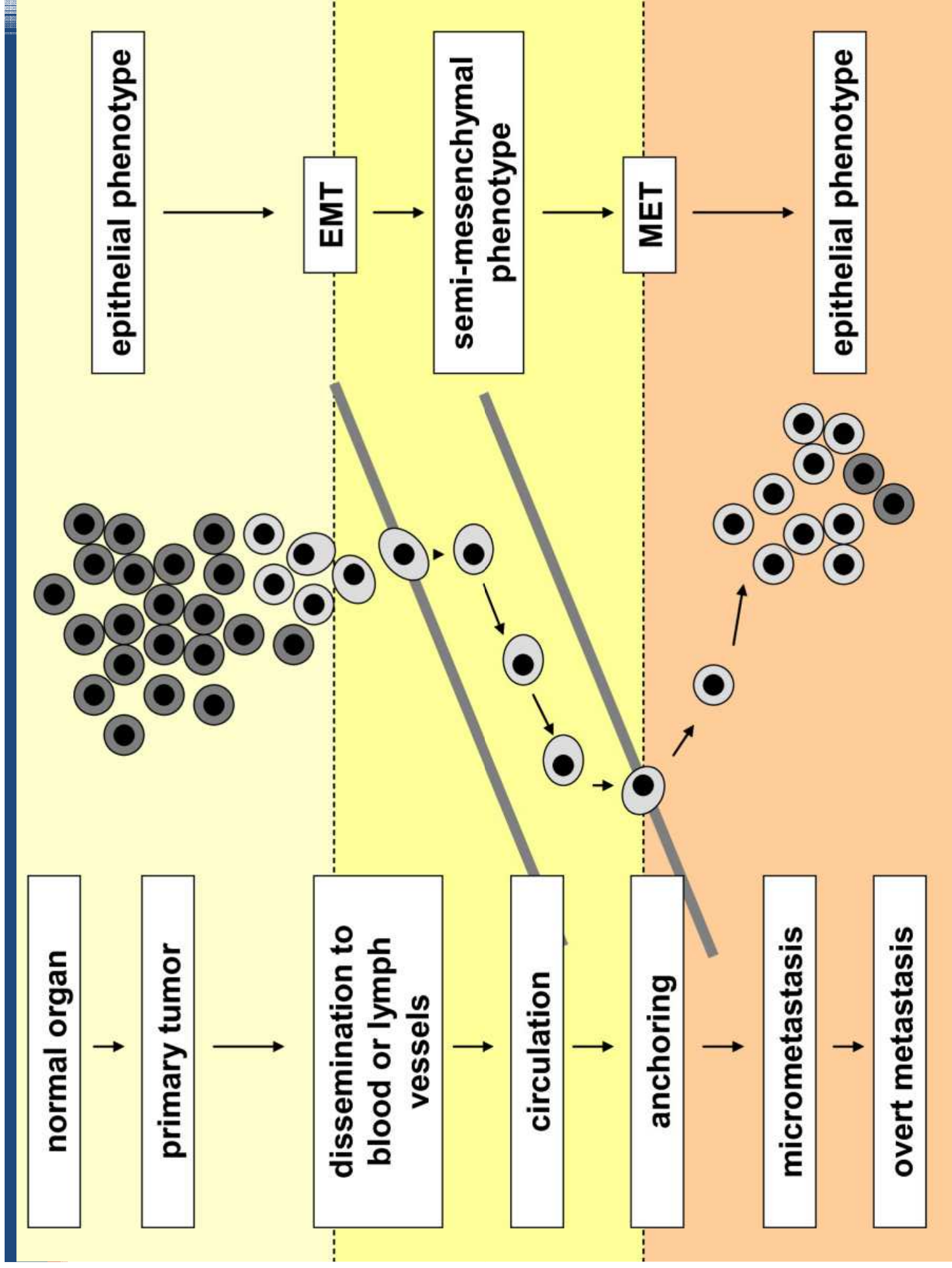


Диагностика диссеминированных клеток рака молочной железы в костном мозге с помощью метода проточной цитометрии

