following procedure: denaturation 30s at 95°C, primer hybridization 30 s at 65°C, elongation 30 s at 72°C.

Selection

Radiation-labeled RNA 1 μ M (300–800 pM) was denatured 2 min at 95°C and cooled on ice. After that it was bound to hIL-6 immobilized on resin at 10 μ M/ml resin. The mixture was incubated 1 h at room temperature, resin precipitation was by centrifugation. Sepharose was washed with 50–1000 μ l buffer 4–5 times for binding. Bound RNA was measured by Cherenkov's radioactivity counting technique. Bound RNA was eluted with 7 M guanidine chloride, purified by extraction with phenol-chloroform mixture and precipitated with alcohol. The whole RNA amount was transformed into cRNA by reverse transcription. Then half of the reverse transcription reaction mixture was used as a matrix for PCR amplification. Amplified DNA was used to produce RNA for the next selection cycle. A total of 14 selection cycles was performed.

To assess affinity of RNA intermediate enriched pool or individual aptamers to hIL-6 we carried out conjugation in 200 μ l solution. 50 nM RNA was incubated with the protein 1 h at room temperature. Protein-bound RNA was separated by ultrafiltration on nitrocellulose membranes (Hybond-C Amersham). The binding was measured by Cherenkov's radioactivity counting technique.

Enriched RNA aptamer fraction cloning

Enriched RNA aptamer fraction was transformed into two-stranded DNA by PCR, treated with Sma I and Hind III restrictases, and added to ligation reaction with plasmid pUC19 prepared using the same restrictases.

Селекция

Раствор радиоактивно меченой РНК концентрацией 1 мкМ (300–800 пкмоль) денатурировали при 95°C в течение 2 минут, охлаждали во льду. Связывание проводили с hIL-6, иммобилизованном на смоле в концентрации 10 мкМ/мл смолы. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, смолу осаждали центрифугированием. Сефарозу промывали 50–1000 мкл буфером для связывания 4–5 раз. Количество связавшейся РНК оценивали методом радиоактивного счета по Черенкову. Связавшуюся РНК элюировали раствором 7 М гуанидин хлорида, очищали экстракцией смесью фенол:хлороформ и осаждали спиртом. Все количество РНК переводили в кДНК методом обратной транскрипции. Затем половину реакционной смеси реакции обратной транскрипции использовали как матрицу при амплификации ПЦР. Амплифицированную ДНК использовали для получения РНК для следующего цикла селекции. Таким образом, было проведено 14 циклов селекции.

Для оценки сродства промежуточного обогащенного пула РНК или отдельных аптамеров к hIL-6 проводили комплексообразование в растворе в объеме 200 мкл. 50 нМ РНК инкубировали с белком в течение 1 часа при комнатной температуре. Связавшиеся с белком молекулы РНК отделяли ультрафильтрацией на нитроцеллюлозных мембранах (Nubond-C Amersham). Степень связывания определяли методом радиоактивного счета по Черенкову.

Клонирование обогащенной фракции РНК-аптамеров

Обогащенную фракцию РНК-аптамеров переводили в двукратную ДНК с помощью ПЦР, обрабатывали рестриктазами Sma I, Hind III и вводили в реакцию лигирования с плазмидой pUC19, подготовленной одноименными рестриктазами.

Лигазная смесь состояла из 100 нг вектора, десятикратного мольного избытка фрагмента, буфера для T4 ДНК лигазы (66 мМ Трис-НСl pH=7,5, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ ДТТ, 10 мМ АТФ), 4 единицы активности T4 ДНК лигазы (Fermentas, Литва). Конечный объем смеси составлял 20 мкл. Лигирование проводили 16 часов при +4°C.

Клетки *E. coli* штамма JM109, трансформированные плазмидой, выращивали при 37°C в среде LB с ампициллином в объеме 5 мл в течение 16 часов при интенсивном перемешивании. Затем клетки отделяли от культуральной среды центрифугированием (9000 об./мин. 5 мин) и разрушали. Плазмиду выделяли с помощью High Pure Plasmid Isolation Kit фирмы Roche.

При получении компетентных клеток и при проведении трансформации использовали стандартные протоколы фирмы Life Science. Суспензию клеток, трансформированную лигазной смесью, высевали на чашки Петри с агаром и ампициллином в концентрации 100 мкг/мл. Чашки инкубировали 16 часов. Отдельные клоны пересевали и выделяли из них плазмиды, затем анализировали на наличие вставки с помощью ПЦР, используя праймеры к константным областям библиотеки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Препарат физиологически активного интерлейкина человека hIL-6 был любезно предоставлен J. Wijdenes (Диаклон, Франция).

The ligase mixture consisted of 100 ng vector, ten-fold molar excess of the fragment, buffer for T4 DNA ligase (66 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 10 mM ATP), 4 activity units of T4 DNA ligase (Fermentas, Lithonia). The mixture final volume was 20 µl. Ligation was carried out at +4°C.

Plasmid-transformed *E. coli* strain JM109 cells were cultured 16 h at 37°C in LB medium with ampicillin 5 ml under intensive stirring. Then the cells were separated from the culture medium by centrifugation (9,000 rpm, 5 min) and destroyed. The plasmid was isolated using a High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche).

Standard Life Science protocols were used to produce competent cells and to carry out transformation. Cell suspension transformed with ligase mixture was plated onto Petri dishes with agar and ampicillin 100 µg/ml. The dishes were incubated 16 h. Individual clones were replated to isolate plasmids and analyzed for insertions by PCR using primers to constant regions of the library.

RESULTS AND DISCUSSION

Physiologically active hIL-6 was kindly supplied by J. Wijdenes (Diaklone, France).

To perform SELEX procedure hIL-6 was immobilized on BrCN-activated sephrose by standard technique. Non-reacting active resin groups were blocked with 1 M Tris-HCl (pH 7.6).

Degree of hIL-6 immobilization on sepharose was assessed by immunodetection procedure involving indirect immunofluorescence. Resin suspension was treated with MAB B-E8 against hIL-6 that inhibited hIL-6-receptor interaction. Then the suspension was treated with FITC-labeled F(ab)2' fragments of antibodies to murine immunoglobulins. Original resin free from immobilized hIL-6 and having its active groups blocked was used as control. Sepharose particles were studied by microscopy both in transmitted light and by luminescence at 495 nm in fluorescent microscope. Intensive fluorescence of resin particles with immobilized hIL-6 and no staining on control particles were qualitative evidence of the reaction (pic. 1).

Measurement of hIL-6 capacity of the resin was done by Bradford reaction. After immobilization the protein was undetectable in supernatant. At a 90% immobilization the supernatant should have contained 2.5 µg protein, which was within the range of sensitivity of the assay. Therefore the reaction proved quantitative immobilization of protein on sepharose. We used a combinatory library recommended by Ellington who is a recognized expert in SELEX [27]. Pic. 2 demonstrates primary structure of the library. The library was synthesized using an automated synthesizer and equivalent number of synthones for synthesis of randomization region. The library contained a 30-nucleotide random region flanked by two regions with a fixed primary structure containing 26 (right) and 24 (left) nucleotides.

Amplification of the library by PCR was conducted using primers complementary to its constant regions (pic. 2). 3'-Terminal primer contained phage T7 RNA-polymerase promoter for RNA transcription.

Choice of buffers for the selection was determined by purpose and target of aptamers to be selected. For non-RNA-binding proteins buffers that mimic environment of the

Для проведения SELEX hIL-6 иммобилизовали на BrCN-активированной сефарозе по стандартной методике. Не вступившие в реакцию активные группы смолы блокировали обработкой раствором 1 М Трис-НСl (рН = 7,6).

Для определения степени иммобилизации hIL-6 на сефарозе проводили иммунодетекцию в непрямой реакции иммунофлуоресценции. Суспензию смолы обрабатывали моноклональными антителами В-Е8 к hIL-6, которые блокируют взаимодействие hIL-6 с рецептором. После чего проводили обработку FITC-мечеными F(ab)2' фрагментами антител к иммуноглобулинам мыши. В качестве контроля использовали исходную смолу, без иммобилизованного hIL-6, с блокированными активными группами. Частицы сефарозы наблюдали под микроскопом, как в проходящем свете, так и в люминисценции при облучении светом с длиной волны 495 нм во флуоресцентном микроскопе. Интенсивная флуоресценция частиц смолы с иммобилизованным hIL-6 и отсутствие окраски контрольных частиц качественно свидетельствовали о том, что иммобилизация прошла (рис. 1).

Для количественного определения емкости смолы по hIL-6 использована реакция Брэдфорда. После иммобилизации белок в супернатанте не детектировался. При выходе иммобилизации 90 % в супернатанте должно было быть 2,5 мкг белка, что находится в пределах чувствительности метода. Следовательно, иммобилизация белка на сефарозе прошла количественно. В качестве исходной была выбрана комбинаторная библиотека РНК, рекомендованная одним из лидеров в области SELEX — Эллингтоном [27]. На рис. 2 показана ее первичная структура. Библиотека была синтезирована на автоматическом синтезаторе с использованием эквивалентных количеств четырех синтонов для синтеза рэндомизированной области. Библиотека содержала тридцатинуклеотидную рэндомизированную область, ограниченную по краям двумя участками с фиксированной первичной структурой: справа — 26 нуклеотидов, слева — 24 нуклеотида.

Для амплификации библиотеки ПЦР использованы праймеры, комплементарные константным частям библиотеки (рис. 2). 3'-концевой праймер содержал промотор РНК-полимеразы фага Т7 для транскрипции РНК.

Выбор буфера для селекции зависит от того, в каких целях и к какой мишени получают аптамеры. В случае РНК-несвязывающих белков состав буфера выбирали, основываясь на составе среды, в которой функционирует белок-мишень. Поэтому в качестве буфера для селекции РНК к hIL-6 был выбран буфер, соответствующий солевому составу крови. Буфер содержал 20 мМ HEPES-КОН (рН=7,6), 1 мМ MgCl₂, 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl

«Строгость» селекции РНК-аптамеров к hIL-6 регулировали путем изменения соотношения белок:РНК. На первом цикле селекции это соотношение составляло 4:1. На последующих циклах селекции это соотношение было еще ниже: циклы 2–5 проводили при соотношении белок:РНК = 4:1. В табл. 1 представлены условия связывания и относительные количества РНК, связавшейся с иммобилизованным на смоле hIL-6.

Выбор таких соотношений был продиктован тем, что на первом цикле селекции полезнее использовать менее строгие условия связывания, чем на последующих циклах. чтобы сохранить представленность для всех вариантов библиотеки.

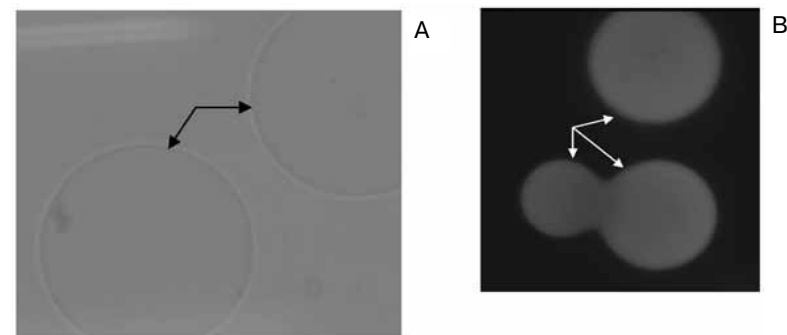


Рис.1.
а) Частицы сефарозы в поле микроскопа в проходящем свете.
б) Флуоресцентное окрашивание антителами шариков сефарозы с «пришитым» к ним интерлейкином-6. Стрелками показаны флуоресцирующие частицы сефарозы.

Рис. 1.
а) Sepharose particles in transmitted light
б) Fluorescent antibody staining of sepharose balls with IL-6. Arrows show fluorescent sepharose particles.

Table 1

Conditions for selection of RNA aptamers to hIL-6. RNA concentration 1 mM

Cycle No.	Protein/RNA	% of binding
1	4:1	0,2
2	2:1	1,5
3	2:1	1,34
4	2:1	1,0
5	2:1	1,0
6	1:1	0,7
7	1:1	0,8
8	1:2	0,8
9	1:2	2,0
10	1:4	2,1
11	1:4	2,7
12	1:6	0,9
13	1:6	1,2
14	1:8	1,1

target proteins are usually chosen. Therefore to select RNA against hIL-6 we used a buffer mimicking blood saline composition. The buffer contained 20 mM HEPES-KОН (рН 7.6), 1 mM MgCl₂, 140 mM NaCl, 5 mM KCl.

14. кДНК-14 была клонирована в вектор pUC19 по сайтам рестрикции HindIII и SmaI. Для анализа были выбраны 39 случайных клонов, 24 из которых содержали вставку в векторную ДНК. Наличие вставки идентифицировали ПЦР с праймерами к константным частям библиотеки. Для определения способности РНК этих клонов связываться с hIL-6 были выбраны 15 РНК. При 50-кратном избытке белка с ним связывался лишь аптамер из клона № 9 (arhIL-6.9). кДНК arhIL-6.9 была секвенирована с помощью ПЦР, фрагмент последовательности представлен на рис. 3.

Первичная структура константной части arhIL-6.9 совпадает со структурой исходной библиотеки, за исключением делеции последнего нуклеотида в левой константной части библиотеки. По-видимому, делеция возникла на стадии амплификации или обратной транскрипции. Возникновение этой мутации при селекции, вероятно, привело к появлению молекул РНК с повышенной аффинностью к hIL-6 и обогащению библиотеки именно этим вариантом. Подобные эффекты были отмечены авторами в работе [28; 29]. Для оценки специфичности к hIL-6 полученный аптамер связывали с БСА. Даже при 50-кратном избытке последнего связывания не наблюдалось.

Строили изотерму связывания arhIL-6.9 hIL-6 в широком диапазоне концентраций белка (рис. 4).

Данные связывания были линеаризованы в координатах Скотчарда. По тангенсу угла наклона прямой удалось оценить кажущуюся константу диссоциации комплекса аптамера с hIL-6, она составила 316 ± 130 нМ.

Используя алгоритм Зукера (программа RNAstructure 7.0) предложена модель вторичной структуры arhIL-6.9, которая представлена на рис. 5.

Интересно сравнить стабильность предполагаемой вторичной структуры полученного аптамера с параметрами какой-либо природной РНК примерно аналогичной струк-

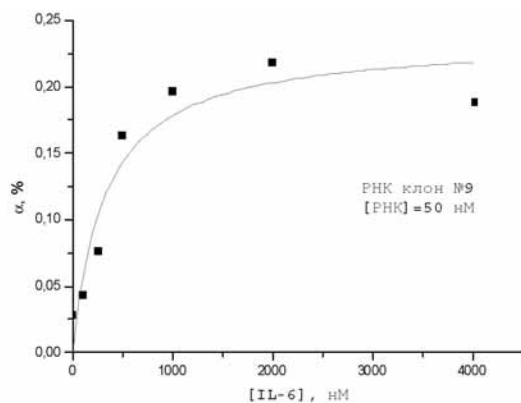


Рис. 4. Изотерма связывания hIL-6 с arhIL-6_9.

Pic. 4. Isotherm of arhIL-6.9 binding to hIL-6

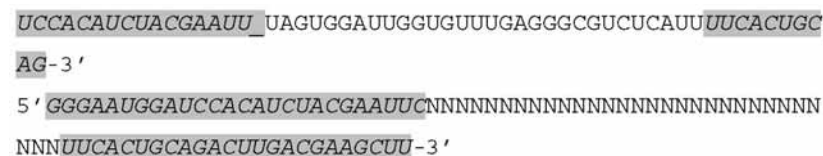


Рис. 3. Фрагмент первичной структуры arhIL-6_9 и исходной библиотеки. Серым цветом выделены нуклеотиды константной части библиотеки.

Pic. 3. ArhIL-6.9 and initial library structure fragments. Grey color indicates nucleotides of the library constant region

Hind III and Sma I. 39 random clones were used for analysis, of which 24 contained insertions in the vector DNA. The presence of the insertions was verified by PCR with primers to constant regions of the library. 15 RNAs were used to determine the ability of these RNA clones to bind hIL-6. Only clone 9 aptamer (arhIL-6.9) bound the protein at a 50-fold protein excess. cDNA arhIL-6 was sequenced by PCR, a sequence fragment is shown in pic. 3.

Primary structure of the arhIL-6.9 constant region coincided with the structure of the starting library except for deletion of the last nucleotide in the left constant region of the library. This deletion might arise at the amplification or reverse transcription stages. Occurrence of this mutation as a result of selection might led to emergence of RNA molecules with increased affinity to hIL-6 and enrichment of the library with this variant. Similar effects are mentioned in [28;29]. The resulting aptamer was bound to BSA to assess its specificity for hIL-6. There was no binding even at a 50-fold BSA excess.

Pic. 4 demonstrates isotherm of arhIL-6.9 binding to hIL-6 for a broad range of protein concentrations.

The binding data were linearized in Scatchard's coordinates. We assessed apparent dissociation constant of the aptamer-hIL-6 complex by tangent of the curve slope that was 316 ± 130 nM.

A presumptive secondary structure of arhIL-6.9 was developed using Zuker's algorithm (RNA Structure, 7.0) (pic. 5).

It seems interesting to compare stability of this presumptive secondary structure of the aptamer with parameters of a natural RNA with similar structure and ability to bind pro-

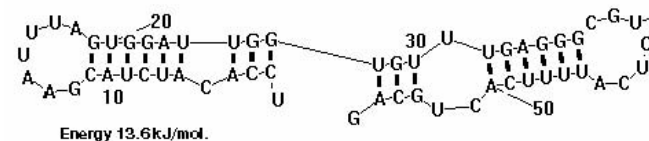


Рис. 5. Модель предполагаемой вторичной структуры аптамера RAhIL-6_9.

Pic. 5. Model of presumptive secondary structure of RAhIL-6.9 aptamer

туры, которая связывает белок. Так, например, межцистронный район S12 — S7 str оперона *E. coli* представлен РНК длиной 103 нуклеотида и может иметь шпильчатую структуру со свободной энергией около 30 кДж/моль, что вполне сопоставимо со значением 13,6 кДж/моль, полученным для arhIL-6.9. Это позволяет надеяться, что аптамер обладает достаточно стабильной структурой. для дальнейшего исследования его свойств.

В настоящее время аптамер проверяется на способность ингибировать действие IL-6 в культуре клеток множественной миеломы. Первые результаты свидетельствуют о том, что аптамеры способны ингибировать димеризацию gp130, индуцируемую IL-6.

Работа поддержана грантами РФФИ № 05-04-49750, РФФИ-офи № 07-04-12221.

Авторы благодарят Головина А.В. за помощь при оформлении статьи.

Литература/References

1. *Poli V.* The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem*, 1998, 273, 29279-29282.
2. *Tupitsyn, N.*, et al., Functional interaction of the gp80 and gp130 IL-6 receptors in human B cell malignancies. *Clin Lab Haematol*, 1998, 20, 345-352.
3. *Autissier, P.*, et al., Dimerization and activation of the common transducing chain (gp130) of the cytokines of the IL-6 family by mAb. *Int Immunol*, 1998, 10, 1881-1889.
4. *Eaton BE*, et al. Post-SELEX combinatorial optimization of aptamers, *Bioorg. Med. Chem.*, 1997, 5, 1087-1096.
5. *Gold L., Polisky B., Uhlenbeck O., Yarus M.*, Diversity of oligonucleotide functions, *Annu. Rev. Biochem.*, 1995, 64, 763-797.
6. *Gold L.* Oligonucleotides as research, diagnostic, and therapeutic agents, *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 13581-13584.
7. *Osborne S.E., Matsumura I., Ellington A.D.* Aptamers as therapeutic and diagnostic reagents: problems and prospects, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1997, 1, 5-9.
8. *Копылов А.М., Спиридонова В.А., Парк К.-Х.* Применение аптамеров в медицинской диагностике и терапии, *Российский химический журнал*, 1998, 42, 89-96.
9. *Копылов А.М., Спиридонова В.А., Парк К.-Х.* Application of aptamers in medical diagnostics and therapy. *Russian Chemical Journal*. — 1998. — V.42. — P.89-96 (In Russian)
10. *Копылов А.М., Спиридонова В.А.* Комбинаторная химия нуклеиновых кислот: SELEX, *Мол. биол.* 2000, 34, 1097-1113.
11. *Копылов А.М., Спиридонова В.А.* Combinatorial chemistry of nucleic acids: SELEX. *Mol. Boil.* - 2000. -V.346. -P.1097-1113
12. *Ellington AD, Szostak JW*, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, 1990, 346, 818-822.
13. *Sassanfar M., and Szostak J.W.* An RNA motif that binds ATP, *Nature*, 1993, 364, 550-553.
14. *Davis J.H., Szostak J.W.* Isolation of high-affinity GTP aptamers from partially structured RNA libraries, *PNAS*, 2002, 99, 11616-11621.
15. *Jiang L., and Patel D.J.* Solution structure of the tobramycin-RNA aptamer complex, *Nat. Struct. Biol.*, 1998, 5, 769-773.
16. *Lorsch J.R., Szostak J.W.* In vitro selection of RNA aptamers specific for cyanocobalamin, *Biochemistry*, 1994, 33, 973-982.

teins. For example, the intercytrone region S12-S7 str of *E. coli* operone is a 103-nucleotide RNA that may have a pin-like structure with a free energy about 30 kJ/mol which is quite similar to the 13.6 kJ energy of arhIL-6.9. This suggests that the resulting aptamer has a rather stable structure and may be investigated in further studies.

Now the aptamer is tested for the ability to inhibit IL-6 in multiple myeloma cell culture. First results prove the aptamer to be able to inhibit IL-6-induced gp130 dimerization.

The study was supported with Russian Foundation for Basic Research grants 05-04-49750, 07-04-12221.

The authors acknowledge the contribution of A.V.Golovin in the getting up of this presentation.

15. *Sussman D., Nix J.C., Wilson C.*, The structural basis for molecular recognition by the vitamin B12 RNA aptamer, *Nat. Struct. Biol.*, 2000, 7, 53-57.
16. *Burgstaller P.G.A., von der Eltz H, Roeder A, Famulok M.* RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity, *Nucleic Acid Res.*, 1996, 24, 1029-1036.
17. *Roychowdhury-Saha M., Lato S.M., Shank E.D., Burke D.H.* Flavin recognition by an RNA aptamer targeted toward FAD, *Biochemistry*, 2002, 41, 2492-2499.
18. *Cowan J.A., Ohyama T., Wang D., Natarajan K.* Recognition of a cognate RNA aptamer by neomycin B: quantitative evaluation of hydrogen bonding and electrostatic interactions, *Nucleic Acid Res.*, 2000, 28, 2935-2942.
19. *Klug, S.J., and Famulok, M.* All you wanted to know about SELEX, *Mol. Biol. Report*, 1994, 20, 97-107.
20. *Bock L.C., Griffin L.C., Latham J.A., Vermaas E.H., Toole J.J.* Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin, *Nature*, 1992, 355, 564-566.
21. *Jellinek, D.*, et al. Potent 2'-amino-2'-deoxypyrimidine RNA inhibitors of basic fibroblast growth factor. *Biochemistry*, 1995. 34(36), 11363-11372.
22. *Jellinek, D.*, et al. Inhibition of receptor binding by high-affinity RNA ligands to vascular endothelial growth factor. *Biochemistry*, 1994, 33(34), 10450-10456.
23. *Green, L.S.*, et al. Nuclease-resistant nucleic acid ligands to vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Chem Biol*, 1995. 2(10), 683-695.
24. *Ruckman, J.*, et al. 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J Biol Chem*, 1998. 273(32), 20556-20567.
25. *Rhodes A., Deakin A, Spaul J, Coomber B, Aitken A, Life P, Rees S.* The generation and characterization of antagonist RNA aptamers to human oncostatin M. *J Biol Chem*, 2000. 275(37): p. 28555-28561.
26. *Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J.* *Protein Methods*, 1996, Willey-Liss, Inc, p.62-63.
27. *Conrad, R.C.*, et al. In vitro selection of nucleic acid aptamers that bind proteins. *Methods Enzymol*, 1996. 267, 336-637.
28. *Kubik MF, Stephens AW, Schneider D, Marlar RA, Tasset D.* High-affinity RNA ligands to human α -thrombin. 1994, 22, 2619-2626.
29. *Kumar PKR, Nishikawa S.* Isolation and characterization of RNA aptamers specific for the hepatitis C virus nonstructural protein 3 protease. *Eur J Biochem*. 267, 3685-3694.

О.Б. Бжадуг¹, С.А. Тюляндин¹, Л.Ю. Гривцова¹, G. Moldenhauer², J. Brochier³,
Н.Н. Тупицын¹

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В КРОВИ БОЛЬНЫХ РАСПРОСТРАНЕННЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹ ГУ РОНЦ имени Н.Н.Блохина РАМН,

² Heidelberg, Germany,

³ Montpellier, France

РЕЗЮМЕ

Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) выявляются у 41,3% больных распространенным раком молочной железы (РМЖ) в количестве не менее 1 клетки на миллион. Количество ЦОК не зависит от локализации и количества метастазов, а также от рецепторного статуса первичной опухоли молочной железы. ЦОК чаще выявляются у больных в менопаузе, чем в пременопаузе (47,8% и 26,7%, $p = 0,044$). У больных инфильтративно-дольковым раком молочной железы ЦОК обнаруживаются достоверно чаще, чем у больных с инфильтративно-протоковым РМЖ (69,2% и 31%, $p = 0,02$). Наличие микрометастазов в костном мозге не влияет на частоту выявления ЦОК. До и после лечения ЦОК выявляются с примерно одинаковой частотой (41,3% и 45,5%). Факт выявления ЦОК не влияет на общую и безрецидивную выживаемость больных с распространенными стадиями РМЖ. При оценке динамики количества ЦОК до и после проведения системной противоопухолевой химио- или гормонотерапии оказалось, что у больных со снижением количества ЦОК после лечения отмечена достоверно большая длительность периода до прогрессирования, чем у больных с повышением количества ЦОК после лечения (14 и 8 месяцев, $p = 0,0127$). Динамика количества ЦОК после проведения специфического противоопухолевого лечения может служить новым объективным критерием оценки ответа на лечение и информативным фактором прогноза у больных диссеминированным РМЖ. ЦОК у больных раком молочной железы гетерогенны по экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DR) и рецептора CD95. У больных РМЖ после лечения отмечается почти двукратное снижение пропорции HLA-DR-позитивных и CD95-позитивных циркулирующих опухолевых клеток в крови.

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

О.Б. Bzhadug¹, S.A. Tyuljandin¹, L. Yu. Grivtsova¹, G. Moldenhauer², J. Brochier³,
N.N. Tupitsyn¹

THE PROGNOSTIC VALUE OF CIRCULATING TUMOR CELLS IN BLOOD OF PATIENTS WITH ADVANCED BREAST CANCER

¹ State N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center
affiliated to the Russian Academy of Medical Sciences, Russian Federation

² Heidelberg, Germany

³ Montpellier, France

ABSTRACT

At least one per million circulating tumor cells (CTC) are found in 41.3% of patients with advanced breast cancer. The CTC level is not related to site or number of metastatic tumors, nor to receptor status of the primary breast cancer. The CTC are found more frequently in menopausal than in premenopausal women (47.8% vs 26.7%, $p=0.044$). Patients with infiltrative lobular disease present with CTC significantly more frequently than those with infiltrative ductal breast cancer (69.2% vs 31%, $p=0.02$). Bone marrow involvement has no influence on CTC detection frequency. The CTC are detected at similar frequency before and after treatment (41.3% vs 45.5%). CTC-positivity has no effect on overall or disease-free survival of patients with advanced breast cancer. Analysis of CTC levels before and after systemic cancer chemo- or hormone therapy demonstrated that patients with diminution of CTC number after treatment had significantly longer time to disease progression than those with increased CTC levels after treatment (14 vs 8 months, $p=0.0127$). Changes in CTC levels after specific anticancer treatment may be a new useful, objective measure of response and an informative prognostic factor in patients with advanced breast cancer. CTC from breast cancer patients demonstrated different expression of major histocompatibility complex (HLA-DR) class II molecules and CD95 receptor. Breast cancer patients presented with an almost two-fold decreased proportions of HLA-DR- and CD95-positive CTC in peripheral blood after treatment.

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

Заболелаемость 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 диагностируются III или IV стадии заболевания. Прирост заболеваемости раком молочной железы в России составил с 1999 по 2004 гг. 10,6%. Результаты лечения больных раком молочной железы остаются неудовлетворительными (прирост стандартизованного показателя смертности составил 2,9%) [1].

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

Развитие современных технологий сделало возможным определение единичных опухолевых клеток (микрометастазов) в биоптатах костного мозга и периферической крови [6]. Доказано, что обнаружение микрометастазов в костном мозге на этапе постановки диагноза влияет на продолжительность безрецидивного промежутка и общую продолжительность жизни у больных РМЖ [2].

Клиническое значение иммунологического определения опухолевых клеток, циркулирующих в периферической крови, остается не до конца понятным [4; 5; 10; 11; 14]. Как известно, опухоли молочных желез гетерогенны по иммунофенотипу [3]. В литературе имеются указания на взаимосвязь иммунофенотипа опухолей молочных желез с клиническим течением, степенью распространенности процесса, характером иммунного ответа и прогнозом заболевания [10; 11]. Есть все основания предполагать, что гетерогенность иммунофенотипа рака молочных желез может отражаться и на неоднородности популяции опухолевых клеток, циркулирующих 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, возможно, поможет расширить знания о механизмах метастазирования и лекарственной устойчивости злокачественной опухоли.

В этой связи представляется актуальным изучение количественного и качественного состава опухолевых клеток, циркулирующих в периферической крови больных диссеминированным раком молочной железы.

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).

There is a continuous rise in breast cancer prevalence both in Russia and worldwide. Breast cancer is the commonest female malignancy with 37.3% of cases presenting with stage III or IV disease at diagnosis. Breast cancer incidence demonstrated a 10.6% increase from 1999 to 2004. Treatment outcomes in breast cancer remain poor (2.9% increase in death rate) [1].

Over recent years investigators focused on more accurate disease staging and improvement of drug therapy for breast cancer. There is a vast study in biologically significant features of the disease that may be useful in decision making on most efficient treatment modality.

The progress in technology made possible detection of single tumor cells (micrometastases) in bone marrow and peripheral blood [6]. Detection of bone marrow involvement at diagnosis is shown to influence disease-free and overall survival in breast cancer [2].

Clinical value of immunological detection of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood is unclear [4;5;10;11;14]. Breast tumors are known to be immunophenotypically heterogeneous [3]. There are reports of relationship between breast tumor immunophenotype and disease clinical course, disease advance, immune response and prognosis [10;11]. There is all reason to suggest that immunophenotypic heterogeneity of breast cancer might be reflected by inhomogeneity of tumor cell population circulating in peripheral blood. It follows then that disease course may be assessed not only by the presence of tumor cells in circulation but also by analysis of qualitative composition of these cells. Study of CTC immunophenotype may improve our understanding of mechanisms of metastasis and tumor drug resistance.

It therefore seems useful to study quantitative and qualitative composition of CTC in peripheral blood of patients with advanced breast cancer.

PATIENTS AND METHODS

A total of 65 patients with locally advanced (primary inoperable) and metastatic breast cancer were enrolled in this study during 2001 through 2003. Most patients (87.7%) had stage IV disease ($n=57$), including 26 (45.6%) with newly diagnosed disease and 31 (54.4%) women relapsing after various anticancer treatments. Eight (12.3%) patients had locally advanced inoperable breast cancer.

Mean patient age was 53 years (range 26 to 75 years).

The study group included 16 (24.6%) premenopausal and 47 (72.3%) menopausal women, in 2 cases ovarian and menstrual functions were unknown. In the subgroup of patients with locally advanced breast cancer 62.5% of women were postmenopausal and 37.5% were premenopausal; postmenopausal women were also predominating (73.7% vs 22.8%) in the subgroup of metastatic disease, menstrual status of 2 women was unknown.

Most patients (72.4%) had histologically verified diagnosis, in 27.7% the diagnosis was confirmed by cytology. Infiltrative ductal disease was the most common (63.8%) type, lobular infiltrative cancer was found in 27.6% and other types in 8.5% of patients.

Steroid hormone receptor status was determined mainly by immunohistochemistry, biochemical tests were used in some cases. Breast tumor receptor status was assessed in 43

В репродуктивном возрасте находилось 16 больных (24,6%), в состоянии менопаузы — 47 больных (72,3%), у двух больных овариально-менструальная функция была неизвестна. В подгруппе больных с местно-распространенным раком молочной железы 62,5% больных были в постменопаузе и 37,5% — в пременопаузе; в подгруппе диссеминированных больных также преобладали больные в постменопаузе (73,7% против 22,8%), у двоих больных менструальный статус был неизвестен.

У большинства больных диагноз был верифицирован гистологически (72,4%), у 27,7% больных диагноз злокачественной опухоли был подтвержден цитологически. Наиболее часто встречалась инфильтративно-протоковая форма рака (в 63,8% случаев), дольковый инфильтративный рак встречался у 27,6% больных, другие формы рака — у 8,5% больных.

Определение рецепторов стероидных гормонов чаще проводилось иммуногистохимическим методом, у части больных — биохимическим методом. Исследование рецепторного статуса опухоли молочной железы было проведено 43 больным. У 18 (41,8%) больных клетки опухоли не содержали рецепторов эстрогенов и прогестерона (РЭ-РП-), у 25 больных (58,13%) больных был обнаружен хотя бы один рецептор стероидных гормонов (РЭ+РП+; или РЭ+РП-; или РЭ?РП+). Оба рецептора выявлены у 10 больных (23,25%).

Системное лечение

Химиотерапия была проведена большинству больных (80%), лечение гормональными препаратами получали 13 пациенток (20%). При местно-распространенном раке молочной железы всем восьми больным была проведена химиотерапия. Все больные, получавшие гормонотерапию, имели отдаленные метастазы.

Химиотерапия по схеме FAC. Большинству больных (n = 40) проводилась химиотерапия по схеме FAC. 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 с последующей гормонотерапией тамоксифеном (n = 11).

Химиотерапия таксанами (паклитаксел 175 мг/м² 1 раз в 21 день или доцетаксел 75 мг/м² 1 раз в 21 день) была проведена 6 больным (10,9%): двоим из них — в связи с прогрессированием рака молочной железы после адьювантной химиотерапии с включением антрациклинов, четверым больным — в качестве 2 линии химиотерапии (после 1 линии химиотерапии с включением антрациклинов).

Другие режимы химиотерапии. Две пациентки были включены в исследование по поводу прогрессирования рака молочной железы после двух линий химиотерапии. В качестве 3 линии химиотерапии одной из них были назначены капецитабин 2000 мг/м² внутрь с 1 по 14 дни + навельбин 25 мг/м² в 1 и 8 дни 3-недельного цикла. Второй больной в качестве 3 линии химиотерапии был назначен капецитабин 2500 мг/м² внутрь с 1 по 14 дни. Одной больной с впервые выявленным диссеминированным раком молочной железы был назначен нестандартный режим химиотерапии циклофосфамид + метотрексат + цефалекс по причинам отказа больной от внутривенной химиотерапии, пожилым возрастом, сопутствующей патологией.

patients. In 18 (41.8%) women breast tumors were free from estrogen or progesterone receptors (ER-PR-), 25 (58.13%) patients presented with at least one receptor type (ER+PR+ or ER+PR- or ER-PR+). Ten (23.25%) patients had both receptors.

Systemic treatment

Most patients (80%) received chemotherapy and 13 (20%) had hormonal therapy. All 8 patients with locally advanced disease received chemotherapy. All patients receiving hormonal therapy had distant metastases.

FAC chemotherapy. Most patients (n=40) received chemotherapy by FAC regimen. This group included both patients receiving FAC chemotherapy only and those who were given FAC regimen with tamoxifen to follow (n=11).

Taxane chemotherapy (paclitaxel 175 mg/m² once, day 21 or docetaxel 75 mg/m² once, day 21) was given to 6 (10.9%) patients: including 2 cases with disease progression after adjuvant anthracycline chemotherapy and 4 cases receiving second line treatment (after first-line anthracycline chemotherapy).

Other chemotherapy regimens. Two patients were enrolled in this study due to disease progression after two chemotherapy lines. One of the patients received third line chemotherapy with oral capecitabine 2,000 mg/m², days 1 to 14 plus navelbine 25 mg/m², days 1 and 8 of 21-day cycles. The second patient received oral capecitabine 2,000 mg/m², days 1 to 14. One woman with first diagnosed advanced breast cancer received non-standard chemotherapy with cyclophosphamide, methotrexate and celebrex because of her refusal to receive intravenous chemotherapy, advanced age and concomitant diseases.

Thirteen patients received hormonal therapy. Tamoxifen 20 mg daily was given mainly to patients with good prognosis (menopause, positive receptor status, long disease-free interval). Tamoxifen therapy was given in 10 cases. Letrosol 2.5 mg daily was given to 1 woman as an adjuvant and to 2 patients as second line hormone therapy after disease progression on tamoxifen.

Chemotherapy was given to 44 (77.2%) patients with metastatic breast cancer, 21.1% of them received hormone therapy after 6 chemotherapy cycles.

Methods for tumor cell detection in peripheral blood and bone marrow

Immunologic study of peripheral blood and bone marrow was performed in all cases to detect single tumor cells before and after treatment (6 chemotherapy courses or 3 months of hormonal therapy) or at disease progression. The immunologic study was made at the Hemopoiesis Immunology Laboratory, N.N.Blokhin RCRC RAMS.

To measure the concentration of CRC in peripheral blood 10 ml peripheral blood was harvested to heparinized tubes. Then the cells were isolated by phycoll-verografin density gradient (standard technique) or red cell lysis, the same techniques were used to separate bone marrow cells.

Direct monoclonal antibody (MAB) conjugates were used to assess circulating epithelial cells in peripheral blood. We used Becton Dickinson (USA) MABs. HEA-125 MAB was kindly supplied by G.Moldenhauer (Germany), fluorescent labelling was done by

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

В группе больных диссеминированным раком молочной железы химиотерапия была проведена 44 больным (77,2%), из них части больных после проведения 6 курсов химиотерапии была назначена гормонотерапия (21.1%).

Методы выявления опухолевых клеток в периферической крови и костном мозге

Всем больным проводилось иммунологическое исследование периферической крови и костного мозга с целью выявления единичных опухолевых клеток до лечения и по окончании цикла лечения (после 6 курсов химиотерапии или через 3 месяца гормональной терапии) или при прогрессировании заболевания. Иммунологическое исследование материала проводилось в лаборатории иммунологии гемопоэза Централизованного клинико-лабораторного отдела НИИ КО ГУ РОНЦ имени Н.Н.Блохина РАМН.

Для оценки количества опухолевых клеток в периферической крови из локтевой вены осуществляли забор 10 мл периферической крови в пробирку с гепарином. Затем клетки выделяли на градиенте плотности фиколл-верографина (стандартная методика) или методом лизиса эритроцитов, как и клетки костного мозга.

При оценке циркулирующих эпителиальных клеток в периферической крови нами использовались прямые конъюгаты моноклональных антител (МКА). Используются МКА фирмы Becton Dickinson (USA). МКА HEA-125 были любезно предоставлены G.Moldenhauer (Germany), флуоресцентное мечение этих антител осуществлено R.Jones (HMDS, Leeds, UK). В отдельных случаях использовали FITC-меченные МКА KL-1 (любезно предоставлены J.Brochier (Montpellier, France)).¹

При подсчете количества опухолевых клеток использовали двойную флуоресцентную метку. Клетки окрашивали МКА к обшейлейкоцитарному антигену CD45, меченными флуоресцеин изотиационатом (FITC), и МКА к эпителиальному антигену Egp34 (HEA 125), меченными PerCP или фикоэритрином (PE). При использовании CD45-PerCP эпителиальные маркеры окрашивали FITC-меченными МКА. 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:

1. IgG1 PerCP
2. CD45PerCP/IgG1FITC

¹ Окрашивание KL-1 проводили после пермеабилзации клеток.

R.Jones (HMDS, Leeds, UK). FITC-labeled MAB KL-1 (kindly supplied by J.Brochier [Montpellier, France])¹ was applied in some cases.

Double fluorescent labeling was used to measure CTC number. The cells were stained with MAB to common leukocytic antigen CD45 labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) and MAB to epithelial antigen Egp34 (HEA 125) labeled with PerCP or phycoerythrin (PE). The epithelial markers were stained with FITC-labeled MAB when CD45-PerCP were used. There was no difference in sensitivity of these fluorochromes. Levels of nonspecific staining were assessed using isotypic control with appropriate fluorochrome labels.

The MAB panel to measure levels of epithelial cells circulating in peripheral blood of breast cancer patients included:

1. IgG1 PerCP
2. CD45PerCP/IgG1FITC
3. CD45PerCP/HEA 125 FITC or CD45PerCP/BerEP4-FITC.

Maximal possible number of cell events within CD45-negative cell fraction with low levels of side light scattering (SSC) were accumulated in flow cytofluorimeter (pic. 1A) with at least 1,000,000 (or more if possible) cell events passing through the detector (pic. 1B).

Cytogram 1A demonstrates choice of analysis area by CD45 expression: on the Y axis — cell granularity levels (SSC) and on the X axis (FL-3 detector) — PerCP-labeled CD45 expression. R1 is CD45-negative cells including circulating breast cancer cells.

Cytogram 1B shows R1 cells only, including a clear-cut cell population (R2) with a strong Egp34 expression as recognized by FITC-labeled HEA 125. The rate of HEA 125+ cells in this specimen was 27 per million cells minus 1 cell from isotypic control.

Triple fluorescent labeling was used to analyze CTC subpopulations. The previous panel was supplemented with MAB to CD95 and HLA-DR.

The following MAB panel was used to assess the subpopulations:

1. IgG1 PerCP
2. CD45 PerCP/IgG1 FITC
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.

When analyzing tumor cell subpopulations we accumulated CD45-negative events too, then chose the tumor cell gate (R2 in fig. 1B) and measured percentage of HLA-DR+ and CD95+ cells. It should be mentioned that when analyzing subpopulations one has to accumulate as many as possible events in the tumor cell area which may be done only on specimens with very high cell numbers or in cases with marked metastatic process.

Cytomorphologic and immunologic study of bone marrow

Bone marrow cells were obtained by sternal puncture. The bone marrow puncture specimens were 0.3 to 0.7 ml (larger volumes might be diluted with peripheral blood).

¹ KL-1 staining was made after cell permeabilization.

3. CD45PerCP/HEA 125 FITC или CD45PerCP/ BerEP4-FITC

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

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, меченного 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 MKA HEA 125. Количество HEA125+ клеток в данном образце составило 27 клеток на 1 млн всех клеток образца за вычетом 1 клетки, попавшей в область R2 в изотипическом контроле.

В случае определения субпопуляций циркулирующих опухолевых клеток использовали тройную флуоресцентную метку. При этом в панель добавляли моноклональные антитела к антигенам CD95 и HLA-DR.

Панель MKA при оценке субпопуляций 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 рис. 1Б), и в этом гейте оценивали процентное содержание HLA-DR+ и CD95+ 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.

Приготовление цитоцентрифужных препаратов, иммунологическая окраска описаны в статьях Н.Н. Тупицына и О.В. Крохиной и соавт. в данном номере журнала. Для выявления опухолевых клеток использовали MKA KL-1 к панцитокератинам, любезно предоставленные J. Brochier (France).

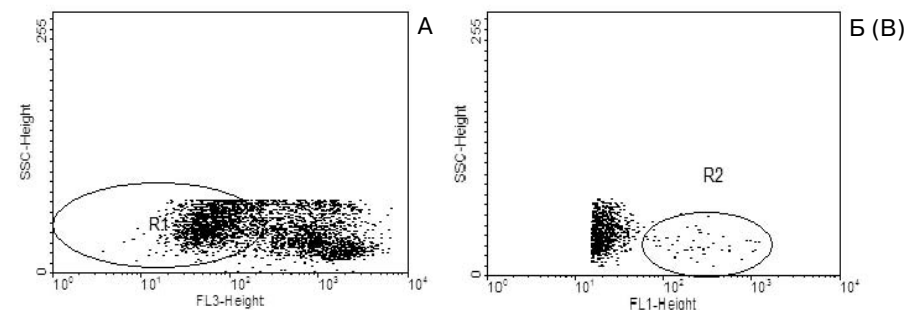


Рис. 1. Выявление циркулирующих опухолевых клеток в крови больной раком молочной железы методом проточной цитофлуориметрии. Двойная флуоресцентная метка.

Pic. 1. Detection of circulating tumor cells in blood of a breast cancer patient by flow cytometry. Double fluorescent label

Cytomorphologic study.

Smear specimens were prepared by standard procedure immediately after bone marrow harvesting and stained by Romanovsky-Giemsa technique to analyze the resulting myelogram.

Procedures for preparation and staining of cyto centrifuge specimens are described in N.N. Tupitsyn and O.V. Krokhina et al. in this issue. MAB KL-1 to pancytokeratins kindly supplied by J. Brochier (France) was used to detect tumor cells.

Tumor cell count per million bone marrow myelokaryocytes was done two times in every patient. Both single and clustered antigen-positive cells were counted.

Statistical analysis

Patient survival (time to progression and overall survival) parameters were assessed by Kaplan—Meier techniques, comparison of differences was done using log rank test.

Chi-squared test with Yates correction for continuity with 2 × 2 contingency tables or exact Fisher's test for small samples were used in comparison of qualitative variables. 95% confidence intervals and two-sided p values were calculated in all cases.

RESULTS

Detection of breast cancer micrometastases in peripheral blood by flow cytometry

We performed 85 immunologic tests in 65 patients to detect CTC.

CTC detection and measurement in peripheral blood were done by flow cytometry using MABs to epithelial antigens (MAB Egp34, BerEP4).

Since there are different opinions in the literature on significance of CTC levels in patient peripheral blood at different stages of systemic treatment and on their relationship

Подсчет опухолевых клеток проводили на 1 млн миелокарицитов 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 χ^2 -тест с поправкой Ейтца на непрерывность при таблицах сопряжения 2×2 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 эпителиальным антигенам (МКА Egp34, 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 ≤ 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 составила до лечения 41,3%, а после лечения — 45,5 %.

У больных местно-распространенным раком молочной железы и у больных с отдаленными метастазами циркулирующие опухолевые клетки по данным проточной цитометрии выявляются приблизительно с одинаковой частотой: ЦОК выявлены у 3 из 7 больных местно-распространенным РМЖ и у 21 из 56 больных метастатическим РМЖ, что составило 42,9% и 41% соответственно.

В табл. 1 показано распределение больных в зависимости от количества выявленных с помощью трех моноклональных антител циркулирующих опухолевых клеток.

with established morphological, clinical and prognostic factors of breast cancer, we believed useful to perform detailed quantitative analysis of data.

Results of CTC immunocytofluorimetry were compared for two levels of sensitivity, i.e. 1 cell per million leukocytes versus 1 cell per 100,000 leukocytes. Frequency of CTC detection at a sensitivity 1 cell per million leukocytes was 47.6% versus 41.3% at a sensitivity level 1 cell per 100,000 leukocytes.

To improve study accuracy and to exclude casual events the number of antigen-positive cells < 10 per million leukocytes was defined as negative result and the positive group included only patients with positive tests (more than 10 CTC per million leukocytes).

CTC rates before and after treatment were 41.3% and 45.5% respectively.

Patients with locally advanced breast cancer and those with distant metastases demonstrated similar rates of CTC detection: 3 of 7 (42.9%) patients with locally advanced disease and 21 of 56 (41%) cases with metastatic breast cancer were CTC-positive.

Table 1 shows distribution of cases with respect to number of CTC detected using three MABs.

Table 1

Quantitative CTC assay in breast cancer patients before systemic treatment

Study groups (No. of AG-positive cells per million leukocytes)	BerEP-4+, No. (%), n=32	HEA-125+, No. (%), n=21	KL-1+, No. (%), n=10	For all three antigens n=63
Group 1 (0–10 cells)	18 (56.3)	11 (52.4)	8 (80)	37 (58.7)
Group 2 (11–100 cells)	8 (25)	8 (38.1)	2 (20)	18 (28.6)
Group 3 (> 100 cells)	6 (18.75)	2 (9.5)	—	8 (12.7)

As demonstrated in table 1, most (69.2%) AG-positive patients had moderate CTC levels (11 to 100 CTC per million leukocytes), while 30.8% had more than 100 CTC per million leukocytes.

CTC were found most frequently in patients with visceral metastases only (14/27; 51.9%). This patient category presented with higher CTC levels (> 100 per million leukocytes) at the highest frequency (15%). Patients with only bone or both bone and visceral metastases had CTC in peripheral blood at a similar frequency: 31.3% (5/16) and 30.8% (4/13) respectively.

In the group with bone marrow involvement CTC were detected in 22.7% (5/22) of cases versus 44.5% (8/18) in the bone marrow-negative group. However relationship (contingency, chi squared test) of these factors was not statistically significant ($p > 0.05$).

Rate of CTC detection was higher in patients with the presence of at least one steroid hormone receptor in tumor tissue (ER+ or PR+, n=24) than in those with negative receptor status (ER- and PR-, n=18): 45.8% and 22.2% respectively. However relationship

Как видно из табл. 1 в группе АГ-позитивных больных ЦОК в большинстве случаев (69,2%) обнаруживаются в умеренном количестве (от 11 до 100 ЦОК на миллион лейкоцитов), а у 30,8% больных выявляется более 100 ЦОК на миллион лейкоцитов.

Таблица 1

Количественный анализ ЦОК у больных раком молочной железы до начала системного лечения

Анализируемые группы (кол-во АГ-позитивных клеток/млн лейкоцитов крови)	VerEP-4+, кол-во (%) n = 32	HEA-125+, кол-во (%) n = 21	KL-1+, кол-во (%) n = 10	В целом по 3 антигенам n = 63
1 группа (0–10 клеток)	18 (56,3%)	11 (52,4%)	8 (80%)	37 (58,7%)
2 группа (11–100 клеток)	8 (25%)	8 (38,1%)	2 (20%)	18 (28,6%)
3 группа (> 100 клеток)	6 (18,75%)	2 (9,5%)	—	8 (12,7%)

Наиболее часто ЦОК обнаруживали у больных с метастазами только во внутренние органы — 14 из 27 больных (51,9%). У этих же больных высокое содержание ЦОК (>100 на 1 млн лейкоцитов) отмечено наиболее часто — в 15% случаев. 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.

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 взаимосвязь между признаками (сопряженность признаков, χ^2) не была статистически значимой ($p > 0,05$).

У больных с наличием хотя бы одного из рецепторов стероидных гормонов в ткани опухоли (РЭ+ или РП+, $n = 24$) ЦОК определялись чаще, чем у больных с отрицательным рецепторным статусом (РЭ- и РП-, $n = 18$) — 45,8% и 22,2% соответственно. Однако взаимосвязь между признаками (сопряженность признаков, χ^2) не была статистически значимой ($p > 0,11$).

У больных в постменопаузе ($n = 46$) ЦОК выявлялись чаще (47,82%), чем у больных в пременопаузе (26,7%, $n = 15$). Взаимосвязь между признаками (сопряженность признаков, χ^2) статистически значима ($p = 0,045$).

У больных инфильтративным дольковым РМЖ ЦОК в периферической крови определялись чаще, чем у больных протоковым инфильтративным РМЖ (69,2% и 31% соответственно). Взаимосвязь между признаками (сопряженность признаков, χ^2) статистически значима ($p = 0,02$).

(contingency, chi squared test) of these factors was not statistically significant ($p > 0.11$).

Postmenopausal women ($n=46$) had CTC more frequently (47.82%) than premenopausal ones (26.7%, $n=15$). Relationship (contingency, chi squared test) of these factors was statistically significant ($p=0.045$).

Rate of CTC detection in peripheral blood was higher in patients with lobular infiltrative than with ductal infiltrative breast cancer (69.2% and 31% respectively). Relationship (contingency, chi squared test) of these factors was statistically significant ($p=0.02$).

Changes in CTC levels in patients with locally advanced and metastatic breast cancer

Changes in CTC levels were analyzed immunologically in 21 patients (23 tests because two tests were repeated in 2 patients, i.e. after treatment and at disease progression). In most cases the tests were performed after completion of systemic treatment. In 2 cases the study was made due to disease progression. Overall there were 10 (45.5%) CTC-positive cases before treatment. CTC detection rate after treatment was also 45.5%. This means that tumor cells continued to circulate in peripheral blood after systemic anticancer treatment in most cases.

Response to anticancer therapy was assessed in 19 of 21 patients. Patterns of changes in CTC levels (before and after treatment) corresponded to clinical and radiological assessments of disease (CTC level increasing at progression and decreasing at stabilization or partial response against baseline) in 12 (75%) patients with > 10 CTC per million leukocytes.

Table 2 demonstrates CTC counts in breast cancer patients with respect to response.

The effect of circulating tumor cells on prognosis in breast cancer

Time to progression and overall survival were analyzed to find out whether the presence of CTC influenced prognosis in breast cancer. Mean follow up time was 21.7 months (range 2 to 51 months). Median overall survival was 20.5 months.

The presence of CTC had no effect on time to progression or overall survival. CTC level did not influence time to breast cancer progression either. Median survival of patients with high CTC levels (more than 100 cells/million) was shorter than of those with CTC levels 10-100 cells per million (15 vs 21 months, respectively), though the differences were not statistically significant.

