

# ДИССЕМИНИРОВАННЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ВЫЯВЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ВЗАИМОСВЯЗЬ С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ДАННЫМИ

**Т. А. Григорьева<sup>2,3</sup>, И. К. Воротников<sup>1</sup>, Н. Н. Тупицын<sup>1</sup>, В. Ю. Сельчук<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва

<sup>2</sup> Медицинская клиника «Врач рядом», Москва

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России, Москва

**Введение.** Распространение метастазов при раке молочной железы является основной причиной смертности от рака. Диссеминированные опухолевые клетки (ДОК) в костном мозге могут оставаться в спящем состоянии в течение длительного периода. Детекция микрометастазов рака молочной железы в костном мозге может способствовать более точному стадированию опухоли и определению адекватной лечебной тактики у данной категории больных.

**Цель исследования:** изучить возможность диссеминации ДОК в КМ больных РМЖ, а также оценить взаимосвязь с клинико-морфологическими параметрами.

**Материалы и методы.** Иммунологическое и морфологическое исследование проводилось в лаборатории иммунологии гемопоэза на 60 образцах костного мозга больных раком молочной железы. Иммунологическое исследование и выявление ДОК выполнено проточно-цитометрическим методом (FACSCANTO II). Морфологическая оценка костного мозга проводилась морфологами с использованием световой микроскопии.

**Результаты.** Изменения при метастатическом поражении костного мозга больных раком молочной железы были представлены сниженным содержанием базофильных нормобластов, моноцитов, а также достоверным более низким уровнем активированных зрелых Т-клеток и несколько более высоким содержанием CD4+CD25+ клеток.

**Заключение.** Гематогенное распространение рака молочной железы — процесс ранний и сопряжен с целым рядом структурно-функциональных изменений в отношении как гемопоэза, так и иммунопоэза. Обнаружена взаимосвязь поражения КМ с клинико-морфологическими данными. Частота поражения КМ составила 21,5 %. При инфильтративном протоковом раке выше частота поражения ДОК в КМ больных раком молочной железы. Эти изменения при метастатическом поражении костного мозга заключались в более низком уровне базофильных нормобластов, моноцитов, а также достоверном снижении процента активированных зрелых Т-клеток и несколько более высоком содержании CD4+CD25+ клеток.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, диссеминированные опухолевые клетки, метастазирование, иммунные клетки и иммунотерапия

## DISSEMINATED TUMOR CELLS IN BREAST CANCER: IDENTIFICATION, CHARACTERISTICS AND RELATIONSHIP WITH CLINICAL AND MORPHOLOGICAL FINDINGS

**T. A. Grigorieva<sup>2,3</sup>, I. K. Vorotnikov<sup>1</sup>, N. N. Tupitsyn<sup>1</sup>, V. Yu. Selchyuk<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Institution "N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

<sup>2</sup> Medical Clinic " Doctor Nearby"

<sup>3</sup> Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Russian University of Medicine" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

**Introduction.** Metastases dissemination in breast cancer is a major cause of cancer – related mortality. Disseminated tumour cells (DTCs) in bone marrow (BM) can remain dormant for a long period. Detection of breast cancer micrometastases in

the bone marrow can contribute to more accurate tumour staging and to the determination of adequate therapeutic strategy in this category of patients.

**Objective of the study** is to investigate the possibility of dissemination of tumour cells (DTCs) in bone marrow (BM) in breast cancer patients and to evaluate the relationship with clinical and morphological parameters.

**Materials and Methods.** Immunological and morphological studies were performed at the Laboratory of Haematopoiesis Immunology on 60 bone marrow samples obtained from breast cancer patients. Immunological examination and identification of disseminated tumour cells (DTCs) was carried out using flow cytometry technique (FRASCANTO II). Morphological evaluation of bone marrow was conducted by morphologists using light microscopy.

**Results.** In metastatic bone marrow lesions of breast cancer patients changes were represented by a reduced content of basophilic normoblasts, monocytes, as well as by significantly lower levels of activated mature T-cells and a slightly higher content of CD4+CD25+ cells.

**Conclusions.** Haematogenous spread of breast cancer is an early process and it is associated with a number of structural and functional changes in both haematopoiesis and immunopoiesis. The correlation between bone marrow (BM) lesion and clinical and morphological data has been found. The rate of bone marrow (BM) lesion was 21,5%. The incidence of disseminated tumor cell (DTCs) lesion in bone marrow (BM) of breast cancer patients is higher in patients with invasive ductal cancer. In bone marrow metastatic lesion these changes were manifested a lower content of basophilic normoblasts, monocytes, as well in significantly reduced percentage of activated mature T-cells and a slightly higher content of CD4+CD25+ cells.

