УДК 616-006.04:618.19:616.419

Особливості клінічного перебігу злоякісного процесу і біомаркери високого ризику розвитку рецидиву захворювання у хворих на рак грудної залози

А.В. Жильчук[1], Н.І. Семесюк[2], Ю.Й. Кудрявець[2]

[1]Рівненський обласний онкологічний диспансер

[2]Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького, м. Київ

На сьогодні разом зі стандартними прогностичними та предикативними факторами при раку грудної залози найбільш перспективною в клініці вважається так звана малоінвазивна рідка біопсія, яка включає виявлення дисемінованих пухлинних клітин та мікрометастазів в кістковому мозку хворих та визначення цитокінового профілю у хворих ще до початку їхнього лікування. Базуючись на цій ідеології, проведено дослідження 33 хворих на рак грудної залози в стадії T1-4N0-2M0-1, які на підставі наявності або відсутності прогресії злоякісного процесу були розподілені на 2 групи: 14 – у стадії ремісії та 19 – у стадії прогресії захворювання.

Пухлинні клітини в цитоспінових препаратах мононуклеарів кісткового мозку виявляли імуноцитохімічним методом за допомогою антитіл до панцитокератину, рівень цитокінів у плазмі визначали за їх біологічною активністю (TNF, M-CSF, IFN) або методом ELISA (IL-1, IL-6, TGF-β, VEGF).

Установлено, що наявність дисемінованих пухлинних клітин в кістковому мозку та високий рівень активності TNF та M-CSF в кістковому мозку та крові хворих на рак грудної залози з високою вірогідністю (P<0,001) свідчать про ризик виникнення рецидиву злоякісного процесу.