ГУЗ Областной клинический онкологический диспансер,
г. Ульяновск,
ГОУ ВПО Ульяновский государственный университет, г. Ульяновск
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, г. Москва

В.В. Родионов, Н.Н. Тупицын, О.А. Богомолова

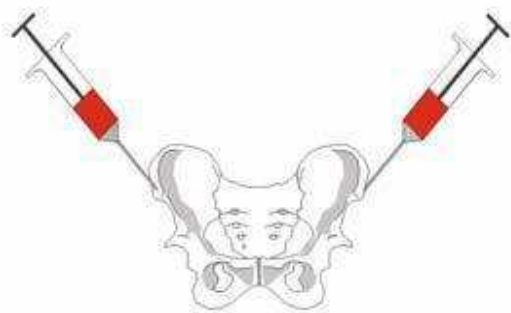


Наличие циркулирующих (ЦОК) и локализация диссеминированных опухолевых клеток (ДОК) у больных различными злокачественными опухолями

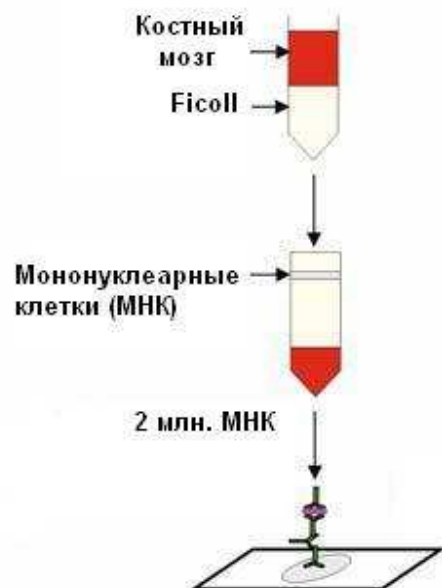
Опухоль	Локализация ЦОК и ДОК
Рак молочной железы	КМ, кровь, ЛУ
Рак желудка	КМ
Рак толстой кишки	КМ, печень
Рак головы и шеи	КМ, ЛУ
Нейробластома	КМ
Лейкозы и лимфомы	КМ, кровь
Рак предстательной железы	КМ, кровь
Рак поджелудочной железы	КМ, кровь, брюшная полость
Меланома	КМ, кровь, ЛУ
Немелкоклеточный рак легкого	КМ, ЛУ
Саркомы мягких тканей	Множество локализаций
КМ- костный мозг, ЛУ- лимф. узлы	

Алгоритм подготовки препарата костного мозга для выявления диссеминированных опухолевых клеток (ИЦХ)

1.



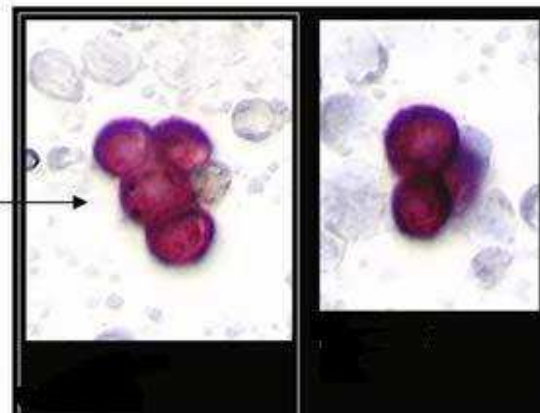
2.



3.