**Keywords:** breast cancer; disseminated tumour cells; metastasis; immune cells and immunotherapy

## Введение

Исследования микрометастазов в костном мозге при раке проводятся довольно давно. При раке молочной железы установлено, что опухолевые клетки в костном мозге обнаруживаются уже на ранних стадиях [1, 2, 3]. Эти клетки могут находиться в так называемом дремлющем состоянии, быть нечувствительны к методам лекарственного воздействия и спустя годы давать начало новым метастатическим очагам [4, 5]. По этой причине иммунная система костного мозга в последнее время является предметом активного изучения.

Основной задачей экспериментальной и клинической онкологии является решение проблемы метастазирования рака, что является главной причиной гибели больных со злокачественными опухолями. На сегодняшний день оценка гематогенного метастазирования отражена в международной TNM классификации (M0i+), что означает наличие изолированных диссеминированных опухолевых клеток или микрометастазов (лимфатические узлы или костный мозг) размерами не более 0,2 мм. В костном мозге диссеминированные опухолевые клетки встречаются довольно часто, могут персистировать годами и быть единственным признаком остающейся в организме опухоли [6].

Гематогенное метастазирование — сложный, динамический, многоэтапный процесс, который

протекает с вовлечением костного мозга, служащего своего рода резервуаром для диссеминированных опухолевых клеток. Изучению проблемы гематогенного метастазирования в костный мозг при раке молочной железы посвящено немало клинических исследований. По данным отечественных и зарубежных авторов, у 30–50 % больных раком молочной железы обнаруживаются микрометастазы в костном мозге, в т. ч. на ранних стадиях опухоли [7, 8, 9, 10, 11]. Сообщается, что наличие в костном мозге диссеминированных опухолевых клеток при раке молочной железы является независимым фактором неблагоприятного прогноза. Два крупных метаанализа установили, что наличие диссеминированных опухолевых клеток у пациенток с неметастатическим раком молочной железы коррелирует с ранним рецидивом и низкой выживаемостью [12, 13].

Для подтверждения прогностической значимости микрометастазов костного мозга на симпозиуме по раку молочной железы в Сан-Антонио был представлен большой объединенный анализ (PADDY) [14]. Данные 10 307 пациенток из 11 учреждений Европы и США были включены в исследование. В 2814 (27,3 %) случаях обнаружены диссеминированные опухолевые клетки в костном мозге. Наибольший процент выявления поражения костного мозга оказался среди группы пациенток с большей опухолевой мас-

сой (большой размер первичной опухоли, метастатическое поражение лимфатических узлов,  $p < 0,001$ ) или более агрессивной опухолью (не экспрессирующие рецепторы эстрогена и прогестерона, HER2-позитивные, с высокой степенью злокачественности,  $p < 0,001$ ). Обнаружение диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге было достоверно связано с ухудшением прогноза (многофакторный анализ): медиана наблюдения 7,6 года, соотношение риска (HR; 95 % ДИ) составило 1,23 (1,06–1,43;  $p < 0,006$ ) для общей выживаемости и 1,30 (1,12–1,52,  $p < 0,001$ ) для безрецидивной выживаемости [15].

Наблюдалась статистически значимая взаимосвязь между молекулярно-биологическим подтипом опухоли и поражением костного мозга ( $p = 0,014$ ). Прогностическая значимость особенно выражена при экспрессирующем рецепторе эстрогена и прогестерона, HER2-отрицательном подтипе рака молочной железы. В работе Nel Ivonne и соавт. отмечено, что количество диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге при данном люминальном подтипе рака выявлено в 2 раза больше [16].

Кроме того, в нескольких исследованиях установлено, что диссеминированные опухолевые клетки обнаруживаются у пациенток с преинвазивным раком молочной железы (с протоковой карциномой *in situ*) [17, 18].

Доклинические данные свидетельствуют о том, что неоадьювантная химиотерапия может способствовать микрометастатическому поражению костного мозга. В своей работе Volmer, L. и соавт. изучили частоту поражения костного мозга у 809 больных раком молочной железы ранних стадий на фоне химиотерапии [19]. Частота выявления диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге после неоадьювантной химиотерапии составила 45,4 % по сравнению с 19,9 % в группе адьювантной химиотерапии ( $p < 0,001$ ). Вместе с тем обнаружение в костном мозге более чем двух диссеминированных опухолевых клеток (на  $1,5 \times 10^6$  клеток костного мозга) после неоадьювантной химиотерапии достоверно коррелировало с ухудшением общей и безрецидивной выживаемости.

Таким образом, накопленные на сегодняшний день клинические данные свидетельствуют

о высокой прогностической значимости микрометастазов в костном мозге у больных раком молочной железы. В этом контексте безусловно важным является подробное изучение морфоиммунологических особенностей костного мозга с целью совершенствования лечебных стратегий рака молочной железы.