Ключові слова: *рак грудної залози, дисеміновані пухлини клітини, цитокіни.*

Рак грудної залози (РГЗ) залишається найчастішим захворюванням у всьому світі [1, 2]. Незважаючи на суттєві досягнення клінічної онкології, смертність від РГЗ продовжує неухильно зростати, за винятком країн Західної Європи та Північної Америки, де смертність від РГЗ зменшується за рахунок впровадженого скринінгу та застосування системної терапії [3–5]. Сьогодні разом зі стандартними прогностичними факторами (клінічне та патоморфологічне стадіювання захворювання, розміри пухлини, статус регіонарних лімфатичних вузлів), стандартними предиктивними факторами (статус рецепторів стероїдних гормонів, рівень експресії HER-2neu) найбільш перспективними, з метою рутинного застосування в клініці, є виявлення метастазів в кістковому мозку (КМ) до початку лікування та через декілька років від початку спостереження. Концепція визначення метастазів в КМ у хворих на солідні пухлини була впроваджена в клінічну онкологію близько 20 років тому завдяки науковим працям Pantel [6], де було доведено, що, незважаючи на проведення радикальної хірургічної операції, у хворих на РГЗ залишається ризик виникнення метастазів, які зумовлені наявністю прихованих пухлинних клітин у КМ. Слід зауважити, що саме КМ відіграє найбільш значущу роль серед видалених органів як орган-індикатор розвитку прогресії захворювання. Наявність таких клітин в організмі онкологічних хворих розцінюють як мінімальну залишкову хворобу. Відомо також, що у хворих на РГЗ основними факторами під час вибору варіанта первинного лікування та оцінки прогнозу є розмір первинної пухлини, ступінь ураження регіонарних лімфатичних вузлів. W. Janni та співавтори встановили, що для хворих з негативними лімфатичними вузлами, в яких у КМ були виявлені пухлинні клітини (ПК), властивий більш високий ризик несприятливого перебігу захворювання, ніж у пацієнтів з негативними лімфатичними вузлами, в КМ яких ПК не були виявлені [7]. Мета-аналіз результатів досліджень у хворих на РГЗ, який провів Braun (2005) [8], свідчить, що наявність дисемінованих ПК (ДПК) в КМ здатна передбачити розвиток метастазів в кістках та інших тканинах і органах. Не менш актуальною та важливою залишається проблема пошуку високочутливих методів ідентифікації ПК, дослідження їх молекулярних характеристик, пошуку зв'язку особливостей біології первинної пухлини з появою депонованих та циркулюючих ПК, механізми дисемінації клітин злоякісних пухлин та їх депонування у КМ онкологічних хворих залишаються на цей час не розкритими. Цитокіни КМ можуть відігравати у цьому процесі важливу роль специфічного мікрооточення, яке спричиняє як депонування ПК у КМ, так і їхню подальшу дисемінацію. На особливу увагу заслуговують цитокіни, які виявлені в пухлинному мікросередовищі, сироватці крові, КМ, що пригнічують клітинну проліферацію. Їхнім джерелом можуть бути як ПК, так і клітини організму. До цієї групи цитокінів належать фактор некрозу пухлин (ФНП), трансформівний фактор росту-бета (Тфр-β), маммастатин, інтерферон. ФНП або кахектин-поліпептид із 157 амінокислот, який синтезується макрофагами, NK-клітинами, злоякісними пухлинами, B-, T-лімфоцитами, гранулоцитами, міозитами, фібробластами, гранульозними клітинами тощо. Уперше цей цитокін було ідентифіковано завдяки протипухлинній активності [9, 10]. Досить цікавим, з точки зору можливого впливу на клітинну проліферацію, виглядає макрофаго-гранулоцитарний колоністимулювальний фактор (МГ-КСФ). Відомо, що продуцентами МГ-КСФ в організмі є моноцити, фібробласти та ендотеліальні клітини [11]. МГ-КСФ утворюється переважно в КМ, його рівень у фізіологічних умовах у здорових людей низький. У низці досліджень зазначено, що злоякісні пухлини продукують МГ-КСФ в надмірній кількості у хворих на рак стравоходу [12], карциному очеревини [13], рак жовчного міхура [14], уротеліальну карциному ниркової миски [15], це свідчить про те, що МГ-КСФ-продукувальні пухлини мають досить агресивний перебіг; для них властивий несприятливий прогноз, що слід ураховувати під час планування лікування. Таким чином, висвітлені дані дозволяють зробити висновок, що визначення депонованих в КМ та циркулюючих в крові ПК, поза сумнівом, має перспективу та серйозну клінічну значущість, перш за все для оцінювання ризику раннього метастазування, предикативності, ефективності системної терапії та її моніторингу, а також в прогнозуванні перебігу захворювання.

Таблиця 1

Визначення порогового рівня ФНП та М-КСФ в КМ та ПК, після якого підвищується ризик прогресії захворювання

Фактор	Рівень	Регресія		Прогресія		Se	Sp	AUC*
		n	%	n	%			
ФНП в КМ, пкг/мл	>72	2	10,5	11	78,6	78,57	89,47	0,803*
	≤72	17	89,5	3	21,4			
ФНП в ПК, пкг/мл	>72	3	21,4	11	78,6	78,57	84,21	0,859*
	≤72	16	84,2	3	15,8			
М-КСФ КМ, од/мл	>300	2	14,3	12	85,7	85,71	89,47	0,859*
	≤300	17	89,5	2	10,5			
М-КСФ в ПК, од/мл	>512	11	45,8	13	54,2	85,71	73,68	0,769*
	≤512	8	88,9	1	11,1			

*Кореляційний зв'язок статистично значущий на рівні p=0,05.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Клінічні групи склали 33 хворих на РГЗ в стадії $T_{1-4}N_{0-2}M_{0-1}$, які лікувалися в Рівненському обласному онкологічному диспансері протягом 2008–2013 рр. У процесі діагностики та лікування даних пацієнтів були застосовані клінічні, гістологічні, імуногістохімічні, цитологічні, лабораторні, радіоімунологічні, ренгенологічні, ультразвукові методи обстеження. Морфологічна верифікація діагнозу була забезпечена шляхом проведення трепанбіопсії первинної пухлини грудної залози до початку лікування. Зразки КМ отримували шляхом проведення стернальної пункції в області нижньої третини грудини, зразки ПК – з ліктьової вени. З пунктату КМ та зразків ПК отримували плазму для визначення рівня біологічної активності цитокінів. Із зразків КМ виділяли мононуклеари у градієнті кількості фіколу (PAA, Австрія), які використовували для приготування серії цитоспінових препаратів для імуноцитохімічного дослідження. Усі зразки КМ та ПК хворих на РГЗ отримували до терапії і хірургічного втручання.