Patient survival in breast cancer is known to depend upon site of metastasis (visceral or only bone metastases) and the number of sites involved. We analyzed follow-up outcomes in patients with different sites of metastasis. The presence of CTC before treatment had no effect on time to progression ($p=0.7$) though influenced overall survival ($p=0.06$) in the subgroup with bone metastases only (the prognosis being more favorable for patients with metastatic breast cancer). In this subgroup median overall survival was almost two-fold shorter than in CTC-free cases. Table 3 demonstrates time to progression and overall survival for subgroups with different sites of metastasis.

In patients with visceral metastases the presence of CTC in peripheral blood before treatment had no effect on disease-free interval ($p=0.26$) or overall survival ($p=0.1$). One may propose that it is other known factors, such as metastasis site, receptor status, age, etc. that may account for poor prognosis.

Динамика ЦОК у больных местно-распространенным и диссеминированным раком молочной железы.

Иммунологическое исследование ЦОК в динамике проведено 21 больной (23 исследования, т.к. у двух больных выполнено по 2 повторных анализа: после лечения и при прогрессировании заболевания). В большинстве случаев анализ проводили по завершении системного лечения. У 2 больных исследование было проведено в связи с прогрессированием заболевания. ЦОК-позитивные случаи до лечения составили во всей группе 45,5% (n=10). Частота выявления ЦОК после лечения также 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 19 больных из 21. У 12 больных (75%) с наличием ≥ 10 ЦОК на 10^6 лейкоцитов динамика количества опухолевых клеток (до и после лечения) совпала с клинической и рентгенологической оценкой состояния болезни: т.е. при прогрессировании заболевания количество ЦОК возрастало, а при стабилизации заболевания или частичной регрессии — снижалось по сравнению с начальным уровнем.

В табл. 2 отражено количество ЦОК у больных раком молочной железы до и после лечения, а также эффект лечения, оцененный по клиническим и рентгенологическим данным.

Влияние циркулирующих опухолевых клеток на прогноз РМЖ

Для того чтобы оценить, влияет ли обнаружение ЦОК до лечения на прогноз у больных распространенным раком молочной железы, были изучены время до прогрессирования и общая продолжительность жизни больных.

Средний период наблюдения за живущими больными составил 21,7 мес. (от 2 до 51 мес.). Медиана общей продолжительности жизни составила 20,5 мес.

Наличие ЦОК не влияло на продолжительность времени до прогрессирования и общую продолжительность жизни больных. Количество ЦОК также не влияло на длительность периода до прогрессирования рака молочной железы. 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.

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. Оказалось, что 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 с диссеминированным РМЖ). У этих больных медиана общей продолжительности жизни была почти в 2 раза ниже, чем у больных с отсутствием ЦОК. Результаты анализа

Table 2

Changes in CTC related to treatment efficacy

No.	CTC number before treatment	CTC number after treatment	Changes in CTC	Response
1	10	2	↓	SD
2	3	104	↑	CR
3	37	500	↑	SD
4	20	2	↓	SD
5	56	7	↓	SD
6	7	4*	=	CR
7	0	48	↑	PD
8	0	0*	=	PR
9	418	204	↓	SD
10	21	10	↓	PR
11	234	50	↓	SD
12	167	0	↓	PR
13	7	27	↑	PR
14	0	5*	=	SD
15	0	8*	=	SD
16	0	409	↑	PD

CR, PR, complete or partial response; SD, stable disease; PD, progressive disease. Changes less than 10 CTC per million leukocytes were defined as no changes (=).

Table 3

Time to progression and overall survival in patients with different sites of metastasis with respect to CTC status before and after treatment

Metastasis site	CTC status	Median TTP, months	P value	Median OS, months	P value
Bone only (n=14)	+	7	P>0.05	11	P=0.06
	–	8		21.5	
Both bone and visceral (n=13)	+	6.5	P>0.05	15.5	P>0.05
	–	5		13	
Visceral only (n=27)	+	8	P=0.26	27	P=0.1
	–	7.5		13.5	

To perform analysis of overall survival and time to progression with respect to the presence of CTC after systemic treatment, we divided the patients into two groups (due to few cases to be analyzed), i.e. CTC-positive (more than 10 CTC per million leukocytes) and

Таблица 2

Динамика количества ЦОК у больных раком молочной железы в сопоставлении с лечебным эффектом

NN пп	Кол-во ЦОК до лечения	Кол-во ЦОК после лечения	Динамика ЦОК	Эффект лечения
1.	10	2	↓	СЗ
2.	3	104	↑	ПР
3.	37	500	↑	СЗ
4.	20	2	↓	СЗ
5.	56	7	↓	СЗ
6.	7	4*	=	ПР
7.	0	48	↑	ПЗ
8.	0	0*	=	ЧР
9.	418	204	↓	СЗ
10.	21	10	↓	ЧР
11.	234	50	↓	СЗ
12.	167	0	↓	ЧР
13.	7	27	↑	ЧР
14.	0	5*	=	СЗ
15.	0	8*	=	СЗ
16.	0	409	↑	ПЗ

ПР, ЧР — полная или частичная регрессия, СЗ — стабилизация, ПЗ — прогрессирование заболевания. Колебания в пределах менее 10 ЦОК на 1млн лейкоцитов расценены как отсутствие ЦОК (=).

времени до прогрессирования и общей продолжительности жизни в группах больных с различной локализацией метастазов представлены в табл. 3.

У больных с метастазами во внутренние органы ЦОК в периферической крови до лечения не оказывали влияния на продолжительность безрецидивного интервала ($p = 0,26$) и общую продолжительность жизни ($p = 0,1$). Видимо, в этой группе больных влияние на неблагоприятный прогноз оказывают другие известные факторы (локализация метастазов, рецепторный статус, возраст и т.д.).

При изучении общей продолжительности жизни и времени до прогрессирования в зависимости от наличия ЦОК после системного лечения ввиду малого количества больных вся группа была поделена на 2 подгруппы: ЦОК-позитивную (более 10 ЦОК на миллион лейкоцитов крови) и ЦОК-негативную. Оказалось, что медиана времени до прогрессирования в ЦОК-негативной группе после проведения системного лечения была в 2 раза выше, чем в ЦОК-позитивной группе после лечения (различия статистически недостоверны, $p = 0,31$).

У больных из ЦОК-негативной группы отмечены также преимущества в общей продолжительности жизни (различия статистически недостоверны, $p = 0,89$). Полученные результаты отражены в табл. 4.

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

CTC-negative. Median time to progression in the CTC-negative group appeared to be two-fold longer than in the CTC-positive group after treatment (the differences were not statistically significant, $p=0.13$).

The CTC-negative group also had an overall survival benefit (the differences were not statistically significant, $p=0.89$). These results are shown in table 4.

Table 4

Time to progression and overall survival in patients with advanced breast cancer with respect to CTC status after systemic treatment

	CTC-negative group	CTC-positive group	
Median time to progression, months (n=20)	15 (n=12)	7.5 (n=8)	$p=0.31$
Median overall survival, months (n=20)	23.5 (n=12)	17.5 (n=8)	$p=0.89$

To find out whether CTC level may be used in monitoring of response to chemo/hormonotherapy we analyzed treatment outcomes with respect to changes in CTC levels before and after treatment.

The changes in CTC levels were analyzed in 19 patients, survival was assessed in 16 cases.

Patients with decrease in CTC number after treatment demonstrated a benefit in time to progression ($p=0.0126$, log-rank test) as compared to those with CTC number increasing or stable.

Neither increase nor decrease in CTC levels had effect on overall survival.

Immunologic detection of epithelial cells in bone marrow

We made 53 immunologic tests on bone marrow puncture specimens from 42 breast cancer patients. Study of bone marrow was performed by fluorescent microscopy using MAB to pancytkeratin KL-1. Myelograms were also counted in the smear specimens.

Single tumor cells were present in 26 of 53 (49%) tests. Number of epithelial cells detected by immunocytology varied from 1 to 464 per million myelolokaryocytes: 1 to 10 cells were detected in 70.4% (19/26), 11 to 100 cells in 15.4% (4) and more than 100 cells in 11.5% (3) of positive tests. Standard cytology tests discovered bone marrow metastases in 5 patients with metastatic breast cancer (11.9%).

In the group with metastatic breast cancer (group 1) immunologic study of bone marrow before treatment was performed in 36 cases. KL-1-positive cells were found in 21 (58.7%) cases: 1 to 10 cells were detected in 16, 11 to 100 cells in 4 and more than 100 cells in 2 cases.

Таблица 3

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

Локализация метастазов	Наличие ЦОК	Медиана ВДП, мес.	P-value	Медиана ОВ, мес.	P-value
Метастазы только в кости, (n = 14)	+	7	P > 0,05	11	P = 0,06
	-	8		21,5	
Метастазы в кости и внутренние органы, (n = 13)	+	6,5	P > 0,05	15,5	P > 0,05
	-	5		13	
Метастазы только во внутренние органы, (n = 27)	+	8	P = 0,26	27	P = 0,1
	-	7,5		13,5	

Динамика количества ЦОК оценена у 19 больных, у 16 из них оценены показатели выживаемости.

У больных со снижением 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.

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

Иммунологическая детекция эпителиальных клеток в костном мозге

В рамках данного исследования выполнено 53 иммуноцитологических исследования пунктатов костного мозга у 42 больных раком молочной железы. Костный мозг исследовали иммуноцитологическим методом флуоресцентной микроскопии с помощью МКА к панцитокератинам KL-1. Одновременно в полученных мазках костного мозга производился подсчет миелограммы.

Единичные опухолевые клетки обнаружены в 26 реакциях из 53 (49%). Количество эпителиальных клеток, определяемых иммуноцитологически, варьировало от 1

Таблица 4

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

	ЦОК-негативная группа	ЦОК-позитивная группа	
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

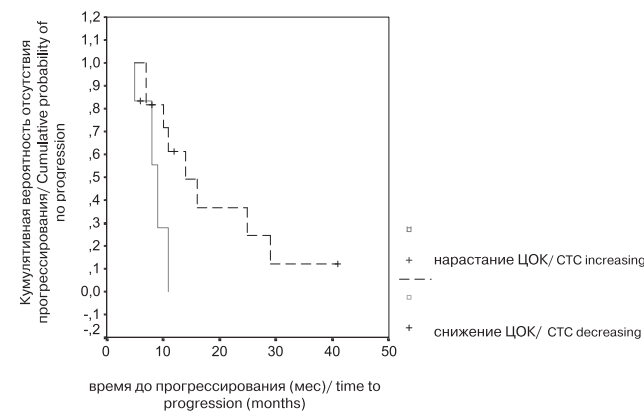


Рис. 2. Время до прогрессирования у больных РМЖ в зависимости от снижения или повышения уровня ЦОК после проведения противоопухолевой терапии.

Pic. 2. Time to progression in breast cancer patients with respect to CTC level increasing or decreasing after antitumor therapy

In the group with locally advanced breast cancer (group 2) immunologic study of bone marrow before treatment was performed in 6 cases. KL-1-positive cells were found in 2 patients (33.3%). One patient had 12 tumor cells and the other had 1 tumor cell per million bone marrow cells. Cytologic study failed to detect bone marrow disease in these patients. Immunologic study after treatment (6 courses of FAC and mastectomy) was performed in both patients, and both had negative tests.

Frequency of bone marrow involvement did not depend on site of distant metastasis and was 63.6% in cases with only visceral metastases and 61.5% in cases with only bone metastases. Most patients presented with 1 to 10 tumor cells.

Immunologic study of bone marrow after treatment was performed in 11 cases. Single tumor cells were found in 27.3% of cases (3 patients). Table 5 demonstrates changes in tumor cell levels in bone marrow.

As seen, all patients with response (complete or partial) and stable disease had the number of antigen-positive cells in bone marrow decreasing or remaining the same, i.e. corresponded to objective response.

Table 6 shows time to progression and overall survival in groups with/without bone marrow involvement by immunocytologic study and in the group with cytologically verified bone marrow metastases. Overall survival was assessed in 39 patients (33 with stage IV and 6 with stage IIB disease); time to progression was measured in 37 patients (31 with metastatic and 6 with locally advanced breast cancer).

As seen, time to progression and overall survival were similar in patients with and without bone marrow micrometastases by immunocytology. Although there was a benefit in these parameters in micrometastasis-free group as compared to the group with cytologi-

до 464 на миллион миелокариоцитов: от 1 до 10 клеток обнаружено в 70,4% позитивных реакций (19 из 26), от 11 до 100 клеток — в 15,4% (4), более 100 клеток — в 11,5% (3). При стандартном цитологическом исследовании метастазы в костный мозг были выявлены у 5 больных диссеминированным раком молочной железы (11,9%).

В группе больных метастатическим раком молочной железы (группа 1) иммунологическое исследование костного мозга до начала лечения проведено 36 больным. KL-1-позитивные клетки у этих пациентов были обнаружены у 21 больной (58,7%): от 1 до 10 опухолевых клетки выявлено у 16, от 11 до 100 клеток — у 4, более 100 клеток — у 2.

В группе больных местно-распространенным раком молочной железы (группа 2) 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. После лечения (6 курсов FAC и РМЭ) иммунологическое исследование костного мозга было проведено обеим этим больным — опухолевых клеток обнаружено не было.

Частота выявления микрометастазов в костный мозг не зависела от локализации отдаленных метастазов: у больных с метастазами только во внутренние органы она составила 63,6%, а у больных с метастазами только в кости — 61,5%. У большинства больных выявлялось от 1 до 10 опухолевых клеток.

Иммунологическое исследование костного мозга после окончания системного лечения проведено 11 больным. Солитарные опухолевые клетки обнаружены в 27,3% случаев (у 3 больных). Динамика содержания опухолевых клеток в костном мозге отражена в табл. 5.

Из табл.5 видно, что у всех больных при эффективном лечении (частичная или полная регрессия опухоли), а также при стабилизации заболевания количество антиген-позитивных клеток в костном мозге уменьшилось или осталось неизменным, т.е. совпадало с оценкой эффекта лечения с помощью объективных методов.

В табл. 6 отражены результаты анализа времени до прогрессирования и общей продолжительности жизни в группах больных с (без) микрометастазами в костный мозг по данным иммуноцитологического исследования, а также в группе больных с цитологически верифицированными метастазами в костный мозг. Общая продолжительность жизни всего оценена у 39 больных (у 33 больных — IV стадия РМЖ, у 6 — IIIВ); время до прогрессирования оценено у 37 больных (у 31 был диссеминированный РМЖ, у 6 больных — местно-распространенный РМЖ).

Из табл. 6 видно, что при иммуноцитологическом обнаружении 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 больше ($p = 0,03$), см. рис. 3.

Table 5
Number of AG-positive cells in bone marrow in breast cancer patients before and after systemic antitumor treatment

Patient No.	Number of tumor cells		Treatment type	Response
	before treatment	after treatment		
1.	12	0	After 6 FAC courses	CR
2.	0	0	After 6 FAC courses	SD
3.	0	0	After 6 FAC courses	PR
4.	1	0	After 6 FAC courses and surgery (wide mastectomy)	CR
5.	0	0	At 3 months after 6 FAC courses	DP
6.	1	0	After 6 FAC courses	PR
7.	416	418	At 3.5 months after tamoxifen therapy	SD
8.	50	0	After 8 FAC courses	PR
9.	2	4	After 5 FAC courses	PR
10.	5	5	After 6 FAC courses	SD
11.	2	0	After 8 FAC courses	PR

Table 6
Time to progression and overall survival with respect to the presence/absence of bone marrow involvement by immunocytology and cytology

	Patients free from bone marrow micrometastases (KL-1 = 0/million)	Patients with bone marrow micrometastases (KL-1 \geq 1/million)	Patients with cytologically verified bone marrow metastases
Median time to progression, months	11 (n=17)	10.5 (n=15)	7 (n=5)
Median overall survival, months	19.5 (n=17)	21 (n=17)	11 (n=5)

cally verified bone marrow metastases: they had a 4 months longer median time to progression ($p=0.03$), pic. 3.

Subpopulations of circulating tumor cell in peripheral blood of breast cancer patients

There is a vast literature on phenotyping of bone marrow micrometastases. Single tumor cells in bone marrow are shown to express major histocompatibility complex class I antigens, adhesion molecule EpCAM, receptor erb-B2 and transferrin, markers associated with proliferation (Ki-67, p-120), genes MAGE [8,12,15,16]. Although there are few reports on characterization of CTC [5].

We studied CTC for expression of major histocompatibility complex (MHC) class II (HLA-DR) molecule and CD95 receptor included in cell apoptosis-mediating system Fas-Fas L in 17 patients. Subpopulations of CTC in peripheral blood in the course of systemic therapy were identified in 6 cases.

Таблица 5

Содержание АГ-положительных клеток в костном мозге у больных РМЖ до и после системного противоопухолевого лечения

№ пп.	Кол-во опухолевых клеток		Вид лечения	Эффект лечения
	До лечения	После лечения		
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

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

Изучению фенотипа микрометастазов костном мозге посвящено множество исследований. Показано, что солитарные опухолевые клетки в костном мозге экспрессируют антигены главного комплекса гистосовместимости I класса, молекулы адгезии ЕpCAM, рецепторы еrб-В2 и трансферрина, маркеры пролиферации (Ki-67, p-120), гены MAGE 8, 12, 15, 16. Сообщения о характеристике ЦОК немногочисленны [5].

В нашей работе ЦОК изучены у 17 больных на предмет экспрессии молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС) II класса — HLA-DR и молекулы

Таблица 6

Время до прогрессирования и общая продолжительность жизни больных РМЖ в зависимости от выявления микрометастазов в костный мозг по данным иммуноцитологического и цитологического методов исследований

	Больные без микрометастазов в костный мозг (KL-1 = 0/млн)	Больные с микрометастазами в костный мозг (KL-1 ≥ 1/млн)	Больные с цитологически верифицированными 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)

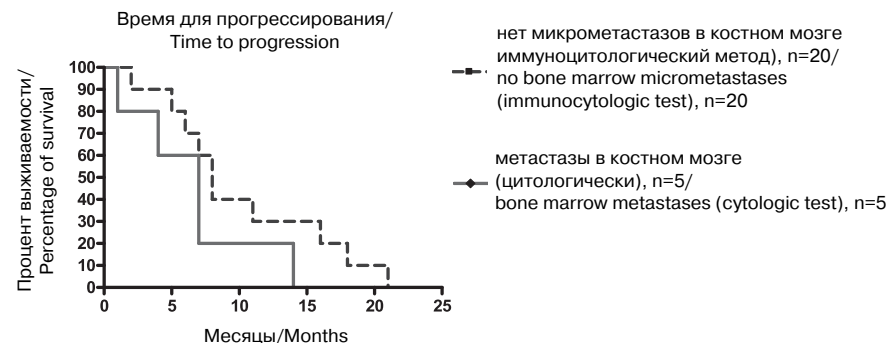


Рис. 3. Время до прогрессирования у больных с метастазами в костный мозг, доказанными цитологическим методом и у больных без микрометастазов (по данным иммуноцитологического исследования).

Fig. 3. Time to progression in patients with cytologically verified bone marrow metastases and micrometastasis-free (by immunocytology) patients

Most patients presented with rather high levels of CTC and only 3 of 17 women had less than 10 AG+ cells per million, table 7.

Table 7

CTC subpopulations in breast cancer patients before systemic treatment

No.	CTC number per million leukocytes	% of HLA-DR+ CTC	% of CD95+ CTC	Number of HLA-DR+ CTC per million leukocytes	Number of CD95+ CTC per million leukocytes
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	-

CD95, входящей в систему Fas-Fas L, опосредующую клеточный апоптоз. У 6 больных оценили субпопуляционный состав циркулирующих опухолевых клеток периферической крови в динамике системной терапии.

В большинстве изученных случаев количество циркулирующих опухолевых клеток было достаточно выраженным и только у 3 пациенток из 17 их число было менее 10 АГ+ клеток на миллион оцененных клеток, табл.7.

Частота экспрессии молекулы HLA-DR на ЦОК составила 82% (у 14 из 17 больных). Средний процент HLA-DR+ ЦОК 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+ ЦОК — $14,8 \pm 5,73\%$, 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 уровень экспрессии CD95 на опухолевых клетках 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 II класса (HLA-DR) и рецептора CD95, табл. 8.

Как видно из табл. 8, количество ЦОК у пациенток данной группы в большинстве случаев было достаточно выраженным и превышало 10 клеток на миллион

HLA-DR expression on CTC was found in 82% (14/17) of patients. Mean percentage of HLA-DR+ CTC was $31.6 \pm 6.4\%$, median 26.2% and a rather broad range of 0.0 to 81.8%.

CD95 was expressed on CTC in 33% of patients. Mean percentage of CD95+ CTC was $14.8 \pm 5.73\%$, median 3.3%, range 0.0 to 66.0%. CD95 expression level on CTC was 20 to 50% in 4 of 15 (26.6%) cases and greater than 50% (66.0%) in one case only.

Subpopulations of CTC after chemotherapy were analyzed in 6 patients. Expression of MHC class II molecule (HLA-DR) and CD95 on CTC (HEA-125+) was studied in all 6 cases, table 8.

Table 8

CTC subpopulations in breast cancer patients after completion of systemic chemotherapy

No.	CTC number per million leukocytes	% of HLA-DR+ CTC	Number of HLA-DR+ CTC per million leukocytes	% of CD95+ CTC	Number of CD95+ CTC per million leukocytes
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

Таблица 7

Субпопуляции ЦОК у больных РМЖ до начала системного лечения

№	Кол-во ЦОК/ млн лейкоц.	%% HLA-DR+ ЦОК	%% CD95+ ЦОК	Кол-во HLA-DR+ ЦОК/млн лейкоц.	Кол-во CD95+ ЦОК/млн лейкоц.
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	-

As seen, patients in this group had rather high CTC levels, i.e. more than 10 cells per million leukocytes of peripheral blood. Subpopulational composition of CTC was variable, though there were no cases with greater than 50% antigen expression.

As compared to values before treatment (see table 7), mean percent of CTC with HLA-DR+HEA125+ immunophenotype was almost 2-fold lower (15.2 ± 6.33), with much lower median 10.8% and range 3.0 to 44/6%.

Mean percent of CTC with CD95+HEA125+ immunophenotype was much lower than before treatment (5.3 ± 1.53). However, median value (5.0%) was similar to that before treatment. The scatter of values in this group was not great (0.0 to 11.3%).

Interestingly, a large CTC number (in advanced breast cancer) or increase in CTC number (e.g. at disease progression) were associated with decreasing number of tumor cells expressing both antigens (HLA-DR and CD95) and predominance of cells free from both antigen expression. The conclusion may therefore be made that as tumor cells lose antigens HLA-DR and CD95 they acquire a greater metastatic potential by becoming "invisible" for immunity cells (CD4 T-cells) and cannot be killed through CD95-dependent apoptosis mechanisms.

Our data prove important further study of CTC subpopulations to improve our understanding of mechanisms of metastasis and drug resistance of malignant tumors.

It is useful to study changes in CTC levels during chemotherapy since, according to our study, an increase in CTC number on therapy is a statistically significant marker of poor prognosis.

лейкоцитов периферической крови. Субпопуляционный состав опухолевых клеток был разнородным, однако случаев экспрессии антигенов на более 50% опухолевых клеток в данной группе больных нет.

По сравнению с данными до лечения (см. табл. 7) средний процент ЦОК с иммунофенотипом HLA-DR+HEA125+ был практически в 2 раза ниже и составил $15,2 \pm 6,33$. Медиана также была значительно ниже и составляла 10,8 %, при разбросе значений от 3,0 до 44,6%.

Таблица 8

Субпопуляции ЦОК больных РМЖ после проведения системной химиотерапии

№ пп	Кол-во ЦОК/млн лейкоц.	%% HLA-DR+ ЦОК	Кол-во HLA-DR+ ЦОК/млн лейкоц.	%% CD95+ ЦОК	Кол-во CD95+ ЦОК/млн лейкоц
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

Средний процент ЦОК с иммунофенотипом CD95+HEA125+ был также значительно ниже, чем в группе больных до лечения и составил $5,3 \pm 1,53$. 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 ЦОК (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.

Представленные в нашей работе данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения субпопуляционного состава циркулирующих опухолевых клеток с целью расширения знаний о механизмах метастазирования и лекарственной устойчивости злокачественных опухолей.

Перспективным представляется также изучение динамики содержания циркулирующих опухолевых клеток в процессе химиотерапии, поскольку, по нашим данным, увеличение содержания ЦОК на фоне лечения является статистически значимым признаком, свидетельствующим о неблагоприятном прогнозе.

ВЫВОДЫ

1. Циркулирующие в периферической крови опухолевые клетки выявляются

CONCLUSIONS

1. Circulating tumor cells are found in peripheral blood of 41.3% of patients with metastatic breast cancer by expression of membrane panepithelial antigens (Egp34, BerEp4) with no expression of CD45; they are characterized by low granularity and variability of size.

2. Circulating tumor cell number may vary from minimal (1 cell per million leukocytes) to rather large (100 or more cells per million leukocytes).

3. Breast cancer cells circulating in peripheral blood demonstrate heterogeneity by expression of major histocompatibility complex class II molecules (HLA-DR) and receptor CD95. Large proportions of HLA-DR-negative and CD95-negative cells are found in most cases which is indicative of their incapability to present tumor-associated peptides to CD4+ T-lymphocytes and to effect cell death through CD95-mediated apoptosis.

4. The presence of circulating tumor cells in peripheral blood has no effect on disease-free or overall survival of patients with stage III-IV breast cancer.

5. The presence of circulating tumor cells in peripheral blood is not associated directly with bone marrow micrometastasis as discovered by immunocytology.

6. Bone marrow micrometastases are found before treatment in 54.8% of cases with stage III-IV breast cancer. The presence of bone marrow micrometastasis at treatment start does not influence disease-free or overall survival.

7. Changes in circulating tumor cell levels during chemotherapy most often correspond to clinical disease course. Increase (or no decrease) in circulating tumor cells is associated with disease progression at a short time after completion of antitumor therapy in spite of a good (complete or partial) response.

8. Changes in circulating tumor cell levels during chemotherapy is an additional objective parameter of treatment efficacy. Patients with decreased levels of circulating tumor cells after polychemotherapy had a significantly longer time to disease progression ($p=0.026$) as compared to patients with the number of circulating tumor cells increasing after treatment.

у 41,3% больных диссеминированным раком молочной железы на основании наличия мембранных панэпителиальных антигенов (Egp34, HerEр4) при отсутствии экспрессии CD45; они характеризуются низкими показателями гранулярности и гетерогенны по размеру.

2. Количество циркулирующих опухолевых клеток варьирует от минимального (1 клетка на млн лейкоцитов) до выраженного (100 и более клеток на млн лейкоцитов).

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

4. Факт наличия циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови не влияет на продолжительность интервала без прогрессирования и общую продолжительность жизни больных раком молочной железы III-IV стадий.

5. Обнаружение клеток рака молочной железы в периферической крови больных не имеет прямой ассоциации с наличием микрометастазов в костном мозге, выявляемых иммуноцитологическим методом.

6. Микрометастазы в костном мозге до лечения обнаруживаются в 54,8% случаев рака молочной железы III-IV стадий. Наличие микрометастазов в костном мозге больных на момент начала лечения не влияет на продолжительность безрецидивного интервала и общую продолжительность жизни в этой группе больных.

7. Динамика содержания циркулирующих опухолевых клеток в процессе химиотерапии, чаще всего, совпадает с клинической оценкой эффективности лечения. В случаях нарастания (или отсутствия снижения) количества циркулирующих опухолевых клеток, несмотря на хороший клинический эффект (полная или частичная регрессия опухоли) отмечалось 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 со снижением 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, $p = 0,026$.

Литература/References

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2004г // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, т.17, №3 (прил.1) 2006.

Davidov M.I., Aksel E.M. Statistica of malignant tumors in Russia and CIS countries in 2004 // Journal of N.N. Blokhin Russian cancer Research Center RAMS. -2006. — V.17, N3(Suppl.). (In Russian)

2. Крохина О.В., Летагин В.П., Тупицын Н.Н. и соавторы. Рак молочной железы. Микрометастазы в костный мозг // Вестник Российского Онкологического Научного Центра РАМН имени Н.Н. Блохина. стр.15-20, 3/2002.

Krokhina O.V., Letyagin V.P., Tupitsyn N.N. et al. Breast cancer. Bone marrow micrometastases // Journal of N.N. Blokhin Russian cancer Research Center RAMS. -2002. — N3. — P.15-20. (In Russian)

3. Тупицын Н.Н. Иммунофенотип рака молочной железы (глава 2 в издании Рак молочной железы под редакцией Н.Е. Кушлинского, С.М. Портного, К.П. Лактионова, Москва 2005.

Tupitsyn N.N. Immunophenotype of breast cancer. Chapter In: Breast cancer (Eds. Kushlinsky N.E., Portnoi S.M., Laktionov K.P.). Moscow. -2005 (In Russian)

4. Brown S. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. New England Journal of Medicine, 2005 Aug 25; 353(8):793-802.

5. Cristofanilli M., Budd G., Ellis M. et al. Circulating tumor cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer // New England Journal of Medicine. — 2004. — Vol. 35. — P. 781–791.

6. Gafforio J.J., Serrano M.J., Sanchez-Rovira P. et al. Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis // Int J Cancer. — 2003. — Vol 2, № 107 (6), P. 984 — 990.

7. Giatromanolaki A., Koukourakis M., Kakolyris S. et al. Assessment of highly angiogenic and disseminated in the peripheral blood disease in breast cancer patients predicts for resistance to adjuvant chemotherapy and early relapse // Int J Cancer. — 2004. — Vol 10, № 108(4) — P. 620 — 627.

8. Gross H.J., Verwer B., Houck D. et al. Model study detecting breast cancer cells in peripheral blood mononuclear cells at frequencies as low as // PNAS. — 1995. — Vol 92, P.537- 541. 10(-7).

9. Manhani A.R., Manhani R., Soares H.P. et al. CK-19 expression by RT_PCR in the peripheral blood of breast cancer patients correlates with response to chemotherapy // Breast Cancer Res. Treat. — 2001. — Vol.66, №3 — P.249 — 254.

10. Molino A., Pelosi G., Micciolo R. et al. Bone marrow micrometastases in breast cancer patient // Breast Cancer Research and Treatment 58, 123-130, 1999.

11. Naumov G., MacDonald I., Weinmeister P. Persistence of Solitary Mammary Carcinoma Cells in a Secondary Site. A Possible Contributor to Dormancy // Cancer Research 62, 2162-2168, April 1, 2002.

12. Schoenfeld A., Kruger K. N., Gomm J. et al. The detection of Micrometastasis in the Peripheral Blood and Bone Marrow of patients with Breast Cancer Using Immunohistochemistry and reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction for Keratin 19 // Eur. J.Cancer — 1999. — Vol.33, No 6, P. 854-861.

13. Stathopoulou A., Vlachonikolis D., Mavroudis D. et al. Molecular detection of Cytokeratin-19-Positive Cells in the Peripheral Blood of Patients With Operable Breast Cancer: Evaluation of Their Prognostic Significance // J. Clin. Oncol. — 2002. — Vol.16, P. 3404-3412.

14. Thurm H, Ebel S, Kantenich et al. Rare expression of epithelial cell adhesion molecule on residual micrometastatic breast cancer cells after adjuvant chemotherapy // Clin Cancer Res. 2003 Jul; 9 (7):2598-604.

15. Wong N.S., Kahn H.J., Zhang L. et al. Prognostic significance of circulating tumour cells enumerated after filtration enrichment in early and metastatic breast cancer patients // Breast Cancer Res Treat. 2006 Mar 16.

16. Xenidis N., Vlachonikolis I., Mavroudis D. et al. Peripheral Blood circulating cytokeratin-19 mRNA-positive cells after the completion of adjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer // Ann Oncol. — 2003 — № 1 — P. 849-855.

17. Zhang J, Shen KW, Liu G et al. Antigenic profiles of disseminated breast tumor cells and microenvironment in bone marrow // Eur J Surg Oncol 2003 Mar; 29 (2): 121-126.

18. Zia A, Schildberg FW, Funke I et al. MHC class I negative phenotype of disseminated tumor cells in bone marrow is associated with poor survival in NOM0 breast cancer patients // Int J Cancer 2001 Aug 15; 93 (4): 566-70. Founded in 2006, the "Association for

Фогт У., Брандт Б., Криг Р.

INDIVICON — ПОДХОД К СТАНДАРТИЗИРОВАННОЙ ИНДИВИДУАЛИЗИРОВАННОЙ КОМПЛЕМЕНТАРНОЙ ОНКОЛОГИИ

INDIVICON, Германия

РЕЗЮМЕ

Для решения вопросов углубленных исследований, выходящих за рамки стандартного обследования онкологических больных, в Германии ведущими учеными создана некоммерческая ассоциация INDIVICON (индивидуализированная комплементарная онкология). Ассоциация решает вопросы определения микрометастазов и циркулирующих опухолевых клеток, оценивает профили генной экспрессии клеток первичной опухоли и микрометастазов, устанавливает не только факт наличия, но и активность рецепторов половых гормонов клеток рака молочной железы. На этой основе ведущие специалисты-онкологи дают рекомендации пациенту по наиболее приемлемым схемам продолжения лечения, включая иммунотерапию. В статье представлены конкретные примеры деятельности Ассоциации.

Ключевые слова: диссеминированные опухолевые клетки, метастазы, иммунотерапия, INDIVICON.

Основанная в 2006 г. Ассоциация индивидуализированной комплементарной онкологии (INDIVICON) является некоммерческой организацией, цель которой — внедрение новых средств диагностики и лечения в дополнение к существующим методам. В основе идеи разработки новых и дополнительных методов в этой области лежит возможность повышения эффективности более дифференцированной диагностики и, как следствие, получения интенсифицированного комплементарного лечения для многих больных. INDIVICON также ставит перед собой задачу восполнить пробелы, существующие в лечении онкологических больных, например, таких как выявление микрометастазов, чтобы повысить уверенность и безопасность пациентов после удаления первичной опухоли.

В статье представлены различные области деятельности INDIVICON, а также показано на примерах, чем подход INDIVICON отличается от современной практики.

U.Vogt, B.Brandt, R.Krieg

INDIVICON, AN APPROACH TO "HIGH-QUALITY" INDIVIDUALIZED COMPLEMENTARY ONCOLOGY

INDIVICON, Germany

ABSTRACT

INDIVICON, the Association for Individualised Complementary Oncology is introduced in this article. Apart from an overview of the association itself examples for new approaches in the field of oncology are given. The latter are meant to show how the INDIVICON-approach is different from traditional diagnoses and therapies and has the aim to demonstrate the benefit this approach means for patients and practitioners.

Key words: disseminated tumor cells, metastases, immune therapy, INDIVICON.

Founded in 2006, the "Association for Individualized Complementary Oncology" (INDIVICON) is a non-profit organization that has the objective to introduce new means of diagnosis and treatment as a complement to the existing options.

The idea to concentrate on new and additional options in this area is based on the observation that many patients would benefit from a more differentiated diagnosis and in consequence, an intensified complementary treatment. INDIVICON also has the aim to fill current gaps in the management of tumor patients, e.g. with early detection of micro-metastases, in order to give patients more certainty and safety that a primary tumor has been treated successfully.

This article will introduce the different areas in which INDIVICON is active and will provide examples for what makes INDIVICON's approach different to what is currently practiced.

1. ACTIVITIES OF INDIVICON

The Association for Individualized Complementary Oncology focuses its activities on four main areas, which are introduced in some detail below:

- the establishment of new concepts for cancer diagnosis and treatment
- the transfer of new concepts to long-term clinical patient management
- training of physicians and other health care professionals
- clinical investigation

1. ОБЛАСТИ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ INDIVICON

Ассоциация индивидуализированной комплементарной онкологии ведет работу в следующих четырех основных областях, которые далее будут представлены более подробно:

- разработка новых концепций для диагностики и лечения рака
- реализация новых концепций в длительном клиническом ведении больных
- подготовка врачей и других медицинских работников.
- клинические исследования

1.1. Разработка новых концепций для диагностики и лечения рака

Исследования, проведенные некоторыми членами Ассоциации (например, профессором Буркхардтом Брандтом), помогли INDIVICON накопить богатый опыт в диагностике и лечении следующих форм рака:

- гинекологические опухоли: рак молочной железы и яичников
- колоректальный рак
- рак ротовой полости и предраковые состояния (например, лейкоплакия)
- рак легкого
- рак предстательной железы

Для того, чтобы продемонстрировать различия между стандартным подходом и подходом INDIVICON к диагностике и лечению онкологических заболеваний, рассмотрим эти подходы на примере рака молочной железы. Стандартное обследование включает определение стадии заболевания (TNM), гистоморфологическое исследование (G) и иммуногистохимический анализ на рецепторы гормонов и онкопротеин HER2. Этот подход имеет существенный недостаток: в случае выявления гормональных рецепторов невозможно определить, функционируют эти рецепторы или нет. Этот недостаток можно восполнить, применяя метод определения функциональной способности рецепторов на основе выявления транскрипционно-зависимого белка, который индуцируется только рецепторами эстрогена. Наиболее эффективным белком-маркером для проведения такого анализа является pS2 (TFF1). На рис. 1 показано, что если рецептор эстрогена находится в активном состоянии, он включает метаболический процесс, который приводит к образованию pS2. Если pS2 не определяется, то рецептор не активен.

Таким образом, полученный результат имеет важное значение для прогноза заболевания и выбора адъювантной терапии. Далее показано, что эффективность лечения больных с большой вероятностью связано с функционированием рецепторов эстрогена.

В таблице представлен пример больной, 52 лет, у которой выявлена злокачественная опухоль молочной железы 17 мм в диаметре. Лимфоузлы не поражены. Гистологическая степень G3, что указывает на относительно выраженное отличие опухолевых клеток от клеток нормальной ткани молочной железы.

1.1 Establishment of New Concepts for Cancer Diagnosis and Treatment

Based on previous studies conducted by some members of the association (e.g. Prof. Burkhard Brandt) INDIVICON has gained extensive experience in diagnosis and treatment of the following types of cancer:

- Gynecological tumors: breast and ovarian cancer
- Colorectal cancer
- Oral cancer and pre-cancer stages (e.g. leukoplakia)
- Lung cancer
- Prostate cancer

In order to show the difference between the standard procedure and how INDIVICON approaches diagnosis and treatment, an example is given here for a breast cancer patient. The standard procedure in this case is based on clinical staging (TNM), histomorphological evaluation (G) and an immuno-histochemical analysis of the hormone receptors and HER2 oncoprotein.

The drawback of this approach is that, although the expression of hormone receptors can be determined, the result does not indicate, however, whether the receptors are functional or not. To test for receptor functionality the detection of a transcriptionally dependent protein which is solely induced by estrogen receptors will fill this lack of knowledge.

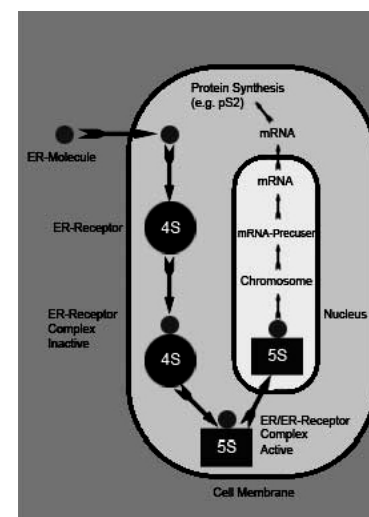


Рис. 1. pS2 — транскрипционно-зависимый белок как показатель функции рецепторов эстрогена

Pic. 1. pS2 as Transcriptionally Dependent Protein of Estrogen Receptor Function

Таблица

Сравнение стандартного и нового прогнозов

Больная, 52 лет, в постменопаузе, инвазивный проточный рак молочной железы, pT1c; pN0 (0/22); G3		
Стандартные лабораторные показатели (рекомендации St. Gallen, 2007 г.)	Применение новых прогностических/предсказательных факторов	Объяснение
Положительный статус рецепторов эстрогена Положительный статус рецепторов прогестерона	Положительный статус рецепторов эстрогена Положительный статус рецепторов прогестерона Отрицательный статус pS2 uPA и PAI в норме Амплификация топо-II-альфа Повышение S-фазы Анеуплоидный индекс ДНК Erb B-1, c-myc в норме Отсутствие мутаций p53 Амплификация erb B-2 Тест на чувствительность к химиотерапии	Рецепторы гормонов не функционируют, неэффективность гормональной терапии При одновременной амплификации erb B-2 повышается эффективность терапии на основе антрациклинов Выявление опухолевых клеток с амплификацией erb B-2 в случае гормональной терапии тамоксифеном Чувствительность к режимам FEC, EDoc, EPac4 Резистентность к CMF
Средний риск	"Высокий риск"	
Гормональная терапия (Тамоксифен)	Химиотерапия	FEC ¹
¹ Консенсус St. Gallen, 2007 г.: FEC +/- Таксан.		

В левом столбце показан анализ в соответствии с рекомендациями Консенсуса St. Gallen, 2007 г., который главным образом основывается на определении статуса рецепторов эстрогена и прогестерона и в нашем случае является положительным для обоих гормонов. В результате случай отнесен к группе среднего риска и предполагает назначение Тамоксифена или ингибиторов ароматазы.

Применение дополнительных параметров, как показано во втором столбце, позволяет провести более точный анализ, например, с учетом отрицательного результата теста на pS2, который показывает, что гормональная терапия будет неэффективной, т.к. рецепторы гормонов не функционируют. На основе этого и других параметров можно сделать вывод, что больная на самом деле относится к группе высокого риска. В этом случае представляется целесообразным назначить химиотерапию и, в связи с амплификацией топо-II-альфа, ожидается, что более эффективной будет терапия на основе антрациклинов. Рекомендован режим химиотерапии FEC (5-фторурацил, эпирубицин, циклофосфамид), который характеризуется более высокой экономической эффективностью при том же клиническом эффекте, по сравнению с другими, более дорогими режимами, к которым установлена чувствительность опухоли по результатам теста на химиочувствительность (терапия на основе таксанов).

The most efficient marker protein for this purpose is pS2 (TFF1). In pic. 1 it is demonstrated that if the estrogen receptor is active, it will trigger a metabolic process that will lead to the production of pS2. Without a positive result for pS2, the receptor can be defined as not active.

Table

Comparison Standard and New Prognosis

Female patient, 52 years, post-menopausal, invasive ductal mamma carcinoma, pT1c; pN0 (0/22); G3		
Standard laboratory parameter (recommendation St. Gallen 2007)	Use of new prognosis/prediction factors	Explanations
Estrogen receptor positive Progesterone receptor positive Average risk	Estrogen receptor positive Progesterone receptor positive pS2 negative uPA and PAI normal Topo-II-alpha amplified S-phase increased Aneuploid DNA-index Erb B-1, c-myc normal p53 not mutated erb B-2 amplified Chemo-sensitivity testing "High risk"	Dysfunctional hormone receptors, no response to anti-hormone therapy In co-amplification with erb B-2 better response to anthracycline-containing therapies Selection of erb B-2 amplified tumor cells in case of an antihormone therapy with Tamoxifen FEC, EDoc and EPac sensitive; CMF resistant
Anti-hormone therapy (Tamoxifen)	Chemotherapy	FEC ¹

In consequence, this finding is important for the estimation of the patient's prognosis which has further implications on the choice of adjuvant treatment options. In the following it is shown that the patient's treatment benefit most likely is related to a functional estrogen receptor.

In table you see the case of a 52 year old female patient. She had a mamma carcinoma with 17 mm diameter. No lymph nodes are affected. The grading is three, thus indicating a relatively strong differentiation of the tumor tissue from normal mamma tissue.

On the left side you see the recommended analyses by the St. Gallen Consensus Meeting 2007, which would focus solely on the estrogen and progesterone receptors and in this case would get a positive result for the two. The conclusion would therefore indicate an average risk for the patient and suggest an anti-hormone therapy using Tamoxifen or aromatase inhibitors.

Due to the use of more parameters as described in the second column you get a more conclusive analysis of the current status: an example for this is the negative result for pS2. This indicates that an anti-hormone therapy would not have any advantage for the patient since the hormone receptors are not active.

Таким образом, больная будет получать более адекватную терапию и имеет больше шансов на успешное лечение.

1.2. Клиническое ведение больных после адъювантной терапии

Концепция INDIVICON предусматривает два основных направления — оценка вероятности метастазирования в каждом конкретном случае и "мягкое" лечение больных с высокой вероятностью метастатического рецидива с целью увеличения безрецидивного периода или времени до прогрессирования.

1.2.1. Диссеминированные опухолевые клетки

Риск метастазирования после адъювантного и даже неоадъювантного лечения первичной опухоли можно определить при помощи методов выявления диссеминированных опухолевых клеток в периферической крови. Это исследование проводят в дополнение к стандартным анализам на опухолевые маркеры. Поэтому, опухолевые маркеры должны использоваться по строго ограниченному показанию, которые также разработаны INDIVICON.

Микрометастазы, которые можно определить в крови по экспрессии тканеспецифических антигенов, например, цитокератинов, скорее всего представляют переходную стадию метастазов. На рис. 2 показана диссеминация опухолевых клеток в кровь первичной опухолью, которая позднее может привести к образованию метастатических опухолей в лимфоузлах и отдаленных органах.

На рис. 3 показано, что диссеминированные опухолевые клетки являются адекватным индикатором при наблюдении за течением заболевания.

Рис. 3 выше показывает, что диссеминированные опухолевые клетки в периферической крови, которые далее будем называть «циркулирующие опухолевые клетки» (ЦОК), отражают прогрессирование рака молочной железы. Как видно, монотерапия эпирубицином приводит к снижению уровня ЦОК (серая линия: цитокератин-положительные клетки; черная линия: цитокератин- и HER2-положительные клетки). После окончания терапии отдельная субпопуляция ЦОК с экспрессией онкопротеина HER2 (erbB-2) снова появляется в периферической крови (черная линия), и больная умирает от метастазов в головной мозг через несколько месяцев.

Этот пример показывает, что уровень диссеминированных опухолевых клеток в крови тесно связан с прогрессированием заболевания, а также что этот индикатор может применяться в наблюдении за больными как показатель эффективности лечения.

1.2.2. Иммунотерапия

После лечения концепция INDIVICON предусматривает не только оценку риска метастазирования но также предупреждение метастатического поражения или, как минимум, увеличение периода до развития метастазов на возможно более продолжительное время.

На рис. 4 показаны основные способы регулирования иммунной системы.

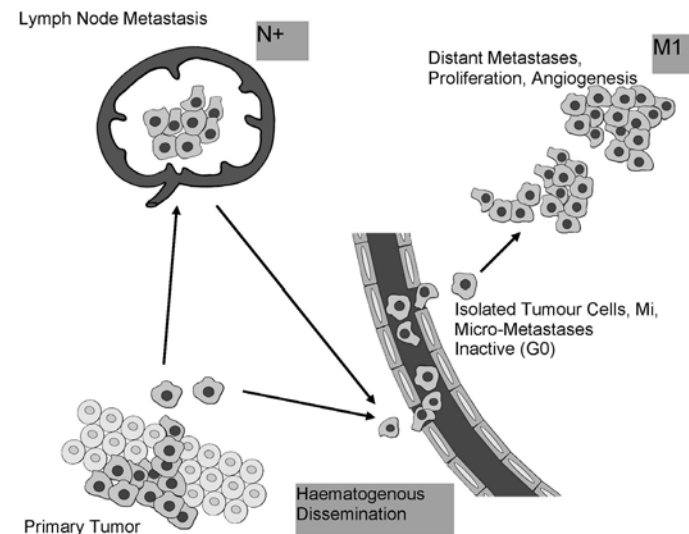


Рис. 2. Микрометастазы — переходный этап к образованию метастазов.
Pic. 2. Micro-Metastasis as Transitory Stage of Metastasis

This and the other parameters lead to the conclusion that the patient is indeed in the high risk group. The suggested therapy here would be a chemotherapy and — due to the amplification of Topo-II-alpha — with a higher benefit of an Anthracycline-containing therapy. The suggested chemotherapeutic is FEC (5-FU Epirubicine Cyclophosphamide) since it is the most economical option and has shown to be equally effective as more expensive ones in the chemo-sensitivity testing (Taxan-containing therapies).

In conclusion, the patient would receive a more adequate therapy and in consequence have higher probability of a successful recovery.

1.2. Clinical Management of Patients after Adjuvant Treatment

INDIVICON focuses on estimating the probability of metastases of an individual patient as well as on the "soft" treatment of patients with a high probability for metastatic relapse in order to increase the time of disease-free survival or the time to progression.

1.2.1 Disseminated Tumor Cells

The risk to suffer from metastases after adjuvant and even neoadjuvant treatment of the primary tumor can be detected by use of methods for the detection of disseminated tumor cells in the peripheral blood. This test should be done complementary to the already established tumor markers. Thereby, tumor markers should be used under seriously restricted indications which are also provided by INDIVICON.

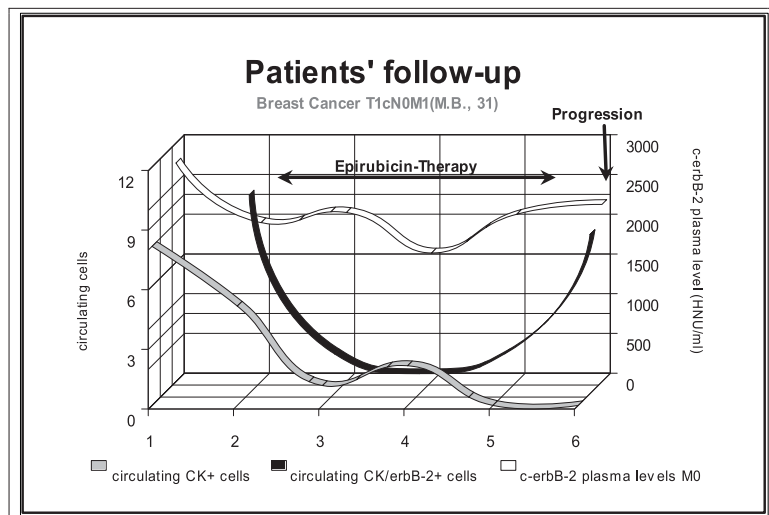


Рис. 3: Мониторинг системного прогрессирования рака молочной железы по ЦОК
Pic. 3: Monitoring of Systematic Progression of Breast Cancer via CTCs

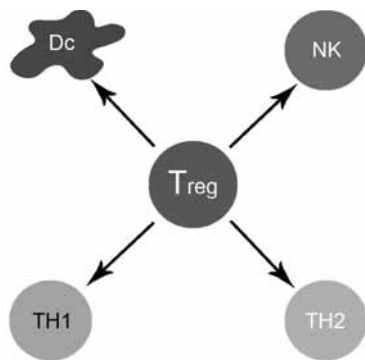


Рис. 4. Упрощенная схема иммунной системы
Pic. 4. Simplified Schema of the Immune System

В центре изображения иммунной системы показаны регулирующие Т-клетки (Treg), которые модулируют все иммунные реакции посредством воздействия на другие клетки иммунитета. Таким образом, они обеспечивают противоопухолевый эффект иммунной системы.

Опухоль всегда старается нарушить связь между Treg и другими иммунными клетками, чтобы блокировать влияние клеток Treg. В результате иммунная система не

Micro-metastases that can be detected in the blood by their expression of tissue specific antigens, e.g. Cytokeratins, are highly proposed to be the transitory stage of metastasis. In the figure below you see how a primary tumor disseminates tumor cells in the blood, which at a later stage can cause lymph node and distant metastases.

The adequacy of disseminated tumor cells as an indicator for the monitoring of the disease is demonstrated in the following graph:

The pic. above demonstrates that disseminated tumor cells in the peripheral blood — then called circulating tumor cells (CTC) — reflect the systemic progression of a breast cancer. A Epirubicin mono-therapy given to a breast cancer patient suffering from metastatic disease drops out clearly the CTCs (bold lines, grey: Cytokeratin-positive cells; black: Cytokeratin- and HER2-positive cells). After the discontinuation of the therapy a specific subpopulation of CTCs, expressing the HER2 (erbB-2) oncoprotein, appeared again in the peripheral blood (black bold line) and the patient died from brain metastasis a few months later.

This case shows that the level of disseminated tumor cells in the blood is closely correlated with the advance of the disease and demonstrates the applicability of this indicator in the monitoring of a patient and as an indication of the treatment's effectiveness.

1.2.2. Immune Therapy

In aftertreatment care of cancer patients, INDIVICON does not only focus on the estimation of the patients' risk to suffer from metastasis but also aims to prevent metastasis or at least delay the process of metastasis as long as possible.

In pic. 4 a schematic diagram is shown that indicates key steps in immune system regulation.

At the centre of the immune system, the regulating T-cells (Treg) regulate all immune reactions via their influence on the other immune cells which are usually being modulated by the Treg. The latter therefore is responsible for the anti-tumor-response of the immune system.

A tumor always tries to impede the communication between the Treg and the other immune cells with the aim to block the influence of the Treg cells. In consequence the immune system does not combat the tumor cells. With the help of an adequate immune therapy, this process can be halted or even be reversed.

By using the tool of an immune status analysis, practitioners can assess whether the immune system is suppressed and can then take measures to strengthen the immune system and reactivate the immune response to tumor cells.

1.3. Training of Physicians and Other Health Care Practitioners

With the objective to make new developments in complementary oncology available for a large number of patients, INDIVICON holds training seminars for physicians on a regular basis. The seminars are open to all interested practitioners and all members of the association are required to participate at least twice yearly to ensure the highest possible standards.

может бороться с опухолевыми клетками. Проведение адекватной иммунотерапии позволяет остановить или даже повернуть этот процесс в обратном направлении.