**Цель исследования:** оценить клинико-морфологические, иммунологические характеристики при наличии микрометастазов в костном мозге у больных раком молочной железы, проанализировать взаимосвязь микрометастазов костного мозга с морфологическими характеристиками опухоли, показателями миелограмм, иммунологическими параметрами костного мозга.

**Материалы и методы.** В нашем исследовании представлены данные 60 больных раком молочной железы. Все пациентки проходили обследование и получали лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России с 2010 по 2014 г. Критерием включения в исследование был диагноз РМЖ I–III стадии, отсутствие лечения в анамнезе, согласие больной на стерильную пункцию. Костный мозг получен путем пункции грудины, которая выполнялась в операционной перед оперативным вмешательством. При анализе микрометастазов использовались моноклональные антитела BD Pharmingen Biosciences: 1) FITC Mouse Anti-Human CD45 (к общелейкоцитарному антигену); 2) Anti-EpCam PE (к эпителиальному антигену). Опухолевые клетки в костном мозге выявлялись по отсутствию экспрессии панлейкоцитарного антигена CD45 в сочетании с экспрессией EpCam (пороговый уровень: 1 клетка на 10 млн миелокариоцитов). Статистическая обработка данных проведена с помощью пакета программ SPSS 17 и включала корреляционный анализ, сравнение средних.

**Результаты и обсуждение.** Нами обследовано 60 больных раком молочной железы на наличие микрометастазов в костном мозге. В исследуемую группу с диагнозом РМЖ вошли женщины возрасте 25–74 лет, средний возраст составил 54 года. У 14 больных (21,5 %) обнаружены диссеминированные опухолевые клетки. Проанализирована взаимосвязь микрометастазов костного мозга с морфологическими характеристиками опухоли, показателями миелограмм, иммунологическими параметрами костного мозга.

Таблица 1

**Частота обнаружения диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге в зависимости от гистологического типа рака молочной железы**

Гистологический тип	Диссеминированные опухолевые клетки		Итого
	Не обнаружены (% в столбце)	Обнаружены (% в столбце)	
Инвазивный протоковый рак	34 (73,9)	9/14 (64,3)	43 (71,7)
Инвазивный дольковый рак	6 (13,0)	3/14 (21,4)	9 (15,0)
Смешанный рак	2 (4,3)	1 /14 (7,1)	3 (5,0)
Тубулярный рак	1 (2,2)	1 /14 (7,1)	2 (3,3)
Слизистый рак	1 (2,2)	0 (0)	1 (1,7)
Рак Педжета	1 (2,2)	0 (0)	1 (1,7)
Инвазивный метапластический	1 (2,2)	0 (0)	1 (1,7)
Итого	46	14	60

Оценка связи микрометастазов костного мозга с гистологическим видом опухоли представлена в табл. 1.

Наибольшее количество больных составили по двум гистологическим подгруппам: инфильтративно-протоковый и инфильтративно-дольковый рак молочной железы. Остальные гистологические варианты встречались реже.

Следующим этапом нашей работы стало сравнение двух гистологических подтипов рака молочной железы: инфильтративный протоковый с инфильтративным дольковым. Мы сравнили частоту наличия диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге при ИПР и ИДР.

Обращает на себя внимание более низкая частота инфильтративно-дольковых раков при сравнении с инфильтративно-протоковым раком, однако в силу разницы в численности групп взаимосвязь не является достоверной.

Мы также оценили связь ДОК с размером опухоли (индекс pT) и тоже не отметили статистически значимых различий,  $p = 0,722$ .

Не выявлено статистически достоверных различий и в частоте обнаружения ДОК в зависимости от поражения лимфатических узлов (N),  $p = 0,522$ .

Анализ морфологического состава КМ больных РМЖ показал, что при отсутствии метастазов в регионарных лимфатических узлах сумма клеток эритроидного роста была выше:  $16,0 \pm 1,19 \%$  при N0 против  $12,8 \pm 1,17 \%$  при N1. Также наблюдалось увеличение числа полихроматофильных нормобластов,  $8,50 \pm 0,69 \%$  и  $6,5 \pm 0,56 \%$  соответственно ( $p = 0,02$ ).