Імуноцитохімічне визначення ДПК в КМ проводили з використанням моноклональних антитіл (МКАТ) панцитокератину людини (клон AE1/AE3, Dako, Німеччина). Рівень експресії відповідних маркерів оцінювали класичним методом за шкалою H-score (McCelland R.A., 1991): S=1*A+2*B+3*C, де S – показник H-score, значення якого знаходиться у межах від 0 (білок не експресується) до 300 (сильна експресія у 100% клітин); A – відсоток клітин із забарвленням слабкої інтенсивності, B – відсоток клітин із забарвленням помірної інтенсивності, C – відсоток клітин із забарвленням сильної інтенсивності.

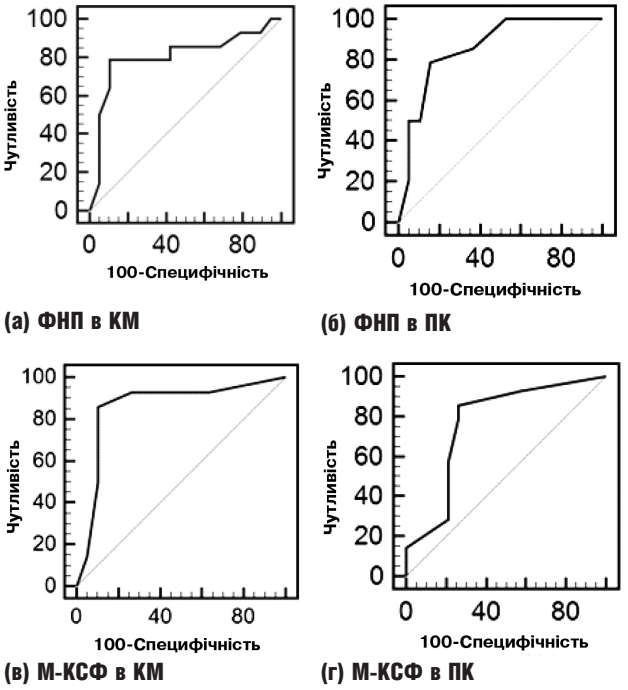
Біологічну активність цитокінів ФНП, КСФ-1 в зразках КМ та ПК хворих на РГЗ визначали в клітинних тест-системах in vitro з використанням чутливих факторзалежних специфічних ліній клітин: (L929a – клітини із сполучної тканини миші для визначення рівня ФНП, M-NFS-60 – клітини мієлолейкозу мишей – для КСФ-1).

Виявлення ДПК в КМ та ФНП і КСФ в КМ і ПК проводили сумісно з відділом експериментальних клітинних систем ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Усі хворі були розподілені за стадією захворювання (TNM), віком, гістологічним типом пухлини, а також рецепторним статусом стероїдних гормонів та експресією HER 2/neu, Кі-67 в ПК. Віковий ценз пацієнток становив 30–75 років (52,9±9,5 року). Спостереження проводили протягом 36 міс.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На початку роботи було досліджено наявність ДПК в КМ та біологічну активність цитокінів ФНП та М-КСФ в



ROC-криві визначення вливу рівня факторів на прогресування захворювання

КМ та в периферійній крові хворих з метою встановлення кореляційного зв'язку між цими показниками і характером перебігу пухлинного процесу (ремісія або прогресія).

Дане дослідження було проведено під час лікування 33 хворих в стадії $T_{1-4}N_{0-2}$, які на підставі наявності або відсутності прогресії злоякісного захворювання були розподілені на 2 групи: 1-а група – 14 хворих, що перебували у стадії ремісії; 2-а група – 19 хворих, що перебували у стадії прогресії захворювання. З метою оцінювання прогностичної значущості та визначення порогових значень рівнів наведених вище цитокінів в КМ та ПК у хворих на РГЗ проведено ROC-аналіз, результати якого висвітлені в табл. 1. Відповідні ROC-криві зображені на малюнку.