Используя средства анализа иммунного статуса, врач может оценить степень подавления иммунной системы и принять меры для укрепления иммунитета и реактивировать иммунный ответ на опухолевые клетки.

1.3. Подготовка врачей и других медицинских работников

Для того, чтобы дать возможность максимально большому числу больных воспользоваться преимуществами новых разработок в комплементарной онкологии, INDIVICON регулярно проводит учебные семинары для врачей. В семинарах могут принять участие все заинтересованные практикующие врачи, а все члены Ассоциации должны принимать в них участие не реже двух раз в год, чтобы поддерживать максимально высокие стандарты качества.

1.4. Клинические исследования

В области клинических исследований INDIVICON ставит своей задачей разработку новых подходов на двух этапах: (1) во время принятия терапевтических решений после первичного (хирургического) лечения — разработка новых профилей генной экспрессии, отражающих метастатическую активность первичной опухоли, для назначения терапии с максимальной вероятностью эффекта; и (2) исследования генной экспрессии по разработанному профилю можно проводить на образцах ткани, фиксированной в формалине и залитых в парафин, что позволяет проводить оценку через несколько лет после первичного лечения рака. Это открывает новые возможности для переоценки терапевтического решения в более позднее время и адаптации терапии в соответствии с последними достижениями в лечении рака, а также, как минимум, назначения комплементарной поддерживающей терапии.

Одним из диагностических инструментов, разработанных INDIVICON, является профиль экспрессии 14 генов, который предусматривает анализ тонких срезов ткани. По результатам исследований оценивают в баллах риск развития метастазов в следующие 5–10 лет для конкретного больного.

2. АССОЦИАЦИЯ ИНДИВИДУАЛИЗИРОВАННОЙ КОМПЛЕМЕНТАРНОЙ ОНКОЛОГИИ

2.1. Ассоциация

Ассоциация индивидуализированной комплементарной онкологии была образована по ряду следующих причин: во-первых, было необходимо создать юридическую основу для работы по таким направлениям, как медицинские исследования, подготовка специалистов и ведение больных после лечения.

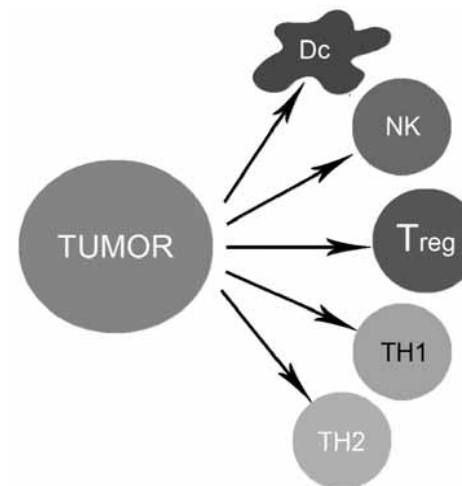


Рис. 5. Опухоль нарушает функционирование иммунных клеток в своем окружении
Pic. 5. Tumor impairs immune cells in its environment

1.4. Clinical Investigation

In terms of clinical investigation, INDIVICON aims to establish new approaches at two stages: (1) at the time point of therapy decision after primary (surgical) treatment, new gene expression profiles reflecting the metastatic activity of the primary tumor will be provided to give the highest probability for the most efficient therapy, and

(2) the profile is applicable to formalin-fixed paraffin-embedded tissue and therefore can be applied years after primary treatment of the cancer.

This opens the way to re-evaluate a therapy decision later on and to adapt a therapy to the latest developments in cancer treatment and complementary supportive therapies.

One new diagnostic tool INDIVICON is establishing is the determination of a 14-gene-expression-profile. For the analysis, only a thin tissue section must be taken from the tumor. The method results in a metastasis score which directly gives a number for the risk of a patient to get a metastasis in the next 5 or 10 years.

2. ASSOCIATION FOR INDIVIDUALIZED COMPLEMENTARY ONCOLOGY

2.1. The Association

The Association for Individualized Complementary Oncology was founded by several reasons: first of all, it was necessary to have a legal framework for all the activities in research, training, and aftertreatment care.

Далее, Ассоциация позволяет принять активное участие в своей работе всем врачам, которые хотят больше узнать о комплементарной онкологии. Разработки INDIVICON отличаются надежностью, т.к. Ассоциация постоянно ведет работу по совершенствованию методов анализа и предлагаемых методов лечения.

INDIVICON способствует дальнейшему развитию принципов индивидуализированной и комплементарной онкологии путем организации различных проектов и привлечения к их осуществлению специалистов, продемонстрировавших высокий уровень профессионализма и исследовательских способностей в данной области.

Кроме того, Ассоциация является инструментом влияния на общественный и частный секторы экономики, чтобы как можно больше больных могли воспользоваться преимуществами новых методов анализа и лечения.

2.2. Повышение профессионального уровня

INDIVICON всеми силами старается помочь своим членам повысить уровень знаний в области индивидуализированной комплементарной онкологии. Практикующие врачи могут получить специализированные знания, участвуя в работе регулярных семинаров, и повысить свой профессиональный уровень, используя в своей практике комплементарные методы анализа и лечения.

Ассоциация имеет техническую инфраструктуру, объединяющую необходимые лаборатории и клиническую базу. INDIVICON предоставляет практическим врачам возможность опробовать разработанные методы анализа и лечения, а также критерии, которые можно использовать при принятии терапевтических решений.

Организационная инфраструктура играет большую роль в повышении качества разработок INDIVICON. В Ассоциацию входят специалисты в области лабораторных исследований и лечения, которые отвечают за качество работ, чтобы обеспечить наиболее эффективное внедрение разработок в практику. В целях постоянного документирования и совершенствования методов анализа и лечения налажена система обратной связи с членами INDIVICON.

2.3. Услуги, предоставляемые членам Ассоциации

Все члены INDIVICON могут пользоваться широким спектром услуг, предоставляемых Ассоциацией. Главными средствами постоянного повышения уровня знаний в данной области являются проведение учебных семинаров, действующая компьютерная коммуникационная платформа и консультации по телефону.

Каждый член Ассоциации обязан принять участие в работе не менее двух семинаров в год, чтобы быть в курсе последних разработок и углубить уже полученные знания.

Веб-сайт INDIVICON (www.indivicon.org) является как информационной, так и коммуникационной платформой. Члены Ассоциации имеют возможность получать дополнительную информацию по всем релевантным проблемам и общаться с другими членами по интересам.

Furthermore, the association enables active participation of physicians who want to learn more about complementary oncology. INDIVICON provides reliability since its methods of analyses and suggested treatments are in a constant process of further development and refinement.

INDIVICON supports further proliferation of individualized and complementary oncology by organizing research projects and inviting speakers who demonstrate a high level of professional or academic expertise in this field.

Moreover, the association is a vehicle used to exert influence in the public and private sector in order to make the benefits of new ways of analysis and treatment accessible to as many patients as possible.

2.2. Professional Expertise

INDIVICON is eager to help its members to generate professional expertise in the field of individualized complementary oncology. Participating practitioners can gain specialist knowledge by way of the regularly held seminars and deepen their practical experience in the respective area by employing the complementary analyses and treatment in their practices.

The association provides the technical infrastructure by bringing together the respective laboratories and practices. INDIVICON also makes the processes of analysis and therapy available to the practitioners and gives them the criteria they need for decision making.

The organizational infrastructure is also important in terms of the professional expertise offered by INDIVICON. The association has gathered experts in the fields of analysis and treatment who are responsible for the quality management in order to ensure the best possible implementation in the practices. In order to further document and improve the analyses and treatment, INDIVICON members give feedback to the association on a regular basis.

2.3. Services for Members

All members of INDIVICON have access to a wide range of services offered by the association. The principal means to support its members in continuously developing their specialist knowledge in this area are the training seminars, online communication platform and telephone consultancy.

Every member is required to participate in at least two training seminars each year in order to keep up to date with the newest developments and in order to strengthen the already gained knowledge.

The INDIVICON website (www.indivicon.org) is meant as an information as well as a communication platform. Members have the possibility to get extra information on all relevant aspects and to communicate with other members who share the same interests.

In order to help member physicians with any queries INDIVICON offers a telephone consultancy. Members who have questions regarding analyses or treatment options can contact with academic and practicing experts who will be able to clarify these issues.

О.В. Крохина, В.П. Летыгин, Н.Н. Тупицын, В.Н. Блиндарь, В.Д. Ермилова

ИММУНОЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА МИКРОМЕТАСТАЗОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В КОСТНЫЙ МОЗГ

ГУ РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН, Москва

РЕЗЮМЕ

Задача исследования: Определение степени гематогенной диссеминации рака молочной железы (РМЖ) на основании обнаружения метастатического поражения костного мозга (КМ) высокочувствительными иммуноцитологическими методами с применением моноклональных антител (МКА) к эпителиальным антигенам.

Материалы и методы: В исследование включены 53 больные РМЖ (I–IV стадий). Изучение КМ, полученного при стеральной пункции, проводилось как стандартным цитологическим, так и иммуноцитологическим методом с применением МКА к цитокератинам (САМ 5.2 и KL-1). Положительной считали реакцию при наличии 1 метастатической клетки среди 1 миллиона миелокариоцитов.

Результаты: При стандартном цитологическом исследовании метастазы в костный мозг были обнаружены у 2 из 53 больных (3,77%). Использование МКА к цитокератинам (САМ 5.2 или KL-1) позволило во всех случаях подтвердить наличие цитологически выявленных метастазов в КМ и существенно повысить частоту их обнаружения при иммуноморфологическом исследовании: микрометастазы в КМ были выявлены у 24 больных (45,3%). Обнаружена достоверная взаимосвязь между наличием микрометастазов в костном мозге и отрицательным статусом опухоли по рецепторам эстрогенов ($p=0,04$) и прогестерона ($p=0,02$), выраженной круглоклеточной инфильтрацией опухоли ($p=0,02$), овариально-менструальной функцией пациенток. Статистически достоверной связи между наличием микрометастазов рака молочной железы в КМ и обнаружением комплексов злокачественных клеток в лимфатических щелях молочной железы, наличием метастазов в регионарные лимфоузлы, некрозом опухоли, степенью ее злокачественности, степенью дифференцировки, размером опухолевого узла, маммографическими признаками распространенности опухоли, а также ее локализацией в молочной железе не выявлено.

Выводы: Иммуноцитологическое исследование костного мозга у больных раком молочной железы может быть рекомендовано к внедрению в клиническую практику, особенно у пациенток с ранними стадиями заболевания для уточнения степени распространенности опухолевого процесса и оптимизации тактики лечения.

Ключевые слова: рак молочной железы, микрометастазы в костный мозг.

O.V. Krokhina, V.P. Letyagin, N.N. Tupitsyn, V.N. Blindar, V.D. Ermilova

IMMUNOCYTOLOGICAL DIAGNOSIS OF MICROMETASTATIC BONE MARROW INVOLVEMENT IN PATIENTS WITH BREAST CANCER

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

ABSTRACT

Cytological as well as immunocytological (monoclonal antibodies CAM 5.2, KL-1) bone marrow study was done in 53 patients with breast cancer. Positive results were noted in case when one or more single cells with panepithelial markers were found. Standard cytological examination revealed bone marrow involvement in 2 of 53 cases (3,8%). Immunocytological study confirmed bone marrow involvement in such cases and significantly increased the rate of micrometastases detection — 24 pts (45,3%). We've found the significant correlation immunocytological detection of bone marrow micrometastases and positive estrogen ($p=0,04$) and progesterone ($p=0,02$) hormone receptor status, as well as with prominent lymphoid infiltration of tumor ($p=0,02$).

Key words: breast cancer, bone marrow micrometastases.

ВВЕДЕНИЕ

Исследования по проблеме рака молочной железы занимают одно из ведущих мест в современной онкологической науке. Статистические данные, опубликованные в последние годы, свидетельствуют о неуклонном росте заболеваемости и смертности от рака молочной железы в различных странах [3].

В связи с многочисленными трудностями в оценке прогноза и выборе адекватной тактики лечения злокачественных новообразований, недостаточной ранней диагностикой, одной из актуальных проблем современной онкологии стал поиск и изучение новых методов диагностики и стадирования опухолей и оценка противоопухолевого иммунитета.

Согласно теории Б. Фишера, рак молочной железы является системным заболеванием, и даже при клинически ранних стадиях (T1-2N0M0) высока вероятность скрытой системной диссеминации опухолевого процесса [7].

Обнаружение малых количеств метастатических клеток (микрометастазов) в костном мозге больных раком молочной железы является показателем гематогенной диссеминации процесса, и многими учеными расценивается как неблагоприятный признак, свидетельствующий о дальнейшем формировании метастазов, прежде всего метастазов в кости [4; 8].

Окончательное решение о наличии или отсутствии метастазов в костный мозг выносится при гистологическом или цитологическом исследовании, однако для каждого метода существует определенная разрешающая способность. Так, гистологический и цитологический методы исследования выявляют злокачественные клетки в костном мозге при их достаточно большом количестве, вследствие чего обнаружение метастазов становится возможным лишь на поздних стадиях рака молочной железы. Применяя гистологическое исследование, возможно выявление 1 опухолевой клетки среди 100 миелокариоцитов [1].

Реальное представление о степени распространенности процесса дают результаты иммуноморфологического исследования. Используя иммуноцитологический метод с применением моноклональных антител к антигенам, экспрессируемым клетками эпителиальных опухолей, можно обнаружить 1 опухолевую клетку среди 1 млн. миелокариоцитов.

На клетках рака молочной железы почти в 100% случаев экспрессирован эпителиальный мембранный антиген (ЕМА), цитокератины (СК), туморассоциированный гликопротеин (TAG-12), антиген мембран жировых глобул женского молока (HMFG-1), панэпителиальный антиген (EGP-34), реже раково-эмбриональный антиген (РЭА) и ряд других маркеров.

Развитие иммуноцитологии привело к появлению моноклональных антител (МКА) к данным антигенам, и открыло новые диагностические возможности для выявления единичных опухолевых клеток в лимфатических узлах, костном мозге, периферической крови. Полученные моноклональные антитела обладают разной чувствительностью и специфичностью. Известно, что муциноподобный раковый антиген (МСА) экспрессируется клетками гемопоэза, моноклональные антитела к ЕМА перекрестно реагируют с лимфоидными клетками костного мозга [6; 9]. По мнению

INTRIDUCTION

Breast cancer studies are an important part of the oncology science today. Recent statistical data demonstrate a continuous rise in breast cancer prevalence and mortality worldwide [3].

The great difficulty in evaluating the prognosis and establishing adequate treatment policies in cancer patients, low rate of early diagnosis render very important search for and study of novel methods for cancer diagnosis and staging, as well as assessment of antitumor immunity.

According to B. Fisher breast cancer is a systemic disease presenting a high risk of latent systemic dissemination even at early clinical stages (T1-2N0M0) [7].

Detection of small clusters of metastatic cells (micrometastases) in bone marrow of breast cancer patients is indicative of hematogenous cancer dissemination and is considered by many investigators a poor prognostic sign reflecting potential involvement of other sites, first of all bones [4; 8].

Final decision about the presence or absence of bone marrow involvement is made basing on histological or cytological findings, though both have a limited resolution. For instance, both histological and cytological tests detect malignant cells in bone marrow only if they are present in a sufficient quantity, therefore detection of bone marrow involvement is possible only at advanced breast cancer. Histology is able to detect 1 cancer cell per 100 myelokaryocytes [1].

Assessment of actual disease advance may be made by immunomorphological study. Immunocytology using monoclonal antibodies to antigens expressed on epithelial tumor cells can detect 1 tumor cell among 1 million myelokaryocytes.

Next to 100% of breast cancer cells express epithelial membrane antigen (EMA), cytokeratins (CK), tumor associated glycoprotein (TAG-12), human milk fat globule antigen (HMFG-1), panepithelial antigen (EGP-34); and at a lower frequency carcinoembryonic antigen (CEA) and some other markers.

The progress in immunocytology over recent years led to development of monoclonal antibodies (MAB) to these antigens and gave rise to diagnostic tests for detection of single tumor cells in lymph nodes, bone marrow, peripheral blood. The MAB have different sensitivity and specificity. Mucin-like cancer antigen (MCA) is known to be expressed by hemopoietic cells, MAB to EMA show cross-reactivity with bone marrow lymphoid cells [6; 9]. W. Janni et al. (2000) consider antibodies to cytokeratins a standard for detection of bone marrow micrometastasis in breast cancer.

MAB CAM 5.2 react with cytokeratins 7 and 8 [12], while MAB to pancytokeratins KL-1 recognize cytokeratins 2, 6, 8, 10, 11, 18, 19 and at a lower extent 5, 14, 15.

Hemopoietic changes characteristic of bone marrow macrometastasis in breast cancer are well known [2; 5], while there are few reports about bone marrow reaction to the presence of single tumor cells [11].

It therefore seems very important to study advance of breast cancer basing on detection of micrometastases in bone marrow, to assess efficacy of various diagnostic tests for bone marrow involvement, to establish differences in macro- and micrometastases, to compare immunocytological findings with other evidence of disease advance, to analyze changes in

Janni W. и соавт., 2000, современным стандартом для обнаружения микрометастазов рака молочной железы в костный мозг являются антитела к цитокератинам.

Моноклональные антитела САМ 5.2 взаимодействуют с цитокератинами 7 и 8 [12], а МКА к панцитокератинам KL-1 распознают цитокератины 2, 6, 8, 10, 11, 18, 19 и в меньшей степени 5, 14, 15.

Изменения в системе кроветворения, характерные для макрометастазов рака молочной железы в костный мозг, хорошо известны [2;5], однако имеются лишь единичные сообщения об анализе костномозговой реакции на присутствие отдельных опухолевых клеток [11].

Таким образом, представляется актуальным изучить степень диссеминации рака молочной железы на основании выявления микрометастазов в костный мозг, оценить эффективность различных методов диагностики метастатического поражения костного мозга, определить различия между макро- и микрометастазами, сопоставить результаты иммуноцитологического метода с другими показателями распространенности процесса, проанализировать изменения в системе кроветворения при метастатическом поражении костного мозга.

Целью работы являлось определение степени гематогенной диссеминации рака молочной железы на основании обнаружения метастатического поражения костного мозга высокочувствительными иммуноцитологическими методами с применением моноклональных антител к эпителиальным антигенам.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Сравнить чувствительность иммуноцитологического и цитологического методов диагностики метастазов рака молочной железы в костный мозг.
2. Определить частоту опухолевого поражения костного мозга при раке молочной железы на различных стадиях при использовании иммуноцитологического метода.
3. Оценить взаимосвязь иммунологического обнаружения микрометастазов рака молочной железы в костный мозг с биологическими характеристиками первичной опухоли, поражением лимфатических узлов, другими клинико-лабораторными показателями распространенности процесса.
4. Проанализировать состояние кроветворения у больных с макрометастазами рака молочной железы в костный мозг, микрометастазами и без гематогенной диссеминации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы материалы клинического, морфологического, иммуноцитологического обследования 53 больных раком молочной железы, находившихся на лечении в хирургическом отделении опухолей молочных желез РОНЦ в период с 1999г. по 2001г.

В исследуемую группу вошли женщины в возрасте от 27 до 72 лет. Средний возраст составил 49 лет.

Стерильная пункция производилась всем больным до начала лечения. Исследование костного мозга выполнялось как стандартным цитологическим методом, так

hemopoiesis due to metastatic involvement of bone marrow.

The purpose of this study was to define degree of breast cancer hematogenous dissemination basing on detection of bone marrow involvement by highly sensitive immunocytological tests using MAB to epithelial antigens.

The following objectives were defined:

1. To compare sensitivity of immunocytological and cytological tests for the diagnosis of bone marrow involvement in breast cancer patients.
2. To assess the rate of bone marrow involvement in breast cancer patients at various disease stages by immunocytology.
3. To assess relationship of micrometastatic bone marrow involvement in breast cancer and biological features of the primary tumor, lymph node status, other clinical and laboratory evidence of disease advance.
4. To analyze hemopoietic status in patients with bone marrow macrometastases vs. micrometastases of breast cancer vs. those free from hematogenous dissemination.

MATERIAL AND METHODS

The paper analyzes clinical, morphological and immunocytological data of 53 breast cancer patients managed at the Breast Cancer Surgery Department, CRCR during 1999 to 2001.

The study population consisted of women 27 to 72 years of age, mean 49 years.

All patients underwent sterile puncture before treatment. Study of bone marrow specimens was made both by standard cytology and immunocytology (by immunofluorescence using MAB to cytokeratins CAM 5.2 (Becton Dickinson, USA) and KL-1 (Immunotech, France). Positive test was defined as the presence of 1 metastatic cell per million myelokaryocytes. The use of MAB allows easy detection of metastatic cells among myelokaryocytes by bright specific cytoplasmatic fluorescence.

RESULTS AND DISCUSSION

Twenty three (43.4%) women were at childbearing age, 8 (15.1%) were perimenopausal and 22 (41.5%) menopausal.

Infiltrative ductal carcinoma was the most common (39.6%) histological type of breast cancer. Infiltrative lobular carcinoma was also rather common (32.1%). Other histological types (mixed, tubular, medullary, mucous and papillary carcinoma) were less frequent.

Metastases detected by bone marrow cytology were considered macrometastases. While micrometastases were defined as metastases detected by immunocytology. This type is undoubtedly just one of the large variety of micrometastases in a broad sense. Initially the meaning of the term 'micrometastases' was limited to tumor cell clusters less than 2 mm in diameter. However immunocytology using MAB can detect not only cell clusters but also single occult cancer cells. Pic. 1 demonstrates a metastatic cell cluster in bone marrow of a breast cancer patient.

Standard cytology detected bone marrow metastases in 2 (3.77%) of 53 patients. One of them had clinical stage IV disease before the detection of bone marrow involvement (T4N2M1; an axillary lymph node conglomerations, epigastral and paraaortal lymph node

и иммуноцитологическим (реакция иммунофлуоресценции с применением МКА к цитокератинам CAM 5.2 (Becton Dickinson, США) и KL-1 (Immunotech, Франция)). Положительной считали реакцию при наличии 1 метастатической клетки среди 1 миллиона миелокариоцитов. При использовании МКА к цитокератинам метастатические клетки легко обнаруживаются среди миелокариоцитов по наличию яркого специфического цитоплазматического флуоресцентного свечения. Подсчет клеток миелограммы и их анализ производился в клинической лаборатории.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В репродуктивном возрасте находились 23 больные (43,4%), в состоянии перименопаузы — 8 пациенток (15,1%), в менопаузе — 22 женщины (41,5%).

Наиболее частым гистологическим вариантом был инфильтративный протоковый рак (39,6%). Отмечена достаточно высокая частота инфильтративного долькового рака (32,1%). Остальные гистологические формы (смешанный, тубулярный, медулярный, слизистый и папиллярный рак) встречались реже.

Метастазы, выявляемые при цитологическом исследовании костного мозга, обозначались как макрометастазы. Термин «микрометастазы» использовался нами применительно к метастазам, определяемым иммуноцитологическим методом. Безусловно, это лишь одна из разновидностей микрометастазов в широком смысле этого слова. Изначально термином «микрометастазы» обозначали кластер опухолевых клеток диаметром менее 2 мм, однако при иммуноцитологическом исследовании с применением моноклональных антител удается определить отдельные, «окультные» раковые клетки, а не только их кластеры. На рис. 1 представлен комплекс метастатических клеток в костном мозге при раке молочной железы.

При стандартном цитологическом исследовании метастазы в костный мозг были обнаружены у 2 из 53 больных (3,77%). У одной из них IV клиническая стадия была установлена до обнаружения метастатических клеток в костном мозге (T4N2M1 — конгломерат лимфоузлов в подмышечной области, метастазы в лимфатические узлы эпигастральной области, парааортальные лимфоузлы, печень). У другой пациентки исходная стадия заболевания была расценена как T2N0M0 (IIa), после цитологического обнаружения метастазов в костный мозг стадия изменена на IV.

Использование моноклональных антител CAM 5.2 и KL-1 позволило во всех случаях подтвердить наличие цитологически выявленных метастазов в костном мозге и существенно повысить частоту их обнаружения при иммуноморфологическом исследовании. Результаты всех исследований оценивались в зависимости от чувствительности метода. К первой группе больных с микрометастазами были отнесены пациентки, в костном мозге которых выявлены 1 или более опухолевых клеток в 1 млн. миелокариоцитов. При применении этого критерия микрометастазы диагностированы у 24 пациенток (45,3%). Ряд исследователей считает пороговой опухолевую нагрузку в 10 злокачественных клеток и указывает, что при таком количестве метастатических клеток в костном мозге вероятность возникновения отдаленных метастазов резко возрастает. В связи с этим, вторую группу больных составили пациентки с 10 и более опухолевыми клетками в 1 млн. миелокариоцитов. При по-

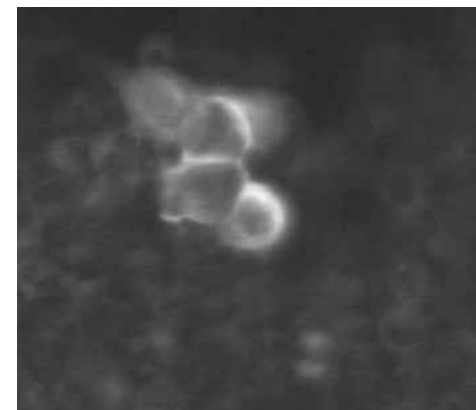


Рис. 1. Комплекс метастатических клеток в костном мозге больной раком молочной железы. Цитоцентрифужный препарат. Окраска МКА KL-1. $\times 400$.

Pic. 1. A metastatic cell cluster in bone marrow of a breast cancer patient. Cyto centrifuge specimen. KL-1 staining. Magn. $\times 100$.

involvement, liver metastases). The other patient had initially T2N0M0 (IIa) disease and the stage was changed to IV after the cytological study.

Immunomorphological study using CAM 5.2 and KL-1 confirmed the bone marrow metastases as detected by cytology in all cases and increased considerably frequency of their detection. Results of all tests were assessed with respect to their sensitivity. Twenty four (45.3%) patients with micrometastases at 1 or more tumor cells per million myelokaryocytes were assigned to group 1. Some investigators believe that detection of 10 cancer cells in bone marrow specimens renders development of distant metastases very likely. Therefore group 2 included 11 (20.75%) patients with 10 or more tumor cells per million myelokaryocytes. Pic. 2 demonstrates frequency of bone marrow metastatic involvement in breast cancer patients by standard cytology and immunocytology.

It should be mentioned that counts of tumor cells detected by immunocytology in our study were very low: 1 to 12 per million myelokaryocytes. Only 2 of 28 patients had 20 tumor cells and 1 had 45 cells per million myelokaryocytes. The ability to detect single tumor cells makes this test much more sensitive than cytology and is its main advantage.

We analyzed relationship between the presence of tumor cells in bone marrow and some clinical and laboratory findings, biological characteristics of the primary, lymph node involvement, other evidence of disease advance.

Relationship between ovarian/menstrual function and breast cancer metastasis to bone marrow was statistically significant ($p=0.031$). Mean number of metastatic cells in bone marrow of women at childbearing age was three-fold greater than in menopausal ones (6.97 ± 2.22 vs. 2.26 ± 0.7 , respectively).

роговом уровне в 10 клеток микрометастазы выявлены в 11 случаях (20,75%). Частота выявления метастазов рака молочной железы в костный мозг при использовании стандартного цитологического метода и иммуноцитологического исследования с применением моноклональных антител представлена на рис. 2.

Важным является то, что в нашем исследовании количество опухолевых клеток, определяемых иммуноцитологически, было очень низким: от 1 до 12 среди 1 млн. миелокариоцитов. Лишь у 2-х из 28 больных иммуноцитологически было обнаружено 20 опухолевых клеток и у одной больной 45 клеток в 1 млн. миелокариоцитов. Возможность выявления единичных опухолевых клеток является главной причиной большей чувствительности иммуноцитологии в сравнении с цитологическим исследованием и ее основным преимуществом

Нами была проанализирована связь между присутствием в костном мозге опухолевых клеток и некоторыми клинико-лабораторными данными, биологическими характеристиками первичной опухоли, поражением лимфатических узлов, другими показателями распространенности процесса.

Связь между овариально-менструальной функцией и метастазированием рака молочной железы в костный мозг была достоверной ($p=0,031$). Среднее количество метастатических клеток в костном мозге больных репродуктивного возраста в 3 раза выше, чем у больных, находящихся в менопаузе ($6,97 \pm 2,2$ и $2,26 \pm 0,7$ соответственно).

У больных с рецепторотрицательной опухолью по рецепторам эстрогенов микрометастазы в костный мозг наблюдались в 62,1% случаев, а при РЭ+ опухоли — в 28,6% ($p=0,039$) (рис. 3)

Выявлена достоверная связь между отрицательным рецепторным статусом опухоли по рецепторам прогестерона и метастазированием рака молочной железы в костный мозг. При РП- опухоли микрометастазы обнаружены в 76,9% случаев, а у пациенток с рецепторположительной опухолью по РП — в 3 раза реже — в 25% (рис.4).

При отсутствии в опухоли рецепторов эстрогенов и рецепторов прогестерона (РЭ-РП-) у 84,6% больных в костном мозге имелись микрометастазы рака молочной железы. Среднее количество злокачественных клеток в костном мозге больных с РЭ-РП- опухолью в 6,4 раза выше, чем среднее количество метастатических клеток, выявляемых у больных с рецепторположительной опухолью по рецепторам эстрогенов и прогестерона. Таким образом, наличие в костном мозге метастатических клеток рака молочной железы, взаимосвязано с негативным статусом опухоли по рецепторам эстрогенов и прогестерона.

В группе больных с наличием 1 и более опухолевых клеток среди 1 млн. миелокариоцитов обнаружена статистически достоверная взаимосвязь между круглоклеточной инфильтрацией и микрометастазами. Под круглоклеточной инфильтрацией понимают инфильтрацию опухоли лимфоцитами, макрофагами, плазматическими клетками. Среди больных с выраженной круглоклеточной инфильтрацией опухоли (++) и (+++) злокачественные клетки в костном мозге определены у 83,3% пациенток, а при умеренной и слабой — соответственно у 58,3% и 33,3%.

В группе пациенток с 10 и более злокачественными клетками связь между круглоклеточной инфильтрацией опухоли и метастазированием в костный мозг прояв-

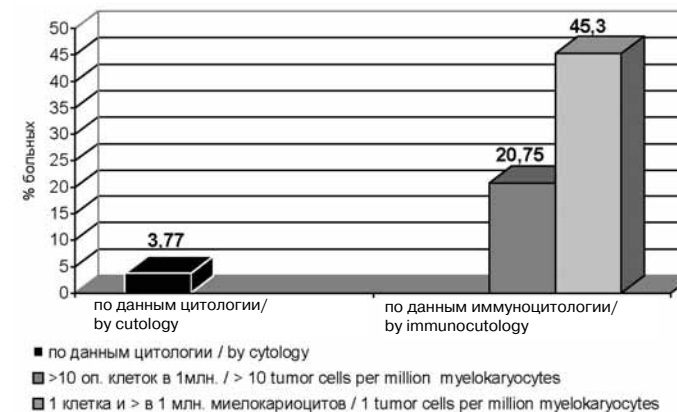


Рис. 2. Частота выявления метастазов в костный мозг цитологическим и иммуноцитологическим методами у больных раком молочной железы

Fig. 2. Frequency of bone marrow metastatic involvement in breast cancer patients by standard cytology and immunocytology

Bone marrow micrometastases were found in 62.1% of patients with estrogen receptor (ER) negative tumors and in 28.6% of patients with ER-positive cancer ($p=0.039$) (pic. 3).

There was a significant relationship between progesterone receptor (PR) negative status and bone marrow metastasis of breast cancer. Micrometastases were found in 76.9%

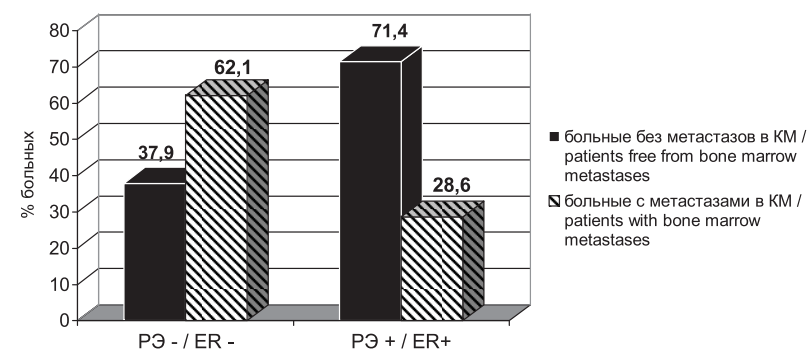


Рис. 3. Распределение больных РМЖ в зависимости от статуса рецепторов эстрогенов в опухоли и иммуноцитологического выявления микрометастазов в костный мозг

Fig. 3. Distribution of breast cancer patients with respect to estrogen receptor status and immunocytological detection of bone marrow micrometastases

ляется с более высокой точностью ($p=0,001$). Опухолевые клетки в костном мозге обнаружены у 4,8% больных со слабой инфильтрацией опухоли, у 33,3% больных с умеренной инфильтрацией и у 66,7% пациенток с выраженной инфильтрацией.

Процент иммуноцитологического обнаружения микрометастазов возрастал от I к IV стадии (от 40% до 62,5%). Наибольшая частота определения метастазов и самое высокое среднее значение количества опухолевых клеток в КМ отмечено при IV стадии заболевания ($7,2$ клетки $\pm 3,5$), наименьшее — при IIIa ст. (0), что, видимо, объясняется малым числом больных в данной группе.

В нашем исследовании не обнаружено различий в частоте выявления микрометастазов при инфильтративном протоковом (57,1%) и инфильтративном дольковом раке (58,8%).

Статистически достоверной связи между частотой выявления микрометастазов в костный мозг и размером первичного очага в молочной железе, степенью злокачественности опухоли, степенью ее дифференцировки, обнаружением комплексов злокачественных клеток в лимфатических щелях молочной железы, некрозом опухоли, маммографическими признаками распространенности, а также локализацией опухоли в молочной железе не выявлено.

Представлялось интересным оценить наличие корреляции между метастазами в костный мозг и статусом лимфатических узлов у больных раком молочной железы.

В нашем исследовании отсутствовала связь между микрометастазированием рака молочной железы в костный мозг и наличием лимфогенных метастазов в регионарные лимфоузлы (индексом N, наличием конгломератов, количеством пораженных метастазами лимфоузлов, прорастанием капсулы лимфоузла опухолью). При любом индексе N частота обнаружения микрометастазов составляла примерно 52% — 53%. На наш взгляд, полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что лимфогенный и гематогенный пути метастазирования являются независимыми и равноценными, а опухолевые клетки могут попадать в кровоток, минуя аксиллярные лимфоузлы.

Анализ результатов радиоизотопного исследования костей в обследуемой группе больных не выявил достоверной взаимосвязи между частотой обнаружения микрометастазов в костном мозге и специфическим поражением по данным скинтиграфии. В группе больных с присутствием опухолевых клеток в костном мозге скинтиграфические признаки поражения костей встречались в 2 раза чаще, однако результаты статистически не достоверны.

Иммуноцитологическая детекция опухолевых клеток в костном мозге и рентгенологическое обнаружение метастазов в кости также не были взаимосвязаны ни в одной из групп.

Нами были изучено состояние кроветворения у больных с макрометастазами, микрометастазами и без гематогенной диссеминации. У 2 пациенток с макрометастазами рака молочной железы в костный мозг, подтвержденными цитологическим и иммуноцитологическим методами, наблюдалась выраженная реакция системы кроветворения в виде гипоплазии костного мозга. Содержание миелокариотитов и мегакариотитов в костном мозге обеих пациенток было снижено: у одной

of patients with PR negative tumors and in 25% (3-fold less frequently) in PR positive cases (pic. 4).

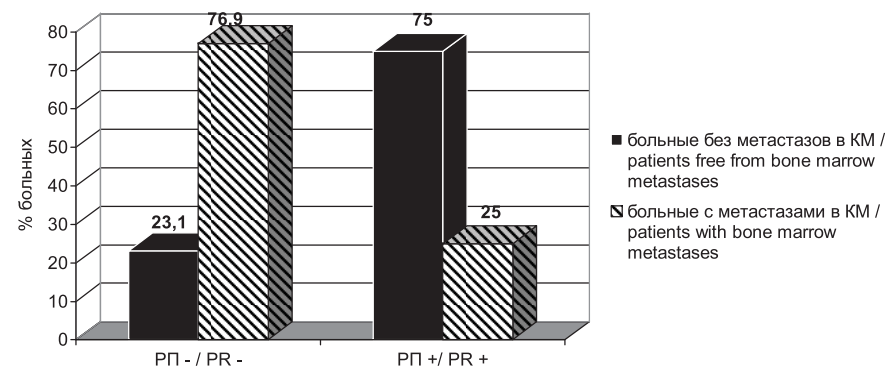


Рис. 4. Распределение больных РМЖ в зависимости от статуса рецепторов прогестерона в опухоли и выявления микрометастазов в костный мозг

Pic. 4. Distribution of breast cancer patients with respect to progesterone receptor status and the presence of bone marrow micrometastases

Micrometastases of breast cancer were detected in bone marrow in 84.6% women free from both ER and PR (ER PR) in their tumors. Mean number of malignant cells in bone marrow of ER PR patients was 6.4-fold as great as that in ER+PR+ cases. Therefore metastatic involvement of bone marrow in breast cancer is related with ER- and PR-negative tumor status.

Patients from group 1 (1 or more tumor cells per million myelokaryocytes) demonstrated a statistically significant relationship between round-cell infiltration and micrometastasis. The round-cell infiltration is defined as infiltration of the tumor by lymphocytes, macrophages, plasmatic cells. Among patients with marked (++ or ++++) round-cell infiltration 83.3% had bone marrow involvement, the respective rates for patients with moderate and mild round-cell infiltration were 58.3% and 33.3%.

In group 2 (10 or more tumor cells per million myelokaryocytes) the relationship between round-cell infiltration and micrometastasis was stronger ($p=0,001$). Bone marrow involvement was found in 4.8% of patients with mild infiltration, 33.3% of patients with moderate and 66.7% of those with marked infiltration.

Percentage of patients with immunocytologically detected micrometastases was increasing from 40% to 62.5% with increase in disease stage from I to IV. Patients with stage IV disease demonstrated the highest frequency of micrometastasis and had the greatest mean number of tumor cells in bone marrow (7.2 ± 3.5 cells), while in stage IIIa the above mentioned rates were the lowest (0), which might be due to very few patients in this subgroup.

больной гранулоцитарный и эритроидный ростки были относительно сохранены, однако среди клеток красного ряда преобладали оксифильные формы (24%, N — 0,8-5,6%). У другой пациентки эритроидный росток был представлен единичными клетками (4,9%, N — 14,5-26,5%), резко увеличено лейко-эритробластическое отношение (15,0, N — 2,1-4,5), снижен индекс созревания нейтрофилов, повышено количество моноцитов и лимфоцитов.

В группе больных с микрометастазами снижение клеточности костного мозга отмечается в 2 раза чаще (53,6%), чем у пациенток без метастатического поражения костного мозга (28%).

Косвенными признаками присутствия опухолевых клеток в костном мозге можно считать скопления 3-5 плазматических клеток и обнаружение крупных клеток с гиперхромным ядром и множественными нуклеолами, отличающихся от нормальных клеток костного мозга.

Скопления плазматических клеток не типичны для нормальной миелограммы. У 100% больных, в пунктатах которых регистрируются скопления плазматических клеток, иммуноцитологически определены микрометастазы в костный мозг. Таким образом, обнаружена достоверная связь между наличием в костном мозге скоплений плазматических клеток и выявлением микрометастазов ($p=0,001$).

У больных с иммуноцитологически определяемыми метастазами в костном мозге обнаружены изменения всех основных видов клеток, участвующих в обеспечении иммуноцитопоэза: моноцитов, лимфоцитов, плазматических клеток. Содержание моноцитов и лимфоцитов в костном мозге при наличии микрометастазов повышено. Так, количество моноцитов повышалось в 4 раза чаще у больных с опухолевым поражением костного мозга, чем у пациенток без метастазов. Среднее их значение составило соответственно 2,3 и 1,7 ($p<0,05$).

Содержание лимфоцитов в костном мозге у больных с микрометастазами было достоверно выше, чем при отсутствии его опухолевого поражения (соответственно $13,9\pm 0,98$ и $10,7\pm 0,5$) ($p<0,01$). Не исключено, однако, что увеличение количества лимфоцитов носило относительный характер.

Обнаружено статистически достоверное повышение лейко-эритробластического отношения ($5,4\pm 1,07$) в группе пациенток с 10 и более опухолевыми клетками среди 1 млн. миелокарицитов по сравнению с больными без микрометастазов ($3,78\pm 0,2$), $p<0,05$.

Можно предположить, что подобные изменения являются наиболее ранним проявлением реакции костного мозга на присутствие отдельных опухолевых клеток.

В анализах периферической крови не выявлено статистически достоверных различий в содержании эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, гемоглобина, гематокрита и других показателей крови у больных с микрометастазами рака молочной железы в костный мозг и у пациенток без метастатического его поражения.

Представленные нами данные демонстрируют необходимость внедрения в клиническую практику иммуноморфологического исследования костного мозга, особенно на ранних стадиях рака молочной железы, для оценки степени распространенности опухолевого процесса. Применение иммуноцитологического метода с использо-

We found no difference in frequency of micrometastasis detection between cases with infiltrative ductal (57.1%) vs. infiltrative lobular (58.8%) carcinomas.

There was no statistically significant relationship between frequency of micrometastatic bone marrow involvement and the primary tumor size, grade or differentiation, the presence of cancer cell clusters in breast lymphatic fissures, tumor necrosis, mammographic evidence of disease advance and tumor location in the breast.

It was thought interesting to assess correlation between bone marrow metastasis and lymph node status in patients with breast cancer.

Bone marrow micrometastatic involvement was found not related to the presence of regional lymph node metastasis (N index, the presence of conglomerations, number of lymph nodes involved, tumor invasion of lymph node capsule). The frequency of micrometastasis detection was about 52-53% for any N value. This finding may be a confirmation of lymphogenous and hematogenous metastasis types being independent and equivalent, and the ability of tumor cells to penetrate into circulation avoiding axillary lymph nodes.

Analysis of bone scintigraphy findings failed to discover significant relationship between frequency of micrometastatic bone marrow involvement and bone disease. Patients with tumor cells in bone marrow presented with scintigraphic evidence of bone involvement 2-fold more frequently, but the differences were not statistically significant.

There was no relationship between immunocytological detection of tumor cells in bone marrow and radiological detection of bone involvement in either group.

We studied hemopoiesis status in patients with macrometastases, micrometastasis and in those free from hematogenous dissemination. Two patients with bone marrow macrometastases by cytology and immunocytology presented with a marked hemopoietic reaction as bone marrow hypoplasia. Both patients had decreased counts of myelokaryocytes and megakaryocytes in bone marrow. One of them demonstrated granulocyte and erythroid series relatively preserved, and predominance of oxyphilic forms among red cells (24%, N — 0.8 to 5.6%). In the other case there were just single erythroid cells (4.9%, N — 14.5 to 26.5%), leukoblast-erythroblast ratio markedly increased (15.0, N — 2.1 to 4.5) and neutrophil maturation index markedly decreased, counts of monocytes and lymphocytes were increased.

Patients with micrometastasis presented with decreased bone marrow cellularity 2-fold more frequently (53.6%) than those free from bone marrow involvement (28%).

Clusters of 3 to 5 plasmatic cells and large cells with hyperchromatic nucleus and multiple nucleoli different from normal bone marrow cells may be an indirect evidence of bone marrow involvement.

Clusters of plasmatic cells are not typical of normal myelogram. Bone marrow involvement was detected immunocytologically in 100% of cases with clusters of plasmatic cells in puncture specimens. Therefore we found a significant relationship between the presence of plasmatic cell clusters and bone marrow micrometastases ($p=0.001$).

Patients with immunologically detected bone marrow involvement demonstrated changes in all cell types responsible for immunocytosis, i.e. monocytes, lymphocytes, plasmatic cells. Cases with bone marrow micrometastasis had increased levels of mono-

ванием моноклональных антител к цитокератинам CAM 5.2 и KL-1 дает преимущества в обнаружении единичных опухолевых клеток в костном мозге больных раком молочной железы, что может явиться одним из основополагающих критериев прогноза и служить показанием для назначения адъювантной химиотерапии.

Литература/References:

1. Берензон Д.Г., Колосков А.В., Тарасов В.А. Поражение костного мозга при солидных опухолях. // Гематология и трансфузиология. — 2000 — т.45 — № 5 — С.35-38.
Berenzon D.G., Koloskov A.V., Tarasov V.A. Bone marrow involvement in solid tumors // Hematology and transfuziology. — 2000. — V.45, N5. — P.35-38 (In Russian)
2. Воробьев А.И. Руководство по гематологии// Москва — 1985- т.1 — С.362.
Vorobiev A.I. Handbook in Hematology //Moscow. — 1985. — V.1. — P. 362 (In Russian)
3. Давыдов М.И., Аксель Е.М. // Злокачественные новообразования в России и странах в 2003г. // Москва — 2005г. — с. 3-77.
Davidov M.I., Aksel E.M. //Malignant diseases in Russia and CIS countries //Moscow. — 2005. — P. 3-77 (In Russian)
4. Braun S., Pantel K. Prognostic significance of micrometastatic bone marrow involvement. // Breast Cancer Res. Treat. — 1998 -Nov. — 52(1/3) — P. 201-216.
5. Come S.E., Schnipper L.E. Bone marrow metastases. // In Marrow M., Schnitt F. et al. (eds.): The breast cancer. — Philadelphia — New-York — 1995 — P. 847-853.
6. Delsol G., Gatter K.C., Stein H. et al. Human lymphoid cells express epithelial membrane antigen. // Lancet. — 1984 — Nov. — Vol.2 — P. 1124-1128.
7. Fisher B. Biological and clinical considerations regarding the use of surgery and chemotherapy in the treatment of primary breast cancer. // Cancer. — 1977 — Vol.40 — P. 574-587.
8. Harbeck N., Untche M., Pache L., Eiermann W. Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy : results of a 3-year median follow-up. // Br. J. Cancer — 1994 — Vol.69 — P.566-571.
9. Heyderman E., Macartney J.C. Epithelial membrane antigen and lymphoid cells. // Lancet. — 1985 — Jan.12 — Vol.1 — P. 109.
10. Janni W., Rjosk D., Braun S. Clinical relevance of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with different stages of breast cancer. // Clin. Breast Cancer. — 2000 — Oct. — Vol.1 — №3 — P. 217-225.
11. Janni W., Strobl B., Rack B., Rjosk D., Schindlbeck C., Hantschmann P., Kentenich C., Sigg W., Zerzer M., Sommer H. The influence of the hemoglobin concentration on the hematogenous tumor cell dissemination at the time of the initial diagnosis of breast cancer. // Dtsch. Med. Wochenschr. — 2002 — Jan. 18 — Vol.127 — № 3 — P. 71-77.
12. Smedts F., Ramaeckers F., Robben H. et al. Changing patterns of keratin expression during progression of cervical intraepithelial neoplasia. // Am. J. Pathol. — 1990 — Vol.136 — №3 — P.657-667.

cytes and lymphocytes. For instance, the number of monocytes was increased in patients with bone marrow micrometastases 4-fold more frequently than in metastasis-free patients (mean 2.3 vs. 1.7; $p<0.05$).

Lymphocyte levels in patients with bone marrow micrometastases were significantly higher than in metastasis-free cases (13.9 ± 0.98 vs. 10.7 ± 0.5) ($p<0.01$). It cannot however be excluded that the rise in lymphocyte count was just relative.

There was a significant increase in leukoblast-erythroblast ratio (5.4 ± 1.07) in patients with 10 or more tumor cells per million myelokaryocytes as compared to metastasis-free patients (3.78 ± 0.2) ($p<0.05$).

Such changes might be the earliest signs of bone marrow response to the presence of single tumor cells.

Analysis of peripheral blood failed to discover statistically significant differences in RBC, WBC, platelet counts, hemoglobin, hematocrit or other parameters between bone marrow micrometastasis-positive and negative cases.

Our findings demonstrate the need in introduction of immunomorphological study of bone marrow into clinical practice especially in early breast cancer to assess disease advance. Immunocytology using MAB to cytokeratins CAM 5.2 and KL-1 has the advantage of detecting single tumor cells in bone marrow of breast cancer patients that may be a principal criterion of prognosis and indication of adjuvant chemotherapy.

М.П. Никулин

МИНИМАЛЬНАЯ РЕЗИДУАЛЬНАЯ БОЛЕЗНЬ ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА

ГУ РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН, Москва

РЕЗЮМЕ

В работе приводятся литературные данные о важности и перспективах диагностики минимальной резидуальной болезни при раке желудка. Обсуждаются вопросы обнаружения микрометастазов в сыворотке крови, костном мозге, лимфоузлах, асцитической жидкости. Подчеркивается, что выявление микрометастазов, с одной стороны, может означать плохой прогноз, с другой стороны, требует активного подхода. Обсуждается потенциальная возможность использования маркеров микрометастазов для лечения минимальной резидуальной болезни

Ключевые слова: рак желудка, микрометастазы, gastric cancer, micrometastasis.

Рак желудка (РЖ) прочно удерживает четвертое место в структуре смертности от злокачественных заболеваний после рака легкого, молочной железы, колоректального рака. Несмотря на снижение заболеваемости, наблюдаемой практически во всех странах, оптимизма в лечении РЖ поздних стадий нет. В России в 2004 году было выявлено более 44 тысяч больных со злокачественными новообразованиями желудка, почти 40 тысяч пациентов умерло [1]. В США в 2006 году ожидалось 22 280 заболевших и 11430 умерших от рака желудка [29]. Высокая заболеваемость РЖ регистрируется в странах Юго-Восточной Азии: Китае, Японии, Корее. В Китае от рака желудка ежегодно умирает 160 тысяч больных [5]. Накопление знаний в области молекулярной диагностики РЖ, расшифровка генома, выявление механизма канцерогенеза РЖ — все это пока не нашло отражения в реальном повышении выживаемости пациентов с поздними стадиями и больных с метастатическим раком желудка. В этом аспекте внимание хирургической общественности вновь было обращено на очередной, 79 съезд японских хирургов (март, 2007), посвященный раку желудка. Такие съезды в Японии проходят ежегодно, являются открытыми, на них приглашаются ученые из стран, где проходят исследования по лечению рака желудка, доклады приглашенных лекторов переводятся на японский язык. Один из симпозиумов съезда назывался «Послеоперационная химиотерапия рака желудка: начало новой эры» и был посвящен адъювантной химиотерапии в лечении рака желудка II-IIIВ стадий. Название статьи в одном из последних журналов

"Gastric Cancer", в которой обсуждался съезд, было еще более интригующим: «Начало новой эры: Восток нашел с Западом консенсус по поводу лимфодиссекции при раке желудка — Япония больше не будет применять только хирургическое лечение в поисках комбинированного лечения рака желудка» [20]. Само название требует некоторых пояснений. Во-первых, в течение последних 10–15 лет не утихает дискуссия о необходимости лимфодиссекции при раке желудка. Хирургами из некоторых европейских стран (Дания, Великобритания) эффективность лимфодиссекции в плане улучшения выживаемости ставилась под сомнение. Неадекватность хирургического метода «на Западе» компенсировалась назначением химиолучевой терапией в послеоперационном периоде. Однако после освоения методики операций и тщательного анализа своего же материала даже бывшие оппоненты признали необходимость лимфодиссекции в объеме D2. Хирурги Японии последовательно и методично отстаивали свои достижения в области хирургии РЖ и, более того, двигались дальше в разработках новых методов лечения. Во-вторых, многие годы японские рекомендации лечения РЖ не предусматривали адъювантной химиотерапии после радикальных операций по поводу рака желудка (послеоперационная химиотерапия рекомендовалась только в рамках научных протоколов), однако, признавалось, что в реальности химиотерапия назначается и вне протоколов. В североамериканских и европейских рекомендациях присутствует как химиотерапия, так и лучевая терапия после радикальных операций по поводу РЖ, а в России четких рекомендаций относительно дополнительного лечения радикально оперированных больных не существует. В России традиционно считается, что после радикального удаления опухоли (R0 резекции), тем более у пациентов со II и IIIA стадией, химиотерапия не повышает выживаемость. Таким образом, не существует стандартного дополнительного лечения РЖ, однако интуитивное желание «дополнить» даже радикальную операцию химиотерапией или лучевой терапией говорит о том, что в сознании многих хирургов присутствует понимание неоспоримого факта о наличии «микрометастазов» даже при полном удалении опухоли. Термин «профилактическая химиотерапия» после радикальных операций надо понимать правильно — это терапия, направленная именно на эрадикацию оставшихся микрометастазов. На съезде японских хирургов были представлены результаты послеоперационной химиотерапии РЖ после радикальных операций препаратом S-1 ("ACTS-GC study"). Препарат S1 является комбинированным и содержит тегафур, гиместат и соль калия, которая снижает гастроинтестинальную токсичность. Тегифур является производным 5-фторурацила, гиместат ингибирует фермент дигидропиримидин дегидрогеназу, которая вызывает распад 5-фторурацила и, таким образом, гиместат пролонгирует действия препарата тегафура. В группу исследования были включены 1059 пациентов со II и III стадиями, которым выполнялась радикальная операция D2. Далее пациенты рандомизировались на группу контроля (530) и на пациентов (529), которым назначался препарат S-1 в дозировке 80 мг/м² 4 недели с 2-х недельным перерывом, всего 8 курсов. Общий и безрецидивный анализ вы-

живаемости показал, что дополнительная химиотерапия значительно улучшает прогноз, а уровень достоверности достиг $p=0.0008$, что позволило авторам сделать вывод о возможности прекратить протокол на полгода раньше запланированного срока. Интересно, что факт досрочного прекращения протокола послужил поводом к дискуссии о необходимости тем не менее завершить его дополнительными 6 месяцами наблюдения, поскольку один из промежуточных анализов выживаемости показал преимущество выживаемости «только» с уровнем значимости $p=0.0016$ (вместо необходимого значения 0.0011 для промежуточного анализа)! Скрупулезность подхода японских хирургов к статистическим данным лишь отодвинет ненадолго опубликование подробных данных о проведенном исследовании, а мы можем констатировать следующее: впервые было представлено успешное проспективное рандомизированное исследование на большой группе больных с адьювантной химиотерапией после радикальных операций по поводу рака желудка II и III стадий. Термин «микростазы» практически не употреблялся при обсуждении вышеуказанного исследования, но совершенно ясно, что именно на микрометастазы или, иначе говоря, минимальную резидуальную болезнь и направлена «профилактическая» химиотерапия. Как указывает в своей статье Y.Kodera, «долгое и болезненное смутное время» сравнения хирургического лечения с адьювантной химиотерапией и чисто хирургического лечения в Японии закончилось, а рекомендации японской Ассоциации по изучению Рака Желудка (Japan Gastric Cancer Association) относительно наблюдения или лечения больных после радикальных операций должны подвергнуться ревизии. Также стоит отметить, что в группу исследования не были включены больные с I и IV стадиями. Объяснение, по-видимому, следует искать в том, что при I стадии вероятность возникновения отдаленных метастазов все же невысока и, кроме того, широко исследуются новые подходы в лечении раннего рака желудка — эндоскопическая мукоэктомия, клиновидная («partia») резекция желудка, ограниченная («limited») лимфодиссекция. Больные же с IV стадией чаще всего представляют собой пациентов либо с наличием макрометастазов, либо, даже при полном удалении опухоли, прогноз обусловлен быстрым метастазированием (реализация тех же микрометастазов) при явном или скрытом дефиците иммунного ответа на опухолевый процесс.