Нами не установлено взаимосвязи между частотой ДОК в костном мозге больных раком молочной железы и стадией заболевания,  $p = 0,568$ ,

Таблица 3

**Частота обнаружения диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге в зависимости от размера первичной опухоли (pT)**

Размер опухоли (pT)	Диссеминированные опухолевые клетки		Итого
	Не обнаружены, n (абс.)	Обнаружены, n (абс.)	
T1	21	7	28 (46,7 %)
T2	23	7	30 (50 %)
T3	2	0	2 (4,3 %)
<b>Итого</b>	<b>46</b>	<b>14</b>	<b>60 (100 %)</b>

Таблица 2

**Сравнение частоты обнаружения диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге в зависимости от гистологического типа рака молочной железы**

Гистологический тип опухоли	Диссеминированные опухолевые клетки		Итого
	Не обнаружены, n (абс.)	Обнаружены, n (абс.)	
ИПР	34	9	43 (82,7 %)
ИДР	6	3	9 (17,3 %)
Итого	40	12	52 (100 %)

Таблица 4

Частота обнаружения диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге в зависимости от статуса лимфатических узлов (N)

N	Не обнаружены ДОК, n (абс.)	Обнаружены ДОК, n (абс.)	Итого, абс. (%)
N0	34	9	43 (71,7%)
N1	9	5	14 (23,3 %)
N2	2	0	2 (3,3 %)
N3	1	0	1 (1,7 %)
<b>Итого</b>	<b>46</b>	<b>14</b>	<b>60 (100 %)</b>

и ассоциации рецепторного статуса с наличием ДОК в костном мозге больных раком молочной железы также не наблюдалось: рецепторы эстрогенов  $p = 0,982$ ; рецепторы прогестерона  $p = 0,776$ ; Her2/neu –  $p = 0,613$ .

Не наблюдалось и взаимосвязи ДОК со степенью злокачественности опухоли ( $p = 0,325$ ), индексом пролиферативной активности Ki-67,  $p = 0,442$ .

Достоверной связи с молекулярным подтипом опухоли также выявлено не было,  $p = 0,992$ .

Мы исследовали субпопуляционный состав лимфоцитов костного мозга при инфильтративно-протоковом раке молочной железы (ИПР) и инфильтративно-дольковом (ИДР).

Как видно из таблицы, при инфильтративно-протоковом раке соотношение CD4/CD8 было ниже:  $0,77 \pm 0,06$  против  $1,05 \pm 0,20$ ,  $p = 0,09$ . Кроме того, обращал внимание более высокий уровень субпопуляции CD10+CD19+ В-лимфоцитов при инфильтративно-протоковом раке:  $16,6 \pm 3,03$  % против  $8,67 \pm 2,87$  %,  $p = 0,06$ . Аналогично отмечено увеличение содержания субпопуляции CD19+CD5+ лимфоцитов при инфильтративно-протоковом раке:  $14,3 \pm 2,93$  % против  $7,36 \pm 2,59$  %, различия близки к достоверным,  $p = 0,09$ .

Нами проведено сравнение средних значений содержания различных клеточных типов, индексов миелограмм в группах больных с отсутствием ДОК в костном мозге и с наличием ДОК.

Как видно из представленных в таблице данных, достоверные различия получены в отношении моноцитов, базофильных нормобластов. В группе больных с наличием ДОК в костном мозге отмечено снижение процента моноцитов, базофильных нормобластов.

Таблица 5

Субпопуляционный состав лимфоцитов костного мозга в зависимости от гистологического типа рака молочной железы: ИПР и ИДР

Субпопуляция лимфоцитов	Подтипы	N	Среднее	Стд. ошибка среднего	p
CD3+HLA-DR+	ИПР	30	11,1	2,06	0,7
	ИДР	8	9,75	3,48	
CD3	ИПР	31	59,2	1,89	0,6
	ИДР	8	57,1	4,40	
CD4	ИПР	31	33,9	1,98	0,1
	ИДР	8	28,1	3,78	
CD8+HLA-DR+	ИПР	30	13,0	3,01	0,9
	ИДР	8	13,6	5,50	
CD8+	ИПР	31	49,5	2,91	0,4
	ИДР	8	42,7	7,91	
CD3-CD16+	ИПР	16	15,5	1,87	0,6
	ИДР	6	12,9	4,34	
TCRalpha	ИПР	2	89,9	5,05	0,3
	ИДР	1	76,1		
CD56	ИПР	20	17,7	1,98	0,2
	ИДР	6	12,4	3,48	
CD56+CD3-	ИПР	17	14,6	1,75	0,3
	ИДР	6	10,7	3,67	
TCRgamma/delta	ИПР	20	4,93	0,76	0,5
	ИДР	5	6,04	1,66	
<b>CD4/CD8</b>	<b>ИПР</b>	<b>31</b>	<b>0,77</b>	<b>0,06</b>	<b>0,09</b>
	<b>ИДР</b>	<b>8</b>	<b>1,05</b>	<b>0,20</b>	
CD4+CD25+	ИПР	29	1,98	0,45	0,3
	ИДР	8	1,21	0,41	
CD19+	ИПР	29	14,1	1,35	0,7
	ИДР	8	12,7	3,23	
CD5+ от CD19+	ИПР	26	30,7	6,03	0,9
	ИДР	8	30,8	13,0	
<b>CD10+ от CD19+</b>	<b>ИПР</b>	<b>31</b>	<b>16,6</b>	<b>3,03</b>	<b>0,06</b>
	<b>ИДР</b>	<b>8</b>	<b>8,67</b>	<b>2,87</b>	
CD38+ от CD19+	ИПР	31	17,8	2,28	0,9
	ИДР	8	17,2	4,20	
<b>CD5+CD38+ от CD19+</b>	<b>ИПР</b>	<b>18</b>	<b>14,3</b>	<b>2,93</b>	<b>0,09</b>
	<b>ИДР</b>	<b>6</b>	<b>7,36</b>	<b>2,59</b>	

Аналогичным образом сравнили процентное содержание различных лимфоцитарных субпопуляций костного мозга в зависимости от наличия ДОК.