Таким чином, рівень ФНП в КМ та ПК більше 72 пкг/мл вважався високим та оцінювався як позитивний (+) щодо виникнення прогресії, менше 72 пкг/мл як негативний (-). У той самий час, М-КСФ в КМ вважався позитивним більше 300 од/мл та більше 512 в ПК, менше наведених рівнів – негативним. Дані граничні значення є «водорозділом», які лягли в основу формування груп високого та

Таблиця 2

Кореляційний аналіз залежності між групами, сформованими за результатами ROC-аналізу та прогресуванням захворювання

Показник		Перебіг захворювання				Коефіцієнт кореляції	Значущість, p
		Прогресія		Ремісія			
		n	%	n	%		
ДПК в КМ	-	9	47,4	12	85,7	-0,394	0,024*
	+	10	52,6	2	14,3		
ФНП в КМ, пкг/мл	-	2	10,5	11	78,5	-0,788	0,001*
	+	17	89,5	3	21,5		
ФНП в ПК, пкг/мл	-	3	15,9	11	78,5	-0,628	0,001*
	+	16	84,1	3	21,5		
М-КСФ в КМ, од/мл	-	2	10,5	12	85,8	-0,752	0,001*
	+	17	89,5	2	14,2		
М-КСФ в ПК, од/мл	-	11	59,9	13	92,9	-0,388	0,026*
	+	8	42,1	1	7,1		

*Різниця статистично значуща на рівні p=0,05.

низького ризику виникнення прогресії захворювання. Результати аналізу залежності між групами, сформованими за результатами ROC-аналізу та прогресуванням захворювання, наведені вказані в табл. 2.

Визначення факторів, що впливають на ризик виникнення рецидиву захворювання, проведено за допомогою кореляційного аналізу Пірсона. Згідно з результатами аналізу наявність ДПК в КМ та високий рівень активності ФНП та М-КСФ в КМ та крові хворих на РГЗ свідчить про статистично значущо високий рівень виникнення рецидиву ($p<0,05$). Дослідження мієлограм хворих, у яких було виявлено ДПК та високий рівень ФНП в КМ, показало, що картина мікроскопічного дослідження КМ є досить варіабельною. Але разом із тим, для даних пацієнтів в КМ мало місце зменшення кількості мієлокаріоцитів, збільшена кількість мегакаріоцитів, збільшення кількості тромбоцитів у вигляді їх скупчення в одному шарі; має місце підвищена кількість плазматичних клітин до 10–15%. При мікроскопічному дослідженні препаратів виявляються групи синтеціально розміщених клітин пухлинної тканини. Частіше ці комплекси розміщені по краю або в «щіточці» мазків.

Мієлограми хворих, у яких не було виявлено ДПК, але теж спостерігався високий рівень ФНП у КМ, мали дещо подібну картину із збільшенням кількості мегакаріоцитів, тромбоцитів, плазматичних клітин. Мієлограми хворих, у яких в КМ ДПК теж були відсутні, але рівень ФНП був низьким, то їхні показники не виходили за межі норми. Щодо активності ФНП в КМ та ПК хворих, то тут також за умов ремісії рівень його активності був достатньо низьким (<72 пкг/мл) і згаданий цитокін спостерігався лише у 21,5% хворих (3/14). У хворих з прогресією захворювання ФНП в переважній більшості пацієнтів мав високий рівень активності (>72 пг/мл) (у КМ у 85,0% та у ПК – у 84,2%). Другий цитокін – М-КСФ часто вважався позитивним, оскільки мав високий рівень активності, як у КМ та ПК хворих, що перебували у стадії прогресії захворювання, кількість таких хворих складала відповідно 88,5% і 89%. У хворих, що перебували у стадії ремісії, М-КСФ у КМ був виявлений у 2 пацієнтів (14,2%), а у ПК – у 1 пацієнта (7,1%). На особливу увагу заслуговують дані про характер метастатичного процесу із групи хворих з прогресією захворювання (17/33, 51,5%). Згідно з результатами аналізу серед 17 пацієнтів, у котрих було виявлено рецидив РГЗ, у 70,6% (n=12) виявлено метастази у кістках. Це статистично значущо частіше ($p<0,05$), ніж утворення вісцеральних метастазів та метастазів у головний мозок. Саме це дало підставу для застосування бісфосфонатів у групах хворих з високим ризиком прогресії в подальшому лікуванні. Таким чином, проведені дослідження виявили чіткий кореляційний зв'язок між дослідженими показниками (ДПК, ФНП та М-КСФ) і характером перебігу пухлинного процесу. За цих обставин можливість використовувати дані показники в якості панелі прогностичних маркерів виникнення рецидиву пухлинного процесу у хворих на РГЗ виглядає обґрунтованою.