Печальная статистика операций при раке желудка говорит о том, что у большинства пациентов рано или поздно возникает рецидив заболевания в виде местного рецидива или отдаленного метастазирования. По данным H.Katai et al. [16] характер и частота метастазирования при РЖ следующие: брюшина 44%, локальный рецидив 24%, метастазы в печень 14%, метастазы в другие органы 11%, неизвестная локализация 8%. Таким образом, лимфогенное метастазирование и метастазирование по брюшине является преимущественным, однако почти у четверти пациентов выявляются гематогенные метастазы. Очевидным следует считать тот факт, что процесс метастазирования является плавным и многоступенчатым, а выявление метастазов или рецидива с помо-

щью широко применяемых методов (УЗИ, КТ, МРТ, эндоскопия) лишь формально означает фиксирование возврата болезни. Известно также и то, что на любую злокачественную опухоль легче воздействовать при ее минимальном размере. Таким образом, ситуацию, при которой больному выполняется операция по поводу не раннего рака желудка (а таких пациентов в России большинство) с последующим пассивным ожиданием констатации факта макрометастазирования следует считать неприемлемой. Важно также и то, что не у всех пациентов с начальными стадиями разовьются метастазы. Решение проблемы можно найти либо в «стандартном» назначении эффективных на сегодняшний день видов лечения (химиолучевое лечение, таргетная терапия и т.д.), либо выявление группы риска — детекция микрометастазов, определение функциональной активности единичных опухолевых клеток с последующей попыткой их элиминации.

Нельзя не обратить внимание и на экономическую составляющую проблемы наблюдения за оперированными больными РЖ. В одном из обзоров, посвященных выживаемости больных РЖ в Японии [35], приводятся такие факты. В 1996 году в Японии было выявлено 103 000 больных РЖ, в 1999 году зафиксировано 50 500 летальных исходов. Если за всеми пациентами вести наблюдение в течение 10 лет, то число больных под наблюдением будет около 400 000. При использовании лучевых методов диагностики и, в частности, КТ, как одного из основных методов контроля, большое количество больных будет подвергаться лучевой нагрузке. В публикации журнала Lancet [3] сообщается, что около 3% всех случаев рака в Японии вызвано лучевыми методами диагностики. Авторы статьи [35] предполагают, что с учетом низкой чувствительности рака желудка к химиотерапии при выявлении макрометастазов, наблюдение за больными РЖ с помощью лучевых методов диагностики может принести больший вред, чем пользу.

Исследования по выявлению минимальной резидуальной болезни при солидных опухолях ведутся около 20 лет. При раке желудка единичные опухолевые клетки выявляют в лимфоузлах, в асцитической жидкости или смывах с брюшины, в крови, в костном мозге. Микрометастазами называются скопления опухолевых клеток от 0.2 до 2 мм в диаметре. К микрометастазам можно отнести также изолированные опухолевые клетки — единичные опухолевые клетки в стро-ме или скопления клеток менее 2 мм в диаметре. Существует еще одно определение микрометастазов — опухолевые клетки, которые не могут быть определены стандартным гистологическим исследованием. Далее в тексте статьи термином «микрометастазы» в костном мозге нами обозначены единичные опухолевые клетки, выявляемые иммунологическими методами. При наличии единичных опухолевых клеток в асцитической жидкости диагноз расценивается как M1 — IV стадия. Обнаружение макрометастазов в кости или костном мозге расценивается как M1 — IV стадия. Наличие опухолевых клеток в крови и микрометастазов в лимфоузлах при установке диагноза по международной классификации TNM не оговаривается. Определение опухолевых клеток в асците или

смывах с брюшины с помощью световой микроскопии является рутинным методом, стандартом в Японии, проводится во многих онкологических учреждениях России. Обнаружение микрометастазов в лимфоузлах и костном мозге чаще всего производится с помощью иммуногистохимического метода. Выявление опухолевых клеток и их фрагментов (ДНК, РНК) в сыворотке крови и смывах брюшины проводится с помощью ПЦР-реакции (PCR-reaction), ПЦР с обратной транскрипцией — ОТ-ПЦР (RT-PCR-reaction), проточной цитофлуориметрии и требует специального оборудования.

С точки зрения клинициста необходимо подчеркнуть простой, но важный факт: выявленные микрометастазы в лимфоузлах — это уже удаленные метастазы, выявленные микрометастазы в костном мозге, крови, асците — это оставшиеся метастазы.

Рецидив раннего рака желудка встречается редко. Так, при наблюдении за 1475 пациентами ранним РЖ в национальном институте рака в Токио [35] рецидив заболевания был зафиксирован в 1.4%, при этом из 20 пациентов с рецидивом, в 11 случаях были выявлены множественные метастазы, 1 случай с перитонеальным метастазированием, 4 местных рецидива, 4 случая гематогенных метастазов. При наблюдении за 1452 больными ранним РЖ в корейском наблюдении [21] в 4 случаях выявлен местный рецидив, в 2 — метастазы в печень. В анализе выживаемости 503 больных с ранним РЖ Ichiyoshi [14] из 17 рецидивов в 9 случаях выявлены гематогенные метастазы в печень, легкие и кости. Частота метастазирования в лимфоузлы при раннем раке желудка от 5 до 24%. Gotoda et al. [9] сообщает о частоте метастазирования 2.2%, при этом при дифференцированных аденокарциномах частота составляет 0.4%, при недифференцированных — 4.2%. В публикации Lehnert [22] говорится о 4.2% метастазирования при анализе 1447 случаев рака в пределах слизистой оболочки желудка и 16.8% на 1509 случаев — при локализации опухоли в подслизистом слое. В обзоре Michiya Kobayashi [18] приводятся данные о частоте метастазирования раннего РЖ в кости. В целом, как считает автор на основании данных литературы, частота метастазирования РЖ в кости явно занижена. В частности, приводятся данные Maeyama et al. о частоте выявления поражения костей скелета в клинической практике и на аутопсии — 0.7% и 17.6% соответственно. Choi et al. [6] при анализе 234 сцинтиграмм скелета больных РЖ у 106 (45.3%) обнаружил костные метастазы. Наиболее часто поражен позвоночный столб (66%), ребра (59%), кости таза (43%), бедренная кость (30%), череп (22%). Редкой локализацией метастазов были плечевой пояс (17%), крестцово-подвздошное сочленение (7.2%), бедренная кость (6.0%), грудина (4.2%), большеберцовая кость (3.0%). Macadam et al. [23] у 27 из 74 (36.5%) больных РЖ и пищевода с помощью иммуногистохимического метода выявил метастазы в костный мозг, при этом использовались антитела Veg-EP4, распознающие гликопептид, присутствующий в эпителии человека. При анализе 167 случаев раннего РЖ приводится пример 13 случаев рецидива с 5 метастазами в печень, 1 — метастазом в кости. Интересен подробный разбор 46 случаев костных метастазов из раннего РЖ, собранный в ли-

тературе Японии к концу 2003 года. В 26 случаях из 46 метастазы были выявлены метакронно, среднее время до выявления после хирургического лечения составило 46.9 месяцев, при этом у 7 пациентов метастазы выявлены более чем через 5 лет, у 2 через 96 месяцев. Наряду с костными метастазами также выявлялись метастазы в других органах: легкие (11), печень (4), мозг (2), почки (2), плевры (2), яичники (2), мозговая оболочка (2), селезенка (2), щитовидная железа (1), брюшина (1), диафрагма (1). Возможным механизмом диссеминации авторы считают: распространение опухолевых клеток через портальную систему; минуя v.portae, в частности через вертебральные вены и далее в легкие; через лимфатические сосуды в системный кровоток.

Таким образом, даже при раннем раке желудка возможен рецидив заболевания в виде метастазов в лимфоузлы или отдаленных метастазов. В связи с этим представляют интерес немногочисленные публикации, свидетельствующие о попытках выявить микрометастазы уже при раннем раке желудка.

Yoshihiko Maehara et al. [24] исследовал костный мозг у 45 пациентов ранним РЖ и у 9 (20%) на момент операции выявил цитокератин-положительные клетки в костном мозге. В работе сделана попытка обнаружить закономерность появления микрометастазов в костный мозг с особенностями фенотипа опухоли, в частности, выраженности ангиогенеза в первичной опухоли. Изучалась экспрессия молекул CD31, при этом выраженность ангиогенеза достоверно коррелировала с наличием метастазов в костный мозг. Не было обнаружено взаимосвязи с экспрессией p53 и с пролиферативной активностью клеток опухоли. Интересно, что факт обнаружения микрометастазов в этом сообщении являлся основанием для назначения послеоперационной химиотерапии.

Корейские ученые Hong-Jo Choi [7] попытались выявить прогностическую ценность обнаружения микрометастазов в регионарных лимфоузлах при локализации опухоли в подслизистом слое, то есть при раннем РЖ. У 17 из 88 (19.3%) пациентов стандартным гистологическим исследованием выявлены метастазы, тогда как при иммуногистохимическом анализе с антителами цитокератин-8 частота выявления составила 28 (31.8%). Авторы не обнаружили различий в 5-ти летней безрецидивной выживаемости между группами с микрометастазами и без таковых, а значимыми факторами явились размер опухоли и классификация по Laugen.

Похожее исследование проведено Hiroshi Higashi et al. [13]. Работа также посвящена макро- и микрометастазам в лимфоузлах при прорастании опухоли в подслизистый слой. Метастазы обнаружены у 23/118 (19.5%) больных. Частота микрометастазов составила 24.2% (23/95) в группе N0 пациентов. В исследовании не проводится анализ выживаемости, но обсуждается возможность исследования сторожевого лимфоузла для выявления не только макро-, но и микрометастазов. При отсутствии в сторожевом лимфоузле микрометастазов, по мнению авторов, возможна лимфодиссекция в редуцированном объеме.

Анализ выживаемости в зависимости от обнаружения микрометастазов в лимфоузлах при раннем РЖ проведен Paolo Morgagni et al. [27]. У 30/300 (10%) паци-

ентов ранним РЖ и гистологически «негативными» лимфоузлами выявлены микрометастазы (с помощью антител к цитокератинам) в регионарные лимфоузлы. Медиана наблюдения составила 7 лет (1-21 год), все больные были прослежены. Не было различий в 5-ти и 10-ти летней выживаемости в группах с микрометастазами и без таковых (94% и 89% — 5-ти летняя выживаемость соответственно). Также не было взаимосвязи с клинико-морфологическими факторами: гистологическим типом, размером опухоли, локализацией, макроскопическим типом опухоли. В исследовании микрометастазы были представлены в основном единичными опухолевыми клетками.

В другом недавнем сообщении немецкие авторы [15] исследовали кровь у 70 больных с различными стадиями РЖ. Цитокератин-20 положительные клетки выявлялись с помощью ОТ-ПЦР непосредственно перед операцией и были обнаружены у 28 (40%) оперированных. Пациентам не назначалась дополнительная терапия. Наличие циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) не было связано с клиническими стадиями. Выживаемость в группе больных с ЦОК была достоверно ($p=0.0363$) ниже по сравнению с группой ЦОК-отрицательных больных. При анализе в подгруппах с индексами T1 и T2 (всего 27 пациентов, 10 с микрометастазами) уровень достоверности был еще выше ($p=0.0032$).

Таким образом, ранний РЖ, несмотря на редкость метастазирования, представляет исключительный интерес в плане способности микрометастазов выживать и давать клоны макрометастазов. Однако еще больше публикаций посвящено исследованию микрометастазов при распространенном раке желудка.

Katsuhiko Matsunami et al. [25] изучали опухолевые клетки в костном мозге и крови, экспрессию сосудистого фактора роста и $erbB-2/HER2$ в первичном раке желудка. Цитокератин-положительные клетки в костном мозге выявлены у 16/53 (30%) больных. Лишь у 2 выявлены ЦОК в крови. Не было установлено наличия взаимосвязи микрометастазов и ЦОК с указанными маркерами на первичной опухоли, как и не было корреляции с уровнями маркеров CEA, CA 19-9. Наличие микрометастазов в костном мозге коррелировало с глубиной инвазии опухоли в стенку желудка и с наличием метастазов в лимфоузлы. В группе пациентов с микрометастазами было 4 больных, у которых в последствие развились метастазы в печень, легкие и одновременно в указанные органы, в то время как в группе без микрометастазов в костный мозг не было рецидивов с метастазами с приведенной локализацией. Выживаемость пациентов с микрометастазами была достоверно ниже, чем в группе без них.

Наличие микрометастазов можно выявить не только с помощью цитокератинов, которые являются частью цитоскелета эпителиальных клеток, но и других молекул, которые могут экспрессироваться на опухолевых клетках. Так, Dao-Rong Wang et al. [33] исследовали экспрессию молекулы CD44v6, точнее mRNA — CD44v6mRNA. Молекула CD44 является мембранным гликопротеидом и в норме ответственна за «хоуминг» лимфоцитов. Экспрессия CD44v6 коррелирует с опухолевой прогрессией, метастазированием и прогнозом при раке молочной железы, желудка, толстой кишки. В работе приводятся данные об исследовании

костного мозга и крови у 46 пациентов РЖ. Реакцией обратной транскрипции установлено, что экспрессия CD44v6mRNA была положительной в костном мозге у 40/46 (86.9%) и у 39/46 (84.8%) в периферической крови. Экспрессия CD44v6mRNA была выше при диффузном раке, при метастазах в лимфоузлы и на поздних стадиях, но снижалась после оперативного лечения. Авторы предлагают исследование молекулы CD44v6mRNA как надежный диагностический и прогностический маркер при РЖ.

Одно из первых крупных исследований, посвященных комплексному подходу к поиску причин возникновения микрометастазов, было опубликовано немецкими авторами [12]. В проспективном исследовании у 180 пациентов РЖ исследовали аспират костного мозга. Иммуногистохимически в ткани РЖ определяли факторы протеолиза — активаторы плазминогена урокиназного типа (катепсин D, антитромбин III), плазминоген, матриксная металлопротеаза 2 (MMP-2), ингибиторы активаторов (ингибиторы активации плазминогена 1 и 2 типа, альфа1-антитрипсин, альфа2-антиплазмин), рецептор активаторов плазминогена и другие факторы активации плазминогена (альфа2-макроглобулин, альфа1-антихимотрипсин). Данное исследование было инициировано фактами, свидетельствующими о том, что в солидных опухолях наблюдается повышенная активность ферментов, разрушающих базальную мембрану, клеточный матрикс, облегчая опухолевым клеткам проникновение в сосудистое русло и, миграцию, оседание в других органах. При анализе безрецидивной выживаемости было показано, что она взаимосвязана с экспрессией факторов протеолиза в опухоли, катепсина D, индексами pT, pN, характером операции. Опухолевые клетки в костном мозге обнаружены у 95 (53%) пациентов. Качественный анализ не выявил значимой взаимосвязи с прогнозом, однако при количественном анализе (отсутствие опухолевых клеток, $1-3 \times 10^6$, более 3 клеток на 106) уровень значимости достиг $p=0.007$. В подгруппах с индексом pT1, pT2, N0 и при кишечном типе рака количественный анализ опухолевых клеток в костном мозге явился независимым фактором прогноза. Наличие микрометастазов в костном мозге достоверно коррелировало с индексом pT и с экспрессией факторов активации плазминогена. Интересно, что при анализе в подгруппах пациентов с наличием микрометастазов в костном мозге, но при «негативных» (pN-) лимфоузлах, выживаемость была хуже в группе с повышенной активностью факторов активации плазминогена в первичной опухоли. Через несколько лет в журнале Journal of Clinical Oncology [11] эти же авторы продемонстрировали, что важно не только обнаружить микрометастазы в костном мозге, но и попытаться охарактеризовать функциональную активность единичных опухолевых клеток. Так, авторы с помощью иммуногистохимического метода показали, что повышенная экспрессия рецептора активатора плазминогена на клетках микрометастазов является независимым фактором прогноза общей и безрецидивной выживаемости. Рецептор активации плазминогена предложен в этой работе мишенью для таргетной терапии минимальной резидуальной болезни при РЖ. В недавнем сообщении были опубликованы

ликованы результаты продолжения исследования факторов активации плазминогена [4]. Вышеуказанные факторы были изучены в плане поиска взаимосвязи с инфекцией *H. pylori* и наличием кишечной метаплазии. Продемонстрировано значение инфекции *H. pylori* в повышении активности факторов протеолиза в метаплазированной слизистой желудка.

Комплексный подход в диагностике микрометастазов прослеживается и в работе Chan-Hang Wu [37]. Для повышения чувствительности и специфичности определения ЦОК в крови 64 больных РЖ определялись mRNA цитокератина-19, раковоэмбрионального антигена (CEA), обратную мРНК (hTERT), муцина-1 (MUC1). Обнаружение большинства маркеров коррелировало с клинико-морфологическими характеристиками, а выживаемость больных с экспрессией всех 4 маркеров была достоверно хуже, чем больных без экспрессии в клетках крови. В другой своей работе авторы указывают, что определение mRNA раковоэмбрионального антигена является точным маркером распространенности опухолевого процесса и фактором прогноза [36].

Среди работ, посвященных изучению микрометастазов в лимфоузлах, необходимо отметить исследование Niyouuki Yokoуama et al. [40]. В работе приведена оригинальная методика на экспериментальной модели, суть которой сводится к следующему. Подопытным животным (мышам) прививалась опухоль рака желудка человека, клетки которой были мечены флуоресцентным белком. Данная метка позволяет визуализировать даже единичные опухолевые клетки в лимфоузлах без гистологического исследования, то есть *in vivo*. Результаты исследования показали, что из первичной опухоли (растущей в повздошной области) в течение 5 недель в паховых лимфоузлах развивались последовательно единичные опухолевые клетки, микрометастазы и макрометастазы. Если первичную опухоль удаляли до развития макрометастазов, то единичные опухолевые клетки подвергались полной спонтанной регрессии, а микрометастазы — лишь частичной регрессии. Если животных начинали лечить анти-асиалогМ1 антителами, подавляющими натуральные киллерные клетки, то отмечался рост как опухоли, так и микрометастазов. И, наконец, при попытке лечения животных препаратом S-1, эффективность была тем хуже, чем больше было микрометастазов в лимфоузлах. Таким образом, авторы на наглядной модели показали, что деление микрометастазов в лимфоузлах на единичные опухолевые клетки и микрометастазы имеет практическое значение, и, самое главное, возможность иммунной системы элиминировать опухолевые клетки на ранних этапах метастазирования.

Большее количество работ посвящено клинической оценке обнаружения микрометастазов в лимфоузлах. Так, Wei Xu et al. [34] изучали экспрессию mRNA цитокератина-18 у 35 пациентов РЖ методом ОТ-ПЦР в лимфоузлах удаленных препаратов. Если при стандартном гистологическом исследовании поражение лимфоузлов выявлено в 99/298 (33.2%), то экспрессия mRNA цитокератина-18 обнаружена уже в 133/298 (44.6%). Среди 199 лимфоузлов, в которых не обнаружено метастазов при стандартном гистологическом исследовании, в 34 (17.1%)

выявлены микрометастазы. Наличие микрометастазов коррелировало со стадией и статусом лимфоузлов.

Попытки обнаружить взаимосвязь между наличием микрометастазов в лимфоузлах и фенотипом опухоли предприняты в работе Ze-Yu Wu et al. [39]. Проводили оценку взаимосвязи экспрессии E-кадгерина на опухолевых клетках первичной опухоли с наличием микрометастазов. Известно, что сниженная экспрессия E-кадгерина связана с метастазированием [17]. Кроме того, наследственная мутация гена E-кадгерина играет важную роль в развитии наследственного рака желудка. Оценка экспрессии иммуногистохимически на первичной опухоли была проведена у 30 пациентов РЖ, исследовали 850 лимфоузлов. Экспрессия E-кадгерина отсутствовала у 10/14 (71.4%) пациентов с микрометастазами в лимфоузлы и у 4/16 (25%) без микрометастазов ($p=0.026$). Наличие микрометастазов коррелировало с глубиной инвазии первичной опухоли (индекс T) и с гистологическим типом опухоли (кишечный/интестинальный). Достоверная корреляция была выявлена также между экспрессией E-кадгерина на клетках первичной опухоли и такими морфологическими характеристиками, как гистологический тип, дифференцировка опухоли (высоко-, умеренно-, низкодифференцированный тип), наличием метастазов в лимфоузлы, инвазией опухоли в лимфатические сосуды.

Матриксные металлопротеазы-2 (MMP-2) играют важную роль в распаде экстрацеллюлярного матрикса. Считается, что клетки опухоли с повышенной экспрессией MMP-2 обладают повышенной метастатической способностью. Ze-Yu Wu et al. [38] изучал экспрессию MMP-2 на клетках первичной опухоли во взаимосвязи с микрометастазами в лимфоузлы. Исследование проведено у 30 пациентов РЖ на клетках первичной опухоли и 850 лимфоузлах, удаленных во время операции. Экспрессия MMP-2 выявлена у 21 (70%) пациентов, при этом наблюдалась достоверная взаимосвязь с глубиной инвазии опухоли, наличием метастазов в лимфоузлы и дифференцировкой опухоли. Микрометастазы обнаружены в 77 (12.5%) лимфоузлах у 14 (46.7%) пациентов. Наблюдалась тенденция к более частому обнаружению микрометастазов в лимфоузлах при повышенной экспрессии MMP-2 в первичной опухоли, однако уровень достоверности не достиг статистической значимости ($p=0.118$).

Kunitomo Miyake et al. [26] у 120 пациентов со стадией pT1pN0 обнаружили иммуногистохимически микрометастазы в 32% случаев, если опухоль проросла в подслизистый слой. В работе не анализируются отдаленные результаты, но приводятся данные в пользу определения сторожевых лимфоузлов при раннем раке желудка.

В работе Hiromichi Sonoda et al. [31] при исследовании лимфоузлов от 28 пациентов ранним РЖ было продемонстрировано, что определение mRNA MUC2 является достоверно более чувствительным и специфичным методом определения микрометастазов, чем определение mRNA раковоэмбрионального антигена.

Американские ученые [10] приводят ретроспективный анализ за 17 лет, в котором было 25 пациентов со стадиями T1-4N0M0. Микрометастазы выявляли с по-

мощью антитела САМ 5.2 к эпителиальному маркеру. У 9 пациентов выявлены микрометастазы в лимфоузлах, и эта группа имела достоверно более низкую выживаемость. Интересно, что медиана удаленных во время операции лимфоузлов составила 7 (1-33), что в целом отражает незначительное количество удаляемых лимфоузлов хирургами Северной Америки.

В обзоре, посвященном анализу материалу минимальной резидуальной болезни и оценке обнаружения метастазов в сторожевом лимфатическом узле при раке молочной железы, а также при раке органов желудочно-кишечного тракта [8], авторы указывают, что существует значительное количество антител для определения микрометастазов и различия в наборе пациентов. Эти различия в определении микрометастазов и в методике определения сторожевого лимфоузла затрудняют их применение в клинической практике.

японские ученые [2] сравнивали иммуногистохимический метод определения микрометастазов в сторожевых лимфоузлах с помощью антител к цитокератинам, реакции ОТ-ПЦР mRNA раковоэмбрионального антигена, а также методики определения радиоизотопа в лимфоузлах. Суть последней методики заключается в следующем: накануне (за сутки) операции эндоскопически вокруг опухоли в подслизистый слой вводится коллоидный радиоактивный технеций (^{99m}Tc), на операции и сразу после нее специальный прибор (Navigator GPS) фиксирует повышенное накопление препарата. В исследование были включены 61 пациент с предоперационным диагнозом РЖ и начальным поражением стенки желудка (T1 и T2 индексами — 53 и 8 пациентов соответственно). Анализ показал высокую точность всех методов, а авторы считают концепцию определения сторожевого лимфоузла при РЖ наиболее приемлемой у пациентов с начальной стадией — T1. В то же время Akira Tanguku et al. [31] подчеркивают, что лимфоотток от желудка значительно сложнее, чем у опухолей эктодермального происхождения, таких как рак молочной железы или опухоли кожи. А частота "прыгающих" метастазов достигает 15–20%, в то же время определение микрометастазов может служить адекватным средством для выбора лечения и, соответственно, улучшения качества жизни и выживаемости.

Попытки оценить функциональную активность микрометастазов можно наблюдать в публикации Y.Yonemura et al. [42]. В этом крупном исследовании приводятся результаты обследования 308 пациентов, у которых при стандартном гистологическом исследовании не были выявлены метастазы в лимфоузлах. Всем пациентам выполняли стандартную лимфодиссекцию D2. Микрометастазы выявляли с помощью антицитокератинов и анти-Ki-67 антител MIB-1. У 37 пациентов в 77 лимфоузлах выявлены микрометастазы. В 12 из 25 единичных опухолевых клеток (микрометастазах) и в 49 из 52 кластерных метастазов наблюдали повышенную пролиферативную активность, выявляемую с помощью MIB-1. Пациенты с микрометастазами имели достоверно более низкую выживаемость ($p=0.014$) по сравнению с пациентами без микрометастазов. Авторы считают, что опухолевые клетки без пролиферативной активности, возможно, погибают, либо находятся в покоящемся состоянии. Но обнару-

жение «активных» микрометастазов нужно расценивать как клиническое метастазирование.

Если обнаружение единичных опухолевых клеток в костном мозге, крови, лимфоузлах не влияет на стадирование в международной классификации, то обнаружение клеток рака в асцитической жидкости расценивается как M1. Считается, что наиболее вероятно попадание опухолевых клеток в свободную брюшную полость при прорастании всей стенки желудка, то есть при индексе T3 и T4. Выявление клеток рака в перитонеальной жидкости даже при отсутствии макроскопически видимых метастазов резко ухудшает прогноз. Наиболее часто в клинической практике выявление микрометастазов в брюшной полости используется для назначения внутрибрюшной химиотерапии, а также для оценки эффективности последней.

Так, Takuji Mori et al. [28] у 19 пациентов с распространенным раком желудка (T3-4) с помощью реакции ОТ-ПЦР определяли mRNA раковоэмбрионального антигена. Пациенты получали предоперационную внутрибрюшную химиотерапию. В 8 случаях наблюдали снижение экспрессии антигена, в 5 — стабилизацию, в 6 — повышение экспрессии после химиотерапии. В первой группе живы в процессе наблюдения все пациенты, кроме одного. В группе с повышением экспрессии антигена умерли 5 от рецидива рака и только один жив в течение 22 месяцев. Авторы считают, что положительные значения mRNA раковоэмбрионального антигена даже в отсутствие цитологически определяемых метастазов являются показанием к внутрибрюшной химиотерапии. У пациентов с микрометастазами (цитологическое исследование и ОТ-ПЦР) по брюшной полости в проведенном исследовании не было снижения экспрессии mRNA даже после сочетанной внутрибрюшной и системной химиотерапии.

Прогностическое значение обнаружения микрометастазов в свободной брюшной полости выявил также Kodera Y et al. [20], показавший важность выявления mRNA раковоэмбрионального антигена в установлении перитонеальной диссеминации.

Выявление mRNA металлопротеазы-7 в свободной брюшной полости в сочетании с цитологическим анализом повысило чувствительность метода в прогнозе больных в работе Yonemura Y et al. [42].

C.Sakakura et al. [30] изучал экспрессию mRNA допадекарбоксилазы (dopa decarboxylase — DDC) и раковоэмбрионального антигена в перитонеальной жидкости у 112 больных РЖ. Предпосылкой для работы было обнаружение повышения экспрессии гена DDC (с помощью *microarray* анализа) в перитонеальных макрометастазах РЖ. DDC является ферментом, ответственным за синтез дофамина, и повышенная экспрессия гена обнаружена при нейробластоме у детей и при мелкоклеточном раке легкого. Выявление DDC явилось чувствительным и специфичным методом в прогнозе перитонеальной диссеминации у некоторых больных РЖ, однако авторы затруднились дать оценку биологического смысла этого факта.

Использование достижений фундаментальной медицины ведет, с одной стороны, к стандартизации лечения больных в развитых странах, с другой — к ин-

дивидуализации подхода. В этом нет противоречия, поскольку «стандарты» лишь будут применяться на более высоком уровне. Лечение онкологического больного в недалеком будущем, возможно, будет применяться с учетом молекулярно-генетического «паспорта» пациента и «паспорта» опухоли. Лечение большой группы больных РЖ после радикальных операций препаратом S-1 показало свое преимущество по сравнению с группой контроля. Анализ наблюдения показал, что снизилось число лимфогенных и перитонеальных метастазов, а частота гематогенных метастазов практически не изменилась. Вероятно, микрометастазы в различных органах обладают различной биологической активностью и своим особенным фенотипом. Может быть, кто-то из пациентов получал химиотерапию напрасно. Выделение группы риска на основе обнаружения микрометастазов является перспективным направлением индивидуализации лечения. Диагностика минимальной резидуальной болезни не должна вести к созерцательной политике. В настоящее время констатация факта микрометастазов также может считаться недостаточной, необходима функциональная оценка опухолевых клонов. Результаты по исследованию факторов плазминогена, сосудистого фактора роста, активности металлопротеаз, индекса пролиферации в микрометастазах рака желудка показывают, что поисковые работы по тщательной функциональной оценке можно считать приоритетными. Химиотерапия и лучевая терапия макроскопических метастазов и рецидива рака желудка мало эффективна. Возможно, для элиминации микрометастазов более эффективными окажутся биологические методы лечения. Маркеры детекции микрометастазов могут быть «мишенями» таргетной терапии. Анализ литературы показывает, что потенциальными "мишенями" в крови могут быть CD46v6, PЭА, MUC1, в костном мозге — VEGF, CD31, в лимфоузлах — PЭА, MUC1, MUC2, в первичной опухоли — E-cadherin, MMP-2, VEGF, MMP7, в асцитической жидкости — PЭА, MMP7.

Таким образом, ранняя диагностика рецидива рака желудка или обнаружение микрометастазов на ранних стадиях могут быть эффективным средством для лечения минимальной резидуальной болезни и улучшения выживаемости.

Литература/References:

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2004 году. Вестник РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН, т.17, №3(прил.1), 2006
Davidov M.I., Aksel E.M. Statistics of malignant tumors in Russia and CIS countries // Journal of N.N.Blokhin Russian cancer Research Center RAMS. — 2006. — v.17, N3 (Suppl.) (In Russian)
2. Arigami T, Natsugoe S, Uenosono Y et al. Evaluation of Sentinal Node Concept in Gastric Cancer Based on Lymph Node Micrometastasis Determined by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Annals of Surgery*. Vol.243, Number 3, March 2006, pp 341-347
3. Berrington de Gonzalez A, Darby S. Risk of cancer from diagnostic X-rays: estimates for the United Kingdom and 14 other countries. *Lancet* 2004; 363:345-51
4. Beyer BCM, Heiss MM, Simon E H. Urokinase System Expression in Gastric Carcinoma. *Cancer* March 1, 2006, Vol.106, Number 5, p.1026-1035

5. Chen Xi-Mei, Chen Guo-Yu, Wang Zhi-Rong. Detection of micrometastasis of gastric carcinoma in peripheral blood circulation. *World J Gastroenterol* 2004; 10(6): 804-808
6. Choi CW, Lee DS, Chung JK et al. Evaluation of bone metastases by Tc-99m MDP imaging in patients with stomach cancer. *Clin Nucl Med* 1995; 20:310-314
7. Choi HJ, Yun-Kim, Young-Hoon Kim et al. Occurrence and Prognostic Implications of Micrometastases in Lymph Nodes From Patients With Submucosal Gastric Carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, 9(1): 13-19, 2002
8. Doekhie FS, Peeters K C.M.J., Tollenaar R A.E.M.. Minimal Residual Disease Assessment in Sentinal Nodes of Breast and Gastrointestinal Cancer: A Plea for Standartization. *Ann Surg Oncol*. Vol.11, No.3, 2004
9. Gotoda Y, Yanagisawa A, Sasako M. Incidence of lymph node metastasis from early gastric cancer: estimation with a large number of cases at two large centers. *Gastric Cancer* 2000;3:219-225
10. Harrison LE, Choe, JK, Goldstein M et al. Prognostic Significance of Immunohistochemical Micrometastases in Node Negative Gastric Cancer Patients. *Journal of Surgical Oncology* 2000;73:153-157
11. Heiss MM, Simon EH, Beyer B CM. Minimal Residual Disease in Gastric Cancer: Evidence of an Independent Prognostic Relevance of Urokinase Receptor Expression by Disseminated Tumor Cells in the Bone Marrow. *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 20, No 8 (April 15), 2002: pp 2005-2016
12. Heiss MM, Allgayer H, Gruetzner KU. Clinical Value of Extended Biological Staging by Bone Marrow Micrometastases and Tumor-Associated Proteases in Gastric Cancer. *Annals of Surgery*, Vol.226, No.6, 736-745, 1997
13. Higashi H, Natsugoe S, Ishigami S et al. Distribution of Lymph Node Metastasis Including Micrometastasis in Gastric Cancer with Submucosal Invasion. *World J.Surg.*27, 455-459, 2003
14. Ichiyoshi Y, Toda T, Minamisono Y et al. Recurrence in early gastric cancer. *Surgery* 1990 ; 107: 489-495
15. Illert B, Fein M, Otto C et al. Disseminated tumor cells in blood of patients with gastric cancer are an independent predictive marker of poor prognosis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2005; 40:843-849
16. Katai H, Maruyama K, Sasako M et al. Mode of recurrence after gastric cancer surgery. *Dig.Surg.*, 1994,99-103
17. Kinsella AR, Green B, Lepts GC et al. The role of the cell-cell adhesion molecule E-cadherin in large bowel tumor cell invasion and metastasis. *Br J Cancer* 1993; 67:904-909
18. Kobayashi M, Okabayashi T, Sano T. Metastatic bone cancer as a recurrence of early gastric cancer — characteristics and possible mechanisms. *World J Gastroenterol* 2005; 11 (36): 5587-5591
19. Kodera Y, Nakanishi H, Yamamura Y et al. Prognostic value and clinical implications of disseminated cancer cells in the peritoneal cavity detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and cytology. *Int. J Cancer*, 1998, 79:429-433
20. Kodera Y. The beginning of a new era: East meets West more comfortably regarding lymphadenectomy for gastric cancer — Japan will finally drop the surgery-alone arm in its pursuit of a multimodal treatment strategy. *Gastric Cancer* (2007) 10:69-74
21. Lee HJ, Kim YH, Kim WH et al. Clinicopathological analysis for recurrence of early gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2003; 33:209-14
22. Lehnert T, Erlandson RA, Decosse JJ. Lymph and blood capillaries of the human gastric mucosa. A morphologic bases for metastasis in early gastric carcinoma. *Gastroenterology* 1985; 89:939-950

23. Macadam R, Sarela A, Wilson J et al. Bone marrow micrometastases predict early post-operative recurrence following surgical resection of oesophageal and gastric carcinoma
24. Maehara Y, Hasuda S, Abe T et al. Tumor Angiogenesis and Micrometastasis in Bone Marrow of Patients with Early Gastric Cancer. *Clinical Cancer Research*, Vol.4, 2129-2134, September 1998.
25. Matsunami K, Nakamura T, Oguma et al. Detection of Bone Marrow Micrometastasis in Gastric Cancer Patients by Immunomagnetic Separation. *Annals of Surgical Oncology*, 10(2):171-175, 2003
26. Miyake K, Seshimo A and Kameoka S. Assessment of lymph node micrometastasis in early gastric cancer in relation to sentinel nodes. *Gastric Cancer* (2006) 9:197-202
27. Morgagni P, Saragoni L, Scarpi E et al. Lymph Node Micrometastases in Early Gastric Cancer and Their Impact on Prognosis. *World J.Surg.* 27, 558-561, 2003
28. Mori T, Fujiwara, Sugita Y et al. Application of Molecular Diagnosis for Detection of Peritoneal Micrometastasis and Evaluation of Preoperative Chemotherapy in Advanced Gastric Carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, Vol.11(1), 2003:14-20
29. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Clinical Practice Guidelines in Oncology — v.1.2006. Gastric Cancer.
30. Sakakura C, Takemura M, Hagiwara A et al. Overexpression of dopa decarboxylase in peritoneal dissemination of gastric cancer and its potential as a novel marker for detection of peritoneal micrometastases with real-time RT-PCR. *British Journal of Cancer* (2004) 90, 665-671
31. Sonoda H, Yamamoto K, Kushima R et al. Detection of Lymph Node Micrometastasis in Gastric Cancer by MUC2 RT-PCR: Usefulness in pT1 Cases. *Journal of Surgical Oncology* 2004;88:63-70
32. Tangoku A, Seike J, Nakano K. et al. Current status of sentinel lymph node navigation surgery in breast and gastrointestinal tract. *The Journal of Medical Investigation*, Vol.54, 2007, pp.1-18
33. Wang DR, Chen GY, Xun-Liang et al. CD44v6 in peripheral blood and bone marrow as micrometastasis of patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006 January 7; 12(1):36-42
34. Wei Xu, Ming-Wei Zhang, Jing Huang et al. Correlation between CK18 gene and gastric carcinoma micrometastasis. *World J Gastroenterol.* 2005; 11 (41):6530-6534
35. Whiting J, Sano T, Saka M et al. Follow-up of gastric cancer: a review. *Gastric Cancer* (2006) 9:74-81
36. Wu CH, Lin SR, Hsieh JS. Molecular detection of disseminated tumor cells in the peripheral blood of patients with gastric cancer: Evaluation of their prognostic significance. *Disease Markers* 22 (2006) 103-109
37. Wu CH, Lin SR, Yu FJ et al. Development of a high-throughput membrane-array method for molecular diagnosis of circulating tumor cells in patients with gastric cancers. *Int. J.Cancer*:119, 373-379 (2006)
38. Wu Ze-Yu, Li Jing-Hua, Zhan Wen-Hua et al. Lymph node micrometastasis and its correlation with MMP-2 expression in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006 May 14; 12(18): 2941-2944
39. Wu Ze-Yu, Zhan Wen-Hua, Li Jing-Hua et al. Expression of E-cadherin in gastric carcinoma and its correlation with lymph node micrometastasis. *World J Gastroenterol* 2005;11(20):3139-3143
40. Yokoyama H, Nakanishi H, Kodera Y et al. Biological Significance of Isolated Tumor Cells and Micrometastasis in Lymph Nodes Evaluated Using a Green Fluorescent Protein — Tagged Human Gastric Cancer Cell Line. *Clin Cancer Res* 2006; 12(2) January 15, 2006, pp 361-368

41. Yonemura Y, Endo Y, Hayashi I et al. Proliferative activity of micrometastases in lymph nodes of patients with gastric cancer. *British Journal of Surgery* 2007; 94:731-736
42. Yonemura Y, Fujimura T, Ninomiya I. Prediction of peritoneal micrometastasis by peritoneal lavage cytology and reverse transcriptase-polymerase chain reaction for matrix metalloproteinase-7 mRNA. *Clin Cancer Res* 2001 7:1647-1653.

ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА

ISSN 1818-4820

УДК 616.-006

Периодическое научное издание. Выходит дважды в год

Основан в 2006 году

1/2008, Том 5

Учредитель: ГУ РОНЦ имени Н.Н.Блохина РАМН
(лаборатория иммунологии гемопоэза)

ПОЧЕТНЫЙ РЕДАКТОР

ПРОФЕССОР Б.БРАНДТ (ГАМБУРГ, ГЕРМАНИЯ)

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР Н.Н.ТУПИЦЫН

Ответственный секретарь А.В. Моженкова

Редакционная коллегия:

З.Г. Кадагидзе (зам. главного редактора)

Е.Г. Турнянская (Москва)

Е.В. Артамонова (Москва)

Ж. Брошь (Франция)

Дж. Виженес (Франция)

Л.Ю. Гривцова (Москва)

Дж. Джаносси (Великобритания)

И.С. Долгополов (Москва)

Т.Н. Заботина (Москва)

А.М. Ковригина (Москва)

А.М. Копылов (Москва)

Л.В. Мазурок (Курган)

А.А. Михайлова (Москва)

Д.Ш. Османов (Москва)

А.И. Павловская (Москва)

С.В. Петров (Казань)

Б.В. Пинегин (Москва)

А.В. Попа (Москва)

Н.А. Пробатова (Москва)

Р.М. Рамазанова (Казakhstan)

И.Н. Серебрякова (Москва)

Г.С. Тумян (Москва)

С.А. Тюляндин (Москва)

А.В. Филатов (Москва)

М.А. Френкель (Москва)

С.А. Шинкарев (Липецк)

Е.Н. Шолохова (Москва)

А.А. Ярилин (Москва)

Адрес редакции: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24
Тел./факс 324-90-69

E-mail: imhaemo_hi@ronc.ru, www.ronc.ru/imhaemo_hi

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору за соблюдением законодательства в сфере массовых коммуникаций и охране культурного наследия.
Свидетельство ПИ № ФС 77-23551 от 06.03.2006
Свидетельство Эл № ФС 77-24174 от 19.04.2006
Подписной индекс № 36915

Отпечатано в типографии ООО «Диджитал»
Тираж 1000 экз.

При перепечатке материалов ссылка на «Иммунологию гемопоэза» обязательна

IMMUNOLOGIE DER HÄMPOESE

ISSN 1818-4820

UDK 616.-006

Semi-annual scientific oncoimmunological periodicals

Founded in 2006

Band 5, Nr. 1/2008

Founder: State N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center affiliated to the Russian Academy of Medical Sciences, Russian Federation (Hämatoipoiesis Immunology Laboratory)

PROF. B. BRANDT, EHRENREDAKTEUR

(HAMBURG, DEUTSCHLAND)

EDITOR-IN-CHIEF N.N.TUPITSYN

Executive secretary A.V. Mozhenkova

Editorial Board:

Z.G. Kadagidze (Deputy Editor-in-Chief)

E.G. Turnianskaia (Moscow)

E.V. Artamonova (Moscow)

J. Brochie (France)

G. Wijdenes (France)

L.U. Grivtsova (Moscow)

G. Janossy (UK)

I.S. Dolgopopolov (Moscow)

T.N. Zabolina (Moscow)

A. M. Kovrigina (Moscow)

A.M. Kopilov (Moscow)

L.V. Mazurok (Kurgan)

A.A. Mikhailova (Moscow)

D.Ch. Osmanov (Moscow)

A.I. Pavlovskaja (Moscow)

S. V. Petrov (Kazan)

B.V. Pinegin (Moscow)

A.V. Popa (Moscow)

N.A. Probatova (Moscow)

R.M. Ramazanova (Kazakhstan)

I.N. Serebriakova (Moscow)

G.S. Tumian (Moscow)

S.A. Tuliandin (Moscow)

A.V. Filatov (Moscow)

M.A. Frenkel (Moscow)

S.A. Shinkarev (Lipetzki)

E.N. Sholokhova (Moscow)

A.A. Iarilin (Moscow)

Address of Editorial Office: 24, Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478. Tel/fax 324-90-69

E-mail: imhaemo_hi@ronc.ru, www.ronc.ru/imhaemo_hi

The journal is registered at the Federal Agency of Press and Mass-media of Russian Federation.
License № ФС 77-23551 от 06.03.2006
License № ФС 77-24174 от 19.04.2006
Zip-code № 36915

Published in Limited company "Digital"
Printed 1000 copies

No reproduction is permitted without reference to Journal Haematopoiesis immunology

Die Jubiläumszeitschrift ist dem sechzigsten Geburtstag von Prof. M.I. Davidow, Mitglied der Russischen Akademie der medizinischen Wissenschaften, gewidmet. Wir bemühten uns dabei, uns auf das aktuelle onkologische Problem — minimale Restkrankheit beim Karzinom — zu konzentrieren. Die Zeitschrift wurde in Zusammenarbeit mit unseren deutschen Kollegen vorbereitet. Prof. B. Brandt (Hamburg, Deutschland) ist liebenswürdig auf den Vorschlag eingegangen ein Ehrenredakteur dieser Nummer zu sein. Die Artikel geben die Thematik der Vorträge der 4. Russischen Konferenz (mit internationaler Teilnahme) "Immunologie der Hämoepoese", die am 6. Juni 2007 stattgefunden ist, wieder. Gemäss dem Wunsch unserer deutschen Kollegen wird die Zeitschrift zum erstenmal dreisprachig (Russisch, Englisch, Deutsch) veröffentlicht.

Wir hoffen, dass die veröffentlichten Artikel ein mächtiger Anreiz zur weiteren Entwicklung der aussichtsreichen Richtung der klinischen Onkologie — immunologischer Karzinomstadiumfeststellung — sein werden.

Chefredakteur der Zeitschrift "Immunologie der Hämoepoese",
Leiter des Labors für Immunologie der Hämoepoese, des Russischen Onkologischen
wissenschaftlichen N.N. Blochin-Zentrums der Russischen Akademie der
medizinischen Wissenschaften (staatliche Einrichtung),
Dr. med., Prof. N. N. Tupizin

Prof. Davidow, Michail Iwanowitsch ist 60 Jahre alt!

Am 11. Oktober 2007 wurde Prof. Davidow, Michail Iwanowitsch, grösster Chirurg, hervorragender Gelehrte-Onkologe, Mitglied der Russischen Akademie der Wissenschaften und der Russischen Akademie der medizinischen Wissenschaften, Direktor des Russischen Onkologischen wissenschaftlichen N.N. Blochin-Zentrums der Russischen Akademie der medizinischen Wissenschaften, Präsident der Russischen Akademie der medizinischen Wissenschaften, 60 Jahre alt.

Die Redaktion der Zeitschrift "Hämoepoeseimmunologie" sowie das Kollektiv des Labors für Hämoepoeseimmunologie des Russischen Onkologischen wissenschaftlichen N.N. Blochin-Zentrums der Russischen Akademie der medizinischen Wissenschaften gratulieren dem Jubilaren vom ganzen Herzen dazu und wünschen ihm gute Gesundheit, weitere Erfolge in seiner aufopferungsvollen Schlacht mit bösartigen Tumoren und hoffen, dass er als endgültiger Sieger aus dieser Schlacht hervorgeht.

Möge dieses Heft, Ihrem Jubiläum gewidmet, unser bescheidenes Geschenk und ein Körnchen des Beitrages in die Hauptsache Ihres Lebens — Kampf gegen Krebs — sein!

Redaktion der Zeitschrift "Hämoepoeseimmunologie"

UDK 616.006,6-033.2:616.419

*Vom Redakteur
N. N. Tupizin*

HÄMATOGEN DISSEMINIERTES OPERIER- BARES KARZINOM FRÜHER STADIEN ALS EINES DER WICHTIGSTEN ONKOLGIEPROBLEME. IMMUNOLOGISCHE STADIUMFESTSTELLUNG VON TUMOREN

Russisches Onkologisches wissenschaftliches N.N. Blochin-Zentrum der Russischen Akademie der
medizinischen Wissenschaften (staatliche Einrichtung), Moskau, Russische Föderation

ZUSAMMENFASSUNG

Die Diagnostik der hämatogenen Verbreitung der Epitheltumoren auf frühen Stadien ist ein der wichtigsten Probleme der Onkologie. Für seine Lösung ist die Standardisierung der Knochenmarkuntersuchungen und der quantitativen Schätzung einzelner isolierter metastatischer Zellen notwendig. Im Artikel wird der Algorithmus der Knochenmarkuntersuchung zur Erkennung der Karzinommikrometastasen angeführt; der gestattet die quantitative Schätzung zu standardisieren und die Lösung durch peripheres Blut zu vermeiden. Die Membran- Hyperexpression HER2/neu auf den Mammakarzinomzellen kann man mit Luminiszenzverfahren und Durchflußzytometrieverfahren untersuchen.

Schlüsselwörter: Mikrometastasen, Knochenmark, Standardisierung.

Die bösartigen Epitheltumoren sind schon auf frühesten operierbaren Stadien bei 20–40 % der Patientinnen hämatogen disseminiert [7].

Chirurgische Tumorentfernung mit der Lymphdissektion hat den Höhepunkt erreicht. Die Ideologie und Technik der Ausführung der Radikaloperationen bei den Tumoren verschiedener Lokalisation sind glänzend vom Prof. M. I. Davidow, Mitglied der Russischen Akademie der medizinischen Wissenschaften, entwickelt (Davidow—Schule). Als Ergebnis wird bedeutende Erniedrigung der Karzinomrezidive beobachtet.

Doch ist das Problem des Tumorwiederwachstums bei den "radikal operierten" Patientinnen nicht gelöst. Man hat es eigentlich als Problem bisher noch nicht formuliert. Und es liegt auf der Hand, und seine Selbstverständlichkeit ist ganz entmutigend — das Prozess fängt wieder aus bösartigen Zellen, die vor der Operation aus dem Primärtumor, wenn auch der sehr klein ist, mit dem Blutfluss ins Knochenmark migriert haben, an. Diese Zellen können sich im "schlimmernden" Ruhezustand befinden (dormant cells) und

sich nach vielen Jahren bzw. Jahrzehnten nach der Radikaloperation aktivisieren und ein metastatisches Wachstum verursachen.

Die Tumoraussaaten im Knochenmark können wie einzelne isolierte (solitäre) Zellen oder ihre Gruppen — Mikrometastasen¹ — aussehen. Diese Zellen werden auch im peripheren Blut — zirkulierende Tumorzellen — gefunden. Morphologisch werden einzelne Tumorzellen nicht gefunden: es ist die Anwendung hochempfindlicher immunologischer Verfahren notwendig.

Die Chemo- und Hormontherapie ist bei der Vernichtung isolierter disseminierter Tumorzellen nicht genug effektiv. Die Immunotherapie (Herzeptin) ist ein Auswahlverfahren in Her2/neu-positiven Fällen. Im ganzen gibt es keine Verfahren der Eradikation von Karzinometastasen. Die Bildung effektiver immunologischer Programme und Präparaten mit der Wirkungsgebundenheit für die Vernichtung isolierter disseminierter Tumorzellen muss als eine der vorrangigen Aufgaben der Onkologie betrachtet werden.

Um die Wirkungseffektivität der Präparaten auf die Metastasen zu prüfen, muss man in erster Linie die quantitative Schätzungsverfahren für isolierte disseminierte Tumorzellen standardisieren. Es geht um eine immunologische Karzinomstadiumfeststellung.

Für die Standardisierung verwendet man eine "Gebundenheit" entweder an Leukozytenanzahl oder an Blutvolumen, in dem eine bestimmte Anzahl der Tumorzellen beobachtet wird, was ausführlich in den Artikeln von Prof. B. Brandt (Immunozytologie) und O. B. Bshadug mit Mitautoren (Durchflusszytometrie) in diesem Heft beschrieben wird.

Ich möchte nur einige Erwägungen über die Standardisierung der Knochenmarkuntersuchungen äussern, weil es in der Fachliteratur ein volles Durcheinander über diese Frage gibt.

Der Knochenmarkuntersuchungsalgorithmus der Erkennung einzelner isolierter Tumorzellen ist folgend.

1. Die Entnahme eines minimalen Knochenmarkvolumens (maximal 0,5 ml). Es ist überzeugend bewiesen, dass bei der Entnahme über 0,2 ml Knochenmark eine Musterlösung durch peripheres Blut möglich ist [8]. Es ist technisch ziemlich kompliziert 0,2 ml zu entnehmen. Deswegen empfehlen wir 0,5 ml zu entnehmen (Abbildung 1). In der Fachliteratur werden die Angaben über die Entnahme als Regel bedeutend grösserer Knochenmarkvolumen angeführt [4], was unvermeidlich mit der Lösung durch peripheres Blut verbunden ist. In Fällen der Knochenmarklösung durch peripheres Blut ist es schon unmöglich zu schätzen, ob die Tumorzellen im Blut bzw. Knochenmark gefunden wurden oder nicht.