Установлено, что содержание активированных Т-клеток (CD3+HLA-DR+) в случаях отсутствия ДОК в костном мозге повышено:  $12,3 \pm 2,2$  %

Таблица 6

**Показатели миелограмм в зависимости от наличия в костном мозге диссеминированных опухолевых клеток**

Субпопуляция лимфоцитов	ДОК	N	Среднее	Стд. ошибка среднего	P
Клеточность	Нет	44	76,0	14,4	
	Есть	13	67,3	8,09	
Бласты	Нет	46	0,9	0,13	
	Есть	14	1,02	0,07	
Промиелоциты	Нет	46	0,31	0,11	
	Есть	14	0,27	0,04	
Миелоциты нейтрофильные	Нет	46	7,95	0,72	
	Есть	14	8,58	0,45	
Метамиелоциты нейтрофильные	Нет	46	7,07	0,48	
	Есть	14	7,48	0,43	
<b>Миелоциты эозинофильные</b>	Нет	46	0,19	0,047	<b>0,012</b>
	Есть	14	0,47	0,11	
Палочкоядерные нейтрофилы	Нет	46	22,7	0,99	
	Есть	14	22,2	0,83	
Сегментоядерные нейтрофилы	Нет	46	27,8	1,580	
	Есть	14	26,9	1,34	
Индекс созревания нейтрофилов	Нет	46	0,32	0,27	
	Есть	14	0,35	0,03	
<b>Моноциты</b>	Нет	46	3,44	0,27	<b>0,021</b>
	Есть	14	2,48	0,48	
Лимфоциты	Нет	46	11,4	1,00	
	Есть	14	13,0	0,94	
Плазмоциты	Нет	46	0,57	1,56	
	Есть	14	0,68	0,08	
<b>Нормобласты базофильные</b>	Нет	46	0,74	0,06	<b>0,009</b>
	Есть	14	0,45	0,07	
Нормобласты полихроматофильные	Нет	46	7,98	0,62	
	Есть	14	7,71	1,11	
Нормобласты оксифильные	Нет	46	6,59	0,51	
	Есть	14	6,04	0,68	
Сумма клеток эритроидного ряда	Нет	46	15,3	1,11	
	Есть	14	14,2	1,71	
Индекс созревания эритроцитов	Нет	46	0,95	0,008	
	Есть	14	0,96	0,01	
Лейкоэритроидное соотношение	Нет	46	10,3	4,24	
	Есть	14	5,84	0	

и  $6,3 \pm 5,6 \%$  ( $p = 0,04$ ). Количество В-клеток при обнаружении ДОК снижено:  $13,1 \pm 2,28 \%$  и  $17,5 \pm 2,6 \%$  ( $p = 0,03$ ). Близкие к достоверным различия отмечены в отношении субпопуляции CD4+CD25+ Т-клеток, количество которых было повышено при наличии в костном мозге ДОК.

Таблица 7

**Анализ средних значений субпопуляций лимфоцитов костного мозга в зависимости от ДОК статуса**

Субпопуляция лимфоцитов	ДОК	N	Среднее	Стд. Ошибка среднего	p
<b>CD3+HLA-DR+</b>	Нет	31	12,3	2,20	<b>0,044</b>
	Есть	11	6,36	5,64	
CD3	Нет	32	58,1	1,89	
	Есть	11	58,4	4,01	
CD4	Нет	32	31,6	1,70	
	Есть	11	40,6	2,50	
CD8+HLA-DR+	Нет	37	13,3	2,70	
	Есть	6	10,7	5,55	
CD8+	Нет	37	46,8	3,08	
	Есть	6	47,0	5,52	
CD3-CD16+	Нет	22	15,2	1,78	
	Есть	2	15,0	7,20	
CD56	Нет	25	17,7	1,80	
	Есть	4	12,3	3,70	
CD56+CD3-	Нет	23	14,0	1,64	
	Есть	2	14,6	7,55	
TCRgamma/delta	Нет	23	4,93	0,70	
	Есть	4	4,72	1,80	
CD4/CD8	Нет	37	0,84	0,07	
	Есть	6	0,90	0,15	
<b>CD4+CD25+</b>	Нет	29	1,42	0,25	<b>0,08</b>
	Есть	11	11,8	1,10	
<b>CD19+</b>	Нет	35	17,5	2,60	<b>0,03</b>
	Есть	6	13,1	2,28	
CD5+ от CD19+	Нет	32	27,9	5,62	
	Есть	5	41,0	16,0	
CD10+ от CD19+	Нет	37	14,2	2,53	
	Есть	6	18,8	8,05	
CD38+ от CD19+	Нет	37	16,5	1,94	
	Есть	6	22,6	5,54	
CD5+CD38+ от CD19+	Нет	24	12,5	2,38	
	Есть	4	7,06	1,74	