ВИСНОВКИ

1. Установлено, що наявність ДПК в кістковому мозку та високий рівень активності ФНП та М-КСФ в кістковому мозку та крові хворих на РГЗ свідчить про високий ризик виникнення рецидиву злоякісного процесу.

2. Виявлено, що найбільш достовірним є прогноз виникнення рецидиву, складений за умов співпадіння показань ДПК та ФНП ($ДПК^+$, $ФНП^+$ або $ДПК^-$ і $ФНП^-$).

Особенности клинического течения злокачественного процесса и биомаркеры высокого риска развития рецидива заболевания у больных раком грудной железы

А.В. Жильчук, Н.И. Семесюк, Ю.И. Кудрявец

Сегодня наряду со стандартными прогностическими и предикативными факторами при раке грудной железы наиболее перспективной в клинике считается так называемая малоинвазивная жидкая биопсия, которая включает выявление диссеминированных опухолевых клеток и микрометастазов в костном мозге больных и определение цитокинового профиля в костном мозге и крови больных еще до начала их лечения. Базируясь на этой идеологии, проведено исследование 33 больных раком грудной железы в стадии T1-4N0-2M0-1, которые на основании наличия или отсутствия прогрессирования злокачественного процесса были разделены на 2 группы: 14 – в стадии ремиссии и 19 – в стадии прогрессирования процесса.

Опухолевые клетки в цитоспиновых препаратах мононуклеаров костного мозга выявляли иммуноцитохимическим методом с помощью антител к панцитокератину, уровень цитокинов в плазме определяли по их биологической активности (TNF, M-CSF, IFN) или методом ELISA (IL-1, IL-6, TGF-β, VEGF).

Установлено, что наличие диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге и высокий уровень активности TNF и M-CSF в костном мозге и крови больных раком грудной железы свидетельствует о высоком риске ($P<0,001$) возникновения рецидива злокачественного процесса.

Ключевые слова: *рак грудной железы, диссеминированные опухолевые клетки, цитокины.*

Clinical features of malignant process and biomarkers of high risk of relapse in patients with breast cancer

A.V. Zhylchuk, N.I. Semesyuk, Yu.I. Kudryavets

Today, along with standard prognostic and predicative factors in breast cancer the most promising in the clinic is the so-called minimally invasive «liquid biopsy», which includes the identification of disseminated tumor cells and micrometastases in the bone marrow of patients and determination of cytokine profile in the bone marrow and the blood of patients has before the start of their treatment. Based on this ideology, studied 33 patients with breast cancer in stage T1-4N0-2M0-1 that based on the presence or absence of progression of malignancy were divided into 2 groups: 14 in remission that 19 – in the stage of progression. Tumor cells in cytospin preparations of bone marrow mononuclear cells revealed immunocytochemical method using antibodies to pancytokeratine, cytokine levels in the plasma was determined by their biological activity (TNF, M-CSF, IFN) or by ELISA (IL-1, IL-6, TGF-β, VEGF).

It is shown that the presence of disseminated tumor cells in the bone marrow and the high level of TNF and M-CSF activity in bone marrow and the blood of breast cancer patients indicates higher risk ($P<0,001$) of recurrence of the malignant process.