2. Die Zählung der Zelligkeit des Knochenmarkes und die Vorbereitung der Standardknochenmarkabstriche für die Myelogrammanalyse. Auf der Grundlage der Myelogrammzusammensetzung und der Musterzelligkeit zieht man einen Schluss

¹ Für klarere Fassung wird der Fachausdruck "Mikrometastasen" in diesem Artikel auch bezüglich einzelne solitäre Tumorzellen verwendet werden.



Abb. 1. Probierröhrchen Vacutainer (Firma BD, USA), mit äthylendiaminotetrazetat bearbeitet, mit den Knochenmarksmustern. Adäquate Mustermenge in den Probierröhrchen Nr. 2 und 3 (Zählung von links nach rechts)

darüber, dass das Knochenmark durch peripheres Blut nicht gelöst wurde. In den Artikeln gibt es als Regel keine solche Angaben.

3. Der Lysinzusatz zu den Erythrozyten und Ausscheidung einer mononuklearen Knochenmarkzellenfraktion im Fikolldichtengradienten.

4. Die Vorbereitung der Zentrifugepräparaten (von 0,5 bis 1 Mio. Zellen pro Präparat), Abbildung 2. In den Fällen der Zellenfraktionierung wird das Myelogramm wieder nach den Zytopräparaten für die Bestimmung des Anreicherungsgrades der mononuklearen Fraktion gezählt; es ist für die Erhaltung der Angaben bezüglich Myelokariozytenausgangskonzentration notwendig.

5. Die immunologische Färbung der Zytopräparaten mit monoklonalen Antikörpern (MKA) zu Epithelantigenen. Es ist wichtig die Antikörper, die mit den hämopoetischen Knochenmarkzellen nicht reagieren, zu verwenden. Deswegen passen MKA zu EMA (Epithelmambranantigen), DF-3 und 115D8 für die Erkennung der Mikrometastasen nicht [5]. Wir verwenden MKA KL-1 und CAM5.2. Für Visualisierung der Tumorzellen, die mit den Antikörpern gebunden sind, passt sowohl die Luminiszenz- [6] als auch die Immunofluoreszenzfärbung. Wir ziehen die Luminiszenzfärbung mit direkten Konjugaten MKA mit FITC vor, weil es in den Fällen der Immunoperoxidasefärbung bestimmte Schwierigkeiten mit voller Blockierung endogener Myeloperoxidase der hämopoetischen Zellen gibt; bei der Anwendung des Alkaliphosphataseverfahrens ist eine nicht spezifische Reaktion der Plasmazysten mit der Alkaliphosphatase möglich [2].

6. Die Zählung der Tumorzellenanzahl unter von 1 bis 10 Mio. Myelokariozyten des Knochenmarkes. Die Zählung muss von einem qualifizierten Morphologen ausgeführt werden.

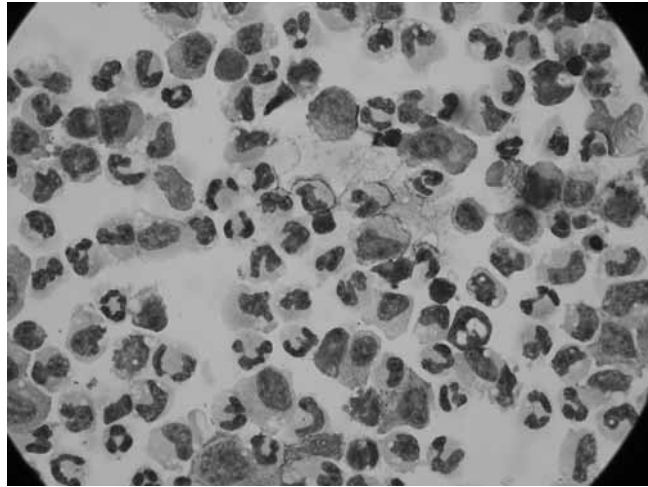


Abb. 2. Zytozentrifugen-Knochenmarkpräparaten. Polymorphes Knochenmark

Die Verwendung dieses Verfahrens hat interessante Ergebnisse gegeben, die die Verbindung der Erkennung der Mikrometastasen ins Knochenmark und des Mammakarzinostadiums, Rezeptorenstatus des Tumors, Zustandes des hämopoetischen Knochenmarkgewebes betreffen [1] (s. Artikel von O. W. Krochina in diesem Heft).

Eine der wichtigsten Fragen, die mit der Mikrometastasenheilungstaktik verbunden ist, ist die Bestimmung der Expression (Hyperexpression) Her2/neu von metastatischen Zellen [3]. Besondere Bedeutung für weitere Therapie hat die Bestimmung der Membranexpression des Rezeptors.

Wir haben dazu das Heilungsmittel Trastuzumab fluoreszenzmarkiert und die Reaktion mit den Mammakarzinomzellen auf den frisch gefrorenen Schnitten mit der Durchflusszytometrie geschätzt (Abbildung 3, auf der Seite 3 des Umschlages).

Die Ergebnisse der Fluoreszenzfärbung stimmen vollständig mit den immunohistochemischen Angaben überein. Was die Möglichkeit der Erkennung der Hyperexpression Her2/neu auf isolierten metastatischen Knochenmarkszellen mit der Durchflusszytometrie anbetrifft, sind für die endliche Schlussfolgerung zusätzliche Untersuchungen und Speicherung der Materialien notwendig.

Bibliographie:

1. Krochina O. W., Letjagin W. P., Tupizin N. N. und andere Immunomorphologische Diagnostik der Mammakarzinommetastasen ins Knochenmark. Mammalogie — 2005, Nr. 1 — Seite 70 — 73. (Rus)

2. Borgen E., Beiske K., Trachsel S. et al. Immunocytochemical detection of isolated epithelial cells in bone marrow: non-specific staining and contribution by plasma cells directly reactive to alkaline phosphatase. J. Pathol. — 1998 — V. 185, Nr. 4 -427 — 434.

3. Braun S., Schlimok G., Heumos I. et al. erbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. Cancer Research. — 2001 — V. 61. — P. 1890 — 1895.

4. Naume B., Wiedswang G., Borgen E. et al. The prognostic value of isolated tumor cells in bone marrow in breast cancer patients: evaluation of morphological categories and the number of clinically significant cells. Clin. Cancer Research -2004 — V. 10 — P. 3091 — 3097.

5. Okumura A., Tajima T. Immunohistochemical detection of tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients. Japanese Journal of clinical oncology. -1998 — V. 28, Nr. 8. — P. 480 — 485.

6. Osborne M.P., Asina S., Wong G.Y. et al. Immunofluorescent monoclonal antibody detection of breast cancer in bone marrow: sensitivity in model system. Cancer Research. — 1989 — V. 49. — P. 2510 — 2513.

7. Pantel K., Muller V., Auer M. et al. Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer. Clinical Cancer Research. -2003 — V. 9. — P. 6326 — 6334

8. Rego E.M., Garcia A.B., Viana S.R., Falcao R.P. Age-related changes of lymphocyte subsets in normal bone marrow biopsies. Cytometry. — 1998. — V. 34, Nr. 1 — P. 22 — 29.

UDK [616.65-006.6+618.19-006.6]-033.2

Iris Alpers, Dr. Burkhard Brandt

MINIMALE RESIDUALE ERKRANKUNG (MRD) BEI SOLIDEN TUMOREN

Institut für Tumorbilogie,
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
2. Der prognostische Wert von HER2-positiven zirkulierenden Tumorzellen aus dem peripheren Blut von Mammakarzinompatientinnen
3. Nachweis und Immunphänotypisierung von Prostata-spezifischen Zellclustern aus dem peripheren Blut von Prostatakrebspatienten
4. Das asynchrone Wachstum von Prostatakrebs spiegelt sich in den zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut wieder
5. Die Detektion von zirkulierenden Tumorzellen aus peripheren Blut von metastasierten Brustkrebspatientinnen mithilfe des halb-automatischen CellSearch® Systems

I. EINLEITUNG

Die hämatogene Disseminierung von Tumorzellen, besonders bei Brust- und Prostatakrebs, scheint ein früher und hoch selektiver, nicht zufälliger Prozess zu sein, welcher hauptsächlich durch eine spezifische aberrante Genexpression charakterisiert wird. Mikrometastatische Zellen sind im Knochenmark (KM) oder peripheren Blut (PB) von 20-90% der Patienten nachweisbar, selbst wenn kein Lymphknotenbefall oder klinische Anzeichen von Metastasierung des Tumors nachweisbar sind. Diese Zellen können eine adjuvante Chemotherapie überleben und viele Jahre in einem schlafenden Zustand verbleiben ("latent dormancy"), bevor sie gegebenenfalls Knochenmetastasen oder Metastasen in anderen sekundären Organen ausbilden. Aufgrund dieses Sachverhaltes haben wir Zellen epithelialen Ursprungs aus peripherem Blut isoliert und immunzytochemisch analysiert. Die Isolierung der Zellen erfolgte mittels einer patentierten Methode bestehend aus einem Dichtegradienten und einer anschließenden immunmagnetischen Zellseparation.

a) Der prognostische Wert von zirkulierenden Tumorzellen (CTC) aus peripherem Blut wurde für Brustkrebspatienten mittels einer Langzeitstudie evaluiert. Bei etwa 50% aller Patienten ohne Metastasierung des Tumors wurden ca. 1-8 zirkulierende Tumorzellen im peripheren Blut gefunden. Als Positivkontrolle diente Blut von metastasierten

Patientinnen, hierbei konnten in allen Fällen zirkulierende Tumorzellen nachgewiesen werden. Bei gesunden Probanden und operierten Patienten mit nicht malignen Krankheiten wurden keine CTCs gefunden. Der Nachweis und die Anzahl von HER2-positiven zirkulierenden Tumorzellen korrelierte mit einem signifikant verkürzten krankheitsfreien überleben (DFS; $p < 0.005$) und Gesamtüberleben (OS; $p < 0.05$). Interessanterweise wurden bei 12 Patienten HER2-positive zirkulierende Tumorzellen gefunden, obwohl der Primärtumor aufgrund immunhistologischen und FISH-Untersuchungen für HER2 negativ war. Für Brustkrebs der Stadien I-III liefert diese Studie einige Hinweise für eine prognostische Bedeutung von HER2-positiven zirkulierenden Tumorzellen. In zukünftigen Herceptin-Studien sollten HER2-positive zirkulierende Tumorzelllevel untersucht werden, da es wahrscheinlich ist, dass die Anzahl der HER2-positiven zirkulierenden Tumorzellen die Aktivität des Tumors widerspiegelt und daher ein Ansprechen auf Trastuzumab vorhergesagt werden kann.

b) Des Weiteren konnten wir aus dem peripheren Blut von Prostatakrebspatienten in 98% der Fälle perioperativ PSA-positive zirkulierende Tumorzellen isolieren. Die isolierten Zellen wurden durch Immunzytochemie unter Verwendung von Antikörpern gegen Prostata-spezifisches Antigen (PSA), Mitose- (Mib-1, H1 und H3) und Apoptose-assoziierten (M30, c-FasR) Proteinen und mithilfe von DNA-Färbungen (DAPI) charakterisiert. Die immunphänotypische und morphologische Charakterisierung von PSA-positiven aus der Prostata stammenden Zellclustern, die im peripheren Blut von Prostatakrebspatienten gefunden wurden, zeigte zwei Hauptpopulationen von Zellen: (1) Im Blut von 35% der untersuchten Patienten wurden Zellaggregate aus intakten potentiellen Tumorzellen entdeckt, welche Proliferations-assoziierte, nicht aber Apoptose-assoziierte Proteine exprimierten (2). In jeder Probe wurde eine große Anzahl zirkulierender dysmorpher Zellcluster gefunden, die positiv für die Expression von apoptose-assoziierten Proteinen waren.

Von jedem Fokus eines multifokalen Prostatatumors wurde unter Verwendung einer Multiplex-PCR, basierend auf einer Mikrosatelliten-Analyse ein genetisches Profil erstellt (D7S522, D8S522, NEFL, D10S541, D13S153, D16S400, D16S402, D16S422 and D17S855). In 85% der Prostatakrebsfälle war das LOH-Muster der CTCs identisch mit nur einem Fokus des Primärtumors. Außerdem deutet das LOH-Muster darauf hin, dass kleine Foci, möglicherweise CTC abgeben. Interessanterweise wurde die größte Anzahl von LOHs beim Marker für das PTEN-Gen D10S541 (85%) beobachtet, welches weniger häufig im unifokalen Prostatakrebs (48%) vorkommt. Zudem ist der seltener auftretende LOH im BRCA1 Gen (38%), hauptsächlich bei Fällen vorgekommen, die innerhalb von drei Jahren nach der Prostataektomie ein biochemisches Rezidiv bekamen. Diese Ergebnisse unterstützen daher die Hypothese, dass bei Prostatakrebs die CTCs von distinkten Foci des Primärtumors stammen. Die Größe des Tumorfokus steht dagegen nicht in Relation zur Disseminierung von Tumorzellen. Obwohl die Anzahl der in dieser Studie untersuchten Fälle gering war, kann die Aussage getroffen werden, dass LOH der Gene PTEN und BRCA1, repräsentiert durch die Marker D10S541 und D17S855, mit hoher Wahrscheinlichkeit sowohl mit dem Auftreten von CTCs im peripheren Blut von Patienten, als auch mit einem frühen biochemischen Rezidiv assoziiert sind.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die molekulare Charakterisierung von CTCs im peripheren Blut von Patienten, die an soliden Tumoren leiden, das Potential hat, spezifische Krebsdiagnostik für die Therapieprognose zu werden.

II. Der prognostische Wert von HER2-positiven zirkulierenden Tumorzellen aus dem peripheren Blut von Mammakarzinompatientinnen

Unsere Gruppe berichtete 1998 als erstes von der Isolierung zirkulierender HER2- positiver Tumorzellen in Zellclustern (cCTCs) aus dem peripheren Blut von Brustkrebspatientinnen mit organbegrenzten Tumoren (Stadium I-III). Diese Zellen wurden durch eine kombinierte Methode, bestehend aus einem Dichtegradienten und einer immunmagnetischen Zellseparationstechnik, isoliert [1]. Vor dem Hintergrund das Brustkrebspatientinnen mit Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Diagnose disseminierte HER2-überexprimierende Epithelzellen im Knochenmark aufwiesen (2), wurde die Hypothese aufgestellt, dass zum Zeitpunkt der primären Behandlung zirkulierende Tumorzellen, die den HER2-onkogenen Rezeptor exprimierten, möglicherweise Zwischenstufen im metastasierenden Prozess darstellen. Diese Hypothese wird zusätzlich gestützt durch die Assoziation zwischen Knochenmark Mikrometastasen und dem Vorkommen von HER2-positiven Zellen.

HER2-positive cCTCs wurden überwiegend im peripheren Blut von ca. 50% der Stadien I-III Patientinnen detektiert. In den Proben, die positiv für cCTCs waren, war die mittlere Anzahl der Cluster pro Probe 4 (Anzahl variierte zwischen 1-8). Die Cluster bestanden aus 2 bis 30 Zellen. Tabelle 1 zeigt die Häufigkeit von HER2-positiven cCTCs, die in den Proben detektiert wurden. Als Positivkontrollen dienten Patienten mit metastasierten Krebserkrankungen (Stadium IV). Bei jedem dieser Patientinnen konnten HER2-positive cCTCs nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wurde Blut von nicht an Krebs erkrankten Personen untersucht und keine HER2- positiven cCTCs detektiert.

Der Nachweis HER2-positiver CTCs und Tumorstaging, Tumorgrading, Hormonrezeptorstatus und immunhistochemischer HER2-Status

Der Nachweis HER2-positiver cCTCs ist signifikant assoziiert mit einer zunehmenden Tumorgröße (pT Stadium), negativem ER Status, schlechter histologischer Differenzierung und lymphovaskulärer Invasion. Außerdem wurde im Blut von allen Patienten mit inflammatorischen Karzinomen des Stadiums M+, HER2-positive cCTCs gefunden. Es wurden keine signifikanten Korrelationen mit dem Lymphknotenstatus (pN Stadium), PR-Status oder der Proliferationsrate (Ki-67) gefunden. Allerdings konnten wir einen signifikanten Unterschied zwischen der Häufigkeit von HER2-positiven cCTCs und dem HER2-Status des entsprechenden Primärtumors feststellen: Bei 12 Patienten mit HER2-positiven cCTCs zeigte der Primärtumor eine negative Auswertung für HER2, was darauf hindeutet, dass die Anzahl HER2-positiver Zellen im Primärtumor bei weniger als 10% liegt. Wir konnten keine Korrelation zwischen HER2-positiven cCTCs und der EGFR Expression, p53 Mutation und bcl-2 Expression nachweisen.

Tabelle 1

Identifizierung und Anzahl von c-erbB2-positiven zirkulierenden Tumorzellen (einzelne vs. in Clustern CTCs)

Einzelne c-erbB2-positive CTCs	Anzahl pro Probe	Patienten n (%)
	0	26 (74.3%)
	1	3 (8.6%)
	2	3 (8.6%)
	3	1 (2.9%)
	4	2 (5.7%)
	Nein	26 (74.3%)
	Ja	9 (26.5%)

In Clustern c-erbB2-positive CTCs	Anzahl pro Probe	Patienten n (%)
	0	18 (51.4%)
	1	4 (11.4%)
	2	2 (5.7%)
	3	3 (8.6%)
	4	3 (8.6%)
	7	1 (2.9%)
	8	4 (11.4%)
	0	
	1-4	
	≥ 5	
	nein	18 (51.4%)
	ja	17 (48.6%)

Die Detektion von zirkulierenden, sich in der aktiven Phase des Zellzyklus befindlichen Tumorzellen

Zirkulierende Tumorzellen der HER2-positiven cCTC Patienten wurden zusätzlich immunzytochemisch mit dem monoklonalen Antikörper Ki-67 gefärbt, um Zellen in der aktiven Phase des Zellzyklus nachzuweisen. Das Vorhandensein von Ki-67 wurde durch Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie visualisiert, wie es in Abbildung 1 ersichtlich ist. Sowohl Ki-67 als auch HER-2-positive Einzelzellen wurden in Proben von zwei Patienten detektiert, nicht aber in Zellclustern. Daher kann man sagen, dass HER2-positive Zellen, die sich in der aktiven Phase des Zellzyklus befinden im peripheren Blut von Patienten vorhanden sind, allerdings muss davon ausgegangen werden, dass diese sehr selten vorkommen.

Die Bedeutung des Nachweises von HER2-positiven cCTCs für die Prognose des Mammakarzinoms

Eine signifikante Korrelation zwischen dem Vorkommen und der Anzahl von HER2-positiven cCTCs wurde sowohl mit einem verkürzten krankheitsfreien überleben als auch mit der Verminderung des Gesamtüberlebens festgestellt. Die Ergebnisse von überlebensanalysen in Beziehung zu HER2-positiven cCTCs sind in Tabelle 2 zusammengefasst; Abbildung 2 zeigt die dazugehörige Kaplan-Meier Kurve.

Überleben in Beziehung zu zirkulierenden c-erbB2-positiven Tumorzellen

Tabelle 2

Überleben in Beziehung zu zirkulierenden c-erbB2-positiven Tumorzellen

c-erbB2-positiv CTCs		DFS Monate (95% CI)	P ^a	OS Monate (95% CI)	P ^a
Einzelzellen	nein	112 ± 9 (94;130)	0.018	125 ± 7 (110;139)	0.024
	ja	46 ± 14 (19;74)		89 ± 15 (60;117)	
Zellen in Clustern	nein	124 ± 7 (110;139)	0.007	125 ± 7 (110;139)	0.024
	ja	60 ± 11 (38;83)		80 ± 15 (60;117)	
0		124 ± 7 (110;139)	0.003		0.021
1-4		72 ± 13 (46;97)			
≥ 5		32 ± 16 (1;62)			

^a Logrank-Test

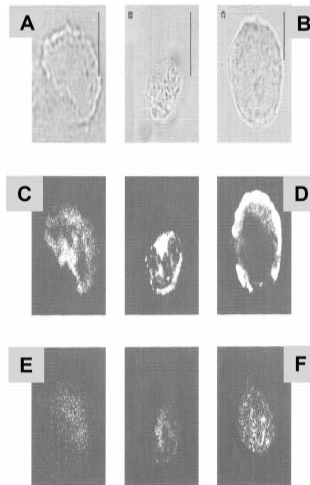


Abb. 1. Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie-Analyse von CTCs aus Blut einer Patientin (links) und SKBR3-Zellen (rechts). Durchlichtmikroskopische Aufnahmen (A, B), HER2 (C, D) und Ki-67 (E, F) Färbungen sind zusätzlich abgebildet. Die CTC und die als Positivkontrolle fungierende SKBR3-Zelle zeigten ähnliche Expressionsmuster des nuklearen Proliferationsproteins Ki-67. Der Größenmarker entspricht 10µm

Folglich korreliert die Detektion von HER2-positiven cCTCs signifikant mit der Inzidenz von Fernmetastasen und mit dem durch die Krebserkrankung verursachtem Tod der Patientinnen. Im Besonderen wurden HER2-positive cCTCs im Blut von allen vier Patientinnen detektiert, die anschließend Knochenmetastasen entwickelt haben. Um den unabhängigen prognostischen Wert von HER2-positiven cCTCs für DFS und OS zu evaluieren, wurde eine multivariate überlebensanalyse durchgeführt. Das Vorhandensein

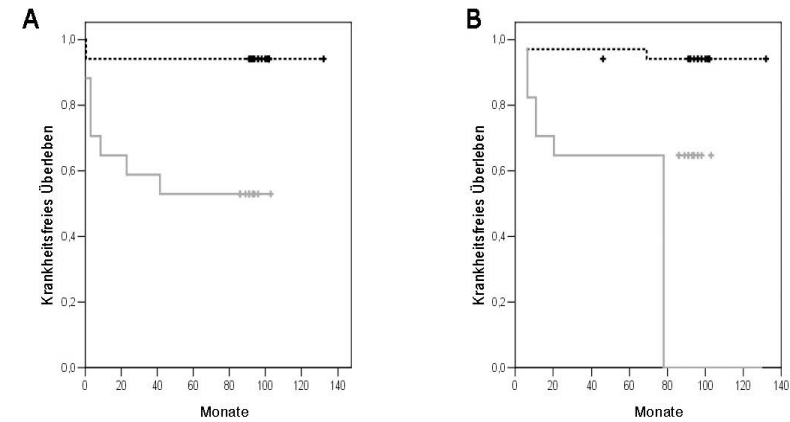


Abb. 2. überlebenskurven von Patientinnen mit primärem Brustkrebs. Berechnete Kaplan-Meier-Kurve für krankheitsfreies überleben (DFS) und Gesamtüberleben (OS) in Bezug auf den Nachweis und die Anzahl von zirkulierenden HER2-positiven Tumorzellen im peripheren Blut. Die schwarze gestrichelte Linie stellt die Patientinnen dar, bei denen keine HER2-positiven Tumorzellen detektiert wurden. Die graue Kurve zeigt das überleben der Patientinnen mit zirkulierenden HER2-positiven Zellen

von HER2-positiven cCTCs (ja vs. nein), der pT-Status (pT1-2 vs. pT3-4), der Lymphknotenstatus (pN0 vs. pN+), histologisches Grading (G1 vs. G2-3), ER- und PR-Status (positiv vs. negativ) wurden als Kovariablen erfasst. Das Vorhandensein von HER2-positiven CTCs erreichte dabei annähernd statistische Signifikanz (p=0.060).

Das Vorhandensein von HER2-positiven cCTCs bei Patientinnen mit nicht metastasierenden Brustkrebs könnte ein spezifischer Indikator für okkulte Metastasen sein. Im Hinblick auf die hämatogene metastasenbildende Tumorzell-disseminierung werden prognostische Marker benötigt, die die Identifizierung von Brustkrebspatientinnen für eine individuelle risikoangepasste Therapie ermöglichen könnten. Die cCTCs könnten ein Surrogatmarker für einen metastatischen Krankheitsverlauf sein, bevor eine Metastase lebensbedrohlich wird. Außerdem könnte der Nachweis von disseminierten Tumorzellen (DTC) im Knochenmark nach der adjuvanten Behandlung ein schlechtes Ansprechen [3-5] der systemischen Behandlung widerspiegeln. Da allerdings häufige Knochenmarksaspirationen für die Suche von okkulten Tumorzellen unangenehm sind und die Akzeptanz von ansonsten gesunden Patientinnen gering ist, könnte die Probenentnahme von peripherem Blut, im Besonderen für Langzeitstudien, eher geeignet sein. Seitdem unsere Technik HER2-positive cCTCs nicht nur bei Patientinnen mit metastasierender Krankheit hochsensitiv detektiert, sondern auch bei Krebspatienten der Stadien I und II, können die CTCs als Marker für die Prognoseeinschätzung dienen, da diese eine unentdeckte Tumordissemination repräsentieren [6; 7]. Weiterhin könnte der

Nachweis von HER2-positiven cCTCs Behandlungsentscheidungen beeinflussen. Dieses steht in Übereinstimmung mit Berichten, die darauf hinweisen, dass CTCs den Ausgang einer Behandlung reflektieren [8]. Die Bestimmung des HER2 in Mammakarzinomen wird benötigt, um die Entscheidung für die Therapie mit dem humanisierten monoklonalen Antikörper Trastuzumab zu treffen. Die Therapie verlängert signifikant das krankheitsfreie Überleben und Gesamtüberleben [9; 10]. Allerdings wird zurzeit die Bestimmung des HER2-Status des Tumors durch die Immunhistochemie im Tumor einmalig durchgeführt. Der Nachweis von HER2-positiven cCTCs könnte nützlich sein, um eine "Echtzeit" Beurteilung des HER2-Status während des Verlaufs der Krankheit zu ermöglichen. Wir konnten eine Diskrepanz zwischen der Detektion von HER2-positiven cCTCs und dem HER2-Wert der dazugehörigen primären Tumoren feststellen: Bei 12 Patientinnen mit HER2-positiven cCTCs hatte der Primärtumor einen HER2-Wert weniger als +3 und/oder keine HER-2 Amplifikation, was durch FISH-Analyse ermittelt wurde. Es wurde außerdem berichtet, dass ein signifikanter Anteil der Patientinnen mit HER2-neaktiven Primärtumoren während der Tumorentwicklung eine hohe Konzentration an HER2 im Serum aufwies. Dieses legt die Möglichkeit nahe, dass die HER2 Genamplifikation während der Progression des Tumors erworben werden kann [11]. Die Daten, die durch diese neue Methode gewonnen werden konnten, unterstützen die Detektion von zirkulierenden HER2-positiven Tumorzellen und erlauben eine Beurteilung des "Echtzeit" HER2-Status, sodass frühe Anzeichen einer okkulten metastatischen Krankheit überwacht und diese somit frühzeitig festgestellt werden kann.

Bibliographie:

1. Brandt B, Roetger A, Heidl S, Jackisch C, Lelle RJ, Assmann G, Zanker KS. Isolation of blood-borne epithelium-derived c-erbB-2 oncoprotein-positive clustered cells from the peripheral blood of breast cancer patients. *Int J Cancer* 1998;76:824-8.
2. Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbiicki JR, Riethmüller G. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:1419-24.
3. Lambrechts AC, van Veer LJ, Rodenhuis S. The detection of minimal numbers of contaminating epithelial tumor cells in blood or bone marrow: Use, limitations and future of RNA-based methods. *Ann Oncol* 1998; 9:1269-76.
4. Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:1113-24.
5. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Qvist H, Janbu J, Kvalheim G, Nesland JM, Naume B. Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2004;10:5342-8.
6. Terstappen LW, Rao C, Gross S, Weiss AJ. Peripheral blood tumor cell load reflects the clinical activity of the disease in patients with carcinoma of the breast. *Int J Oncol* 2000;17:573.
7. Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis Ch, Apostolaki S, Malamos N, Kakolyris S, Kotsakis A, Xenidis N, Reppa D, Georgoulis V. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol* 2002;20:3404-12.

8. Smith BM, Slade MJ, English J, Graham H, Luchtenborg M, Sinnott HD, Cross NC, Coombes RC. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol* 2000;18:1432-9.
9. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-92.
10. Scientific Symposium at the ASCO Annual Meeting 2005: Advances in Monoclonal Antibody Therapy for Breast Cancer.
11. Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S, Beitsch P, Khan A, Euhus D, Osborne C, Frenkel E, Hoover S, Leitch M, Clifford E, Vitetta E, Morrison L, Herlyn D, Terstappen LW, Fleming T, Fehm T, Tucker T, Lane N, Wang J, Uhr J. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:9393-8.
12. German Patent DE 102 17 102 A1 "Verfahren zur Charakterisierung von Primärtumoren", 2002.
13. International Patent application PCT/EP03/04037 (Veröffentlichungsnummer WO 03/087405 A2) "Methods for characterizing primary tumors", 2003.
14. Griwatz C, Brandt B, Assmann G, Zanker KS. An immunological enrichment method for epithelial cells from peripheral blood. *J Immunol Methods* 1995;183:251-65.
15. Brandt B, Junker R, Griwatz C, Heidl S, Brinkmann O, Semjonow A, Assmann G, Zanker KS. Isolation of prostate-derived single cells and cell clusters from human peripheral blood. *Cancer Res* 1996;56:4556-61.

III. Nachweis und Immunphänotypisierung von Prostata-spezifischen Zellclustern aus dem peripheren Blut von Prostatakrebspatienten

Eine provokante Diskussion über die Diagnose und Indikation zur Operation von Prostatakrebs (PCa) wurde in der Literatur durch die Daten einer klinischen Langzeitstudie ausgelöst [1]. Eine Differenzialdiagnose zwischen PCa mit einer guten Prognose und metastasierenden PCa ist nach wie vor schwierig. Deshalb wurden Studien durchgeführt, um Tumorzellen im Blut von Patienten zu identifizieren, die mit dem Risiko des Patienten für die Entstehung von Metastasen korrelieren.

Phänotypische Daten des Primärtumors zeigen, dass dieser relativ heterogen bezüglich der Expression von proliferationsassoziierten Markern (MIB-1) und Apoptose-induzierter DNA Fragmentierung ist [2]. Dieses deutet auf ein asynchrones Wachstum von Prostata Tumoren hin, was die Schlussfolgerung zulässt, dass die Zellen, die in die Blutzirkulation gelangen möglicherweise unterschiedliches Metastasierungspotential haben. Diese Hypothese wird zusätzlich durch die Tatsache gestützt, dass die Anzahl der Aberrationen, die durch Mikrosatelliten-PCR bestimmt werden können, mit Fortschreiten der Krebserkrankung ansteigt. Die Zunahme der Mutationen im Primärtumor erhöht möglicherweise auch die Heterogenität der disseminierten Tumorzellen und beeinflusst das Überleben der Patienten [3].

Um zusätzlich die Lebensfähigkeit der Zellpopulationen, die im peripheren Blut von PCa Patienten gefunden wurden zu evaluieren, haben wir immunzytologische Färbungen

Table 3
Anzahl der Patienten mit Zellcluster und die Anzahl von aus dem Blut isolierten Zellclustern, die positive für Prostata-spezifisches Antigen und Zytokeratin waren, enthalten in 11 EDTA- Blut von 68 Patienten mit Prostatakrebs

Zellcluster-Typ	DC	DC einschließlich IC	IC	cCTC
Anzahl der Patienten mit Zellclustern (% von 76)	70 (92%)	50 (66%)	25 (33%)	74 (98%)
Mittlere Anzahl der Cluster ± Standardabweichung	814 ± 946	80 ± 151	11 ± 36	825 ± 954
Spannweite der Anzahl von Clustern pro Cluster-positiver Patient	20–5400	3–1080	1–193	1–5400

DC = Zellcluster die nur aus dysomorphen Zellen bestehen; IC = Zellcluster von schmalen, runden, intakten Zellen; cCTC = alle Arten von zirkulierenden aus der Prostata stammenden Zellclustern

mit Antikörpern sowohl gegen die Proliferationsmarker Mib-1 (Ki-67) und H1/H3 [10], als auch gegen die Apoptose-assoziierten Marker c-Fas Rezeptor und M30 (apoptose-assoziiertes Zytokeratinfragment, Leers 1999) durchgeführt [4]. Dadurch stellte sich heraus, dass ein kleiner Anteil der selten vorkommenden Population von intakten Zellclustern positiv für die Proliferationsmarker Mib-1 und H1/H3 waren. Keine der intakten Zellcluster, die wir untersucht haben, waren positiv für den c-Fas Rezeptor oder M30. Durch die Färbung gegen den c-Fas Rezeptor und M30 konnten wir nachweisen, dass die dysomorphen Zellcluster (DC) apoptotisch sind.

IV. Das asynchrone Wachstum von Prostatakrebs spiegelt sich in den zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut wieder

Prostatakarzinome wachsen in 70 bis 80% multifokal. In 50-76% der Fälle muss deshalb der Tumor chirurgisch mit einer radikalen retropubischen Prostatatektomie (PRP) behandelt werden. Die klinische und prognostische Signifikanz der Multifokalität ist weiterhin unklar. Verschiedene Foci des Prostatakarzinoms können sich in ihrer Histologie unterscheiden, was nahe legt, dass separate Foci eines bestimmten Prostatakarzinoms möglicherweise auch eine unterschiedliche Tumorbiologie aufweisen [1]. Primäre Tumore zeigen vielmehr heterogene Expressionsraten von proliferations-assoziierten Markern wie Ki-67 und apoptose-induzierter DNA Fragmentierung, was auf ein asynchrones Wachstum des Prostatumors hinweist (siehe oben). Basierend auf Mikrosatellitenstudien von mikrodissiziertem Geweben konnten Bereiche im Primärtumor mit verschiedenen Alterationen identifiziert werden, die mit einer bestimmten Zelldifferenzierung in der Histologie und damit mit einem unterschiedlichen Gleason Score assoziiert waren [2; 3; 4].

Wir haben multifokale Prostatumore und PSA-positive CTCs aus dem peripheren Blut von 20 Patienten mittels Multiplex-PCR untersucht, von diesen Patienten konnten zwischen 55 und 5400 cCTCs aus 50 ml Blut isoliert werden. Neun polymorphe

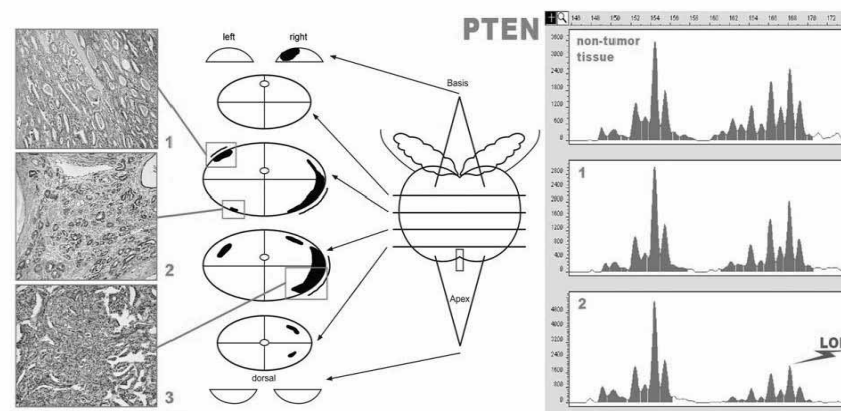


Abb. 3. Topographische Karte der Prostata eines Patienten, beinhaltend die verschiedenen Foci des Tumors, Form, Multifokalität und Verhältnis zur Kapsel und Operationsränder (rechte Seite) genauso wie die durch Hämatoxylin-Eosin gefärbten Bereiche der untersuchten Foci: 1: Focus 6 Gleason 3+3, Focus 9 Gleason 3+4, Focus 24 Gleason 4+4 (Vergrößerung 10x). Darstellung der durch Mikrosatelliten-PCR ermittelten LOHs des PTEN-Markers

Mikrosatellitenmarker wurden für den Vergleich von LOH- Mustern von verschiedenen Tumorfoci und zirkulierenden Tumorzellcluster (cCTC) verwendet. Die höchste Anzahl von LOH im primären Tumor (PT) und cCTCs wurden für den Marker D10S541 (PTEN, 92% bzw. 85%), gefolgt von D13S153 (82% bzw. 76%) und D16S422 (86% bzw. 71%) gezeigt. Der Marker D17S855 (BRCA1, 39% bzw. 39%) wies die geringste LOH Frequenz auf. Weiterhin wurde in 4 von 5 Fällen, die ein biochemischen Rezidiv innerhalb von 3 Jahren bekamen, ein LOH des Markers D17S855 sowohl für die cCTCs als auch für den PT nachgewiesen werden. Die höchste Anzahl von LOHs wurde in Foci entdeckt, die nicht identisch mit dem genomischen Muster der cCTCs waren. Die größten Unterschiede zwischen PT und cCTCs zeigte der Marker D8S258, der nicht disseminierende Focus des Primärtumors wies mehr als 50% häufiger einen LOH auf als die cCTCs (79% PT vs. 50% cCTC). Zwei Foci eines PT zeigten nur in einem Fall identische LOH-Muster, verglichen mit denen der cCTCs. In einem weiteren Fall besaß keiner der zwei Tumorfoci ein identisches Alterationsmuster mit den CTCs. Die untersuchten Tumorfoci waren in 9 Fällen annähernd gleich groß, wohingegen in 11 Fällen die Größe sehr unterschiedlich war. Der kleinste Focus wies nur ein Volumen von ungefähr 0.2 cm³ auf. Eine Korrelation zwischen der Anzahl der cCTCs sowie dem t-PSA-Level, dem Tumorstaging ebenso wie der Differenzierung konnte nicht aufgezeigt werden. Ein biochemisches Rezidiv trat in dieser Studie nur in Fällen mit niedriger Anzahl von CTCs (55–750 CTCs pro 50 ml; Mittelwert: 330) auf. Unserer Studie legt zum einen nahe, dass die cCTCs höchstwahrscheinlich nur von einem distinkten Fokus abstammen und zum anderen, dass die anderen Foci desselben Tumors manchmal über zusätzliche LOH verfü-

gen. Nur in einem der untersuchten Fälle zeigten beide Foci identische LOH Muster, während es in einem anderen Fall nicht möglich war, den disseminierenden Fokus im Primärtumor zu identifizieren. Interessanterweise konnten Qian et al. (5) durch Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) zeigen, dass kleine Foci des Primärtumors metastasieren können und dass gewöhnlich einer oder mehrere Foci dieselben Chromosomenaberrationen mit der entsprechenden Metastase gemeinsam haben. In der Tat konnten wir in 6 Fällen zeigen, dass in multifokalen Tumoren ein kleiner Fokus von nur 0.2 cm³ Größe, höchstwahrscheinlich der Ursprung für die Dissemination der cCTCs war, und nicht der größere Fokus. Interessanterweise wurde die höchste Anzahl von LOH beim Marker D10S541 (85%) festgestellt, das PTEN-Gen, welches in monofokalen Prostatakrebs (48%) weniger häufig betroffen ist. Zudem trat das selten auftretende LOH im BRCA1 Gen (38%) in 4 von 5 Fällen auf, die ein biochemisches Rezidiv innerhalb von 3 Jahren nach der Prostataktomie bekamen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass unsere Daten die Hypothese eindringlich unterstützen, dass die cCTCs bei Prostatakrebs von distinkten Foci des Primärtumors stammen. Die Größe des Tumorfokus steht nicht in Beziehung zur Anzahl der disseminierten Zellen, die in das Blutsystem gelangen. Sogar kleine Foci, kleiner als 0.2 cm³ Größe, zeigten eine signifikante Abgabe von cCTCs. Obwohl die Anzahl der Fälle, die wir in der Studie untersucht haben, gering war, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass LOH bei distinkten Markern wie D10S541 und D17S855, welche die Gene PTEN und BRCA1 repräsentieren, möglicherweise mit dem Auftreten von cCTCs im peripheren Blut von Patienten und ebenso einem frühen biochemischen Rezidiv assoziiert sind. Die Sequenzierung des PTEN- und BRCA1-Gens bei Prostatakrebs, die ein LOH besitzen, könnte einen neuen Marker für die frühe Detektion eines Rezidivs identifizieren.

Bibliographie:

1. Cheng L, Bostwick DG, Li G, et al. Allelic imbalance in the clonal evolution of prostate carcinoma. *Cancer* 1999; 85: 2017-22.
2. Takimoto Y, Shimazui T, Akaza H, et al. Genetic heterogeneity of surgically resected prostate carcinomas and their biopsy specimens is related to their histologic differentiation. *Cancer* 2001; 91: 362-70.
3. Arora R, Koch MO, Eble J N, et al. Heterogeneity of Gleason grade in multifocal adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 2004; 100: 2362-6.
4. Konishi N, Nakamura M, Kishi M, et al. Genetic mapping of allelic loss on chromosome 6q with in heterogeneous prostate carcinoma. *Cancer Sci* 2003; 94: 764-5. Qian J, Bostwick DG, Takahashi S, et al. Chromosomal anomalies in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 1995; 55: 5408-14.

V. Die Detektion von zirkulierenden Tumorzellen aus peripheren Blut von metastasierten Brustkrebspatientinnen mithilfe des halb-automatischen CellSearch® Systems

Die viel versprechenden klinischen Ergebnisse zum Nachweis von CTCs haben bislang nicht in die klinische Routine Eingang gefunden. Es fehlten standardisierte automatisierte

Methoden und Geräte. Der Nachweis der CTC wurde mit aufwendigen manuellen Probenaufarbeitungsmethoden durchgeführt, was zu großen Schwankungen der Ergebnisse, sowohl in verschiedenen Laboratorien als auch innerhalb eines Labors, führte. Weiterhin wurden verschiedene Reagenzien und Methoden für die Färbung und Evaluierung der immunzytochemisch präparierten Zellen bei der Suche nach diesen seltenen Ereignissen im Blut und Knochenmark verwendet, was zu Unterschieden in der Spezifität und Sensitivität führte. Obwohl Blut aufgrund der einfachen Probenentnahme letztlich eine ideale Quelle für die Detektion von CTCs darstellt, ist die klinische Signifikanz von CTCs im peripheren Blut weniger erhärtet als für CTCs im Knochenmark. Ein wichtiger Fortschritt in diesem Gebiet entstand durch die Entwicklung eines automatisierten Anreicherungs- und immunzytochemischen Detektionssystems für CTCs (CellSearch; Veridex; 1). Dieses System besteht aus einem CellSave-Probengefäß (Immunicon, Huntingdon Valley, PA) zur Aufbewahrung und zum Transport der Blutproben, dem "CellSearch Epithelial cell kit" (Veridex), welches alle Reagenzien und Verbrauchsmaterialien enthält, um einen Test durchzuführen, die CellSearch-Kontrollzellen (Veridex), um täglich oder für jeden Ablauf eine einwandfreie Durchführung zu sichern, ein automatisiertes Gerät, um die Reagenzien hinzuzugeben und die Zellen zu waschen (AutoPrep; Veridex), und ein halbautomatisches Mikroskop zum Auslesen und Auswerten der Ergebnisse (CellSpotter Analyzer; Veridex).

Durch die Verwendung dieses Systems, zeigten Cristofanilli et al. in einer vorausblickenden Studie, dass die CTC-Detektion signifikante prognostische Informationen für Patienten mit metastasierendem Brustkrebs liefert (2, 3). Die evaluierte Detektion der Anzahl von CTCs im peripheren Blut bei metastasierendem Brustkrebs, ist begleitet von einem verkürzten krankheitsfreien Überleben und Gesamtüberleben, ähnlich wie für das Knochenmark. Es gibt weiterhin einige Berichte über die Detektion von CTCs bei Patientinnen mit primärem Brustkrebs, allerdings meistens mit niedriger Anzahl an CTCs und unterschiedlichen Ergebnissen sowohl betreffend der Anzahl der positiven Patientinnen als auch der Anzahl der CTC eines einzelnen Patienten (4-8). Demnach könnte die Bestimmung des CTC-Niveaus ein erhebliches Potential für die Therapieprädiktion beim Mammakarzinom haben und die therapeutischen Strategien in der Zukunft beeinflussen. Für diesen Zweck wird eine zuverlässige Methode dringend benötigt, die in unterschiedlichen Laboratorien sowohl einfach durchzuführen als auch reproduzierbar ist. Weiterhin ist die Standardisierung und Automatisierung dieser Methode entscheidend, um hohe Durchsatzraten als eine Voraussetzung für klinische Anwendungen und multizentrische Studien sicher zu stellen.

Das CellSearch-System wurde von der U.S. Food and Drug Administration für klinische Routinearbeiten bei Brustkrebspatientinnen für die klinische Diagnostik zugelassen, obwohl eine unabhängige Validierung dieser neuen Technologie für Routinearbeiten fehlte. Eine kürzlich abgeschlossene multizentrische Studie zeigte durch eine hohe Übereinstimmung der Instrumente die Zuverlässigkeit des Systems und belegte dadurch, dass das System ein brauchbares Gerät für Routineanwendungen von therapeutischer Effizienz für metastasierende Brustkrebspatientinnen ist. Des Weiteren wird durch die Daten gezeigt, dass die Proben bei Raumtemperatur verschickt werden können, und dass die Anzahl der

CTCs bis zu 75 Stunden stabil bleibt. Diese Tatsache macht sowohl die Probenbearbeitung an zentralen Laboratorien als auch den Transport an entfernte Standorte möglich.

Die Untersuchung von Blutproben nach CTCs mithilfe des CellSearch-Systems ist für klinische Versuche mit multizentrischen Voraussetzungen möglich. Das System ist außerdem für klinische Laboratorien ein solides Gerät für Routinebestimmungen bei Brustkrebspatientinnen.

Bibliographie:

1. *Kagan M, Howard D, Bendele T*, et al. Circulating tumor cells as cancer markers, a sample preparation and analysis system. In: Diamandis EP, Fritsche HA, Lilja H, Chan DW, Schwarz M, editors. Tumor markers: physiology, pathobiology, technology and clinical applications. Washington (DC): AACR Press; 2002. p 495-
2. *Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ*, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:781-91.
3. *Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT*, et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:1420-30
4. *Muller V, Stahmann N, Riethdorf S*, et al. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin Cancer Res* 2005;11:3678-85.
5. *Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Schneider U, Schunemann S, Hoffken K*. Quantification of the response of circulating epithelial cells to neoadjuvant treatment for breast cancer: a new tool for therapy monitoring. *Breast Cancer Res* 2005;7:R975-79.
6. *Kahn HJ, Presta A, Yang LY*, et al. Enumeration of circulating tumor cells in the blood of breast cancer patients after filtration enrichment: correlation with disease stage. *Breast Cancer Res Treat* 2004;86:237-7.
8. *Witzig TE, Bossy B, Kimlinger T*, et al. Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients using immunomagnetic enrichment and digital microscopy. *Clin Cancer Res* 2002;8:1085-91.

UDK 618.19-006.6-033.2:616419

Radionov V.V, Petrov S.V

DAS PROBLEM VON KNOCHENMARKMETASTASEN BEI PATIENTINNEN MIT BRUSTKREBS (MAMMAKARZINOM)

Klinische onkologische Gebietsgesundheitsfürsorgestelle Uljanovsk
Klinische Onkologische Gesundheitsfürsorgestelle GM Kazan

ZUSAMMENFASSUNG

Bei durchschnittlich 30-35% der Patientinnen mit Brustkrebs wurden Mikrometastasen im Knochenmark diagnostiziert. Für die Bestimmung des Tumorbefalls im Knochenmark werden verschiedene Forschungsmethoden — zytologische und histologische — angewandt, immunozytochemische Untersuchung, Polymerase Kettenreaktion, Durchflußzytometrie und Zellenkulturen. In dieser Studie wurden bei 50 Patientinnen mit Brustkrebs Knochenmarkuntersuchungen mit Hilfe einer zytologischen, histologischen und immunozytochemischen Methode durchgeführt. Die Mehrzahl der Patientinnen (74%) hatten einen metastatischen Verlauf. Bei 19 Patientinnen (38%), die an der Untersuchung teilnahmen, wurden Knochenmarkmetastasen entdeckt. Die Kombination unterschiedlicher Diagnosemethoden erhöhte die Wahrscheinlichkeit der Entdeckung von Tumorzellen im Knochenmark nicht wesentlich. Andererseits konnten mit histologische und immunozytochemische Methoden Tumorzellen im Knochenmark ausreichend festgestellt werden. Die Mikrometastasen im Knochenmark hatten keine klinischen Entwicklung; gleichzeitig wurde bei Blutuntersuchungen, statistisch belegbar, eine Beschleunigung der Blutsenkungsgeschwindigkeit und Senkung des Hämoglobin-Spiegels festgestellt.

Schlüsselwörter: Mammakarzinom, Knochenmark, Mikrometastasen

Bei verschiedenen bösartigen Tumoren ist das Entdecken einzelner Tumorzellen im Knochenmark von großer Bedeutung, da subklinische Mikrometastasen Indikatoren für Tumordissemination und Vorgänger von Fernmetastasen sind. Im Laufe von 5 Jahren bricht nach einer chirurgischen Behandlung der Metastasen bei fast der Hälfte der Patientinnen ein Mammakarziom aus. Sogar bei 1/3 der Patientinnen ohne Metastasen in den regionalen Lymphknoten wurde später eine Prozessdissemination festgestellt. Mit dem ersten Rückfall zeigen sich bei 23% Patientinnen Tumorherde im Knochenmark mit Hilfe von standardisierten diagnostischen Prozeduren, wobei dieses Ergebnis bis zu 80% 18 nach einer Autopsie der verstorbenen Brustkrebspatientinnen steigt.

Die erste Nachricht über den Fund von Knochenmarkmetastasen ist im Jahr 1834 belegt; damals bekam dieser Zustand den Name "Tumordiathese" [1]. 1908 charakterisiert Ryall den Tumorbefall des Knochenmarks als "Tumorinfektion". [26]. Seit 1980 legt man große Aufmerksamkeit auf Knochentumoren, aber es besteht immer noch eine terminologische Unklarheit. Wenn man über das Knochenmark spricht, werden verschiedene Bezeichnungen benutzt — Mikrometastasen, okkulte Metastasen, minimale residuale Krankheit, isolierten Tumorzellen, disseminierte epitheliale Zellen. [4]. Uns scheint der Standpunkt der Gelehrten um Paul Hermanek am akzeptabelsten (1999) [15]. Die Autoren schlagen vor, Mikrometastasen und isolierten Tumorzellen auszuwählen. Von Mikrometastasen wird nur dann gesprochen, wenn eine Implantation von Tumorzellen in sogenannte "sekundäre Organe" vorkommt und sich ein Bild von Extravasation, Zellenproliferation mit Stromalreaktion zeigt. Aber die Größe des Tumorherdes ist das wichtigste Kriterium. Im Fall von Mikrometastasen ist die Clustergröße im Unterschied zu isolierten Tumorzellen groß genug, aber nicht höher als 2 mm. Eine Klärung der Terminologie ist für eine richtige Beschreibung des Tumorprozesses und dementsprechend für eine richtige Therapie notwendig. Wenn wir über Tumorzellen im Knochenmark sprechen, wird dieser Zustand als M0(i+) oder M0(mol+), je nach Untersuchungsmethode, klassifiziert, und der Tumorprozess kann entsprechend nicht als IV. Krankheitsstadium eingeordnet werden. Hingegen werden die Mikrometastasen im Knochenmark als pM1(mi) bezeichnet, und dementsprechend soll der Tumorprozess als IV. Stadium eingeordnet werden [15].

Nach Angaben verschiedener Autoren wurden die ITZ im Knochenmark bei ungefähr 30-35% Patientinnen mit Brustkrebs diagnostiziert [5; 6; 11; 14; 24]. Wovon hängt die Häufigkeit der Tumorzellenentdeckung im Knochenmark ab?

Wie Untersuchungsergebnisse von Krochina O.V. und Mitautoren zeigten (2002), gibt es in verschiedenen Krankheitsstadien von Patientinnen mit Brustkrebs eine Wahrscheinlichkeit der Metastasierung im Knochenmark [2]. Dabei steigt der Prozentanteil der Metastasenentdeckung vom I. bis zum IV. Stadium. Der höchste Prozentanteil der Mikrometastasen ist im IV. Stadium des Mammakarzioms (62,5); der geringste Prozentanteil im IIIa. Stadium, was sich wahrscheinlich durch eine geringe Patientenzahl in dieser Gruppe erklärt.

Fernmetastasen werden zum größten Teil mit dem Tumorbefall des Knochenmarks assoziiert. Die Häufigkeit des Knochenmarkbefalls hängt oft von der Lokalisierung der Fernmetastasen ab. In einer Arbeit von M. Osborne (1994) wurden bei 38% Brustkrebspatientinnen im IV. Stadium Mikrometastasen im Knochenmark entdeckt; bei 20% der Patientinnen Fernmetastasen, außerhalb von Knochen und bei 10% Patientinnen mit primär operablem Mammakarziom [21]. In der Arbeit von S. Braun und seinen Mitautoren wurden bei der Untersuchung von 33 Patientinnen mit viszerale Metastasen bei 13 Patientinnen Tumorzellen im Knochenmark entdeckt. Bei 18 von 19 Patientinnen mit Metastasen in Knochen wurden ebenfalls Mikrometastasen im Knochenmark diagnostiziert, sowie bei 48 von 55 Patientinnen mit gleichzeitiger metastatischer Skelettzerstörung und Viszeralorganen. [7].