**Вывод**

Таким образом, морфо-иммунологический анализ костного мозга на данном этапе работы показал, что при ранних стадиях рака молочной железы в костном мозге выявляются диссеминированные опухолевые клетки. При этом наблюдаются изменения пропорции клеток в эритроидном и моноцитарном ростке костного мозга. Это проявляется снижением содержания базофильных нормобластов и моноцитов. Также наблюдаются и иммунологические особенности,

которые заключаются в достоверно более низком уровне содержания активированных зрелых Т-клеток и несколько более высоком проценте CD4+CD25+ клеток.

Далее нами выявлен ряд изменений, касающихся эритроидного роста костного мозга. Так, при отсутствии метастазов в регионарных лимфатических узлах сумма клеток эритроидного роста была выше при N0. Это наблюдалось за счет увеличения числа полихроматофильных нормобластов,  $8,50 \pm 0,69$  % и  $6,5 \pm 0,56$  % соответственно ( $p = 0,02$ ), что также прослеживалось и при анализе в зависимости от стадии рака молочной железы ( $p = 0,04$ ).

По результатам анализа не наблюдалось достоверных связей наличия диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге с гистологическим типом рака молочной железы, размером первичной опухоли, статусом лимфатических узлов, рецепторным статусом опухоли и ее молекулярно-биологическим подтипом. По литературным данным, достоверно более высокая частота обнаружения микрометастазов в костном мозге прослеживается при гормон-негативном статусе рака молочной железы, а также при распространенных стадиях опухоли, но при этом связи с метастазированием в регионарные лимфатические узлы не наблюдается [20, 21, 22]. Таким образом, наши результаты частично согласуются с данными других исследователей, а кроме того, подчеркивают, что метастатическое поражение костного мозга происходит уже на ранних стадиях рака молочной железы.

Оценка морфологически выявляемых типов костного мозга в зависимости от наличия микрометастазов обнаружила достоверно более высокие уровни моноцитов при отсутствии диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге ( $p = 0,021$ ). Кроме того, более высокими были уровни содержания базофильных нормобластов ( $p = 0,009$ ). Аналогичное изменение показателей эритропоэза отмечено и в работе Д. А. Рябчикова [21]. Интересно, что в других исследованиях при микрометастазах рака молочной железы отмечалось снижение

клеточности костного мозга и скопление в нем плазматических клеток [20, 21]. По всей вероятности, эти признаки больше характерны для распространенных стадий болезни, поскольку в нашей работе преобладали ранние стадии рака молочной железы (I–II), и поэтому наши результаты не противоречат литературным данным.

Изучение иммунологических характеристик костного мозга позволило установить также ряд особенностей. Прежде всего это касалось зрелых Т-клеток, а именно субпопуляции CD3+HLA-DR+ клеток, уровни содержания которой были достоверно вдвое выше при отсутствии в костном мозге диссеминированных опухолевых клеток:  $12,3 \pm 2,2$  % против  $6,3 \pm 5,6$  % ( $p = 0,04$ ). Близкие к достоверным различия наблюдались в отношении субпопуляции CD4+CD25+ клеток, количество которых было значительно выше при наличии в костном мозге микрометастазов рака молочной железы ( $p = 0,08$ ). По результатам исследования Д. А. Рябчикова, наличие поражения костного мозга сопровождается сниженными уровнями цитотоксических CD8+Т-клеток [21]. В нашей работе мы не наблюдали значимого изменения пропорции субпопуляции этих клеток, но вместе с тем отметим, что несколько меньше выглядело число CD8+HLA-DR+ клеток.

В совокупности результаты морфологического и иммунологического анализа костного мозга в зависимости от микрометастазов подтверждают, что гематогенное распространение рака молочной железы — процесс ранний и сопряжен с целым рядом структурно-функциональных изменений в отношении как гемопоэза, так и иммунопоэза.