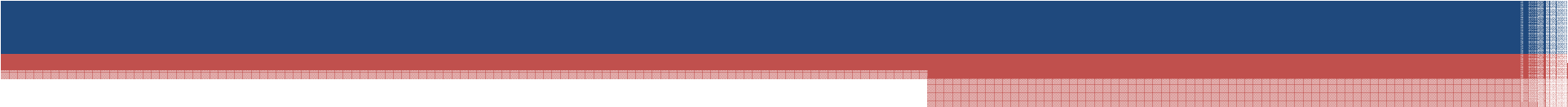


Кластер
опухолевых
клеток



Гомогенное распределение
окрашенных клеток





Актуальность проблемы

- Наличие циркулирующих или диссеминированных опухолевых клеток является при целом ряде эпителиальных опухолей, независимо от стадии заболевания, **фактором неблагоприятного прогноза;**
- В клинической практике онколога пока не найдено рутинных методов обнаружения микрометастазов с целью оценки индивидуального прогноза больного.

Исследование костного мозга у больных раком молочной железы (В.В. Родионов, 2003-2005)

Материалы исследования:

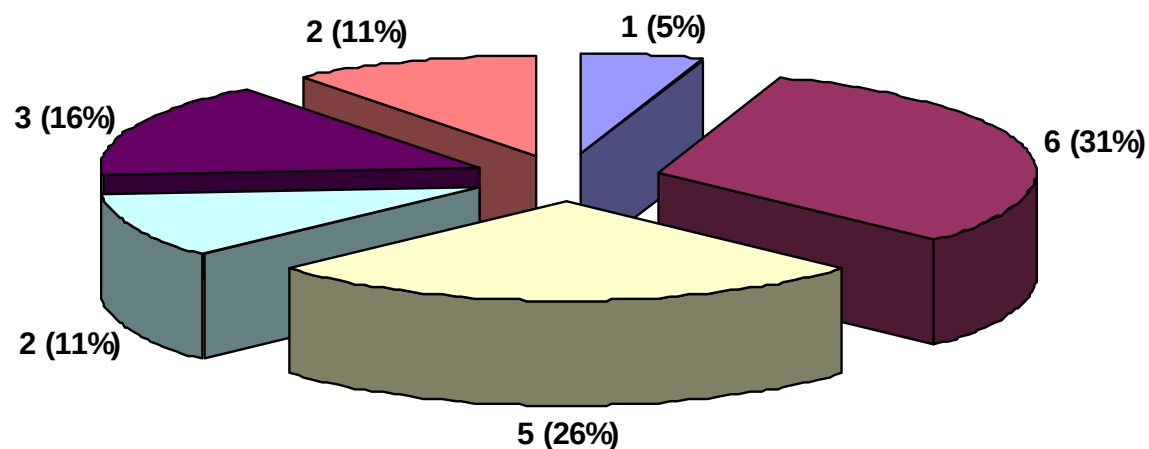
50 больных:

- местно-распространенный
рак -13 (26%) пациенток
- метастатический процесс -
37 (74%) пациенток

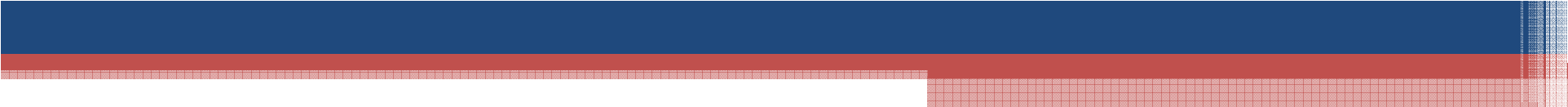
Методы исследования:

- цитологический
- гистологический
- иммуноцитохимический
(ИЦХ)

Результаты исследования



- Цитологический
- Гистологический
- Иммуноцитохимический
- Гистологический + иммуноцитохимический
- Цитологический + иммуноцитохимический
- Цитологический + иммуноцитохимический + гистологический