In der nächsten Arbeit hat S. Braun (2005) eine Metaanalyse mit 9 der größten Untersuchungen durchgeführt, die insgesamt 4703 Patientinnen mit Mammakarziom

umfasst [9]. Der Vergleich von Patientinnen mit und ohne Knochenmarkzerfall, hatten Patientinnen mit Mikrometastasen im Knochenmark den höchsten ausgedehnten Tumorherd und meist einen niedrigen Differenzspiegel, sowie eine größere Wahrscheinlichkeit des Zerfalls der regionalen Lymphknoten und oft einen negativen rezeptorischen Status des Tumors.

Für einen Nachweis des Tumorzerfalls im Knochenmark, können folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

1. Bei weniger als 4% der Patientinnen lässt sich mit der zytologische und histologische Methoden Tumorzellen (nur bei ausreichend hoher Zahl) entdecken. Mit Hilfe der histologischen Methode werden echte Metastasen öfter entdeckt. Einzelne metastatische Zellen kann man mit einem Lichtmikroskopie sehr schwierig oder gar nicht bestimmen [25]. Die Steigung des Sensibilitätsnachweises von ITZ wird durch folgende Untersuchungsmethode erreicht:

2. Immunocytochemische Methode gründet auf einem Knochenmarkabstrich mit Hilfe von monoklonaler Antikörpern zu Antigenen, die zwar nicht für das hämopoetische Gewebe typisch sind, aber für Zellen mit soliden Tumoren [10; 24]. Für die Immunodetektion von ITZ des Mammakarzioms im Knochenmark werden monoklonale Antikörper zur epithelialen Membran des Antigen benutzt ((EMA), Zytokeratin (CK), tumorassoziierte Glykoproteine 12 (TAG 12)). Bei dieser Methode, die auf der Verwendung von monoklonalen Antikörpern zu Antigenen gründet, ist der Nachweis von 1-2 Tumorzellen pro 1 Mio. gesunder Knochenmarkzellen möglich. Die Sensibilität der immunocytochemischen Methode wird durch den niedrigen Expressionspiegel von Antigenen der Tumorzellen begrenzt. In diesem Fall ist die Nutzung der Antikörperplatte für die Sensibilitätssteigerung der Methode folgerichtig. Aber dieses Herangehen führt zur Senkung der Sensibilität der Methode, da bekannt ist, dass MKA zu EMA mit lymphoiden und früheren myeloiden Knochenmarkzellen kreuzartig reagieren, und CK-8 und CK-18 positiven Zellen kommen im Bereich von 2-5 von 1 Mio. im Knochenmark auch bei gesunden Personen vor. Deshalb kann die immunocytochemische Methode pseudo-positive Ergebnisse bei 2-10% bei gesunden Personen ergeben. Es ist auch wichtig, dass heute weltweit viele kommerzielle MKA mit verschiedener Sensibilität und Spezifität benutzt werden, was keine Standardisierung der Methode erlaubt und den Vergleich der Ergebnisse erschwert, die von verschiedenen Forschungsgruppen kommen.

3. Die Polymerasenkettenreaktion (RT-PCR) ist zum Nachweis von Mustergeweben für Matrizen-RNA bestimmt. Diese Methode besteht in der Suche nach mRNA in einigen Genen (Zytokeratine), die in metastatischen Zellen vorkommen, oder für die Suche nach mRNA in Genen, die für Mutationen von Tumorzellen spezifisch sind (z.B. Gene ERB B2, p53 und k-ras und andere). Einige Autoren meinen, dass PCR eine empfindlichere Methode als IZC zum Nachweis von Mikrometastasen bei Mammakarziom ist. Ein weiterer Nachteil von PCR ist die Bewertung der genetischen Information und nicht die Anwesenheit einzelner lebender Zellen, die man bei einer Knochenmarkuntersuchung nach der Chemotherapie bekommt; man muss sicher sein, dass die entdeckte RNA aus lebenden Zellen (und nicht aus abgestorbenen) Tumorzellen stammen. Außerdem kann RNA nicht immer aus Mustern extrahiert werden, was eine retrospektive Analyse erschwert.

4. Für den Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark durch Durchflusszytometrie wurde eine Tumorzellensuspension mit markierten Antikörpern zu Antigenen bearbeitet und lässt sich durch ein Zytofluorimeter untersuchen, das die gefärbten Zellen automatisch erkennt und zählt. Mit dieser Methode kann eine Zelle in 10-100.000 normalen Zellen des Knochenmarks entdeckt werden. Der größte Nachteil der Durchflusszytometrie ist die Notwendigkeit der Absonderung einer bedeutenden Zahl lebender Tumorzellen aus dem Knochenmark (was nicht immer möglich ist). Außerdem, ist die Spezifikation der Methode bis heute noch nicht ausgereift genug.

5. Bei der Knochenmarkuntersuchung werden Muster der Zellstrukturen, die aus der Aspirationsbiopsie bekommen wurden, in Nährböden gebracht. Die normalen Knochenmarkzellen wuchern bei Abwesenheit der gewonnenen Mikroumgebung nicht. Falls sich eine sekundäre Kolonie in Milieu bildet, deutet dies auf ein Vorhandensein von Tumorzellen im Knochenmark hin, die zu autonomem Wachstum fähig sind. Ein wichtige Faktor, der die Nutzung der kulturalen Methode begrenzt, ist die technische Schwierigkeit und der hohe Preis.

Zur Bestimmung eines diagnostischen Wertes des unterschiedlichen Tumorbefalls im Knochenmark haben wir eigene Untersuchung durchgeführt.

MATERIAL UND METHODE

An der Untersuchung nahmen 50 Patientinnen mit Mammakarziom teil, die in der regionalen onkologischen Gesundheitsfürsorge von Uljanovsk behandelt wurden. Von der Gesamtpatientenzahl wurden bei 37 Patientinnen (74%) metastatische Prozesse diagnostiziert — bei 13 (26%) örtlich ausgebreitete. Das Knochenmark wurde mit Hilfe der zytologischer, histologischer und immunozytochemischer Methode (IZC) untersucht. Material für die zytologische und IZC wurde durch eine aspiratorische Punktion mit 8-10 ml Knochenmark aus dem oberen, hinteren Spina Iliaca beiderseits entnommen. Für die histologische Untersuchung wurde zusätzlich an der gleichen Punktionsstelle die Trepan-biopsie des Knochenmarks durchgeführt. Die IZC- Untersuchung des Knochenmarks wurde im Labor die immunohistologische Diagnose des klinischen onkologischen Zentrum der Republik Tatarstan durchgeführt. Für die Analyse wurden der monoklonale Antikörper zu Zytokeratine — "PAN", Klon MNF 116, DAKO benutzt. Das Vorhandensein einer metastatischen Zelle pro 1 Mio. Myelokariozyten wurde als positive Reaktion gesehen. Im Fall eines Nachweises von Mikrometastasen im Knochenmark mit Hilfe der IZC Methode wurden ein zusätzlicher Rezeptorstatus und eine proliferative Aktivität mit Proliferationsmarker Ki-67, Klon BS6, Pharmingen bestimmt.

Für die mathematische Datenverarbeitung wurde das Standardpaket des Programms Microsoft Excel 2000 benutzt. Als Kriterium für die Richtigkeit des Vergleichs der Patientenzahl wurde 2 benutzt, und für den Vergleich des Mittelwertes wurde das T-Kriterium (Stjudenta) benutzt.

ERGEBNISSE

Von der gesamten Patientenzahl, die an der Untersuchung teilnahmen, wurden bei 19 (38%) Patientinnen Mikrometastasen im Knochenmark entdeckt. Der Tumorbefall des

Knochenmarks wurde in den meisten Fällen mit Hilfe der IZC Methode diagnostiziert (12 von 19 Patientinnen). Die Mikrometastasen im Knochenmark wurden mit Hilfe der histologische Methode durchgeführt — bei 10 — und mit Hilfe der zytologische Methode — bei 5 Patientinnen. Die Kombination der verschiedenen Diagnostikmethoden hat überraschenderweise, die Wahrscheinlichkeit des Nachweises von Mikrometastasen im Knochenmark nicht erhöht — nur bei 2 Patientinnen (10,5%) wurde die Tumorauffektion sowie bei IZC, als auch bei der histologischen Untersuchung entdeckt, bei 3 Patientinnen (15,8%) — gleichzeitig mit Hilfe der zytologischen und immunozytologischen Methode, bei 2 Patientinnen (10,5%) — mit Hilfe aller drei Diagnosemethoden. Die histologische und IZC Methoden zeigten unabhängig voneinander einen ausreichend höheren Informationswert. Mit Hilfe dieser Methoden wurden Mikrometastasen im Knochenmark entsprechend bei 6 (31,6%) und 5 (26,3%) Patientinnen diagnostiziert.

Von 12 Patientinnen, bei denen die Mikrometastasen im Knochenmark mit Hilfe der IZC Methode entdeckt wurden, waren in allen Fällen die Tumorzellen Rezeptor-negativ und hatten eine niedrige Expression des Antigen Ki-67.

Bei Patientinnen ohne Mikrometastasen im Knochenmark wurden Knochenmetastasen bei fast der Hälfte der Patientinnen klinisch diagnostiziert (45%), während eine Skelettaffektion bei mehr als 2/3 der Patientinnen (76,5%) der Patientinnengruppe mit Mikrometastasen festgestellt wurden. Es ist merkwürdig, dass die Mikrometastasen im Knochenmark bei 4 von 15 Patientinnen mit keinen Knochenmetastasen entdeckt wurden (26,7%). Seltsamerweise (2 aus 19 Fällen) wurden bei Patientinnen mit einem örtlich-ausgebreiteten Mammakarziom Mikrometastasen im Knochenmark entdeckt.

Während unserer Arbeit haben wir versucht zu klären, ob die Mikrometastasen auf die Knochenmarkfunktion wirken. Dazu wurde eine Analyse des peripheren Blut der Patientinnen durchgeführt, welche an der Untersuchung teilnahmen.

Die durchgeführte Analyse hat gezeigt, dass metastatische Knochenmarkaffektion von der Hemmung der Erythropoäse begleitet wird (p 0,05) und nicht auf granulozytare und trom-

Tabelle

Die Werte der allgemeinen Blutanalyse bei Patientinnen mit und ohne Mikrometastasen im Knochenmark

Die Werte	KM(-) (n=31)	KM(+) (n=19)	p
Hämoglobin, g/l Norm (115-145) Anämie (<115)	27(87,1%) 4(12,9%)	12(63,2%) 7(36,8%)	0,047
Leukozyten, 410 in 9 / l Norm (4,0-8,8) Leukopenie (<4,0)	25(80,6%) 6(19,4%)	14(73,7%) 5(26,3%)	0,564
Trombozyten, 410 in 9/l Norm (180-320) Trombozytopenie (<180)	2(6,5%) 29(93,5%)	0 19(100%)	0,065
Blutsenkungsgeschwindigkeit(BSG),mm/h <30 ≥30-39	20(64,6%) 11(35,4%)	2(10,5%) 17(89,5%)	<0,001

bozytare Teile der Hämoese wirkt, was die Hämoglobin-, Leukos- und Trombozyten-Werte bestätigen. Die Anämie in der Mikrometastasengruppe trat fast 2 mal häufiger auf, als bei der Kontrollgruppe. Eine hochsignifikante Steigung der Blutsenkungsgeschwindigkeit bei der Patientengruppe mit Mikrometastasen im Knochenmark ($p < 0,001$) ist merkwürdig. Der Mittelwert der Blutsenkungsgeschwindigkeit in der Patientengruppe ohne Mikrometastasen im Knochenmark war 23,5 mm/h (17,5 29,5), während sie bei der Gruppe mit metastatischen Knochenmarkaffektion bis 51,7 mm/h (44,2 59,2) ($p < 0,001$) erreichte.

DISKUSSION

Aufgrund der vorgestellten Daten kann man sagen, dass sich Mikrometastasen im Knochenmark häufig bei Patientinnen mit Mammakarziom (38% der Fälle) zeigen. Die Wahrscheinlichkeit der tumorösen Knochenmarkaffektion steigt bis 59,1% bei einer metastatischen Skelettaffektion.

Die IZC (63,2%) und histologische (57,9%) Methoden zur Bestimmung von okkulten Metastasen im Knochenmark haben sich als informativste Methode bewährt. Das heißt, für die maximale Vergrößerung der Wahrscheinlichkeit der Diagnostik von Metastasen im Knochenmark ist es sinnvoll, gleichzeitig beide Methoden zu benutzen. Die Tripan-biopsie des Knochenmarks und die Durchführung einer histologischen Untersuchung ist zur Bewertung der Größe des Tumorherds im Knochenmark notwendig und entscheidet somit, ob die Mikrometastasen oder ITZ verantwortlich waren. Dies ist wichtig für die richtige Klassifikation des Tumorprozesses und die Planung der weiteren Therapie.

Trotz fehlender klinischer Äußerungen der Mikrometastasen im Knochenmark wurde in der allgemeinen Blutuntersuchung statistisch glaubwürdige die Blutsenkungsgeschwindigkeit und eine Minderung des Hämoglobin-Wertes festgestellt. Damit kann gesagt werden, dass genau diese Ergebnisse bei Patientinnen mit Verdacht auf tumorösen Knochenmarkaffektion die besten Sensibilität haben.

Gleichzeitig, wie unsere Untersuchung gezeigt hat, haben die okkulten Tumorzellen, die im Knochenmark entdeckt wurden, eine niedrige proliferative Aktivität, d.h. sie befinden sich im prodromalen Zustand.

Bei der Diskussion der Problematik über Mikrometastasen im Knochenmark wäre es nach dem Blick auf Daten der Fachliteratur und auf die eigenen Ergebnissen wünschenswert, die gesamte Problematik der Metastasierung neu zu betrachten.

Das Problem der modernen Onkologie liegt nicht in der Behandlung des primären Tumorherds, sondern in der Therapie der Fernmetastasen, die hauptsächlich für den Tod der onkologischen Patienten verantwortlich sind. Während der 20-jährigen Beobachtung starben 80% der Patientinnen mit Brustkrebs am allgemeinen Prozess, wobei Fernmetastasen eine wichtigere Bedeutung als Todesursache hatten, als regionale Rezidive. Welche Rolle hat das Knochenmark bei den Metastasierungsprozessen? Aus unserer Sicht — eine Schlüsselrolle. Und nicht nur im Fall der Knochenmarkmetastasierung, sondern auch im Fall von nicht Knochenmarkmetastasierung. Auf welcher Basis gründet diese Vermutung?

Die Tumorzelle kann potentiell metastasieren sobald sie im primären Herd die Möglichkeit für Intravasation bekommt und in den Kreislauf kommt. Tumorzellen reagieren im Blutsystem sensibel auf verschiedenen Abwehrreaktion des Wirtes, ein-

schließlich der Auflösung von Lymphozyten, Monozyten und natürlichen Killerzellen. Außerdem werden Tumorzellen bei Kreislaufstörungen und Thrombosen verletzt. Die Untersuchungen mit Injektion von Tumorzellen, die mit Isotopen markiert wurden, haben die Tatsache bestätigt, dass nur eine von tausend Tumorzellen, die die Blutbahn erreichen, lebensfähig bleibt. Es überleben nur 0,1% der Tumorzellen, die durch das Kapillarnetz anderer Organen aufgehalten werden und von dort die Entwicklung von Fernmetastasen stimulieren. Die Lunge ist der erste Metastasierungsorgan. Dabei überwindet der Großteil der Tumorzellen diese Grenze. Dafür spricht die hohe Zahl von Knochenmarkmetastasen ohne Lungenbeteiligung. Die nächste Barriere ist das Knochenmark.

1889 hat Stephen Paget ein Modell der Knochenmarkmetastasen dargelegt und bezeichnet: "Für mich ist es selbstverständlich, dass bei Mammakarziom die Knochen auf speziellem Weg geschädigt werden, der nicht nur mit einer Theorie der Tumorembolisation erklären werden kann." 22 . Er vermutete, dass die Eigenschaften der Gewebe (in denen sich die Metastasen entwickeln), in diesem Prozess entscheidend sind. Damit hat er die heute sehr populäre Theorie vom "Boden und Samen" begründet.

Einerseits spielen bei der Metastasierung die Eigenschaften (Samen) eine bestimmte Rolle, d.h. die Tumorzellen. Die Ergebnisse der Untersuchungen von japanischen Wissenschaftler zeigten, dass die Zellenlinien des Mammakarziom und H-31, die proteolytische Stoffe wie Kollagenase, beta-3-Integrin herstellen können, die die Schicht der Osteozyten zerstören und bei der Invasion der Tumorzellen in Knochen helfen 19;20 .

Andererseits bildet das Knochengewebe zusammen mit dem Knochenmark eine gute Grundlage für die Tumorentwicklung. Es ist bekannt, dass die sinusoidale Struktur im Knochenmark eher zur Bildung von metastatischen Herden passt, als das einfache arteriovenöse Kapillarnetz. Aber die Milz, die auch eine sinusoidale Struktur hat, wird nur in seltenen Fällen von Metastasen geschädigt. Somit hat das Milieu, das die Tumorzellen umgibt, eine große Bedeutung.

Knochen sind eine günstige Umgebung, weil es dort viele Wachstumsfaktoren gibt, wie transformierte Beta-Wachstumsfaktor (TGF-beta), insulinähnliche Wachstumsfaktoren (IGFs), trombozytare Wachstumsfaktoren (PDGF), Fibroblasten WF(FGF), morphogenetischer Knocheneiweiß (BMP), die mit kollagenen Fragmenten Tumorzellen anziehen und beginnen im Knochenmark zu zirkulieren 12;13 . Ein Teil der Tumorzellen, die sich im Knochenmark befinden, gibt den Beginn für die Knochenmarkbildung. Genau deshalb sind Knochenmarkmetastasen der erste Ort der Metastasierungsstruktur. Die anderen Teile der Tumorzellen bleiben im Knochenmark in einem inaktiven Zustand, was die niedrige Expression des Antigens Ki-67 zeigt. Die niedrige proliferative Aktivität der Tumorzellen im Knochenmark verstärkt die Situation noch mehr, weil solche Zellen auf Chemotherapie sehr schlecht reagieren. Das führt zu Misserfolgen von adjuvanten und auch hochdosierten Chemotherapien als Versucht der Eliminierung von Mikrometastasen im Knochenmark 8;6;17 . Nach einer bestimmten Zeit (nach ein paar oder Dutzenden Jahren) wandern die Tumorzellen aus dem Knochenmark in die Kreislaufgefäße und führen zu Metastasenbildung in anderen Organen.

Zum Schluss kann man sagen, dass das Knochenmark ein Depot für die Tumorzellen bildet und eine Schlüsselrolle bei den Prozessen von Fernmetastasierung spielt.

Bibliographie:

1. *Berenson D.G., Koloskov A.V., Tarasov V.A.* Knochenmarkbefall bei den soliden Tumor. // Hämatol. und transfusiol., 2000. — T. 45, №5. — C. 35-37. (In Russian)
2. *Krochina O.V., Letjagin V.P., Tupizin N.N.* et al. Mammakarzinom. Mikrometastasen im Knochenmark // Vestnik des russischen onkologischen Forschungszentrum Blochin N.N. RMWA — 2002. — T. 3 — C. 15-20. (In Russian)
3. *Moiseenko V.M.* "Natürliche Krankheitsgeschichte" des Mammakarzinoms // Praktische Onkologie: ausgewählte Lektionen. Unter Redaktion von Tuljandina C.A., Moiseenko V.M. St-Petersburg: Zentrum Tomm-2004- S-27. (In Russian)
4. *Benoy I.H., Salgado R., Elst H.* et al. Relative microvessel area of the primary tumor, and not lymph node status, predicts the presence of bone marrow micrometastases detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients with clinically non-metastatic breast cancer // Breast Cancer Res. — Vol. 7 — P. 210-219.
5. *Berger U., Bettelheim R., Mansi J.L.* et al. The relationship between micrometastases in the bone marrow, histopathologic features of the primary tumor in breast cancer and prognosis // Am. J. Clin. Pathol. — 1988. — Vol. 90. — P 1-6.
6. *Braun S., Müller M., Hepp F.* et al. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status // J. Natl. Cancer Inst. — 1998. — Vol. 90. — P.1099-1100.
7. *Braun S., Pantel K., Müller P.* et al Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II or III breast cancer // N Engl. J. Med. — 2000. — Vol. 34, № 2. — P. 525-533.
8. *Braun S., Kantenich C., Janni W.* et al. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients // J. Clin. Oncol. — 2000. — Vol. 18, №1. — P.80-86.
9. *Braun S., Vogl F.D., Naume B., Janni W.* et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastases in breast cancer // N. Engl. J. Med. — 2005. — Vol. 353. — P. 793-802.
10. *Brugger W., Bühring H.J., Grünebach F.* et al. Expression of MUC-1 epitopes on normal bone marrow: implications for the detection of micrometastatic tumor cells // J. Clin. Oncol. — 1999. — Vol.17. — P. 1535-1544.
11. *Diel I.J., Kaufmann M., Costa S.D.* et al. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status // J. Natl. Cancer Inst. — 1996. — Vol. 88. — P 1652-1664.
12. *Duffy M.J.* The role proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis // Clin. Exp. Metastasis. — 1992. — Vol. 10. — P. 145-155.
13. *Ellis V., Pyke C., Eriksen J.* et al. The urokinase receptor: involvement in cell surface proteolysis and cancer invasion // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1992. — Vol. 667. — P. 13-31
14. *Funke I., Schraut 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.
15. *Hermanek P., Hutter R.V.P., Sobin L.H., Wittekind C.* Classification of isolated tumor cells and micrometastasis // Cancer. — 1999. — Vol. 86. — P. 2668-2673.
16. *Hempel D., Muller P., Oruzio D.* et al. Adoptive immunotherapy with monoclonal antibody 17-1A to reduce minimal residual disease in breast cancer patients after high-dose chemotherapy // Blood. — 1997. — 90. — P.379B (abstr. 4454).

17. *Hohaus S., Funk L., Brehm M.* et al. Persistens of isolated tumor cells in patients with breast cancer after sequential high-dose therapy with peripheral blood stem cell transplantation // Blood. — 1996. — 88. — P.128A (abstr. 501).
18. *Kamby K., Guldhammer B., Vejborg I.* et al. The presence of tumor cells in bone marrow at the time of first recurrence of breast cancer // Cancer. — 1987. — Vol. 60. — P.1306-1312.
19. *Kitazawa S., Maeda S.* Development of skeletal metastases // Clin. Orthop. — 1995. — Vol. 312. — P. 45-50.
20. *Ohishi K., Fujita N., Morinaga Y., Tsuruo T.* H-31 human breast cancer cells stimulate type I collagenase production in osteoblast-like cells and induce bone resorption // Clin. Exp. Metastasis. — 1995. — Vol. 13(4). — P. 287-295.
21. *Osborne M., Rosen P.* Detection and management of bone marrow micrometastases in breast cancer // Oncology. — 1994. — Vol. 8. — P. 25-36.
22. *Paget S.* The distribution of secondary growths in cancer of breast // Lancet. — 1889. — 1. — P. 571-573
23. *Pantel K., Schlimok G., Angstwurm M.* et al. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow // J. Hematother. — 1994. — P 165-173.
24. *Redding H.W., Coombes R.C., Monaghan P.* et al. Detection of micrometases in patients with primary breast cancer // Lancet 1983; ii:1271-1274.
25. *Ridell B., Landys K.* Incidence and histopathology of metastases of mammary carcinoma in biopsies from the posterior iliac crest // Cancer. — 1979. — Vol.44. — P. 1782-1788.
26. *Ryall C.* The technique of cancer operations, with reference to the danger of cancer infections // BMJ. — 1908. — Vol. 2. — P. 1005-1008.

W.A. Spiridonowa¹, S. Bessonow², N.N. Tupizin³, D.A. Schirokow³,
A.M. Kopilow^{1,2}

PERSPEKTIVEN DER ANTIZYTOTOKINOTHERAPIE Gewinnung des RNS-Aptamers zum humanem Interleukin 6 (hIL-6) durch die SELEX Methode

1 A.N. Belosorskiy-Institut für physisch-chemische Biologie der Staatlichen
Moskauer Lomonossow-Universität

2 Chemische Fakultät der Staatlichen Moskauer Lomonossow-Universität

3 Russisches Onkologisches wissenschaftliches N.N. Blochin-Zentrum der Russischen Akademie der
medizinischen Wissenschaften, staatliche Einrichtung

ZUSAMMENFASSUNG

Mit der SELEX-Methode und kombinatorischen RNS-Bibliothek mit einer randomisierten Zone mit einer Länge von 30 Nukleotiden und der Komplexität von 1015 Varianten wurde eine Selektion zu hIL-6 in einem Puffer durchgeführt, der die Salzzusammensetzung des Blutes imitiert,.

Es wurde für die Selektion mit der Affinchromatographie hIL-6 auf der BrCN-aktivierten Sepharose immobilisiert, dabei hat hIL-6 eine native Konformation des Bindungsteiles von Monoklonalantikörper B-E8 beibehalten, was mit der Luminiszenzmikroskopie gezeigt wurde.

Nach 14 Selektionszyklen haben wir den RNS-Aptamer gewonnen, der speziell hIL-6 bindet. Die primäre Aptamerstruktur wurde nach dem Sucker-Algorithmus bestimmt, sowie eine mögliche sekundäre Struktur prognostiziert. ArhIL-6.9 bindet spezifisch hIL-6 mit einer scheinbaren Dissociationskonstante von 316 ± 130 nM.

Schlüsselwörter:

Abkürzungen:

IL-6 — Interleukin-6;

hIL-6 — humanes Interleukin-6;

OSM — Onkostatin M;

VEGF — Wachstumsfaktor des Gefäßendothels;

bFGF — Hauptwachstumsfaktor der Fibroblasten;

ArhIL-6 — RNS-Aptamer zum humanen Interleukin-6.

EINLEITUNG

Ein Ansatz zur Behandlung der minimalen Restkrankheit bei Tumoren ist die Antizytokintherapie, d.h. die Blockierung der Wirkung von Zytokinen und anderen

Einflussgrößen, die eine Wachstums- und antiapoptische Wirkung in Bezug auf die Tumorzellen hervorrufen können. Ein klassisches Beispiel ist die Wirkung von Interleukin 6, das ein Hauptwachstumsfaktor für die Zellen des multiplesen Myeloms ist. Dieses Zytokin ist nicht nur an der Progredienz des multiplesen Myeloms beteiligt, sondern auch an einer Reihe von Epitheltumoren.

Die IL-6-Rezeptoren exprimieren sich an der Mehrzahl von Zellentypen. Der spezifische gp80-Rezeptor hat keinen zytoplasmatischen Teil. Das ist ein Membraneiweiß, das an der Zellmembran exponiert ist oder in löslicher Form vorhanden ist. Der Universalrezeptor für alle Zytokinen der IL-6 — gp130-Gruppe ist für die Signalübergabe von IL-6 von der Membran zum Zytoplasma der Zellen verantwortlich und mit der JAK-Kinase assoziiert [1].

In der IL-6-Struktur werden drei Zonen kartiert, die für die Wechselwirkung mit den Rezeptoren verantwortlich sind: eine Kontaktzone mit gp80 und zwei Kontaktzonen mit gp130. Nur in der Komplexzusammensetzung von gp80 kann IL-6 mit gp130 wirken [2-3]. Der gp80-IL-6-Komplex wirkt mit gp130, dabei findet die Dimerisation zweier gp130-Moleküle statt und bildet sich ein Hexamerkomplex, der aus zwei IL-6-Molekülen, zwei gp80-Molekülen und zwei gp130-Molekülen besteht. Die Komplexbildung aktiviert die JAK-Kinasen, die die Thyrosinreste im STAT3-Faktor phosphorylieren. Als Ergebnis einer Reaktionskaskade findet die Aktivierung einer Reihe von Genen statt, die mit der Wachstumsaktivierung und den antiapoptischen Effekten bei verschiedenen Krankheiten verbunden sind [3].

Bei dem multiplen Myelom ist die häufigste Blockierungsmethode der Zytokinwirkung die klinische Verwendung von Monoklonantikörpern. Darunter sind die effektivsten, in der Klinik erlaubten Antikörper die von J.Wijdenes (Frankreich) entdeckten B-E8-Antikörper. Diese Antikörper neutralisieren die biologische Wirkung von IL-6. Am effektivsten sind die Antikörper in der Elimination der Restzellen (Residualzellen) des multiplen Myeloms. Moderne Therapieprogrammen des multiplen Myeloms schließen die Hochdosischemotherapie mit der Transplantation der hämopoetischen Stammzellen ein. Gerade in der Kombination mit diesem Verfahren werden zur Zeit für die Therapie Zwecke MKA B-E8 verwendet. Das Wesen dieses Verfahrens besteht darin, dass nach der Hochdosischemotherapie die Knochenmarkstromazellen große Mengen von Interleukin 6 produzieren. Dies übt seinerseits die antiapoptische Wirkung auf die von der Chemotherapie (Melphalan) und Hormontherapie (Dexamethason) geschädigten Tumorzellen aus. Diese Zellen überleben und machen den Therapieeffekt zunichte. Die Antikörper neutralisieren IL-6 und seine antiapoptische Wirkung und tragen dadurch bei der Erreichung einer vollen Remission der Kranken bei. Dieses Vorgehen wurde auch im Russischen Onkologischen wissenschaftlichen N.N. Blochin-Zentrum der Russischen Akademie der medizinischen Wissenschaften verwendet, doch ist es in Frankreich verbreiteter.

Wir stellten uns die Aufgabe, ob man die Aptamers zu IL-6, die die Aktivität von Zytokin-Interleukin 6 blockieren, gewinnen kann.

Die SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment) Methode ist ein relativ neues, aber leistungsfähiges Verfahren zur Gewinnung der Aptamers von verschiedenen

Targets [4–10]. Die Aptamers (lat. aptus — geeignet) sind Moleküle, die aus den kombinatorischen Nukleinsäurebibliotheken selektiert wurden und eine hohe Affinität und Spezifität zu den Targets haben. Die SELEX Methode wird breit zur Gewinnung von Aptamers zu verschiedensten Stoffen verwendet. Es sind Aptamers zu Eiweiße, Nukleinsäuren, Antibiotika, Zucker und vielen anderen organischen Verbindungen gewonnen worden [11–20].

Man kann sagen, dass Aptamers das Funktionsanalogon zu monoklonalen Antikörpern sind. Die Aptamerkomplexe mit ihren Targets sind mit den Antigen-Antikörper-Komplexen der Festigkeit nach vergleichbar.

Aptamers für Eiweiß ohne Bindung der Nukleinsäuren zu bekommen ist eine schwierige Aufgabe.

Es wurden AptamerRNS zu solchen Faktoren wie Hauptwachstumsfaktor von Fibroblasten (bFGF) und Wachstumsfaktor von Endothel der Gefäße (VEGF) gewonnen [21–24]. Die Aufgabe wurde dadurch erleichtert, dass sie eine Heparin-verbundene Zone haben. VEGF und bFGF sind ihrer Natur nach RNS von nicht-bindenden Eiweißen und enthalten Zonen, die eine potenziell hohe Affinität zu den Polyanionen haben, darunter RNS. Diese Besonderheit hat den Erfolg der SELEX Methode zu diesen Eiweißen vorhergesagt.

Ein anderer Wachstumsfaktor, zu dem die Aptamers auf der RNS-Grundlage gewonnen wurden, ist Onkostat M (OSM) [25]. OSM sowie IL-6 sind keine Heparin bindende Eiweiße, d.h. sie haben keine Ausgangsaffinität auf Nukleinsäuren, wie auf Polyanionen. Doch die für sie gewonnenen Aptamers haben eine ausreichend hohe Affinität und Spezifität.

Ziel dieser Arbeit ist die Gewinnung der AptamerRNS zu humanen IL-6 (hIL-6). Die Gewinnung der Aptamers zu hIL-6 erlaubt es, die Mechanismen der Wechselwirkung von IL-6 und Rezeptoren, sowie die Signalübergabesysteme effektiver zu untersuchen.

STOFFE UND METHODEN

Immobilisation von hIL-6 auf BrCN-Sepharose

Die Sepharose wurde mit 1 mM HCl-Sepharose gewaschen — ausgehend von 200 ml Säure auf 1 g trockenes Bromzyan-aktivierte Sepharose (BrCN-activated Sepharose 4B, Amersham-Pharmacia), und dann mit einem Puffer zur Bindung von 20 mM HEPES-KOH (pH = 7,6), 1 mM MgCl₂, 140 mM NaCl, 5 mM KCl gewaschen. Danach wurde die Sepharose mit Doppelvolumen der hIL-6-Sepharose inkubiert — ausgehend davon, dass die Konzentration von immobilisierten hIL-6 in der Sepharose mindestens 10 µM betrug.

Ein direktes Verfahren zur Ermittlung der hIL-6-Kapazität der Sepharose ist die Ermittlung der Eiweißmenge durch die Aminosäureanalyse. Die Probe enthielt 7,0–7,3 mg Eiweiß, was einer 100%igen Immobilisation entspricht. Die Eiweißkapazität der Sepharose betrug 1 µmol hIL-6/ml, ausgehend von einer IL-6-Molekularmasse von 21 kD.

Die Eiweißkonzentration wurde mit Bradford-Verfahren mit Stierserumalbumin als Standard bestimmt [26].

Bestimmung des Immobilisationsgrades

BrCN-aktivierte Sepharose mit auf ihr immobilisierten hIL-6 wurde in einem Phosphatpuffer (PBS) inkubiert, der 1 % BSA und 0,01 % NaN₃ enthält. Dann hat man die monoklonalen Antikörper B-E8 (mit freundlicher Genehmigung von J. Wijdenes, Frankreich, überlassen) zu hIL-6 bis zu einer Konzentration von 25 µg/ml beigemischt. Danach hat man mit FITC-markierten Antiserum gegen Ig von Mäusen inkubiert (wissenschaftliches Produktionszentrum NPZ Medbiospekt, Moskau, Russische Föderation), und bis zu einer Konzentration von 25 µg/ml zugemischt. Die Fluoreszenz wurde visuell im Feld des Mikroskops AXIOPLAN-2 (Carl Zeiss, Bundesrepublik Deutschland) bei 520 nm und Bestrahlung mit Lichtwellenlänge 495 nm detektiert.

RNS — Bibliothek

Wir haben die Länge der randomisierten Reihenfolge 30 Nukleotiden gewählt. Die Unterschiedlichkeit der Möglichkeiten dieser Reihenfolgen betrug mindestens 430=1018 Varianten, was uns erlaubte die Aptamers-"Sieger" auszuwählen. Ein Aptamer mit kurzer Länge kann außerdem stabilere Struktur aufweisen. Das einfachste Strukturelement der RNS ist ein Stift mit kurzem Stiel und kleiner Schlinge, es fordert zirka 10–20 Nukleotidenreste.

Die Ausgangsbibliothek von Einstrang-DNS, die eine degenerierte Reihenfolge enthält und mit Restriktionssiten und Primern flankiert wird, wird chemisch synthetisiert. Die flankierten Teile haben eine Länge von 18 und 43 Nukleotidenreste.

Folgende Oligonukleotiden wurden mit einem Festphasenverfahren mit dem automatischen Synthesator AP-380B (Applied Biosystems) synthetisiert. Es wurden geschützte β-Zyanäthylphosphoramiditen der Nukleosiden (Pharmacia) verwendet. Die Trennung wurde an den Spalten Waters HPLC systeme durchgeführt.

Die Transkription wurde im Volumen 50–100 µl im Puffer von 40 mM Tris-HCl (pH=8,0), 6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 100 mM NaCl, 2 mM Spermidin durchgeführt. In die Reaktion wurden eingeführt: rATP, rGTP, rCTP bis Endkonzentration 2 mM, rUTP bis zur Konzentration von 0,5 mM; 1,5–3 µl [α-³²P]-rUTP mit spezifischer Aktivität 600 MBk/ml (Obninsk, Russische Föderation); 5–15 µg DNS; 20–40 Aktivitätseinheiten des Ribonuklease-Inhibitors (Fermentas, Litauen); 50–100 Aktivitätseinheiten T7 RNS Polymerase (Fermentas, Litauen). Die Reaktion wurde im Laufe von 3,5 Stunden bei einer Temperatur von 35°C durchgeführt.

Die RNS wurde im denaturierenden 8% Polyakrylamidgel (7 M Harnstoff) gereinigt. Die RNS wurde mit der Autoradiographie detektiert. Die Zone, die einem Vollgrößeprodukt mit der Länge von 80 Nukleotiden entspricht, wurde aus dem Gel eluiert und die RNS wurde mit der Phenol-Chloroform-Mischung extrahiert und mit Alkohol abgeschieden. Die RNS-Menge wurde spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt. Die spezifische RNS-Markierung betrug 7–12 Tausend Impulse/Min/ pMol. Die RNS-Radioaktivität wurde nach Tscherenkow mit den Tracor Analytic- Zählern (Frankreich) gemessen.

Die Rücktranskriptionsreaktion wurde im Volumen 30 µl im Puffer, der 50 mM Tris-HCl (pH = 8,3), 4 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM DTT, 0,2 M dNTP, 30 pMol Primer und 10 Aktivitätseinheiten der Rücktranskriptase M.MuVI (Fermentas, Litauen) enthält,

im Laufe von einer Stunde bei einer Temperatur von 42°C durchgeführt. Als Matrize diente RNS, von der Sepharose eluiert.

Die Polymerisationskettenreaktion wurde im Puffer, der 50 mM Tris-HCl, (pH = 8,8), 2 mM MgCl₂, 0,1 mM DTT, 0,2 mM dNTP, 0,7 mM Primer, 0,1 % BSA, 10 PikoMol zu DNS und 20 Aktivitätseinheiten der Taq-Polymerase (Fermentas, Litauen) enthält, durchgeführt. Die Amplifikation wurde mit einem Thermozykler Perkin Elmer Cetus im Laufe von 25 Zyklen nach folgendem Schema durchgeführt: Denaturierung — 30 s, bei einer Temperatur von 95°C, Glühen von Primern — 30 s, bei einer Temperatur von 65°C, Elongation — 30 s bei einer Temperatur von 72°C.

Selektion

Die Sepharose der radioaktivmarkierten RNS mit einer Konzentration von 1 mM (300–800 pMol) wurde bei einer Temperatur von 95°C im Laufe von 2 Min denaturiert und im Eis gekühlt. Die Bindung wurde mit hIL-6 durchgeführt, immobilisiert in der Sepharose mit einer Konzentration von 10 mM/ml der Sepharose. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur im Laufe von einer Stunde inkubiert, die Sepharose wurde durch Zentrifugierung abgeschieden. Sepharose wurde mit 50–1000 mkl Puffer für die Bindung 4–5 mal gewaschen. Die gebundene RNS-Menge wurde mit dem radioaktiven Zählverfahren nach Tscherenkow bestimmt. Die gebundene RNS wurde mit einer Sepharose von 7 M Chloridguanidin eluiert, durch Extraktion mit der Mischung Phenol/Chloroform gereinigt und mit Alkohol abgeschieden. Die gesamte RNS-Menge wurde in kDNS mit der Rücktranskription überführt. Dann wurde die Hälfte der Reaktionsmischung der Rücktranskriptionsreaktion als Matrize bei der Amplifikation von der Polymerisationskettenreaktion verwendet. Die amplifizierte DNS wurde für die Gewinnung von RNS für folgenden Selektionszyklus verwendet. So wurden 14 Selektionszyklen durchgeführt.

Für die Schätzung der Affinität des angereicherten RNS-Zwischenpools oder einzelner Aptomere zu hIL-6 hat man die Komplexbildung in der Sepharose im Volumen 200 mkl durchgeführt. RNS (50 nM) wurde mit Eiweiß im Laufe von einer Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die mit Eiweiß gebundenen RNS-Moleküle wurden mit Ultrafiltration auf den Nitratzellulosemembranen (Hybond-C Amersham) getrennt. Der Bindungsgrad wurde mit dem radioaktiven Zählverfahren nach Tscherenkow bestimmt.

Klonung der angereicherten RNS — Aptamer—Fraktion

Die angereicherte RNS-Aptamer-Fraktion wurde in die Zweistrang-DNS mit Polymerisationskettenreaktion überführt, mit Restriktasen Sma I, Hind III bearbeitet und in die Legierungsreaktion mit Plasmide pUC19, die mit gleichnamigen Restriktasen vorbereitet wurde, eingeführt.

Die Ligasemischung bestand aus 100 ng Vektor, 10mal-Molüberschuss der Fragmente, Puffer für T4 DNS Ligase (66 mM Tris-HCl pH=7,5, 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT (Dithiothreitol), 10 mM ATP (Adenosintriphosphat), 4 Aktivitätseinheiten T4 DNS Ligase (Fermentas, Litauen). Das Endvolumen der Mischung betrug 20 mkl. Das Legieren wurde im Laufe von 16 Stunden bei einer Temperatur von + 4°C durchgeführt.

Die Zellen E. coli des JM109-Stammes, mit Plasmide transformiert, wurden bei einer Temperatur von 37°C im Medium LB mit Ampizillin im Volumen 5 ml im Laufe von 16 Stunden bei intensivem Vermischen gezüchtet. Dann wurden die Zellen vom Kulturmedium mit der Zentrifugierung (9000 Umdrehungen/Minute, 5 Minuten) getrennt und zerstört. Plasmide wurde mit High Pure Plasmid Isolation Kit (FirmaRoche) abgesondert.

Bei der Gewinnung kompetenter Zellen und bei der Durchführung der Transformation wurden die Standardprotokolle der Firma Life Science verwendet. Die Zellsuspension, mit Ligasemischung transformiert, wurde auf Petrischalen mit Agaragar und Ampizillin in der Konzentration 100 mkg/ml durchgeseibt. Die Petrischalen wurden im Laufe von 16 Stunden inkubiert. Einzelne Klone wurden nochmals durchgeseibt. Aus ihnen wurden die Plasmide abgetrennt. Dann wurde die Analyse mit der Polymerisationskettenreaktion — auf Vorhandensein eines Einsatzes — durchgeführt, dabei wurden die Primer zu den konstanten Bibliothekszonen verwendet.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Das Präparat von physiologisch aktiven humanem Interleukin hIL-6 wurde uns mit freundlicher Genehmigung von J. Wijdenes (Diaklon, Frankreich) überlassen.

Für die SELEX Durchführung wurde hIL-6 auf BrCN-aktivierten Sepharose nach der Standardmethode immobilisiert. Die aktiven Sepharosegruppen, die nicht in die Reaktion getreten sind, wurden durch Bearbeitung mit der Sepharose 1 M Tris-HCl (pH = 7,6) blockiert.

Für die Bestimmung des Immobilisationsgrades von hIL-6 auf Sepharose wurde die Immunodetektion mit indirekter Immunofluoreszenzreaktion durchgeführt. Die Sepharose suspension wurde mit monoklonalen Antikörpern B-E8 zu hIL-6, die die Wechselwirkung von hIL-6 mit Rezeptor blockieren, bearbeitet. Dann hat man die Bearbeitung mit FITC-markierten F(ab)₂' Fragmenten der Antikörper zu Immunoglobulinen von Mäusen durchgeführt. Für die Kontrolle wurde Ausgangs Sepharose ohne immobilisierten hIL-6B mit blockierten aktiven Gruppen verwendet. Sepharoseteilchen beobachtete man unter Mikroskop sowie in Durchlicht als auch in der Luminiszenz bei der Lichtbestrahlung mit der Wellenlänge 495 nm im Fluoreszenzmikroskop. Intensive Fluoreszenz der Sepharoseteilchen mit immobilisierten hIL-6B und farblose Kontrollteilchen zeigten qualitativ, dass die Immobilisation durchgeführt ist (Abb. 1).

Für die quantitative Bestimmung der Kapazität nach hIL-6 wurde die Bradford-Reaktion verwendet. Nach der Immobilisation wurde Eiweiß in Supernatant nicht festgestellt. Bei der Immobilisationsausbeute 90 % musste der Eiweißgehalt im Supernatant 2,5 mkg betragen, was an den Empfindlichkeitsgrenzen dieses Verfahrens liegt. Das bedeutet, dass die Eiweißimmobilisation auf Sepharose quantitativ durchgeführt wurde. Als Ausgangsbibliothek wurde die kombinatorische RNS-Bibliothek, die von Ellington, einem der Führer auf dem SELEX — Gebiet empfohlen wurde, gewählt [27]. Auf Abb. 2 ist ihre Primärstruktur ersichtlich. Die Bibliothek wurde auf dem automatischen Synthesator mit der Verwendung äquivalenter Mengen von vier Sintonen für Synthese der randomisierten Zone synthetisiert. Die Bibliothek enthielt randomisierte Zone aus dreißig

Aptamer die Dimerisation von gp130, die von IL-6 induziert wird, inhibieren können.

Die Arbeit wird von Grants РФФИ Nr. 05-04-49750, РФФИ-офу Nr. 07-04-12221 unterstützt.

Die Autoren bedanken sich bei Herren Golowin A.W. für die Hilfe bei der Ausstattung dieses Artikels.

Bibliographie:

1. Poli, V. The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem*, 1998, 273, 29279-29282.
2. Tupitsyn N. et al. Functional interaction of the gp80 and gp130 IL-6 receptors in human B cell malignancies. *Clin Lab Hämatol*, 1998, 20, 345-352.
3. Autissier, P. et al. Dimerization and activation of the common transducing chain (gp130) of the cytokines of the IL-6 family by mAb. *Int Immunol*, 1998, 10, 1881-1889.
4. Eaton BE et al. Post-SELEX combinatorial optimization of aptamers, *Bioorg. Med. Chem.*, 1997, 5, 1087-1096.
5. Gold L., Polisky B., Uhlenbeck O., Yarus M. Diversity of oligonucleotide functions, *Annu. Rev. Biochem.*, 1995, 64, 763-797.
6. Gold L. Oligonucleotides as research, diagnostic, and therapeutic agents, *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 13581-13584.
7. Osborne S.E., Matsumura I., Ellington A.D. Aptamers as therapeutic and diagnostic reagents: problems and prospects, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1997, 1, 5-9.
8. Копылов А.М., Спиридонова В.А., Парк К.-Х. Применение аптамеров в медицинской диагностике и терапии, *Российский химический журнал*, 1998, 42, 89-96.
9. Копылов А.М., Спиридонова В.А. Комбинаторная химия нуклеиновых кислот: SELEX, *Мол. биол.* 2000, 34, 1097-1113.
10. Ellington A.D., Szostak J.V. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, 1990, 346, 818-822.
11. Sasanfar M., and Szostak J.W. An RNA motif that binds ATP, *Nature*, 1993, 364, 550-553.
12. Davis J.H., Szostak J.W. Isolation of high-affinity GTP aptamers from partially structured RNA libraries, *PNAS*, 2002, 99, 11616-11621.
13. Jiang L., and Patel D.J. Solution structure of the tobramycin-RNA aptamer complex, *Nat. Struct. Biol.*, 1998, 5, 769-773.
14. Lorsch J.R., Szostak J.W. In vitro selection of RNA aptamers specific for cyanocobalamin, *Biochemistry*, 1994, 33, 973-982.
15. Sussman D., Nix J.C., Wilson C., The structural basis for molecular recognition by the vitamin B 12 RNA aptamer, *Nat. Struct. Biol.*, 2000, 7, 53-57.
16. Burgstaller P.G.A., von der Eltz H., Röder A., Famulok M. RNA aptamers that bind L-arginine with submicromolar dissociation constants and high enantioselectivity, *Nucleic Acid Res.*, 1996, 24, 1029-1036.
17. Roychowdhury-Saha M., Lato S.M., Shank E.D., Burke D.H. Flavin recognition by an RNA aptamer targeted toward FAD, *Biochemistry*, 2002, 41, 2492-2499.
18. Cowan J.A., Ohyama T., Wang D., Natarajan K. Recognition of a cognate RNA aptamer by neomycin B: quantitative evaluation of hydrogen bonding and electrostatic interactions, *Nucleic Acid Res.*, 2000, 28, 2935-2942.

19. Klug, S.J., and Famulok, M. All you wanted to know about SELEX, *Mol. Biol. Report*, 1994, 20, 97-107.
20. Bock L.C., Griffin L.C., Latham J.A., Vermaas E.H., Toole J.J. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin, *Nature*, 1992, 355, 564-566.
21. Jellinek, D. et al. Potent 2'-amino-2'-deoxypyrimidine RNA inhibitors of basic fibroblast growth factor. *Biochemistry*, 1995. 34(36), 11363-11372.
22. Jellinek D. et al. Inhibition of receptor binding by high-affinity RNA ligands to vascular endothelial growth factor. *Biochemistry*, 1994, 33(34), 10450-10456.
23. Green L.S. et al. Nuclease-resistant nucleic acid ligands to vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Chem Biol*, 1995. 2(10), 683-695.
24. Ruckman, J. et al. 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J Biol Chem*, 1998. 273(32), 20556-20567.
25. Rhodes A., Deakin A, Spaull J., Coomber B., Aitken A., Life P., Rees S. The generation and characterization of antagonist RNA aptamers to human oncostatin M. *J Biol Chem*, 2000. 275(37): p. 28555-28561.
26. Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J. *Protein Methods*, 1996, Willey-Liss, Inc, p. 62-63.
27. Conrad, R.C., et al., In vitro selection of nucleic acid aptamers that bind proteins. *Methods Enzymol*, 1996. 267, 336-637.
28. Kubik M.F., Stephens A.W., Schneider D., Marlar R.A., Tasset D. High-affinity RNA ligands to human α -thrombin. 1994, 22, 2619-2626.
29. Kumar PKR, Nishikawa S. Isolation and characterization of RNA aptamers specific for the hepatitis C virus nonstructural protein 3 protease. *Eur J Biochem*. 267, 3685-3694.

UDK 616.15-076.5:618.19-006.6

*O.B. Bjadug, C.A. Tuljandin, L.U. Grivzova, G. Moldenhauer, J. Brochie,
N.N. Tupizin*

DIE KLINISCHE BEDEUTUNG DER BESTIMMUNG VON DEN ZIERKULIERENDEN TUMORZELLEN BEI DEN PATIENTEN MIT DEM DISSEMINIERTEN MAMMAKARZINOM

Hauptverwaltung des Russischen Onkologischen Wissenschaftszentrums
namens N.N. Blochin der Russischen Akademie für medizinische Wissenschaften
Heidelberg, Germany, Montpellier, France

ZUSAMMENFASSUNG

Zirkulierende Tumorzellen (ZTZ) werden bei 41,3% Patienten mit dem disseminierten Mammakarzinom im Schnitt nicht weniger als 1 Zelle pro Mio erfasst. Die Zahl der ZTZ ist von der Lokalisation und der Zahl der Metastasen, sowie vom rezeptorischen Status des primären Mammakarzinoms nicht abhängig. ZTZ werden bei den Patientinnen in der Menopause häufiger erfasst, als in der Premenopause (47,8% und 26,7% $p=0,044$). Bei den Patientinnen mit dem infiltrierten Karzinom des Brustdrüsenlappchens werden die ZTZ sicher häufiger erfasst, als bei den Patientinnen mit dem infiltrativ-duktalem Mammakarzinom (69,2% und 31%, $p=0,02$). Das Vorhandensein der Knochenmarkmikrometastasen hat keinen Einfluss auf die Häufigkeit der Sichtbarmachung von ZTZ. Die Zellen werden mit gleicher Häufigkeit vor und nach der Behandlung ermittelt (41,3% und 45,5%). Das Faktum der ZTZ-Entdeckung wirkt auf die allgemeine und rezidivfreie Überlebensfähigkeit der Patienten mit Stadien des Mammakarzinoms nicht. Beim Bewerten der Dynamik der ZTZ-Zahl vor und nach der Durchführung einer systematischen antitumorösen Chemo- und Hormontherapie ergab es sich, daß bei den Patientinnen mit der Zahlensenkung der ZTZ eine längere Zeit bis zur Krankheitsfortschreitung ist, als bei den Patientinnen mit Zahlerhöhung der ZTZ nach der Behandlung (14 und 8 Monaten, $p=0,0127$). Die Dynamik der Zahl der ZTZ nach der durchgeführten spezifischen antitumorösen Behandlung kann als ein neues objektives Kriterium der Bewertung auf die Behandlungsreaktion und als ein informativer Prognosefaktor bei den Patienten mit disseminiertem Mammakarzinom benutzt werden. Die ZTZ bei den Patienten mit MK sind nach Expression der Moloküle des Hauptkomplexes der histologischen Verträglichkeit heterogen. Bei den Patienten mit MK wird nach der Behandlung die doppelte Senkung der Proportion der positiven-HLA-DR und der positiven CD95 zirkulierender Tumorzellen (ZTZ) im Blut festgestellt.

Schlüsselwörter: Duktale Zytofluorimetrie, zirkulierende Tumorzellen, Mammakarzinom

Die Morbilität des Mammakarzinoms nimmt in Russland, sowie auch in anderen Ländern zu. Das Mammakarzinom nimmt ständig den 1. Platz in Morbilitätsstruktur ein, dabei wird bei 37,3% der erkrankten Frauen gleich das III. oder IV. Stadium diagnostiziert. Die Morbilitätszunahme des Mammakarzinoms in Russland betrug von 1999 bis 2004 10,6%. Die Therapieergebnisse der MK-Kranken bleiben unbefriedigend. (die Zunahme der standardisierten Mortalitätskennziffer beträgt 2,9%).