### Заключение

Полученные в проделанной работе результаты, на наш взгляд, демонстрируют перспективность морфологического и иммунологического исследований костного мозга при раке молочной железы не только с научной, но и с практической точки зрения в связи с активным внедрением иммунотерапии в протоколы лечения онкологических больных.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. *Pantel, K.* Bone marrow as a reservoir for disseminated tumor cells: a special source for liquid biopsy in cancer patients / K. Pantel, C. Alix-Panabieres // *Bonekey Report*. — 2014. — V. 3. — P. 584. PMID: 25419458
2. *Pantel, K.* Differential expression of proliferation associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells / K. Pantel, G. Schlimok, S. Braun et al. // *Journal of the National Cancer Institute*. — 1993. — V. 85. — P. 1419–1424.
3. *Тупицын, Н. Н.* Циркулирующие и диссеминированные раковые клетки при раке молочной железы и раке яичников / Н. Н. Тупицын // *Онкогинекология*. — 2013. — № 1. — С. 12–18.
4. *Price, T. T.* Dormant breast cancer micrometastases reside in specific bone marrow niches that regulate their transit to and from bone / T. T. Price, M. L. Burness, A. Sivan et al. // *Science Translational Medicine*. — 2016. — V. 8. — 340ra73. PMID: 27225183
5. *Volmer, L.* Neoadjuvant Chemotherapy of Patients with Early Breast Cancer Is Associated with Increased Detection of Disseminated Tumor Cells in the Bone Marrow / L. Volmer, A. Koch, S. Matovina et al. // *Cancers*. — 2022. — V. 14(3). — P. 635. <https://doi.org/10.3390/cancers14030635>
6. *Тупицын, Н. Н.* Костный мозг онкологического больного: стадирование опухолей, гемопоэз, иммунная система / Н. Н. Тупицын // *Иммунология гемопоэза*. — 2/2018—1/2019. — Т. 16—17. — С. 10–15.
7. *Tabor S.* How to Predict Metastasis in Luminal Breast Cancer? Current Solutions and Future Prospects / S. Tabor, M. Szostakowska-Rodzios, A. Fabisiewicz et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2020. — V. 21. — P. 8415.
8. *Banys, M.* The role and clinical relevance of disseminated tumor cells in breast cancer / M. Banys, N. Krawczyk, T. Fehm // *Cancers*. — 2014. — V. 6. — P. 143–152. doi:10.3390/cancers6010143
9. *Крохина, О. В.* Микрометастазы рака молочной железы в костный мозг. Иммуноморфологическая диагностика: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.14 / Ольга Владимировна Крохина. — Москва, 2003. — 170 с. — (Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН (РОИЦ РАМН)).
10. *Рябчиков, Д. А.* Диссеминированные опухолевые клетки у пациентов с люминальным раком молочной железы / Д. А. Рябчиков, О. А. Безнос, И. А. Дудина и др. // *Российский биотерапевтический журнал*. — 2018. — Т. 17 (1). — С. 53–57.
11. *Tjensvoll, K.* Detection of disseminated tumor cells in bone marrow predict late recurrences in operable breast cancer patients / K. Tjensvoll, O. Nordgård, M. Skjæveland et al. // *BMC Cancer*. — 2019. — V. 19. — P. 1131. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6268-y>
12. *Braun, S.* A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer / S. Braun, F. D. Vogl, B. Naume // *N. Engl. J. Med*. — 2005. — V. 353. — P. 793–802.
13. *Janni, W.J.* Pooled Analysis of the Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer / W. J. Janni, B. Rack, L.W. Terstappen et al. // *Clinical Cancer Research*. — 2016. — V. 22. — P. 2583–2593.
14. *Banys-Paluchowski, M.* Circulating and Disseminated Tumor Cells in Breast Carcinoma: Report from the Consensus Conference on Tumor Cell Dissemination during the 39th Annual Meeting of the German Society of Senology, Berlin, 27 June 2019 / M. Banys-Paluchowski, T. Fehm, W. Janni et al. // *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. — 2019. — V. 79. — P. 1320–1327. doi:10.1055/a-1031-1120.
15. *Banys-Paluchowski, M.* Circulating and Disseminated Tumor Cells in Breast Carcinoma: Report from the Consensus Conference on Tumor Cell Dissemination during the 39th Annual Meeting of the German Society of Senology, Berlin, 27 June 2019 / M. Banys-Paluchowski, T. Fehm, W. Janni et al. // *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. — 2019. — V. 79. — P. 1320–1327. doi:10.1055/a-1031-1120.
16. *Nel, I.* Analysis of disseminated tumor cells (DTCs) in primary breast cancer patients with various molecular subtypes / I. Nel, L. Weydandt, A. Höhn et al. // *Journal of Clinical Oncology*. — 2021. — V. 39. — 15 suppl.
17. *Walter V. P., Taran F. A., Wallwiener M.* Abstract P1-01-16: Detection of disseminated tumor cells in DCIS patients impacts local recurrence. San Antonio Breast Cancer Symposium; December 5–9, 2017; San Antonio, Texas. *Cancer Res*. 2018 doi: 10.1158/1538-7445.SABCS17-P1-01-16
18. *Banys M., Hahn M., Gruber I.* Detection and clinical relevance of hematogenous tumor cell dissemination in patients with ductal carcinoma in situ. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;144:531–538
19. *Volmer, L.* Neoadjuvant Chemotherapy of Patients with Early Breast Cancer Is Associated with Increased Detection of Disseminated Tumor Cells in the Bone Marrow / L. Volmer, A. Koch, S. Matovina et al. // *Cancers*. — 2022. — V. 14(3). — P. 635. <https://doi.org/10.3390/cancers14030635>
20. Микрометастазы рака молочной железы в костный мозг. Иммуноморфологическая диагностика: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.14 / Крохина Ольга Владимировна. — Москва, 2003. — 170 с. — Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН (РОИЦ РАМН).