Key words: *breast cancer, disseminated tumor cells, cytokine.*

Сведения об авторах

Жильчук Андрей Викторович – Ровенский областной онкодиспансер МЗ Украины, 33013, г. Ровно, ул. А. Олеся, 12. E-mail: zhylchuk@mail.ru

Семесюк Надежда Ивановна – Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 45. E-mail: nadijka@inbox.ru

Кудрявец Юрий Иосифович – Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 45. E-mail: kudryavets@mail.ru

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Лекции по фундаментальной и клинической онкологии под редакцией В.М. Моисеенка, А.Ф. Урманцевой, К.П. Хансона. – Издательство Н-Л, 2004. – 703 с.

2. Лекарственная терапия рака молочной железы: Под ред. Н.И. Переводчиковой и М.Б. Стениной. – М.: Практика, 2014. – 284 с.

3. Мерабишвили В.М. Эпидемиология и выживаемость больных раком молочной железы // Вопросы онкологи, Т. 59, № 3. – 2013. – С. 314–319.

4. Miller A.B., Wall C., Baines C.J. Twenty five year follow up breast cancer incidence and mortality of the Canadian Breast Screaning Study: Randomized Screening trial. BMJ, 2014. – Vol. 348. – P. 366.

5. Toriola A.T., Colditz J.A. Trends in breast cancer incidence and mortality in the United States: implication for prevention. Breast cancer Res Trial. 2013. – V. 138. – P. 665–673.

6. Pantel K, Schlimok G, Braun S et al. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micormetastatic carcinoma cells. J Natl Cancer Inst, 1993; 85: 1419–24.

7. Janni W, Gastroph S, Hepp F, Kentenich C, Rjosk D, Schindlbeck C, Dimpfl T, Sommer H, Braun S. Prognostic significance of an increased number of micrometastatic tumor cells in the bone marrow of patients with first recurrence of breast carcinoma. Cancer. 2000 May 15; 88 (10):2252–9.

8. A Pooled Analysis of Bone Marrow Micrometastasis in Breast Cancer/ Stephan Braun, M.D., Florian D. Vogl, M.D., Bjurn Naume, M.D., Wolfgang Janni, M.D.

9. Biologic response modulation by TNF-1 in a phase 1b trial in cancer patients /T.F. Logan, W.E. Gooding, T.L. Whiteside [et al.]// J. of Immunotherapy. – 1997. – V. 20. – P. 387–398.

10. Tumor necrosis factor as an autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor expression/ S. Wu, C.M. Bozer, R.S. Whitaker [et al.]//Cancer Res. 1993. – V. 53. –P. 1939–1944.

11. Матяш М.Г., Хричнокова Т.Ю., Шаталова В.Н., Гольберг В.Е. Злокачественные опухоли, продуцирующие гранулоцитраный колониестимулирующий фактор //Сибирский онкологический журнал. – 2006. – № 2 (18). – С. 68–70.

12. Sato Y., Takahashi Y., Nishie K. et al. A case of granulocyte-colony stimulating factor producing smale cell carcinoma of esophagus. // Nippon Shokakibyo Gakkai Zosshi. – 2005. – V. 102. – P. 888–893.

13. Mikam M., Tanaka K., Komiyama S. et ac. Primary serosus carcinoma of the peritoneum producing granulocyte colony-stimulating factor // Aeta Obster Gynecol. Scand. – 2005. – V. 84, № 8. – P. 820–822.

14. Ikaeda T., Ohgaki K., Miura M. et al. Granulocyte colony stimulating factor-producing gallbladder cancer without recurrence more than 2 years after resection: report of a case // Surg. Today. – 2005. – V. 35, № 7. – P. 590–593.

15. Terao S., Yamada Y., . et ac. Granulocyte-colony stimulating factor producing urothelial carcinoma of renal pelvis // Int. J. Urol. – 2005. – V. 12, № 5. – P. 500–502.

Статья поступила в редакцию 25.09.2015