In der letzten Zeit wird besonders auf die bessere Stadiumfeststellung der Krankheit, sowie auch auf die Verbesserung der medikamentösen Therapie des MK geachtet. Die große Bedeutung wird der Untersuchung der biologisch bedeutsamen Charakteristik der Erkrankung beigelegt, die bei der Auswahl der effektivsten Therapiemethodiken nützlich sein könnten.

Die Entwicklung der modernen Technologien ermöglichte es die Bestimmung der einzelnen Tumorzellen (Mikrometastasen) in der Knochenmarkbiopsie, sowie im peripheren Blut (6). Es wurde nachgewiesen, daß die Feststellung der Mikrometastasen bei der Diagnostik auf die Länge des rezidivfreien Intervalls und insgesamt auf die Lebensdauer bei den Patienten mit MK wirkt.

Die klinische Bedeutung der immunologischen Erkennung der im peripheren Blut zirkulierenden Tumorzellen (ZTZ) bleibt bis jetzt nicht ganz voll klar (4,5,10,11,14). Wie bekannt, sind die Mammatumoren bei Immunophenotyp heterogen (3). Es gibt in der Fachliteratur die Hinweise auf den Zusammenhang zwischen dem Immunophenotyp der Mammatumoren, dem klinischen Verlauf, der Prozessverbreitung, dem Charakter der immunologischen Reaktion und der Krankheitsprognose. Es gibt alle Gründe zu vermuten, daß die Heterogenität des Immunophenotyps des MK sich auf die Ungleichartigkeit der Population der TZ auswirken kann, die im peripheren Blut zirkulieren. Somit kann sich der Krankheitsverlauf nicht nur durch Auffinden der Tumorzellen in der peripheren Blutbahn, sondern auch durch qualitative Zusammensetzung dieser Zellen bestimmt werden. Die Untersuchung des Immunophenotyps der ZTZ hilft wahrscheinlich die Kenntnisse über Metastasierungswege und medikamentöse Resistenz des bösartigen Tumors zu erweitern.

In diesem Zusammenhang scheint die Untersuchung der quantitativen und der qualitativen Zusammensetzung der TZ, die im peripheren Blut der Patienten mit disseminiertem MK zirkulieren aktuell.

DIE PATIENTENCHARAKTERISTIK UND DIE UNTERSUCHUNGSMETHODEN

Von 2001 bis 2003 wurde in der Untersuchung 65 Patientinnen mit dem lokalverbreiteten (primär nicht operablen) und dem metastatischen MK untersucht. Bei der Mehrzahl der Patientinnen (87,7%) wurde das IV Stadium des MK festgestellt ($n=57$); davon wurde bei 45,6% ($n=26$) die Erkrankung erstmalig festgestellt, bei 54,4% Patientinnen ($n=31$) wurde das Rezidiv der Erkrankung nach unterschiedlichen Arten der Tumorthherapie festgestellt. Bei 8 Patientinnen (12,3%) wurde ein lokalverbreitetes nichtoperables MK festgestellt.

Das durchschnittliche Alter war 53 Jahre (26–75).

Im reproduktiven Alter waren 16 Patientinnen (24,6%), in Menopause — 47 Patientinnen (72,3%), bei 2 Patientinnen war die ovarial-menstruale Funktion nicht

bekannt. In der Untergruppe der Patientinnen mit dem lokal ausgebreiteten MK waren 62% in Postmenopause und 37,5% Patientinnen in Pre-Menopause. In der Untergruppe der disseminierten Patientinnen waren auch überwiegend die Patientinnen in Post-Menopause (73,7% gegen 22,8%). Bei 2 Patientinnen war der menstruale Status nicht bekannt.

Bei der Mehrzahl der Patientinnen wurde die Diagnose histologisch verifiziert (72,4%), bei 27,7% Patientinnen wurde die Diagnose des bösartigen Tumors zytologisch festgestellt. Am häufigsten kam die infiltrativ-duktales Form (63,8% der Patienten) vor, lobares infiltratives Karzinom wurde bei 27,6% Patienten festgestellt, die anderen Karzinomformen bei 8,5% der Kranken.

Die Ermittlung von Rezeptoren der Steroidhormone wurde häufiger mittels der histochemischen Methode, teilweise -bei manchen Patienten - mittels einer biochemischen Methode durchgeführt. Die Untersuchung des Rezeptorenstatus des MK wurde für 43 Patienten durchgeführt. Bei 18 Patienten (41,8%) enthielten Tumorgewebe keine östrogen- und Progesteron -Rezeptoren (RE- RP-), bei 25 Patienten (58,13%) wurde mindestens 1 Rezeptor der Steroidhormone ermittelt (RE+RP+; oder RE+RP-; oder RE-RP+). Die beiden Rezeptoren wurden bei 10 Patienten ermittelt (23,25%).

Systembehandlung

Bei der Mehrzahl der Patientinnen wurde die Chemotherapie durchgeführt (80%), 13 Patientinnen wurden hormonell behandelt (20%). Alle 8 Patientinnen mit dem lokal verbreiteten MK wurden chemotherapeutisch behandelt. Alle Patientinnen, die eine Hormontherapie bekommen haben, hatten die Fernmetastasen.

Chemotherapie nach FAC -Schema. Bei der Mehrzahl der Patientinnen wurde eine Chemotherapie nach FAC Schema durchgeführt. Zur dieser Gruppe zählen die Patientinnen, welche nur eine Chemotherapie nach FAC- Schema bekommen haben (n=32), sowie die Patientinnen, welche als erste Behandlungsstufe die Chemotherapie nach FAC- Schema bekommen haben mit der späteren Hormontherapie mit Tamoxiphen (n=11).

Chemotherapie mit Taxanen. (Paklitaxel 175 mg/m² einmal pro 21 Tage oder Dozetaxel 74mg/m² ein mal pro 21 Tage) wurde bei 6 Patientinnen (10,9%) durchgeführt: zweien davon -im Zusammenhang mit der Progredienz des MK nach adjuvanten Chemotherapie einschließlich der Antrazykline, bei vier davon - als zweite Chemotherapielinie (nach der ersten Chemotherapielinie mit Antrazyklinen).

Andere Regime der Chemotherapie. Zwei Patientinnen waren in die Untersuchung aufgrund der Progredienz des MK nach 2 Linien der Chemotherapie eingeschlossen. Als dritte Chemotherapielinie hat eine der Patientinnen Kapezitabin 2000 mg/m² per os ab 1. bis zum 14. Tag + Navelbin 25 mg/m² am 1. und am 8. Tag des 3-wöchigen Zyklus bekommen. Die zweite Patientin bekam als dritte Therapielinie Kapezitabin 2500mg/m² per os ab 1. und bis zum 14. Tag. Bei einer Patientin mit dem erstentdeckten disseminierten MK wurde aufgrund der Nebenerkrankungen, Ablehnung von der intravenösen Chemotherapie, des höheren Alters ein nichtstandartes Chemotherapieschema mit Zyklofosamid+ Metotrexat+Zelexin angeordnet.

Hormontherapie wurde bei 13 Patientinnen durchgeführt. In der Regel wurde

Tamoxiphen (20mg pro Tag) bei den Patientinnen mit günstiger Prognose (Patientinnen in Menopause, mit positiven Rezeptoren der Sexualhormone, mit einem langen rezidivfreien Intervall) angeordnet. Die Therapie mit Tamoxiphen wurde bei 10 Patientinnen durchgeführt. Letrosol 2,5 mg pro Tag wurde einer Patientin angeordnet, welche Tamoxiphen adjuvant bekommen hatte, und bei zwei Patientinnen als zweite Linie der Hormontherapie nach der Krankheitsprogredienz begleitet von Tamoxiphen Einnahme.

In der Patientinnengruppe mit dem disseminierten MK wurde die Chemotherapie bei 44 Patientinnen (77,2%) durchgeführt, davon ein Teil der Patientinnen hat nach der Durchführung von 6 Kursen Chemotherapie auch eine Hormontherapie bekommen (21,1%).

Erkennungsmethoden von Tumorzellen im peripheren Blut und im Knochenmark

Bei allen Patientinnen war die immunologische Untersuchung des peripheren Blutes und Knochenmarkes durchgeführt, das Ziel dabei war die Erkennung von einzelnen TZ vor und nach der Behandlung (nach 6 Chemotherapiekursen oder nach 3 Monaten der Hormontherapie) oder bei der Krankheitsprogredienz.

Die immunologische Untersuchung des Materials wurde im Labor der Immunologie der Hämoese der Zentralisierten Klinischen Laborabteilung des wissenschaftlichen Institutes der Hauptverwaltung des ROZ namens N.N. Blochin der RMWA.

Für die Bewertung der Tumorzellenzahl im peripheren Blut wurde die Blutentnahme von 10ml des peripheren Blutes aus der Ellenvene ins Heparinröhrchen durchgeführt. Danach wurden die Zellen auf dem Dichtegradient von Fikolverographin (Standardmethode) oder mit der Erythrozytenlyse-methode, sowie die Knochenmarkzellen, abgesondert.

Bei der Bewertung der zirkulierenden Epithelzellen im peripheren Blut haben wir direkte Konjugaten der monoklonalen AK benutzt. Es wurden monoklonale AK der Firma Becton Dickenson benutzt (USA). Die MAK HEA-125 wurden von G. Moldenhauer (Germany) zur Verfügung gestellt, die fluoreszente Markierung der AK wurde durch R. Jones (HMDS, Leeds UK) durchgeführt. In bestimmten Fällen wurden FITC markierte MAK KL-1 benutzt (von J. Bronchier, Montpellier, France zur Verfügung gestellt)¹.

Bei der Zählung der TZ wurde eine doppelte fluoreszente Markierung benutzt. Die Zellen wurden mit MKA im Vergleich zu AG CD45 mit FITC markierte und MKA zu epitheliale AG Egp34 (HEA 125), Per CP oder PE gefärbt. Bei der Benutzung von CD45-PerCP wurden die epitheliale Marker mit FITC markierten MKA gefärbt. Der Unterschied in Fluorochromsensibilität wurde nicht festgestellt. Niveaus der nichtspezifischen Bindung wurden entsprechend den isotypischen Kontrollen mit entsprechender Fluorochrommarkierung bewertet.

Die Platte von MAK für die Zahlbestimmung der Epithelzellen, die im peripheren Blut bei MK zirkulieren:

1. IgG1 PerCP
2. CD45PerCP/IgG1FITC
3. CD45PerCP/HEA 125 FITC oder CD45PerCP/Ber EP4-FITC

Bei der Musterprobensammlung auf Zyto-Strömungsmesser wurde maximal mögliche Zahl der passierten Zellen in den Grenzen der negativen Zellenfraktion mit dem niedrigen Spiegel

der seitlichen Lichtstreuung (Abb. 1A) akkumuliert. Dabei flossen durch den Detektor nicht weniger als 1 Mio, möglicherweise mehr als 1 Mio passierten Zellen (Abb. 1B).

Das Zytogramm 1A zeigt die Auswahl des Analysegebietes nach Expression von AG CD 45. Die Ordinatenachse zeigt den Kennwert des Zellkörnigkeitspiegels (SSC), die Abszissenachse (FL-3-Detektor) zeigt die Expression des PerCP markierten AG CD45. R1 -Gebiet — sind CD45-negative Zellen, einschliesslich der ZTZ.

Auf dem Zytogramm 1B wurden nur die Zellen des R1- Gebietes vorgestellt, unter denen ist eine deutliche Population von Zellen mit merkwürdiger Expression von AG Egp34 vorhanden, die mit FITC-markierten MKA HEA 125 festgestellt werden können. Die Zahl der HEA125+ Zellen in dieser Probe betrug 27 Zellen pro 1 Mio aller Probezellen, ausgenommen 1 Zelle aus R2 Gebiet nach der isotopischen Kontrolle.

Die Erkennung der ZTZ im Blut von MK-Patientinnen mittels der Methode der Strömungszytofluorometrie. Doppelte fluoreszente Markierung.

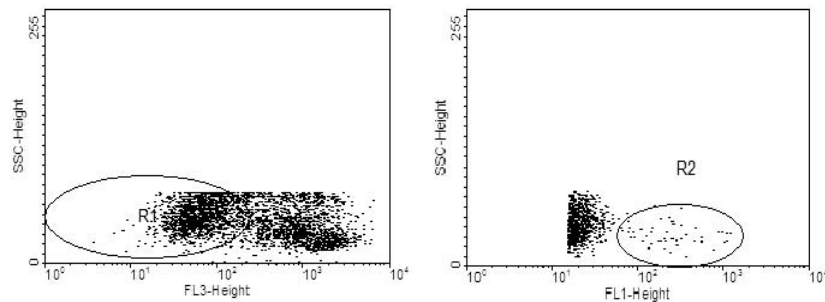


Abb. 1. Die Erkennung der ZTZ im Blut von MK-Patientinnen mittels der Methode der Strömungszytofluorometrie. Doppelte fluoreszente Markierung

Im Falle der Subpopulationsbestimmung von ZTZ wurde eine dreifache fluoreszente Markierung benutzt. Dabei wurden auf die Platte die monoklonalen AK zu den AG CD95 und HLA-DR hinzugefügt.

Die MKA Platte sah bei der Bewertung der Subpopulation so aus:

1. IgG1 PerCP
2. CD45 PerCP/IgG1 FITC
3. CD45 PerCP/HEA 125 FITC/IgG1 PE
4. CD45 PerCP/HEA125 FITC/CD95 PE
5. CD45 PerCP/HEA 125 FITC/HLA-DR PE

Bei der Analyse der Zusammensetzung der Subpopulation der TZ wurden auch die CD45-negativ passierte Zellen akkumuliert, nachher wurde das Gate der TZ (R2 auf der Abb.1B) ausgewählt und in diesem Gate wurde der Prozentgehalt von HLA-DR+ und CD95+ Zellen bewertet. Es sei erwähnt, daß bei der Populationsbewertung sehr wichtig

ist, soviel wie möglich passierter Zellen im Gebiet der TZ zu erhalten, was möglicherweise nur unter der Voraussetzung sehr höheren Zelligkeit der Probe oder beim ausgeprägten metastatischen Prozess möglich ist.

Zytomorphologische und immunologische Untersuchung des Knochenmarkes

Die Knochenmarkzelle (KMZ) wurden im Laufe der Sternalpunktion im Brustbeinbereich bekommen. Das Volumen des KM-Punktates betrug normalerweise von 0,3 bis 0,7 ml (beim grösseren Volumen ist die Verdünnung der Probe mit peripheren Blut möglich).

Zytomorphologische Untersuchung

Aus den KM -Aspirat wurden sofort nach der Punktion die Aufstrichen mit rutiner Methode vorbereitet, sie wurden nach Romanovski—Gimse Methode gemacht und das Myelogramm abgerechnet.

Die Vorbereitung von zytozentrifugen Präparaten, die immunale Färbung wurden in den Artikeln von N.N. Tupizin und O. V. Krochina und von den Verfassern in diesem Nummer beschrieben. Für die TZ -Erkennung wurden MKA KL-1 zu den Panzitokeratinen benutzt, von J. Brochier (France) zur Verfügung gestellt.

Die Zahlbestimmung der TZ wurde auf eine 1 Mio der Myelokariozyte der KM bei jeder Patientin zweimal durchgeführt. Unter Berücksichtigung der einzigen AG -positiven Zellen, sowie der Komplexe AG-positiven Zellen.

Die statistische Bearbeitung der gewonnenen Daten

überlebensfähigkeit von Patientinnen (die Zeit vor der Progredienz und allgemeine überlebensfähigkeit) wurde nach Kaplan-Meier Methode analysiert und nach Long-rang Test verglichen.

Für den Vergleich der Qualitätsmerkmale wurde χ^2 Test mit Jetz -Korrektur auf Kontinuität bei den Konjugationstabellen 2×2 oder das direkte Fischer,s-Kriterium bei kleinen Stichproben. In allen Fällen wurde das 95% Konfidenzintervall und doppelseitiges P angewendet.

DIE ERGEBNISSE

Die Erkennung von MK Mikrometastasen im peripheren Blut nach der Durchflußzytofluorimetrie Methode

Mit dem Ziel der Entdeckung von ZTZ wurde bei 85 immunologischen Untersuchungen des peripheren Blutes bei 65 Patientinnen durchgeführt.

Die Rausfindung und Bestimmung der Tumorzellenzahl im peripheren Blut wurde nach der Durchflußzytofluorimetrie Methode mit monoklonalen AK zu epithelialen AG (MKA Egp34, BerEP4).

Da es keine Meinungseinheit in der modernen Fachliteratur über die Bedeutung von ZTZ im peripheren Blut von Patientinnen auf verschiedenen Etappen der Systembehandlung und über den Zusammenhang dieses Kennwertes mit bekannten morphologischen, klinischen und prognostischen Charakteristiken des MK gibt, haben wir

uns darauf entschieden, die detaillierte quantitative Analyse der erhaltenen Werte durchzuführen.

Es wurde die verschiedene Sensibilität der Methode der immunozytofluorimetrischen Ermittlung der ZTZ verglichen: 1 Zelle pro 1 Mio Leukozyten und 1 Zelle pro 100 000 Leukozyten. Bei der Analyse mit Genauigkeit 1 Zelle pro 1 Mio Leukozyten betrug die Häufigkeit der ZTZ- Erkennung 47,6%, bei der Analyse mit Genauigkeit 1 Zelle pro 100 000 Leukozyten betrug die Häufigkeit der ZTZ- Erkennung 41,3%.

Für die Genauigkeitserhöhung der Untersuchung und zum Zweck des Ausschlusses der einzelnen zufälligen Ereignisse, wurde es entschieden, die Zahl der AG- positiv Zellen ?10 pro 1 Mio Leukozyten als negatives Ergebnis anzunehmen d.h. der Gruppe der positiven Patienten wurden nur die Patientinnen mit offenkundig positiven Ergebnissen der Untersuchung zugerechnet (mehr als 10 ZTZ pro 1 Mio Leukozyten).

Die Häufigkeit der Erkennung der ZTZ betrug 41,3% vor der Behandlung und 45,5% nach der Behandlung.

Bei den Patientinnen mit lokal ausgebreitetem MK und bei den Patientinnen mit den Fernmetastasen wurden die ZTZ nach Angaben der Durchflußzimetrie etwa mit gleicher Häufigkeit ermittelt: die ZTZ wurden bei 3 aus 7 Patientinnen mit lokalausgebreiteten MK und bei 21 aus 51 Patientinnen mit metastasierenden MK ermittelt, was 42,9% und b.z.w. 41% beträgt.

Die Tabelle 1 zeigt Patientverteilung in Abhängigkeit von der Zahl der mit Hilfe von drei monoklonale AK den ZTZ.

Wie man aus der Tabelle 1 sieht, in der Gruppe der AG-positiven Patienten, werden in den meisten Fällen (69,2%) die ZTZ in der ermäßigten Menge (von 11 bis 100 ZTZ pro 1 Mio Leu) ermittelt, bei 30,8% Patientinnen werden mehr als 100 ZTZ pro 1 Mio Leu ermittelt.

Tabelle 1

Die quantitative Analyse der ZTZ bei Patientinnen mit MK vor der Beginn der Systembehandlung

Untersuchungsgruppen (die Zahl der AG-positiv Zellen/Mio Leukozyten)	BerEP-4+Zahl (%) n=32	HEA-125+Zahl(%) n=21	KL-1+ Zahl(%) n=10	Insgesamt nach 3 AG n=63
1 Gruppe(0-10 Zellen)	18(56,3%)	11(52,4%)	8(80%)	37(58,7%)
2 Gruppe(11-100 Zellen)	8(25%)	8(38,1%)	2(20%)	18(28,6%)
3 Gruppe(>100 Zellen)	6(18,75%)	2(9,5%)	—	8(12,7%)

Am häufigsten wurden die ZTZ bei den Patientinnen mit Metastasen nur in die innere Organe ermittelt (51,9%). Bei denselben Patientinnen wurde ein hoher Gehalt der ZTZ (>100 pro 1 Mio Leu) am häufigsten festgestellt — in 15% von Fällen. In der Patientengruppe mit ausschliesslich Knochenmetastasen und bei Patienten mit Metastasen in Knochen und auch in die innere Organe werden die ZTZ mit gleicher Häufigkeit ermittelt — 31,3%(bei 5 aus 16 Patientinnen) und 30,8% (bei 4 aus 13 Patientinnen).

Die immunozytologische Untersuchung zeigt, daß bei den Patientinnen mit Tumorzellen im Knochenmark die Häufigkeit der ZTZ — Ermittlung 22,7% (5 aus 22) und bei den Patientinnen ohne Mikrometastasen im Knochenmark — 44,5% (8 aus 18) betrug . übrigens war der Zusammenhang zwischen den Merkmalen (Kontingenz, χ^2) nicht statistisch relevant ($p>0,05$).

Die ZTZ wurden bei den Patientinnen zumindest mit einem der Rezeptoren der Steroidhormone im Tumorgewebe (RE+ oder RP+,n=24)- öfter bestimmt, als bei den Patientinnen mit negativen Rezeptorstatus (RE- und RP, n=18) — 45,8* und b.z.w. 22,2%. Aber der Zusammenhang zwischen den Merkmalen (Kontingenz, χ^2) war statistisch nicht relevant ($p=0,11$).

Bei Kranken in Post-Menopause (n = 46) wurden die TZZ öfter (47,82%), als bei den Patienten in Pre-Menopause (26,7%, n = 15) ermittelt. Der Zusammenhang zwischen den Merkmalen (Kontingenz, χ^2) ist statistisch relevant ($p = 0,045$).

Bei den Patienten mit dem infiltrativen lobulären MK wurden die TZZ öfter als bei Patientinnen mit dem duktalem infiltrativen MK (69,2% und 31%) ermittelt. Der Zusammenhang zwischen den Merkmalen (Kontingenz, χ^2) war statistisch relevant ($p=0,02$).

Dynamik der ZTZ bei den Patientinnen mit lokal-disseminiertem Mammakarzinom

Die immunologische Untersuchung der ZTZ wurde in Dynamik bei 21 Patientinnen durchgeführt, (23 Untersuchungen, weil es bei zwei Patientinnen jeweils 2 wiederholte Analysen durchgeführt worden war: gleich nach der Therapie und bei der Krankheitsprogredienz). Die Analyse wurde in meisten Fällen nach der Systembehandlung durchgeführt. Bei zwei Patientinnen wurde die Untersuchung aufgrund der Krankheitsprogredienz durchgeführt. Die ZTZ-positive Fälle betrug vor der Behandlung 45,5%(n=10) in gesamter Gruppe. Die Häufigkeit der ZTZ-Ermittlung nach der Behandlung betrug auch 45%.

Auf solche Weise, bei den meisten Patienten zirkulieren die Tumorzellen nach der Durchführung der Systemantitumortherapie im peripheren Blut weiter.

Der antitumor Effekt war bei 19 Patienten aus 21 bestimmt. Bei den 12 Patientinnen (75%) mit ≥ 10 ZTZ auf 106 Leu stimmte die Dynamik der ZTZ -Zahl (vor- und nach der Behandlung) mit der klinischen und röntgenologischen Beurteilung der Krankheit überein: d.h. bei der Krankheitsprogredienz stieg die Zahl der ZTZ, und senkte sich bei der Stabilisierung der Krankheit oder partieller Regression im Vergleich zum Ausgangsniveau.

PR,TR-Voll- und Teilregression, ST-Stabilisation, PK-progressive Krankheit, Schwingungen in den Grenzwerten weniger als 10 ZTZ auf 1 Mio LEU werden als ZTZ-Mangel ausgewertet.

Einfluss der ZTZ auf MK Prognose

Um abzuschätzen, ob die Ermittlung der ZTZ die Prognose bei den Patientinnen mit dem erweiterten MK vor der Behandlung beeinflusst, wurde die Zeit vor der Progredienz und die allgemeine Lebensdauer der Patientinnen untersucht.

Die durchschnittliche Periode der lebenden Patientinnen betrug 21,7 Monaten (von 2 bis 51 M.) Die Mediane der allgemeinen Lebensdauer betrug 20,5 Monate.

Tabelle 2

Die Tabelle 2 zeigt die TZT-Menge bei den Patientinnen mit MK vor und nach der Therapie, sowie den Behandlungseffekt, bewertet nach klinischen und röntgenologischen Daten

Nr	Zahl der TZT vor der Behandlung	Zahl der TZT nach der Behandlung	TZT -Dynamik	Behandlungseffekt
1.	10	2	↓	ST
2.	3	104		VR
3.	37	500		ST
4.	20	2	↓	ST
5.	56	7	↓	ST
6.	7	4*	=	PR
7.	0	48		VK
8.	0	0*	=	TR
9.	418	204	↓	ST
10.	21	10	↓	TR
11.	234	50	↓	ST
12.	167	0	↓	TR
13.	7	27		TR
14.	0	5*	=	ST
15.	0	8*	=	ST
16.	0	409		PK

Das Vorhandensein der TZT hat keinen Einfluß auf die Zeitdauer der Progredienz und die allgemeine Lebensdauer der Patientinnen gehabt. Die Zahl der TZT hat die Dauer der Periode vor der Progredienz des MK auch nicht beeinflusst. Mediane der allgemeiner Lebensdauer der Patientinnen mit erhöhtem TZT Spiegel (mehr als 100 Zellen/1 Mio) war weniger, als in den Fällen des Vorhandenseins 10–100 TZT (15 und b.z.w. 21 Mon.), übrigens sind die Unterschiede statisch nicht plausibel.

Wie bekannt, ist die Lebensdauer der Patientinnen mit erweitertem MK von der Lokalisation von Metastasen (viszerale oder nur Knochenmetastasen), und auch von der Menge der Schadenbereiche abhängig. Es wurden auch die Spätergebnisse der Behandlung in den Untergruppen der Patienten mit verschiedener Lokalisation von Metastasen analysiert. Es stellte sich heraus, dass der Vorhandensein der TZT vor der Behandlung keinen Einfluss auf die Zeit der Progredienz hatte (p=0,7), hat aber die allgemeine Lebensdauer (p=0,06) nur in der Untergruppe der Patientinnen mit der metastatischen Knochenaffektion beeinflusst. (mit günstigsten Prognosen in der Untergruppe der Patientinnen mit disseminiertem MK). Bei diesen Patientinnen war die Mediane der allgemeinen Lebensdauer fast doppelt niedriger als bei den Patientinnen ohne TZT. Die Ergebnisse der Zeitanalyse vor der Progredienz und der allgemeinen Lebensdauer in der

Gruppe der Patienten mit verschiedener Metastasenlokalisierung sind in der Tabelle 3 vorgestellt.

Tabelle 3

Die Zeit vor der Progredienz und die allgemeine Lebensdauer der Patientinnen mit verschiedener Metastasenlokalisierung je nach dem Vorhandensein oder der Abwesenheit der TZT vor der Behandlung

Metastasenlokalisierung	Vorhandensein der TZT	Mediane ZvP,Mon	P-value	MedianeAZ,Mon	P-value
Metastasen nur in Knochen (n=14)	+ -	7 8	P>0,05	11 21,5	P=0,06
Metastasen in die Knochen und innere Organe (n=13)	+ -	6,5 5	P>0,05	15,5 13	P>0,05
Metastasen nur in innere Organe	+ -	8 7,5	P=0,26	27 13,5	P=0,1

Mit den Patientinnen mit Metastasen in inneren Organe hatten die TZT im peripheren Blut keinen Einfluss auf die unrezidive Intervalldauer vor der Behandlung (p=0,26) und auf allgemeine Lebensdauer (p=0,1) gehabt. Wahrscheinlich, hatten in dieser Gruppe der Patientinnen andere bekannten Faktoren den Einfluss auf ungünstige Prognose gehabt (Metastasenlokalisierung, Rezeptorenstatus, Alter etc).

Bei der Untersuchung der allgemeiner Lebensdauer und der Zeit vor der Progredienz (abhängig vom Vorhandensein der TZT nach der Systembehandlung) war die ganze Gruppe (wegen weniger Patientenzahl) in 2 Untergruppen unterteilt: TZT -positive Gruppe (mehr als 10 TZT auf 1 Mio Leu) und TZT- negative Gruppe. Es stellte sich heraus, daß die Zeitmediane vor Progredienz in der TZT-nagativer Gruppe nach der Systembehandlung 2 Mal höher war, als in der TZT-positiver Gruppe nach der Behandlung (die Unterschiede sind statistisch nicht zuverlässig p = 0,31)

Bei den Patientinnen aus TZT-negativer Gruppe wurden auch Vorteile in allgemeiner Lebensdauer festgestellt. (Die Unterschiede sind statistisch nicht zuverlässig, p=0,89). Die festgestellten Ergebnisse zeigt die Tabelle 4.

Mit dem Ziel der Beantwortung der Frage, ob das Effektivitätsmonitoring der Chemie/Hormontherapie mit Hilfe der quantitativen Analyse der TZT möglich ist, haben

Tabelle 4

Die Zeit vor der Progredienz und allgemeine Lebensdauer der Patientinnen mit disseminiertem MK, in Abhängigkeit vom Vorhandensein der TZT nach der Systembehandlung

	TZT-negative Gruppe	TZT-positive Gruppe	
Zeitmediane vor der Progredienz, Mon (n=20)	15 (n=12)	7,5 (n=8)	P=0,31
Überlebensmediane, Mon (n=20)	23,5 (n=12)	17,5 (n=8)	P=0,89

wir die Behandlungsergebnisse bei den Patientinnen in Abhängigkeit von der ZTZ-Dynamik vor und nach der Behandlung bewertet.

Die Dynamik der ZTZ-Menge wurde bei 19 Patientinnen bewertet, davon bei 16 wurden auch die überlebensfähigkeitswerte bewertet.

Bei den Patientinnen mit der Reduktion der ZTZ-Zahl nach der Behandlung wurden die Vorteile in der Zeitdauer vor der Krankheitsprogredienz ($p = 0,0126$, Log-rank test) im Gegenteil zu den Patientinnen mit konstanter oder zunehmender ZTZ-Zahl ermittelt.

Die Zeit vor Krankheitsprogredienz bei den Patientinnen mit MK in Abhängigkeit von der Erhöhung oder Senkung des ZTZ nach Durchführung der Antitumorthherapie

Die Erhöhung oder die Erniedrigung der ZTZ-Zahl nach der Behandlung hatte keine Wirkung auf die Lebensdauer.

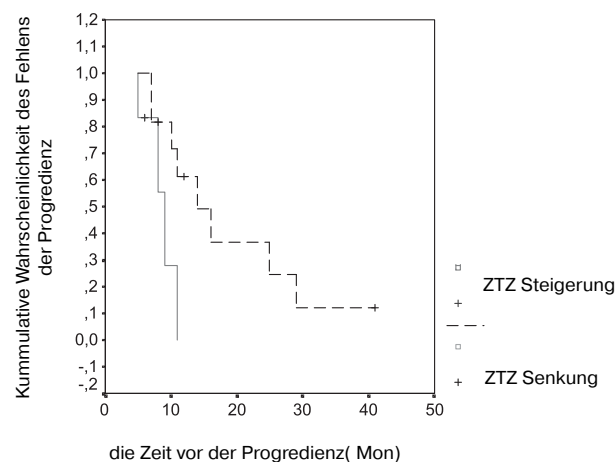


Abb 2. Die Zeit vor Krankheitsprogredienz bei den Patientinnen mit MK in Abhängigkeit von der Erhöhung oder Senkung des ZTZ nach Durchführung der Antitumorthherapie

Immunologische Detektion der epithelialen Zellen im Knochenmark

In Rahmen dieser Untersuchung wurde 53 immunozytologische Untersuchungen der Knochenpunkate bei 42 Patientinnen mit ZTZ durchgeführt. Der Knochenmark wurde nach der Methode der immunozytologischen Fluoreszenzmikroskopie mit Hilfe von MKA zu Panzytokeratine KL-1 untersucht. Gleichzeitig wurde eine Myelogrammberechnung in erhaltenen Abstrichen des Knochenmarks durchgeführt.

Die einzelnen Tumorzellen wurden in 26 Reaktionen aus 53 (49%) festgestellt. Die Zahl den epithelialen Tumorzellen, die immunozytologisch bestimmt wurde, variiert von 1 bis 464 auf 1 Mio Myelokariozyten: von 1 bis 10 Zellen wurde in 70,4% positiven Reaktionen ermittelt (19 aus 26), von 11 bis 100 Zellen- in 15,4% (4), mehr als 100 Zellen — in 11,5%

(3). Bei Standardzytologischer Untersuchung wurden die Metastasen im Knochenmark bei 5 Patientinnen mit disseminierten MK entdeckt. (11,9%)

In der Patientengruppe mit dem metastasierenden MK (Gruppe 1) wurde die immunologische Untersuchung des Knochenmarks bei 36 Patientinnen durchgeführt. KL-1-positive Zellen wurden bei 21 Patientinnen (58,7%) ermittelt: von 1 bis 10 Tumorzellen wurde bei 16 Patientinnen, von 11 bis 100 Zellen - bei 4 Pat., mehr als 100 Zellen- bei 2 Pat. ermittelt.

In der Patientengruppe mit lokal-verbreitetem MK (Gruppe 2) wurde die immunologische Untersuchung des Knochenmarks vor dem Therapiebeginn bei 6 Patientinnen durchgeführt, KL-1 positive Zellen wurden bei 2 Patientinnen ermittelt. (33,3%). In einem Fall wurde 12 Tumorzellen auf 1 Mio Knochenmarkszellen, in anderem Fall — 1 Zelle ermittelt. Bei der zytologischen Untersuchung wurden die Metastasen ins Knochenmark bei diesen Patienten nicht entdeckt. Nach der Behandlung (6 Kursen FAC und PME) wurde die immunologische Untersuchung des Knochenmarks bei den beiden Patientinnen durchgeführt- es wurde keine Tumorzellen festgestellt.

Die Häufigkeit der Entdeckung der Mikrometastasen ins Knochenmark war von der Lokalisation der Fernmetastasen nicht abhängig: bei der Patientinnen mit Metastasen nur in die innere Organe betrug diese 63,3% und bei Patientinnen nur mit Knochenmetastasen — 61,5%. Bei der Mehrzahl der Patientinnen wurden von 1 bis 10 Tumorzellen entdeckt.

Die immunologische Untersuchung des Knochenmarks wurde nach der Beendigung die Systembehandlung bei 11 Patientinnen durchgeführt. Solitäre Tumorzellen wurden in 27,3% Fällen (bei 3 Patientinnen) ermittelt. Die Tabelle 5 zeigt die Dynamik des Gehaltes der Tumorzellen im Knochenmark.

Die Tabelle zeigt, dass bei allen Patientinnen mit der effektiven Behandlung (teilweise oder volle Tumorregression), und auch bei der Krankheitsstabilisation wurde die Zahl der AG-positiven Zellen im Knochenmark entweder gesenkt oder unverändert blieb, d.h. das trifft mit der Bewertung des Behandlungseffektes mit Hilfe der objektiven Methoden zusammen.

Die Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse der Zeitanalyse vor der Progredienz und die allgemeine Lebensdauer in der Gruppe der Patientinnen mit (ohne) Knochenmarkmetastasen nach Angaben der immunologischen Untersuchung, sowie in der Gruppe der Patientinnen mit zytologisch verifizierten Knochenmarkmetastasen. Die allgemeine Lebensdauer wurde bei 39 Patientinnen bewertet (bei 33 Patientinnen — IV MK Stadien, bei 6 Pat. — III B); die Zeit vor der Progredienz wurde bei 37 Patientinnen bewertet (bei 31 war das disseminierte MK, bei 6 Patientinnen — lokal-ausgebreitetes MK).

Die Tabelle 6 zeigt, dass bei der immunozytologischen Ermittlung der Mikrometastasen im Knochenmark unterschieden sich die Kennziffer der Zeit vor Progredienz und der allgemeinen Lebensdauer zwischen der positiven und der negativen Gruppe nicht wesentlich. Es gibt die Vorteile bei der Gruppe der Patientinnen ohne Mikrometastasen gegenüber der Gruppe mit Metastasen im KM (nachgewiesen mit zytologischer Methode) — die Zeitmediane vor der Progredienz ist bei denen auf 4 Monate höher. ($p=0,03$). Abb. 3.

Tabelle 5
Der Gehalt der AG-positiven Zellen im Knochenmark bei den Patientinnen mit MK und nach systematischer Antitumorbehandlung

N	TZ-Zahl		Art der Behandlung	Effekt der Behandlung
	Vor der Behandlung	Nach der Behandlung		
1.	12	0	Nach 6 FAC Kursen	VE
2.	0	0	Nach 6 FAC Kursen	ST
3.	0	0	Nach 6 FAC Kursen	TR
4.	1	0	Nach 6 FAC Kursen und OP	VR
5.	0	0	Nach 3 Monate nach 6 FAC Kursen	PK
6.	1	0	Nach 6 FAC Kursen	TR
7.	416	418	Nach 3,5 Monate Tamoxiphen Einnahme	ST
8.	50	0	Nach 8 FAC Kursen	TR
9.	2	4	Nach 5 FAC Kursen	TR
10.	5	5	Nach 6 FAC Kursen	ST
11.	2	0	Nach 8 FAC Kursen	TR

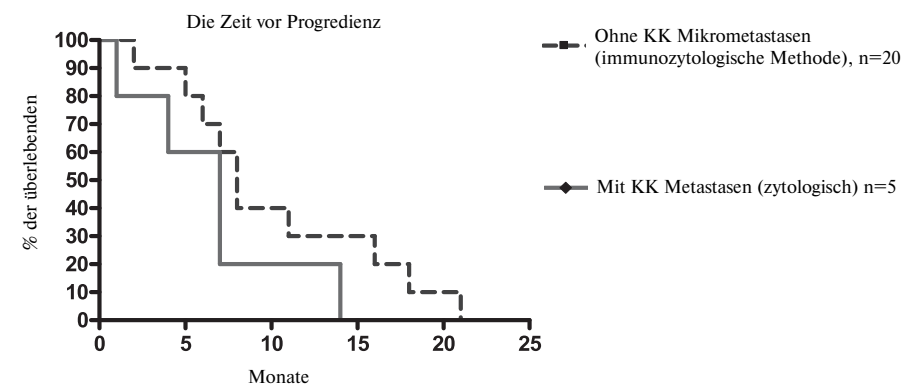


Abb. 3. Die Zeit vor Progredienz bei den Patientinnen mit KM Metastasen, mit der zytologischen Methode nachgewiesen und bei den Patientinnen ohne Mikrometastasen (nach Angaben der immunozytologischer Untersuchung)

Die Zeit vor Progredienz bei den Patientinnen mit KM Metastasen, mit der zytologischen Methode nachgewiesen und bei den Patientinnen ohne Mikrometastasen (nach Angaben der immunozytologischer Untersuchung)

Tabelle 6
Die Zeit vor der Progredienz und die allgemeine Lebensdauer von Patientinnen mit MK, in Abhängigkeit von der Ermittlung der Mikrometastasen im Knochenmark nach Angaben der immunologischen und zytologischen Untersuchungsmethoden

	Patientinnen ohne KM Metastasen (KL-1=0/Mio)	Patientinnen mit KM Metastasen (KL-1≥1/Mio)	Patientinnen mit zytologisch verifizierten KM Metastasen
Zeitmediane vor der Progredienz, Monate	11 (n=17)	10,5 (n=15)	7 (n=5)
Zeitmediane der allg. Lebensdauer, Monate	19,5 (n=17)	21 (n=17)	11 (n=5)

Subpopulation der TZ, die im peripheren Blut der Patientinnen mit MK zirkulieren

Viele Erforschungen sind der Untersuchung des Phenotyps der KM Mikrometastasen gewidmet. Es ist bekannt, dass die solitäre TZ im KM die AG des Hauptkomplexes der Histokompatibilität der I Klasse, Adhäsionsmoleküle EpCAM, Rezeptoren erb-B2 und Transferin-Rezeptoren, Proliferation Marker (Ki-67, p-120), Gene MAGE (8,12,15,16) expressieren . Die Mitteilungen über Charakteristik der ZTZ sind nicht zahlreich.[5].

In unserer Arbeit wurden die ZTZ bei 17 Patientinnen zwecks der Expression des Moleküls des Hauptkomplexes der Histokompatibilität (MHC) II Klasse-HLA-DR und des Moleküls CD95 aus Fas-Fas L -System für die Bestimmung des Zellapoptosis untersucht. Bei 6 Patientinnen wurde die subpopulativen Zusammensetzung der ZTZ im peripheren Blut in Dynamik der Systemtherapie bewertet.

In meisten untersuchten Fällen war die ZTZ- Zahl deutlich ausgeprägt und nur bei 3 Patientinnen aus 17, war diese Zahl niedriger als 10 AG+ Zellen pro Mio. der bewerteten Zellen, Tab.7.

Expressionshäufigkeit der HLA-DR Moleküle pro ZTZ beträgt 82% (bei 14 aus 17 Patientinnen). Mittleres Prozent HLA-DR+ ZTZ beträgt 31,6±6,4% bei der Mediane 26,2% und einer deutlichen Streuung von 0,0 bis 81,8%.

Die Expressionshäufigkeit der Moleküle CD95 pro ZTZ beträgt 33%. Durchschnittliches Prozent CD95+ZTZ — beträgt 14,8±5,73%, bei Mediane 3,3,% und bei der Streuung von 0 bis 66%. Bei den 4 aus 15 Fällen (26%) betrug die Expression von AG auf den ZTZ von 20 bis 50% und nur in 1 Fall war der Expressionsspiegel Cd95 auf den ZTZ mehr als 50% (66,6%).

Nach der Chemotherapie wurde die Subpopulationzusammensetzung der ZTZ bei 6 Patientinnen bewertet. In allen 6 Fällen wurde die Expression auf ZTZ (HEA-125+) der Hauptkomplexmoleküle der Histokompatibilität der II. Klasse (HLA-DR) und des Rezeptors CD95 untersucht. Tab.8

Wie man aus der Tabelle 8 sieht, war die Zahl der ZTZ bei den Patienten aus dieser Gruppe in meisten Fällen ausreichend ausgeprägt und war höher als 10 Zellen pro Mio. Leu des peripheren Blutes. Die Subpopulationale Zusammensetzung der ZTZ war verschiedenartig, aber es gab keine Fälle mit der Expression der AG auf mehr als 50% TZ in dieser Patientengruppe.

Tabelle 7

Subpopulation der ZTZ bei Patientinnen mit MK vor dem Beginn der systematischen Behandlung

Nr	ZTZ- Zahl/Mio. Leu	% HLA-DR+ZTZ	% CD95+ZTZ	Zahl von HLA-DR+ZTZ/Mio. Leu	Zahl von CD95+ZTZ/Mio. Leu
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	—

Im Vergleich zu den Angaben vor der Behandlung (siehe die Tab. 7) war durchschnittliches Prozent der ZTZ mit dem Immunophenotyp HLA-DR+HEA125+ praktisch doppelt niedriger und betrug $15,2 \pm 6,33\%$. Die Mediane war auch wesentlich niedriger und betrug $10,8\%$, bei der Kenndatenstreuung von $3,0$ bis $44,6\%$.

Durchschnittliches Prozent der ZTZ mit Immunophenotyp CD95+HEA125+ war auch wesentlich niedriger, als in der Gruppe mit der Patientinnen vor der Behandlung und betrug $5,3 \pm 1,53$. Aber die Kenndatenmediane unterschied sich praktisch nicht von dieser vor der Behandlung und betrug $5,0\%$. Die Kenndatenstreuung in dieser Gruppe war unbedeutend — $0,0$ – $11,3\%$.

Tabelle 8

ZTZ Subpopulationen bei den Patientinnen mit MK nach der systematischen Chemotherapie

Nr	ZTZ Zahl/Mio. Leu	% HLA-DR+ZTZ	HLA-DR+ZTZ Zahl/Mio. Leu	% CD95+ ZTZ	CD95+ZTZ/Mio. Leu
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

Beachtenswert ist auch der Fakt, daß bei der größeren ZTZ -Menge (beim disseminierten MK) oder bei der Vergrößerung der ZTZ- Zahl im peripheren Blut (z.B. bei Krankheitsprogredienz) reduziert die TZ- Zahl, welche die beide AG (HLA-DR und CD95) expressiert und die negativen Zellen dominieren. Das erlaubt zu vermuten, dass beim Verlust durch die TZ der AG HLA-DR und CD95, erwirbt sie größeres metastatisches Potential, weil sie "unsichtbar" für die Zellen des Immunsystems (CD4 T-Zelle) wird und kann durch CD95-abhängige Apoptose nicht zerstört werden.

Die in unserer Arbeit vorgestellten Daten zeigen die Notwendigkeit der weiteren Untersuchung der subpopulativen Zusammenhang der ZTZ mit dem Ziel die Kenntnisse über die Metastasierungsmechanismen und medikamentöse Resistenz des bösartigen Tumors zu erweitern.

Perspektiv betrachten wir auch die Forschung der Dynamik des ZTZ-Gehaltes während der Chemotherapie, weil nach unseren Daten ist die Vergrößerung des ZTZ -Gehaltes bei der Therapie ist ein statistisch signifikantes Zeichen, das von einer ungünstigen Prognose zeugt.

SCHLUßFOLGERUNGEN

1. Die ZTZ (im peripheren Blut) sind bei $41,3$ Patientinnen mit disseminierten MK auf Grund des Vorhandenseins von membranpanepithelialen AG (Egp34, BerEp4) bei fehlender Expression entdeckt; sie zeichnen sich durch niedrige Werte der Granulation und sind nach der Größe heterogen.

2. Die Zahl von ZTZ variiert von minimaler (1 Zelle pro Mio. Leu) bis ausgeprägter Menge (100 oder mehr Zellen pro Mio. Leu).

3. Die ZTZ, die im peripheren Blut zirkulieren, sind heterogen nach Expression der Moleküle des Hauptkomplexes der Histokompatibilität II. Klasse (HLA-DR) und des Rezeptors CD95. In meisten Fällen wurde ausgeprägte Proportion HLA-DR-negativer und CD95 positiver Zellen gemerkt, was von der Unfähigkeit der Präsentation der tumor-assoziierten Peptide CD4+ den T-Lymphozyten und von der Unmöglichkeit der Realisierung des Zelltodes durch CD-95 -Apoptose zeugt.

4. Das Vorhandensein der ZTZ beeinflusst nicht die Intervalldauer ohne Progredienz und die allgemeine Lebensdauer von den Patientinnen mit MK III und IV Stadien.

5. Die TZ -Ermittlung im peripheren Blut hat keine direkte Assoziation mit den Mikrometastasen im Knochenmark, die mittels der immunozytologischen Methoden ermittelt werden könnten

6. Die Mikrometastasen im KM vor der Behandlung wurden bei $54,8\%$ Fällen von MK in III und IV Stadien entdeckt. Das Vorhandensein von Mikrometastasen im KM beeinflusst nicht die Dauer des unrezidiven Intervalls und die allgemeine Labensdauer in dieser Patientengruppe.

7. Dynamik des Gehaltes der ZTZ während Chemotherapie trifft am öftesten mit klinischer Bewertung des Behandlungseffektes zusammen. Bei der ZTZ -Steigerung (oder beim Fehlen der Senkung) wurde trotz eines positiven klinischen Effektes (völlige oder partielle Regression des Tumors) die Krankheitsprogredienz in kurzer Zeit nach der Beendigung der antitumor — Therapie gemerkt, .

8. Dynamik des Gehaltes der ZTZ während der Chemotherapie ist ein Ergänzendes objektives Kriterium des Behandlungseffektes. Bei den Patienten mit der Senkung der ZTZ nach der Polichemotherapie beobachtet man eine plausibel längere Intervalldauer ohne Progredienz, im Vergleich zu den Patientinnen, bei welchen in der Dynamik eine Spiegelerhöhung der ZTZ festgestellt wurde, $p=0,026$.

Bibliographie:

1. *Davidov M.I., Aksel E.M.* Statistik der Tumoren in Russland und SNG in 2004 // *Vestnik ROWZ Blochin N.N.* RWMA, t.17, № 3 (Beilage 1) 2006. (In Russian)
2. *Krochina O.V., Letjagin V.P., Tupizin N.N. und Mitverfasser.* Mammakarzinom. Mikrometastasen im Knochenmark // *Vestnik ROWZ Blochin N.N.* Liste 15-20,3/2002. (In Russian)
3. *Tupizin N.N.* Immunophenotyp des Mammakarzinoms (Kap. 2 in der Auflage "Mammakarzinom" herausgegeben von: Kuschlinskij N.E., Portnoj S.M., Laktionova K.P., Moskau 2005. (In Russian)
4. *Brown S.* A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 2005 Aug 25; 353(8):793-802.
5. *Cristofanilli M., Budd G., Ellis M.* et al. Circulating tumor cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer // *New England Journal of Medicine*. — 2004. — Vol. 35. — P. 781-791.
6. *Gafforio J.J., Serrano M.J., Sanches-Rovira P.* et al. Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis // *Int J Cancer*. — 2003. — Vol 2, № 107 (6), P. 984 — 990.
7. *Giatromanolaki A., Koukourakis M., Kakolyris S.* et al. Assessment of highly angiogenic and disseminated in the peripheral blood disease in breast cancer patients predicts for resistance to adjuvant chemotherapy and early relapse // *Int J Cancer*. — 2004. — Vol 10, № 108(4) — P. 620 — 627.
8. *Gross H.J., Verwer B., Houck D.* et al. Model study detecting breast cancer cells in peripheral blood mononuclear cells at frequencies as low as // *PNAS*. — 1995. — Vol 92, P.537- 541. 10(-7).
9. *Manhani A.R., Manhani R., Soares H.P.* et al. CK-19 expression by RT-PCR in the peripheral blood of breast cancer patients correlates with response to chemotherapy // *Breast Cancer Res. Treat.* — 2001. — Vol.66, №3 — P.249 — 254.
10. *Molino A., Pelosi G., Micciolo R.* et al. Bone marrow micrometastases in breast cancer patient // *Breast Cancer Research and Treatment* 58, 123-130, 1999.
11. *Naumov G., MacDonald I., Weinmeister P.* Persistence of Solitary Mammary Carcinoma Cells in a Secondary Site. A Possible Contributor to Dormancy // *Cancer Research* 62, 2162-2168, April 1, 2002.
12. *Schoenfeld A., Kruger K. N., Gomm J.* et al. The detection of Micrometastasis in the Peripheral Blood and Bone Marrow of patients with Breast Cancer Using Immunohistochemistry and reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction for Keratin 19 // *Eur. J.Cancer* — 1999. — Vol.33, No 6, P. 854-861.
13. *Stathopoulou A., Vlachonikolis D., Mavroudis D.* et al. Molecular detection of Cytokeratin-19-Positive Cells in the Peripheral Blood of Patients With Operable Breast Cancer: Evaluation of Their Prognostic Significance // *J. Clin. Oncol.* — 2002. — Vol.16, P. 3404-3412.
14. *Thurm H, Ebel S, Kantenich* et al. Rare expression of epithelial cell adhesion molecule on residual micrometastatic breast cancer cells after adjuvant chemotherapy // *Clin Cancer Res.* 2003 Jul; 9 (7):2598-604.

15. *Wong N.S., Kahn H.J., Zhang L.* et al. Prognostic significance of circulating tumour cells enumerated after filtration enrichment in early and metastatic breast cancer patients // *Breast Cancer Res Treat.* 2006 Mar 16.
16. *Xenidis N., Vlachonikolis I., Mavroudis D.* et al. Peripheral Blood circulating cytokeratin-19 mRNA-positive cells after the completion of adjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer // *Ann Oncol.* — 2003 — № 1 — P. 849-855.
17. *Zhang J, Shen KW, Liu G.* et al. Antigenic profiles of disseminated breast tumor cells and microenvironment in bone marrow // *Eur J Surg Oncol* 2003 Mar; 29 (2): 121-126.
18. *Zia A, Schildberg FW, Funke I.* et al. MHC class I negative phenotype of disseminated tumor cells in bone marrow is associated with poor survival in N0M0 breast cancer patients // *Int J Cancer* 2001 Aug 15; 93 (4)

U. Vogt, B. Brandt, R. Krieg

INDIVICON, EIN ANSATZ ZUR QUALIFIZIERTEN INDIVIDUALISIERTEN KOMPLEMENTÄREN ONKOLOGIE

INDIVICON, Deutschland

ZUSAMMENFASSUNG

INDIVICON, die Gesellschaft für individualisierte komplementäre Onkologie wird in diesem Artikel vorgestellt. Neben einem Überblick die Gesellschaft selbst betreffend, werden Beispiele für eine neue Herangehensweise in der Onkologie gegeben. Diese Beispiele sollen verdeutlichen, inwiefern sich der Ansatz der INDIVICON von den bisher üblichen Diagnose- und Therapieformen unterscheidet. Die Vorteile sowohl für Patienten als auch für Mediziner werden verdeutlicht.

Schlüsselwörter: Disseminierte Tumorzellen, Metastasen, Immuntherapie, INDIVICON

Die "Gesellschaft für individualisierte komplementäre Onkologie e.V." (INDIVICON) ist eine 2006 gegründete gemeinnützige Vereinigung, die das Ziel verfolgt, neue Wege der Diagnostik und Behandlung zusätzlich zu den vorhandenen Möglichkeiten zu etablieren.

Die Idee sich auf neue und zusätzliche Möglichkeiten in diesem Gebiet zu konzentrieren basiert auf der Beobachtung, dass viele Patienten von einer differenzierteren Diagnose und — damit zusammenhängend — einer intensiveren komplementären Behandlung profitieren würden. INDIVICON hat sich auch zum Ziel gesetzt, die zur Zeit bestehenden Lücken in der Betreuung von Tumorkranken zu füllen. Dies wird z.B. über die Metastasenfrüherkennung erreicht, die Patienten mehr Sicherheit gibt, dass der Primärtumor erfolgreich behandelt worden ist.