## Опухоли молочных желез

21. *Рябчиков, Д. А.* Диссеминированные опухолевые клетки у пациентов с люминальным раком молочной железы / Д. А. Рябчиков, О. А. Безнос, И. А. Дудина и др. // Российский биотерапевтический журнал. — 2018. — Т. 17(1). — С. 53–57.
22. *Тупицын, Н. Н.* Гуморальный противоопухолевый иммунитет / Н. Н. Тупицын // Иммунология гемопозеза. — 2018. — Т. 2, № 2. — С. 107–149.
23. *Тупицын, Н. Н.* Взаимосвязь костномозговых популяций врожденного иммунитета (TCR $\gamma\delta$ -клетки, В1 (CD5+)-лимфоциты) у больных раком молочной железы с клиническими показателями и гемопозезом / Н. Н. Тупицын, В. А. Мкртчян, А. Д. Палладина, И. К. Воротников // Онкогинекология. — 2020. — № 1 (33). — С. 23–30.
24. *Талипов, О. А.* Метилирование генов супрессорных микроРНК при раке молочной железы / О. А. Талипов, Д. А. Рябчиков, С. В. Чулкова и др. // Онкогинекология. — 2020. — № 2 (34). — С. 14–22.
25. *Мкртчян, В. А.* Взаимосвязь между НК-клетками костного мозга больных раком молочной железы и биологическими особенностями опухоли и эритропозом / В. А. Мкртчян, И. К. Воротников, О. А. Чернышева, А. Д. Палладина, Н. Н. Тупицын // Онкогинекология. — 2019. — № 3 (31). — С. 4–13.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

*Григорьева Татьяна Анатольевна*, врач-онколог в Медицинской клинике «Врач Рядом», Москва, 117452, Черноморский бульвар, д. 10, корп. 1, e-mail: onko100@mail.ru; соискатель кафедры онкологии Научно-образовательного института непрерывного профессионального образования им. Н. Д. Ющука ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России, 127006, Москва, ул. Долгоруковская, д. 4, e-mail: selvu@mail.ru

*Grigorieva Tatyana A.*, Oncologist in Medical Clinic Doctor near Moscow, Moscow, 117452, Chornomorsky Blvd. boulevard 10, building 1, e-mail: onko100@mail.ru; departmental fellow of the Department of Oncology of Scientific — Educational Institute of Continuing Professional Education named after N. D. Yushchyuk of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Russian University of Medicine” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 127006, Moscow, Dolgorukovskaya street, 4; e-mail: selvu@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2306-8959>

*Воротников Игорь Константинович*, ведущий научный сотрудник хирургического отделения № 15 НИИ клинической онкологии Национального медицинского исследовательского центра онкологии имени Н. Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор, Москва, e-mail: nntca@yahoo.com

*Vorotnikov Igor K.*, MD, Phd, Professor, leading researcher of surgical department № 15, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, Moscow, e-mail: nntca@yahoo.com

*Тупицын Николай Николаевич*, руководитель лаборатории иммунологии гемопозеза НИИ клинической онкологии Национального медицинского исследовательского центра онкологии имени Н. Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор, Москва, e-mail: nntca@yahoo.com

*Tupitsyn Nikolay N.*, MD, Phd, Professor, Head of the Laboratory of Haematopoiesis Immunology, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, Moscow, e-mail: nntca@yahoo.com

*Сельчук Владимир Юрьевич*, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой онкологии Научно-образовательного института непрерывного профессионального образования им. Н. Д. Ющука ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России, 127006, Москва, ул. Долгоруковская, д. 4, e-mail: selvu@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2306-8959>

*Selchyuk Vladimir Yu.*, M. D., Ph.D. in Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Oncology of Scientific — Educational Institute of Continuing Professional Education named after N. D. Yushchyuk of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Russian University of Medicine” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 127006, Moscow, Dolgorukovskaya street, 4; e-mail: selvu@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2306-8959>