Im Folgenden werden die verschiedenen Gebiete in denen INDIVICON sich betätigt vorgestellt und Beispiele gegeben, die den Ansatz von INDIVICON von den bisher üblichen unterscheidet.

1. BETÄTIGUNGSFELDER DER INDIVICON

Die Gesellschaft für individualisierte komplementäre Onkologie konzentriert sich vorwiegend auf vier Bereiche, die in diesem Artikel ausführlicher vorgestellt werden:

- die Etablierung neuer Verfahren zur Krebsdiagnose und -behandlung
- die Fortbildung in neuen Verfahren zur langfristigen klinischen Patientenversorgung
- der Qualitätssicherung durch Fortbildung von Ärzten und anderen medizinischen Angestellten

- Angewandte klinische Forschungsprojekte

1.1 Etablierung neuer Konzepte der Krebsdiagnose und -behandlung

Basierend auf Forschungen, die von Mitgliedern der Gesellschaft (z.B. Prof. Burkhard Brandt) durchgeführt wurden, kann INDIVICON auf umfassende Erfahrung in Diagnose und Behandlung bei folgenden Krebsarten zurückgreifen:

- gynäkologische Tumoren: Brust- und Ovarialkarzinome
- Kolonrektale Karzinome
- Karzinome und ihre Vorstufen im Mund- und Rachenraum (z.B. Leukoplakien)
- Lungenkarzinome
- Prostatakarzinome

Der Unterschied zwischen der etablierten Vorgehensweise und dem Ansatz von INDIVICON bei der Diagnose und Behandlung sei hier am Beispiel einer Brustkrebspatientin erläutert. Das etablierte Verfahren basiert auf der klinischen Diagnose (TNM), einer histomorphologischen Evaluation (G) und einer immun-histochemischen Analyse der Hormonrezeptoren und des HER2 Onkoproteins. Der Nachteil dieser Vorgehensweise ist die fehlende Aussagekraft der Hormonrezeptoranalyse in Bezug auf tatsächliche Aktivität der Rezeptoren. Um die Rezeptoraktivität zu analysieren muss nach ein stoffwechselabhängiges Protein, das nur durch einen aktiven Östrogenrezeptor entsteht, bestimmt werden.

Für diesen Zweck ist das Marker-Protein pS2 (TFF1) am besten geeignet. Abbildung 1 verdeutlicht, dass ein aktiver Östrogenrezeptor einen Stoffwechselprozess anstößt, an dessen Ende pS2 produziert wird. Ohne ein positives Ergebnis auf pS2 kann der Rezeptor als nicht aktiv bezeichnet werden.

Dieses Ergebnis hat wichtige Implikationen für die Einschätzung der weiteren Prognose des Patienten und beeinflusst infolgedessen die Wahl der adjuvanten Therapieoptionen. Am Beispiel eines konkreten Falles wird im Folgenden gezeigt, dass der Behandlungsnutzen der Patientin höchstwahrscheinlich mit einem nicht funktionierenden Östrogenrezeptor zusammenhängt.

In Tabelle 1 sehen Sie den Fall einer 52-jährigen Patientin. Sie hatte ein Mammakarzinom mit 17 mm Durchmesser. Es sind keine Lymphknoten betroffen. Die Klassifizierung (Grading) ist drei, was auf eine niedrige Differenzierung des Tumorgewebes vom normalen Mammagewebe hindeutet.

Die linke Spalte beschreibt die empfohlenen Analysen, die beim St. Gallen Consensus Meeting 2007 festgelegt wurden. Diese würden sich nur auf die Östrogen- und Progesteronrezeptoren beschränken und in diesem Fall für beide zu einem positiven Testergebnis kommen. Das Ergebnis würde auf ein mittleres Risiko für die Patientin hindeuten und eine Anti-Hormontherapie mit Tamoxifen oder Aromatasehemmern indizieren.

Durch die Verwendung weiterer Parameter, wie sie in der zweiten Spalte beschrieben sind, erhält man ein vollständigeres Bild des Ist-Zustandes: Z.B. das negative Ergebnis für pS2. Letzteres deutet darauf hin, dass eine Anti-Hormontherapie der Patientin keinen Vorteil bringen würde, da die Hormonrezeptoren nicht aktiv sind.

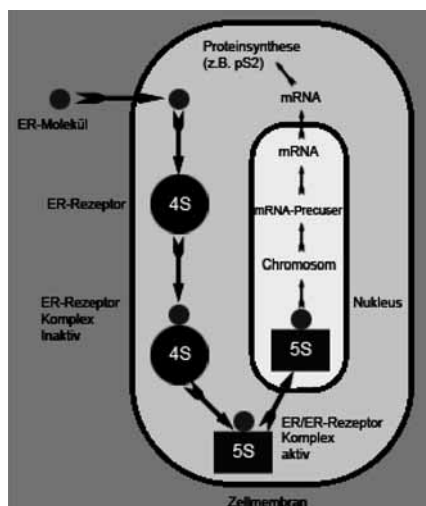


Abb. 1. pS2 als stoffwechselabhängiges Protein der östrogenrezeptorfunktion

Dieser und die anderen Parameter führen zu der Einschätzung, dass die Patientin tatsächlich zur Hoch-Risiko-Gruppe gehört. Die empfohlene Therapie wäre hier eine

Chemotherapie und hierbei aufgrund des erweiterten Topo-II-Alpha vorzugsweise eine anthrazyklinhaltige Therapie.

Die empfohlene Chemotherapie wäre daher FEC (5-FU Epirubizinyklophosphamid), da dies nicht nur eine günstige, sondern im Vergleich zu teureren Chemotherapeutika eine gleichermaßen effektive Option ist (Ergebnis einer Chemosenstestung von Taxan-haltigen Therapien).

Abschließend lässt sich also feststellen, dass die Patientin eine adäquatere Therapie bekommen würde und infolge dessen eine erhöhte Heilungswahrscheinlichkeit hätte.

1.2. Klinische Behandlung von Patienten nach adjuvanter Therapie

INDIVICON konzentriert sich sowohl auf die Beurteilung des individuellen Metastasierungsrisikos des einzelnen Patienten als auch auf die nicht-invasive Behandlung von Patienten mit hohem Metastasierungsrisiko mit dem Ziel, die krankheitsfreie Zeit zu verlängern bzw. das Gesamtüberleben zu verbessern.

1.2.1. Disseminierte Tumorzellen

Die Gefahr, nach einer adjuvanten oder sogar neoadjuvanten Behandlung eine Metastasierung des Primärtumors zu erleiden kann durch Analysemethoden auf disseminierte Tumorzellen im peripheren Blut erkannt werden. Dieser Test sollte zusätzlich zu

Tabelle 1

Vergleich von Standard- und neuer Prognose

Patientin, 52 Jahre alt, post-menopausal, invasives ductuales Mammakarzinom, pT1c; pN0 (0/22); G3		
Standardlaborparameter (Empfehlungen St. Gallen 2007)	Verwendung neuer Prognosefaktoren	Erläuterungen
Östrogenrezeptor positiv Progesteronrezeptor positiv	Östrogenrezeptor positiv Progesteronrezeptor positiv pS2 negativ uPA and PAI normal Topo-II-alpha erweitert S-Phase gesteigert Aneuploider DNA-Index Erb B-1, c-myc normal p53 nicht mutiert erb B-2 erweitert Chemosensitivitätstestung	Funktionsgestörte Hormonrezeptoren, keine Reaktion auf die Hormontherapie Bei Miterweiterung mit erb B-2 bessere Wirkung von anthracyclinhaltigen Therapien Auswahl erb B-2 erweiterter Tumorzellen im Fall einer Antihormontherapie mit Tamoxifen FEC-, EDoc- and EPac-sensitiv; CMF resistent
Durchschnittliches Risiko	„Hohes Risiko“	
Antihormontherapie (Tamoxifen)	Chemotherapie	FEC

den bereits etablierten Tumormarkern durchgeführt werden. Die Tumormarker sollten jedoch strikt nach Indikationsstellung eingesetzt werden, da sonst durch ihre Unspezifität falsch-positive Ergebnisse erzielt werden, die zu einer Verunsicherung des Patienten und einer möglichen überdiagnostik und übertherapie führen, die dem Patienten schaden.

Grundregel ist, Tumormarker nur in der Nachsorge einzusetzen bei Patienten, die präoperativ erhöhte Werte der Marker im Serum hatten. Patienten, die präoperativ keine mit ihrem Tumor assoziierten Markererhöhungen hatten, sollten in der Nachsorge keine erneuten Bestimmungen bekommen. Darüber hinaus sollte bei wiederholtem Markeranstieg abgeklärt werden, welche gutartigen Erkrankungen vorliegen könnten, die zu einem Markeranstieg geführt haben könnten. Beispiele sind ein CEA-Anstieg bei Cholestase oder ein CA 15-3-Anstieg bei Bronchitis. Die organspezifischen Indikationsfelder der Tumormarker sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Mikrometastasen, die im Blut durch ihre Ausbildung gewebespezifischer Antigene, wie z.B. Zytokeratine nachgewiesen werden können, sind höchstwahrscheinlich Vorstufen von Metastasen. In Abbildung 2 ist wiedergegeben, wie man sich die Dissemination von Tumorzellen aus dem Primärtumor ins Blut vorstellen könnte, die in einer späteren Phase Lymphknoten- und Fernmetastasen verursachen können.

Die Tauglichkeit disseminierter Tumorzellen als Indikator für die Beobachtung der Krankheit ist in folgender Abbildung (abb.3) verdeutlicht.

Abbildung 3 zeigt, dass disseminierte Tumorzellen im peripheren Blut — dann zirkulierende Tumorzellen (CTC) genannt — die systemische Entwicklung eines

Tabelle 2

Tumormarkerindikationen¹

Karzinom	Typ	AFP	β-2-M	CA 125	CA 15-3	CA 19-9	CA 72-4	CEA	Cyfra 21.1	Cyfra 8/18	erbB-2 p105	HCG	NSE	PSA	p53 Auto-Ak	SCC
Blase								•		•						
HNO																•
Hoden	• Seminom • Nonseminom	∂								+			+			
Kolon/Rektum						•	••	∂								
Leber	• HCC • CCC • Metastasen	∂						∂								•
Lunge	• NSCLC • SCLC							• +	∂	∂			∂		+	+
Lymphom (NHL)			•													
Magen							∂	••								
Mamma					∂			••			••					+
Nieren										∂						
Ösophagus							•	•								
Ovar	• serös • muzinös • Keimzell	∂		∂			∂						∂			
Pankreas				+		∂										
Prostata														∂		
Uterus	• Corpus • Endometr. • Zervix • Chorion							• • •					∂			∂

¹ ∂ = Marker 1. Wahl (Marker mit hoher Sensitivität bei hoher Spezifität)
 • = Marker 2. Wahl (Marker mittlerer Sensitivität bei hoher Spezifität)
 + = Marker 3. Wahl (Marker niedriger Sensitivität bei hoher Spezifität)
 •• = als komplementärer Marker zu ∂ empfohlen
 AFP = α-Fetoprotein, β-2-M = β-2-Mikroglobulin, CEA = Carcinoembryonales Antigen, Cyfra = Zytokeratinfragmente, erbB-2 = Proteinfragment des Onkogens Her-2/neu/c-erbB-2, HCG = humanes Choriongonadotropin, NSE = Neuronenspezifische Enolase, PSA = Prostataspezifisches Antigen, p53 Auto-Ak = p53 Autoantikörper, SCC = Squamous Cell Carcinoma Antigen (TA-4)

Brustkrebses widerspiegeln. Eine Epirubicin-Monotherapie, die einer unter Metastasen leidenden Brustkrebs-Patientin gegeben wurde, senkte die Anzahl an CTCs (graue Linie: Zytokeratin-positive Zellen; schwarz: Zytokeratin- und HER2-positive Zellen). Nach Absetzen der Therapie wurde wieder eine spezielle Subpopulation der CTCs im peripheren Blut nachgewiesen, die das HER2 (erbB-2) Onkoprotein exprimieren. Die Patientin starb einige Monate später an Gehirnmetastasen.

Dieser Fall zeigt, daß die Menge und die Eigenschaften disseminierter Tumorzellen im Blut eng mit dem Fortschreiten der Erkrankung korreliert sind und unterstreicht die Anwendbarkeit dieses Parameters für die Überwachung der Patienten und als Indikator für den Therapieerfolg.

1.2.2. Immuntherapie

In der Tumornachsorge konzentriert sich INDIVICON nicht nur auf die Beurteilung des Metastasierungsrisikos eines Patienten, sondern hat auch das Ziel, eine Metastasierung zu verhindern oder zumindest langfristig hinauszuögern.

Abbildung 4 zeigt ein stark vereinfachtes Schema, dass die Regulation des

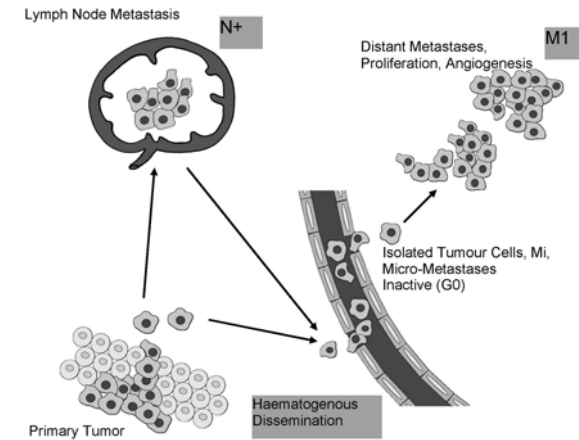


Abb. 2: Mikrometastasen als Übergangsstufe der Metastasierung

Patientenmonitoring

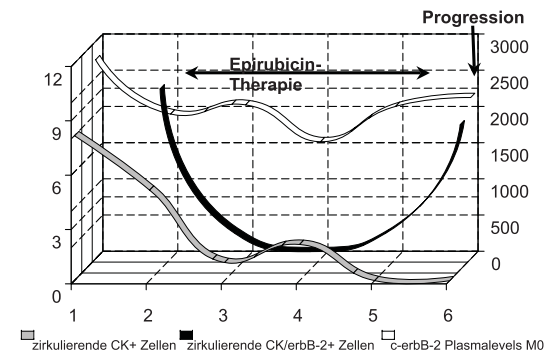


Abb. 3. Überwachung der systematischen Entwicklung eines Brustkrebses durch zirkulierende Tumorzellen

Immunsystems darstellt.

Im Zentrum des Immunsystems bestimmen die regulatorischen T-Zellen (Treg) spezifische Immunreaktionen, indem sie Einfluss auf die anderen Immunzellen ausüben. Die Treg-Zellen sind also verantwortlich für die Anti-Tumor-Reaktion des Immunsystems.

Wie in Abbildung 5 vereinfacht dargestellt, versucht ein Tumor immer, die Kommunikation zwischen den Treg-Zellen und den anderen Immunzellen zu verhindern und so den regulatorischen Einfluss der Treg-Zellen zu unterbinden. Infolgedessen bekämpft das Immunsystem die Tumorzellen nicht. Mithilfe einer adäquaten Immuntherapie kann dieser

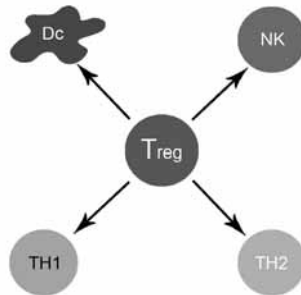


Abb. 4. Vereinfachte Darstellung des Immunsystem

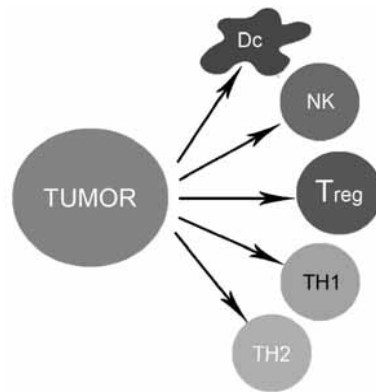


Abb. 5. Der Tumor behindert Immunzellen in seiner Umgebung

Prozess aufgehalten oder eventuell sogar das Immunsystem neu aktiviert werden.

(1) Indem man die Möglichkeit einer Analyse des Immunstatus nutzt, kann man beurteilen, ob das Immunsystem in seiner Regulation durch den Tumor inhibiert ist und dann Maßnahmen zu seiner Stärkung ergreifen und so die Immunantwort auf die Tumorzellen reaktivieren.

1.3 Qualitätssicherung durch Weiterbildung von Ärzten und anderem medizinischen Personal

Mit der Absicht neue Entwicklungen im Bereich komplementärer Onkologie für eine große Zahl von Patienten zugänglich zu machen, organisiert die INDIVICON regelmäßig Fortbildungsveranstaltungen für Ärzte. Die Seminare sind allen interessierten Medizinern offen. Mitglieder der Gesellschaft verpflichten sich, mindestens zweimal jährlich daran teilzunehmen, um die höchstmöglichen Standards zu gewährleisten. Die Veranstaltungen

sind durch die Ärztekammern zertifiziert.

1.4. Klinische Forschung

In bezug auf klinische Forschung hat INDIVICON das Ziel, neue Herangehensweisen in zweifacher Hinsicht zu etablieren:

(2) Zum Zeitpunkt der Therapieentscheidung nach vorheriger (operativer) Behandlung werden neue Genexpressionsprofile verwendet, um die metastatische Aktivität des Primärtumors einzuschätzen und somit die Wahrscheinlichkeit, die effektivste Therapie anzuwenden, erhöht.

(3) Das Profil kann ebenfalls auf formalinfixiertes in Paraffin eingebettetes Gewebe und daher auch noch Jahre nach der Erstbehandlung des Krebses angewandt werden.

Dies eröffnet die Möglichkeit, Therapieentscheidungen ex-post zu evaluieren und die Therapie den neuesten Entwicklungen in der Krebsbehandlung und den letzten komplementären und unterstützenden Therapien anzupassen.

Eine neue Diagnostikmethode, die INDIVICON etabliert, ist die Bestimmung eines 14-Genexpressionsprofils. Für die Analyse muss lediglich ein Gewebeschnitt aus dem Tumor entnommen werden. Die Methode führt dann zu einem zählbaren Messwert, der das Metastaserisiko des Patienten für die nächsten 5 bis 10 Jahre angibt.

2. GESELLSCHAFT FÜR INDIVIDUALISIERTE KOMPLEMENTÄRE ONKOLOGIE

2.1. Die Gesellschaft

Die Gesellschaft für individualisierte komplementäre Onkologie wurde aus mehreren Gründen ins Leben gerufen: Zuerst einmal war es notwendig, ein Konstrukt für die Aktivitäten in den Bereichen Forschung, Fortbildung und Nachsorge zu schaffen.

Überdies ermöglicht die Gesellschaft die aktive Teilnahme von Medizinern, die mehr über komplementäre Onkologie lernen wollen. INDIVICON gewährleistet eine hohe Qualität aufgrund der Tatsache, dass ihre Analysemethoden und Behandlungsvorschläge kontinuierlich weiterentwickelt und verbessert werden.

INDIVICON unterstützt die Weiterverbreitung der individualisierten und komplementären Onkologie indem sie regelmäßig Projekte initiiert und Vortragende einlädt, die in diesem Feld eine große Expertise haben.

Ferner will die Gesellschaft im öffentlichen wie auch privaten Sektor Einfluss nehmen, um die Vorteile der neuen Analyse- und Behandlungsverfahren für eine möglichst große Patientenzahl verfügbar zu machen.

2.2. Fachkompetenz

INDIVICON will seinen Mitgliedern helfen, im Bereich individualisierte komplementäre Onkologie professionelle Fachkenntnisse zu erlangen. Teilnehmende Mediziner können sich mittels der regelmäßigen Fortbildungen Spezialwissen aneignen und ihre praktischen

Erfahrungen durch die Anwendung komplementärer Diagnostik und Behandlung vertiefen.

Die Gesellschaft stellt die technische Infrastruktur bereit indem sie die entsprechenden Labore und Mediziner zusammenbringt. INDIVICON macht den Ärzten außerdem die Analyse- und Therapieprozesse verfügbar und gibt ihnen Kriterien an die Hand, die für die Entscheidungsfindung notwendig sind.

Die Gesellschaft vereinigt Experten in den Bereichen Diagnostik und Behandlung, die für das Qualitätsmanagement verantwortlich zeichnen, um die bestmögliche Implementierung in der Praxis sicherzustellen. Um Analyse und Behandlung weiter zu dokumentieren und zu verbessern geben die Mitglieder der INDIVICON regelmäßig Rückmeldung.

2.3. Dienste für Mitglieder

Alle INDIVICON-Mitglieder haben Zugang zu einer Vielzahl von Diensten, die die Gesellschaft anbietet. Das Ziel, den Mitgliedern die Möglichkeit zu einem kontinuierlichen Aufbau von Spezialwissen zu geben wird mit Angeboten wie Fortbildungsseminaren, einer Kommunikationsplattform im Internet und telefonischer Beratung verfolgt.

Jedes Mitglied verpflichtet sich, mindestens zweimal jährlich an einer Fortbildungsveranstaltung teilzunehmen, um das Wissen über neue Entwicklungen ständig zu erweitern und bereits gelerntes zu festigen.

Die Internetpräsenz der INDIVICON (www.indivicon.org) soll sowohl Informations- als auch Kommunikationsplattform sein. Mitglieder haben die Möglichkeit, zusätzliche Informationen in allen wichtigen Bereichen zu erlangen und sich mit anderen Mitgliedern, die dieselben Interessen haben, auszutauschen.

Um teilnehmenden Ärzten bei eventuellen Fragen zur Seite zu stehen, bietet INDIVICON telefonische Beratung an. Mitglieder, die Fragen zu Analysen oder Behandlungsmöglichkeiten haben können akademische sowie praktisch tätige Experten kontaktieren, die ihre Fragen beantworten.

UDK 618.19-006.6-033.2:616.419-076.5:57.083.3

O. W. Krochina, W. P. Letjagin, N. N. Tupizin, W. N. Blindar, W. D. Ermilowa

IMMUNOZYTOLOGISCHE DIAGNOSTIK DER MAMMAKARZINOMMIKROMETASTASEN INS KNOCHENMARK

Russisches Onkologisches wissenschaftliches N.N. Blochin-Zentrum der Russischen Akademie der medizinischen Wissenschaften (staatliche Einrichtung), Moskau, Russische Föderation

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungszweck: die Bestimmung des hämatogenen Disseminationsgrades des Mammakarzinoms auf Grund der Erkennung der metastatischen Knochenmarkschädigung mit hochempfindlichen immunozytologischen Verfahren mit monoklonalen Antikörpern zu Epithelantigenen.

Materialien und Verfahren: es wurden 53 Mammakarzinompatientinnen (I–IV Stadien) untersucht. Die Untersuchung des Knochenmarkes, das mit der Sternalpunktion erhalten wurde, wurde sowohl mit zytologischem Standardverfahren als auch mit immunozytologischem Verfahren mit monoklonalen Antikörpern zu Zytokeratinen (CAM 5.2 und KL-1) durchgeführt. Als positiv wurde die Reaktion beim Vorhandensein einer metastatischen Zelle unter 1 Mio. Myelokariozyten geschätzt.

Ergebnisse: bei der zytologischen Standarduntersuchung wurden die Metastasen ins Knochenmark bei zwei Patientinnen von 53 Patientinnen (3,77 %) gefunden. Die Verwendung der monoklonalen Antikörper zu Zytokeratinen (CAM 5.2 oder KL-1) gestattete in allen Fällen das Vorhandensein zytologisch gefundener Knochenmarkmetastasen zu bestätigen und bedeutend die Häufigkeit ihrer Erkennung bei der immunomorphologischen Untersuchung zu erhöhen: die Mikrometastasen ins Knochenmark wurden bei 24 Patientinnen (45,3 %) gefunden. Es wurde eine sichere Verbindung des Vorhandenseins der Knochenmarkmetastasen und des negativen Status des Tumors nach östrogen- ($p=0,04$) und Progesteronrezeptoren ($p = 0,02$) festgestellt. Sie wurde durch rundzellige Tumorfunktion ($p=0,02$) sowie ovarial-menstruale Funktion der Patientinnen zum Ausdruck gebracht. Es wurde keine statistisch sichere Verbindung des Vorhandenseins der Mikrometastasen des Mammakarzinoms ins Knochenmark und des Auffindens der Komplexe bösartiger Zellen in den Brustdrüselymphspalten, des Auffindens der Metastasen in die regionäre Lymphknoten, der Tumornekrose, des Tumorbösartigkeitsgrades, des Differenzierungsgrades, der Tumorknotengröße, der mammographischen Merkmale der Tumorerbreitung sowie ihrer Lokalisation in der Brustdrüse festgestellt.

Schlussfolgerungen: immunozytologische Knochenmarkuntersuchung bei den Mammakarzinompatientinnen kann für die Einleitung in die klinische Praxis, besonders für die Patientinnen mit frühen Erkrankungsstadien, für die Präzisierung des

Verbreitungsgrades vom Tumorprozeß und die Optimierung der Heilungstaktik, empfohlen werden.

Schlüsselwörter: Mammakarzinom, Mikrometastasen ins Knochenmark

EINLEITUNG

Die Mammakarzinomuntersuchungen nehmen einen der wichtigsten Plätze in der gegenwärtigen onkologischen Wissenschaft ein. Die in letzten Jahren veröffentlichte Statistik zeigt ein stätiges Morbiditäts- und Mortalitätswachstum wegen Mammakarzinom in verschiedenen Ländern [3].

Infolge zahlreicher Schwierigkeiten bei der Schätzung und Wahl einer adäquater Behandlungstaktik für bösartige Neubildungen sowie ungenügender Früherfassung ist ein der aktuellen Probleme der gegenwärtigen Onkologie das Suchen nach neuen Diagnose- und Stadiumfeststellungsmethoden, ihre Untersuchung und Schätzung der Antitumorimmunität geworden.

Das Mammakarzinom ist den Bestimmungen der Theorie von B. Fischer nach eine Systemerkrankung. Die Wahrscheinlichkeit der latenten Systemdissemination des Tumorprozesses ist sogar in klinischen Frühstadien (T1-2N0M0) hoch [7].

Die Erkennung kleiner Mengen der metastatischen Zellen (Mikrometastasen) im Knochenmark der Mammakarzinompatientinnen zeigt die hämatogene Dissemination des Tumorprozesses und wird von vielen Wissenschaftlern als schlechtes Merkmal der weiteren Metastasenbildung, vor allem Metastasen im Knochen, geschätzt [4; 8].

Endgültige Entscheidung über Vorhandensein oder Fehlen der Metastasen ins Knochenmark wird bei der histologischen bzw. zytologischen Untersuchung getroffen, jedes Verfahren hat doch ein bestimmtes Auflösungsvermögen. Die histologischen bzw. zytologischen Untersuchungsverfahren zeigen die bösartigen Zellen im Knochenmark bei genügender Menge solcher Zellen. Das Auffinden der Metastasen ist deshalb erst in späten Mammakarzinomstadien möglich. Die histologische Untersuchung ermöglicht das Auffinden einer Tumorzelle unter 100 Myelokariozyten [1].

Reale Vorstellung über die Verbreitung des Tumorprozesses geben die Ergebnisse der immunomorphologischen Untersuchung. Das immunozytologische Untersuchungsverfahren mit monoklonalen Antikörpern zu Antigenen, die von den Epitheltumorzellen expressiert werden, zeigt eine Tumorzelle unter 1 Mio. Myelokariozyten.

Auf den Mammakarzinomzellen sind in fast 100% Fällen das Epithelmembranantigen (EMA), Zytokeratinen (CK), tumorassoziertes Glykoprotein (TAG-12), Antigen der Membranen der Frauenmilchfettglobulen (HMFG-1), Panepithelantigen (EGP-34), seltener auch Karzinom-Embryonalantigen sowie eine Reihe anderer Marker expressiert.

Die Entwicklung der Immunozytologie hat zur Erscheinung der monoklonalen Antikörper (MKA) zu diesen Antigenen geführt und neue diagnostische Möglichkeiten der Erkennung einzelner Tumorzellen in den Lymphknoten, dem Knochenmark, peripherem Blut geöffnet. Die erhaltenen monoklonalen Antikörper haben verschiedene Empfindlichkeit und Spezifität. Es ist bekannt, dass das muzinähnliches Karzinomantigen

(MCA) von den Hämoepoesezellen expressiert wird, monoklonale Antikörper zu EMA mit den Knochenmarklymphoidzellen kreuzartig reagieren [6; 9]. Nach der Meinung von Janni W. und Mitautoren, 2000, dienen als modernes Standard des Auffindens der Mammakarzinommetastasen ins Knochenmark die Antikörper zu den Zytokeratinen.

Monoklonale Antikörper CAM 5.2 wirken mit den Zytokeratinen 7 und 8 zusammen [12] und die MKA zu Panzytokeratinen KL-1 erkennen die Zytokeratinen 2, 6, 8, 10, 11, 18, 19 und im kleineren Grade auch 5, 14, 15.

Die Änderungen im Blutbildungssystem, die für die Mammakarzinommetastasen ins Knochenmark typisch sind, sind gut bekannt [2;5]. Es sind doch nur einzelne Mitteilungen über Analyse der Knochenmarkreaktion auf Vorhandensein einzelner Tumorzellen bekannt [11].

Es ist deshalb notwendig den Mammakarzinomdisseminationsgrad auf der Grundlage des Auffindens der Mikrometastasen ins Knochenmark zu untersuchen, die Effektivität verschiedener Diagnosemethoden für metastatische Knochenmarksschädigung zu bestimmen, die Unterschiede zwischen Makro- und Mikrometastasen zu bestimmen, die Ergebnisse der immunozytologischen Methode mit anderen Merkmalen der Verbreitung des Tumorprozesses zu vergleichen, die Änderungen im Blutbildungssystem bei der metastatischen Knochenmarksschädigung zu analysieren.

Ziel der Arbeit war die Bestimmung des hämatogenen Disseminationsgrades des Mammakarzinoms auf Grund des Auffindens der metastatischen Knochenmarksschädigung mit hochempfindlichen immunozytologischen Methoden und monoklonalen Antikörper zu Epithelantigenen.

Für Verfolgung dieses Zweckes wurden folgende Aufgaben gestellt:

1. die Empfindlichkeit der immunozytologischen Methode und der zytologischen Methode der Diagnose der Mammakarzinommetastasen ins Knochenmark zu vergleichen.
2. die Häufigkeit der Tumorschädigung des Knochenmarkes in verschiedenen Mammakarzinomstadien mit der immunozytologischen Methode zu bestimmen.
3. die Wechselbeziehung des immunologischen Auffindens der Mammakarzinommetastasen ins Knochenmark mit biologischen Merkmalen des Primärtumors, der Lymphknotenschädigung, anderen klinischen bzw. Labormerkmalen der Verbreitung des Tumorprozesses zu bestimmen.
4. den Blutbildungszustand der Patientinnen mit den Mammakarzinommetastasen ins Knochenmark, Mikrometastasen und ohne hämatogene Dissemination zu analysieren.

MATERIALIEN UND METHODEN

In dieser Arbeit wurden die Materialien der klinischen, morphologischen, immunozytologischen Untersuchung von 53 Patientinnen, die in der chirurgischen Mammatumorabteilung des Russischen Onkologischen wissenschaftlichen N.N. Blochin-Zentrums der Russischen Akademie der medizinischen Wissenschaften Behandlung im Zeitraum von 1991 bis 2001 in Anspruch nahmen, verwendet.

Die untersuchte Gruppe bestand aus den Frauen von 27 bis 72 Jahre alt (das Mittelalter betrug 49 Jahre).

Die Sternalpunktion wurde bei allen Patientinnen vor Beginn der Behandlung gemacht. Die Knochenmarkuntersuchung wurde sowie mit zytologischer Standardmethode als auch mit immunozytologischer Methode (Immunofluoreszenzreaktion mit MKA zu Zytokeratinen CAM 5.2 (Becton Dickinson, USA) und KL-1(Immunotech, Frankreich)) durchgeführt. Als positiv wurde die Reaktion beim Vorhandensein einer metastatischen Zelle unter 1 Mio. Myelokariozyten geschätzt. Bei der Verwendung von MKA zu Zytokeratinen werden die metastatischen Zellen unter den Myelokariozyten wegen heller spezifischer zytoplasmatischer Fluoreszenzleuchtens leicht aufgefunden.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

23 Patientinnen (43,4%) hatten Fertilitätsalter, 8 Patientinnen (15,1%) hatten Perimenopause, 22 Patientinnen (41,5%) hatten Menopause.

Die häufigste histologische Variante war das Infiltratmilchgangkarzinom (39,6%). Es wird auch eine genug hohe Infiltratbrustdrüsenläppchenkarzinomhäufigkeit (32,1%) beobachtet. Andere histologische Formen (Misch-, tubuläres, medulläres, Gallert-, papilläres Karzinom) sind seltener.

Die bei der zytologischen Knochenmarkuntersuchung entdeckten Metastasen wurden als Makrometastasen bestimmt. Der Fachausdruck "Mikrometastasen" verwendeten wir bezüglich Metastasen, die mit der immunozytologischen Untersuchung aufgefunden wurden. Es ist zweifellos nur eine der Mikrometastasenabarten im weitesten Sinne des Wortes. Ursprünglich wurde mit dem Fachausdruck "Mikrometastasen" ein Tumorzellencluster mit Durchmesser unter 2 mm bestimmt, doch bei der immunozytologischen Untersuchung mit den monoklonalen Antikörpern gelingt es einzelne "okkulte" Karzinomzellen und nicht nur ihre Cluster aufzufinden. Auf der Abbildung 1 ist ein Komplex metastatischer Knochenmarkzellen beim Mammakarzinom sichtbar.



Abb. 1. Komplex metastatischer Knochenmarkzellen beim Mammakarzinom. Zytozentrifugepräparat. Färbung MKA KL-1. Vergrößerung beträgt 400

Bei zytologischer Standarduntersuchung wurden die Metastasen ins Knochenmark bei zwei von 53 Patientinnen (3,77%) aufgefunden. Bei einer dieser Patientinnen wurde das IV. klinische Stadium vor der Erkennung metastatischer Knochenmarkzellen entdeckt (T4N2M1- ein Lymphknotenkonglomerat in der Achselgegend, Metastasen in die Lymphknoten der Oberbauchgegend, paraaortale Lymphknoten, Leber). Bei einer anderen Patientin wurde das Ausgangsstadium der Krankheit als T2N0M0 (IIa) bestimmt, doch nach der zytologischen Erkennung der Metastasen ins Knochenmark wurde das Stadium

geändert auf IV. Stadium.

Die Verwendung der monoklonalen Antikörper CAM 5.2 und KL-1 bestätigte in allen Fällen Vorhandensein der zytologisch aufgefundenen Knochenmarkmetastasen und erhöhte bedeutend die Häufigkeit ihrer Erkennung bei der immunomorphologischen Untersuchung. Die Ergebnisse aller Untersuchungen wurden in der Abhängigkeit von der Empfindlichkeit des Verfahrens geschätzt. Zur ersten Patientinnengruppe mit den Mikrometastasen gehörten die Patientinnen, in deren Knochenmark eine (oder mehr) Tumorzelle in 1 Mio. Myelokariozyten aufgefunden wurden. Bei der Verwendung dieses Kriteriums wurden die Mikrometastasen bei 24 Patientinnen (45,3%) gefunden. Eine Reihe der Wissenschaftler sind der Meinung, dass eine Grenzturnorbelastung 10 bösartige Zellen beträgt und zeigen, dass bei solcher Anzahl metastatischer Knochenmarkzellen die Möglichkeit der Fernmetastasenbildung bedeutend zunimmt. Deshalb gehörten zur zweiten Gruppe die Patientinnen mit 10 und mehr Tumorzellen in 1 Mio. Myelokariozyten. Bei der Grenzmenge 10 Zellen wurden die Mikrometastasen in 11 Fällen (20,75%) aufgefunden. Die Häufigkeit des Auffindens der Mammakarzinommetastasen ins Knochenmark bei der Verwendung der zytologischen Standardmethode und immunozytologischen

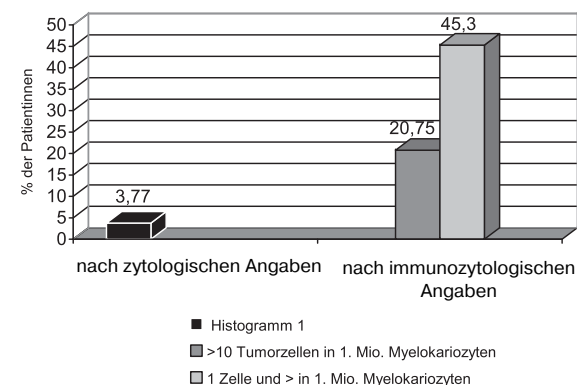


Abb. 2. Die Häufigkeit des Auffindens der Mammakarzinommetastasen ins Knochenmark bei der Verwendung der zytologischen und immunozytologischen Methoden bei den Mammakarzinompatientinnen

Methode mit monoklonalen Antikörpern ist auf der Abbildung 2 gezeigt.

Es ist wichtig, dass in unserer Untersuchung die Anzahl der Tumorzellen, die mit immunozytologischer Methode aufgefunden wurden, sehr klein ist: von 1 bis 12 Zellen in 1 Mio. Myelokariozyten. Nur zwei von 28 Patientinnen hatten 20 immunozytologisch aufgefundenen Tumorzellen, eine Patientin hatte 45 Tumorzellen in 1 Mio. Myelokariozyten. Die Möglichkeit der Erkennung einzelner Tumorzellen ist ein Hauptgrund grösserer Empfindlichkeit der immunozytologischen Methode (im Vergleich zu zytologischen Methode) und ihr Hauptvorteil.

Wir haben die Verbindung zwischen dem Vorhandensein der Tumorzellen im Knochenmark und einigen klinischen und Laborangaben, biologischen Merkmalen der Primärtumors, Schädigung der Lymphknoten, anderen Merkmalen der Verbreitung des Tumorprozesses analysiert.

Die Verbindung zwischen der ovarial-menstrualen Funktion und dem Metastasieren des Memmakarzinoms ins Knochenmark war sicher ($p = 0,031$). Die mittlere Anzahl der metastatischer Zellen im Knochenmark der Patientinnen im Fertilitätsalter war drei mal höher als die der Patientinnen im Menopausealter (6,97 2,2 und 2,26 0,7 entsprechend).

Die Patientinnen mit rezeptornegativem Tumor (nach den östrogenenrezeptoren) hatten die Metastasen ins Knochenmark in 62,1 % Fällen, und die mit rezeptorpositivem

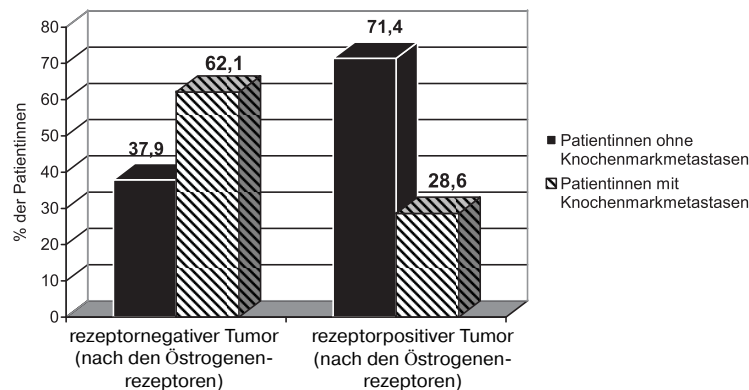


Abb. 3. Verteilung der Mammakarzinompatientinnen in der Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorenstatus im Tumor und immunozytologischen Auffinden der Mikrometastasen ins Knochenmark

Tumor in 28,6 % Fällen ($p = 0,039$) (Abbildung 3)

Es wurde eine sichere Verbindung zwischen dem negativen Progesteronrezeptorenstatus des Tumors und dem Metastasieren des Mammakarzinoms ins Knochenmark bestimmt. Beim negativen Progesteronrezeptorenstatus des Tumors wurden die Metastasen in 76,9 %

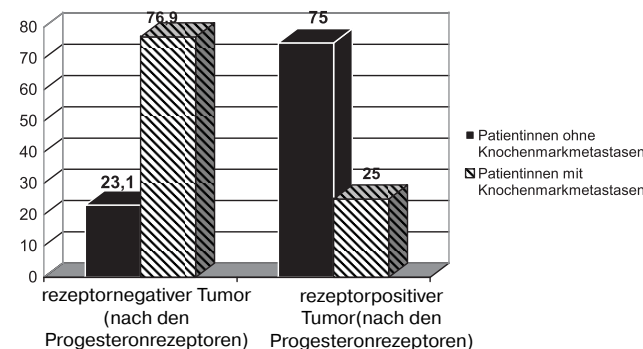


Abb. 4. Verteilung der Mammakarzinompatientinnen in der Abhängigkeit vom Progesteronrezeptorenstatus im Tumor und Erkennung der Mikrometastasen ins Knochenmark

Fällen aufgefunden und bei den Patientinnen mit positivem Progesteronrezeptorenstatus des Tumors — drei mal seltener — in 25 % Fällen (Abbildung 4).

Beim Fehlen der östrogenen- und Progesteronrezeptoren (Rö-RP-) im Tumor hatten 84,6 % der Patientinnen im Knochenmark die Mammakarzinommetastasen. Die mittlere Anzahl der bösartigen Zellen im Knochenmark mit Tumor Rö-RP- war 6,4 mal höher als die der metastatischen Zellen, die bei den Patientinnen mit rezeptorpositivem Tumor nach den östrogenen- und Progesteronrezeptoren aufgefunden werden. So ist das Vorhandensein metastatischer Mammakarzinomzellen im Knochenmark mit negativem Status des Tumors nach den östrogenen- und Progesteronrezeptoren verbunden.

In der Gruppe der Patientinnen mit dem Vorhandensein einer (oder mehrer) Tumorzelle in 1 Mio. Myelokariozyten wurde eine statistisch sichere Verbindung zwischen rundzelliger Infiltration und Mikrometastasen festgestellt. Unter rundzelliger Infiltration meint man die Infiltration des Tumors von Lymphozyten, Makrophagen, Plasmazellen. Unter den Patientinnen mit ausgeprägter rundzelliger Infiltration des Tumors (++ und +++) wurden die bösartigen Knochenmarkzellen bei 83,3 % Patientinnen und unter den Patientinnen mit mässiger bzw. schwacher rundzelliger Infiltration des Tumors bei 58,3 % und 33,3 % Patientinnen entsprechend aufgefunden.

In der Gruppe der Patientinnen mit 10 (und mehr) bösartigen Zellen wird die Verbindung zwischen rundzelliger Infiltration des Tumors und Mikrometastasieren ins Knochenmark genauer ($p = 0,001$) bestimmt. Die Tumorzellen im Knochenmark wurden bei 4,8 % der Patientinnen mit schwacher rundzelliger Infiltration des Tumors, bei 33,3 % der Patientinnen mit mässiger rundzelliger Infiltration des Tumors und 66,7 % der Patientinnen mit ausgeprägter rundzelliger Infiltration des Tumors aufgefunden.

Die immozytologisch entdeckten Mikrometastasen betragen von 40 % bis 62,5 % vom I. bis IV. Stadium, d.h. der Anteil wuchs mit Vergrösserung des Stadiums. Die höchste Häufigkeit der Bestimmung von Metastasen und die höchste mittlere Anzahl der

Tumorzellen im Knochenmark wird im IV. Erkrankungsstadium ($7,2 \text{ Zelle} \pm 3,5$) bestimmt, die kleinsten Kennziffern entsprechen dem IIIa. Stadium (0), was vielleicht mit kleiner Anzahl der Patientinnen in dieser Gruppe verbunden war.

In unserer Untersuchung haben wir keine Unterschiede der Häufigkeit der Erkennung der Mikrometastasen beim Infiltratmilchgangankarzinom (57,1%) und Infiltratbrustdrüsenläppchenkarzinom (58,8%) bestimmt.

Es wurde keine statistisch sichere Verbindung zwischen der Häufigkeit des Auffindens der Mikrometastasen ins Knochenmark und der Primärherdgrösse in der Brustdrüse, dem Grad der Tumorbösartigkeit, dem Grad seiner Differenzierung, dem Auffinden der Komplexe bösartiger Zellen in den Lymphspalten der Brustdrüse, der Tumornekrose, den mammographischen Merkmalen der Verbreitung des Tumorprozesses sowie der Lokalisierung des Tumors in der Brustdrüse gefunden.

Es war interessant das Vorhandensein der Korrelation zwischen den Metastasen ins Knochenmark und dem Lymphknotenstatus bei den Mammakarzinompatientinnen zu schätzen.

In unserer Untersuchung fehlte die Verbindung zwischen dem Mikrometastasieren des Mammakarzinoms ins Knochenmark und dem Vorhandensein lymphogener Metastasen in regionale Lymphknoten (sowie dem N-Index, dem Vorhandensein der Konglomeraten, der Anzahl der von Metastasen geschädigten Lymphknoten, dem Tumorwachstum in der Lymphknotenkapsel). Bei jedem N-Index betrug die Häufigkeit des Auffindens der Mikrometastasen zirka von 52 % bis 53 %. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen unserer Meinung nach die Hypothese, dass lymphogene und hematogene Metastasierenswege unabhängig und gleichwertig seien und die Tumorzellen in den Blutfluss ohne Axillarlymphknoten gelangen können.

Es wurden bei der Analyse der Ergebnisse der Radioisotopuntersuchung des Knochens in der untersuchten Patientinnengruppe keine sichere Verbindung zwischen der Häufigkeit des Auffindens der Knochenmarkmikrometastasen und spezifischer Schädigung nach szintigraphischen Angaben gefunden. In der Patientinnengruppe mit dem Vorhandensein der Tumorzellen im Knochenmark wurden die szintigraphischen Angaben über die Knochenschädigung zwei mal öfter registriert, doch waren die Ergebnisse statistisch nicht sicher.

Die immunozytologische Detektion der Tumorzellen im Knochenmark sowie röntgenographisches Auffinden der Knochenmetastasen waren in keiner Gruppe verbunden.

Wir haben die Blutbildung bei den Patientinnen mit den Makrometastasen, Mikrometastasen und ohne hämatogene Dissemination untersucht. Zwei Patientinnen mit den Mammakarzinommakrometastasen ins Knochenmark, die mit der zytologischen und immunozytologischen Untersuchung bestätigt wurden, hatten eine ausgeprägte Reaktion des Blutbildungssystems als Knochenmarkhypoplasie. Der Myelokariozyten- und Megakariozytengehalt im Knochenmark beider Patientinnen war niedrig: eine Patientin hatte relativ beibehaltene granulozytaren und erythroiden Keime, doch unter en Zellen der roten Reihe herrschten oxyphile Formen (24 %, $N = 0,8-5,6$ %) vor. Andere Patientin hatte den erythroiden Keim, durch einzelne Zellen (4,9 %, $N = 14,5 = 26,5$ %) vorgestellt, das leuko-erythroblastisches Verhältnis (15,0, $N = 2,1 = 4,5$) war bedeutend

vergrössert, Neutrophilenreifungsindex war kleiner, die Anzahl der Monozyten und Lymphozyten war grösser.

In der Gruppe der Patientinnen mit den Mikrometastasen wird die Erniedrigung der Zelligkeit des Knochenmarkes zwei mal öfter (53,6 %) als bei den Patientinnen ohne metastatische Knochenmarkschädigung (28 %) beobachtet.

Indirekte Merkmale des Vorhandenseins der Tumorzellen im Knochenmark können die Ansammlungen von drei bis fünf Plasmazellen sowie das Auffinden grosser Zellen mit dem Hyperchromkern und zahlreichen Nukleolen, die sich von normalen Knochenmarkzellen unterscheiden, sein.

Die Ansammlungen von Plasmazellen sind für ein normales Myelogramm nicht typisch. 100 % der Patientinnen, in deren Punktaten die Ansammlungen von Plasmazellen beobachtet werden, haben die immunozytologisch gefundenen Mikrometastasen ins Knochenmark. So wird eine sichere Verbindung zwischen dem Vorhandensein der Ansammlungen von Plasmazellen im Knochenmark und dem Auffinden der Mikrometastasen ($p = 0,001$) festgestellt.

Bei den Patientinnen mit immunozytologisch festgestellten Metastasen im Knochenmark werden die Änderungen aller Hauptarten der Zellen, die sich an der Sicherung von Immunozytopoese beteiligen, aufgefunden: Monozyten und Lymphozyten sowie Plasmazellen. Monozyten- und Lymphozytengehalt im Knochenmark ist beim Vorhandensein der Mikrometastasen erhöht. So wurde die Monozytenmengenerhöhung vier mal öfter bei den Patientinnen mit Tumorschädigung des Knochenmarkes als bei den Patientinnen ohne Metastasen beobachtet. Durchschnittswert betrug entsprechend 2,3 und 1,7 ($p < 0,05$).

Lymphozytengehalt im Knochenmark bei den Patientinnen mit Mikrometastasen war sicher höher als bei fehlender Tumorschädigung des Knochenmarkes (entsprechend $13,9 \pm 0,98$ und $10,7 \pm 0,5$) ($p < 0,01$). Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass die Lymphozytengelderhöhung relativ war.

Es wurde auch eine statistisch sichere Erhöhung des leuko-erythroblastischen Verhältnisses ($5,4 \pm 1,07$) in der Patientinnengruppe mit zehn (und mehr) Tumorzellen unter 1 Mio. Myelokariozyten im Vergleich zu den Patientinnen ohne Mikrometastasen ($3,78 \pm 0,2$), $p < 0,05$ festgestellt.

Man kann annehmen, dass ähnliche Änderungen die früheste Form der Knochenmarkreaktion auf Vorhandensein einzelner Tumorzellen sei.

In den Analysen des peripheren Blutes sind keine statistisch sichere Unterschiede im Erythrozyten-, Leukozyten-, Thrombozyten-, Hämoglobin-, Hämatokritgehalt und in anderen Blutkennziffern bei den Patientinnen mit den Mammakarzinommikrometastasen ins Knochenmark und bei den Patientinnen ohne seine metastatische Schädigung gefunden.

Die von uns gezeigten Angaben bestätigen die Notwendigkeit der Überleitung in die klinische Praxis der immunomorphologischen Knochenmarkuntersuchung, besonders auf frühen Mammakarzinomstadien, für die Schätzung des Verbreitungsgrades des Tumorprozesses.

Die Anwendung der immunozytologischen Methode mit den monoklonalen Antikörpern zu Zytokeratinen CAM 5.2 und KL-1 gibt gewisse Vorteile bei der Erkennung einzelner Tumorzellen im Knochenmark der Mammakarzinompatientinnen,

was ein der wichtigsten Kriterien für Prognose und für eine Indikation der Adjuvantchemotherapieverordnung sein könnte.

Bibliographie:

1. *Berenson D. G., Koloskow A. W., Tarassow W. A.* Knochenmarkschädigung von soliden Tumoren. // Hämatologie und Transfusiologie — 2000 — Band 45 — Nr. 5 — Seite 35 — 38. (In Russian)
2. *Worobjow A. I.* Leitung in der Hämatologie // Moskau — 1985 — Band 1 — Seite 362. (In Russian)
3. *Davidov M. I., Axel E. M.* //Bösartige Neubildungen in Russland und anderen Ländern im Jahre 2003 // Moskau — 2005 — Seite 3 — 77. (In Russian)
4. *Braun S., Pantel K.* Prognostic significance of micrometastatic bone marrow involvement. // Breast Cancer Res. Treat. — 1998 -Nov. — 52 (1/3) — P. 201 — 216.
5. *Come S. E., Schnipper L. E.* Bone marrow metastases. // In Marrow M., Schnitt F. et al. (eds.): The breast cancer. — Philadelphia — New-York — 1995 — P. 847 — 853.
6. *Delsol G., Gatter K.C., Stein H.* et al. Human lymphoid cells express epithelial membrane antigen. // Lancet. — 1984 — Nov. — Vol.2 — P. 1124-1128.
7. *Fisher B.* Biological and clinical considerations regarding the use of surgery and chemotherapy in the treatment of primary breast cancer. // Cancer. — 1977- Vol.40 — P. 574-587.
8. *Harbeck N., Untch M., Pache L., Eiermann W.* Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up. // Br. J. Cancer — 1994 — Vol.69 — P. 566 — 571.
9. *Heyderman E., Macartney J. C.* Epithelial membrane antigen and lymphoid cells. // Lancet. — 1985 — Jan.12 — Vol.1 — P. 109.
10. *Janni W., Rjosk D., Braun S.* Clinical relevance of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with different stages of breast cancer. // Clin. Breast Cancer. — 2000 — Oct. — Vol. 1 — Nr. 3 — P. 217–225.
11. *Janni W., Strobl B., Rack B., Rjosk D., Schindlbeck C., Hantschmann P., Kentenich C., Sigg W., Zerzer M., Sommer H.* The influence of the hemoglobin concentration on the hematogenous tumor cell dissemination at the time of the initial diagnosis of breast cancer. // Dtsch. Med. Wochenschr. — 2002 — Jan. 18 — Vol. 127 — Nr. 3 — P. 71–77.
12. *Smedts F., Ramackers F., Robben H.* et al. Changing patterns of keratin expression during progression of cervical intraepithelial neoplasia. // Am. J. Pathol. — 1990 — Vol.136 — Nr. 3 — P. 657–667.