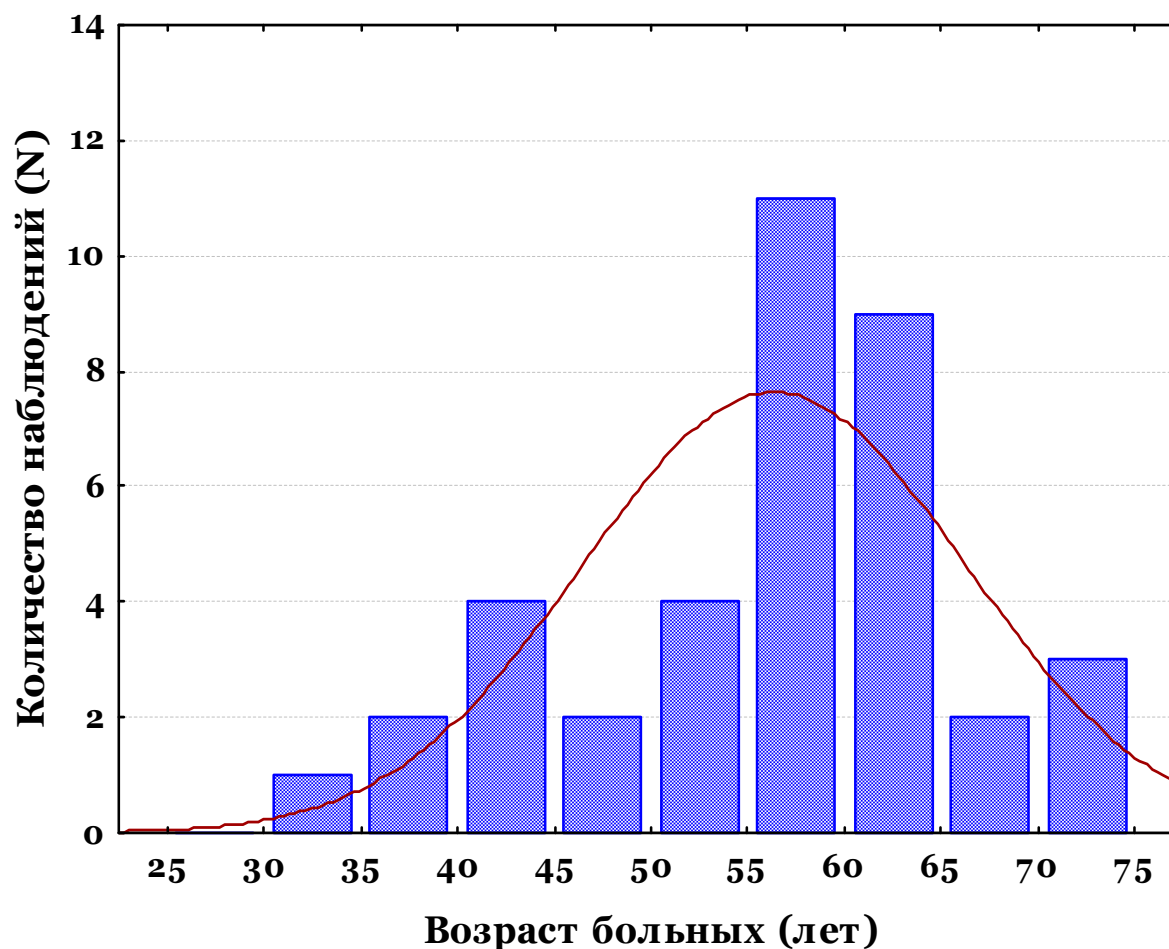
Цель исследования (2011-2013)

- установление степени гематогенной диссеминации у больных раком молочной железы на основании обнаружения диссеминированных опухолевых клеток (ДОК) в костном мозге методом проточной цитофлуориметрии с применением моноклональных антител к молекуле адгезии эпителиальных клеток EpCAM

Задачи исследования

- Провести количественную оценку диссеминированных клеток рака молочной железы в костном мозге методом проточной цитометрии и сопоставить полученные данные с результатами морфологических методов исследования
- Определить частоту опухолевого поражения костного мозга при раке молочной железы на различных стадиях
- Оценить корреляцию иммунологического выявления ДОК в костном мозге с другими факторами прогноза

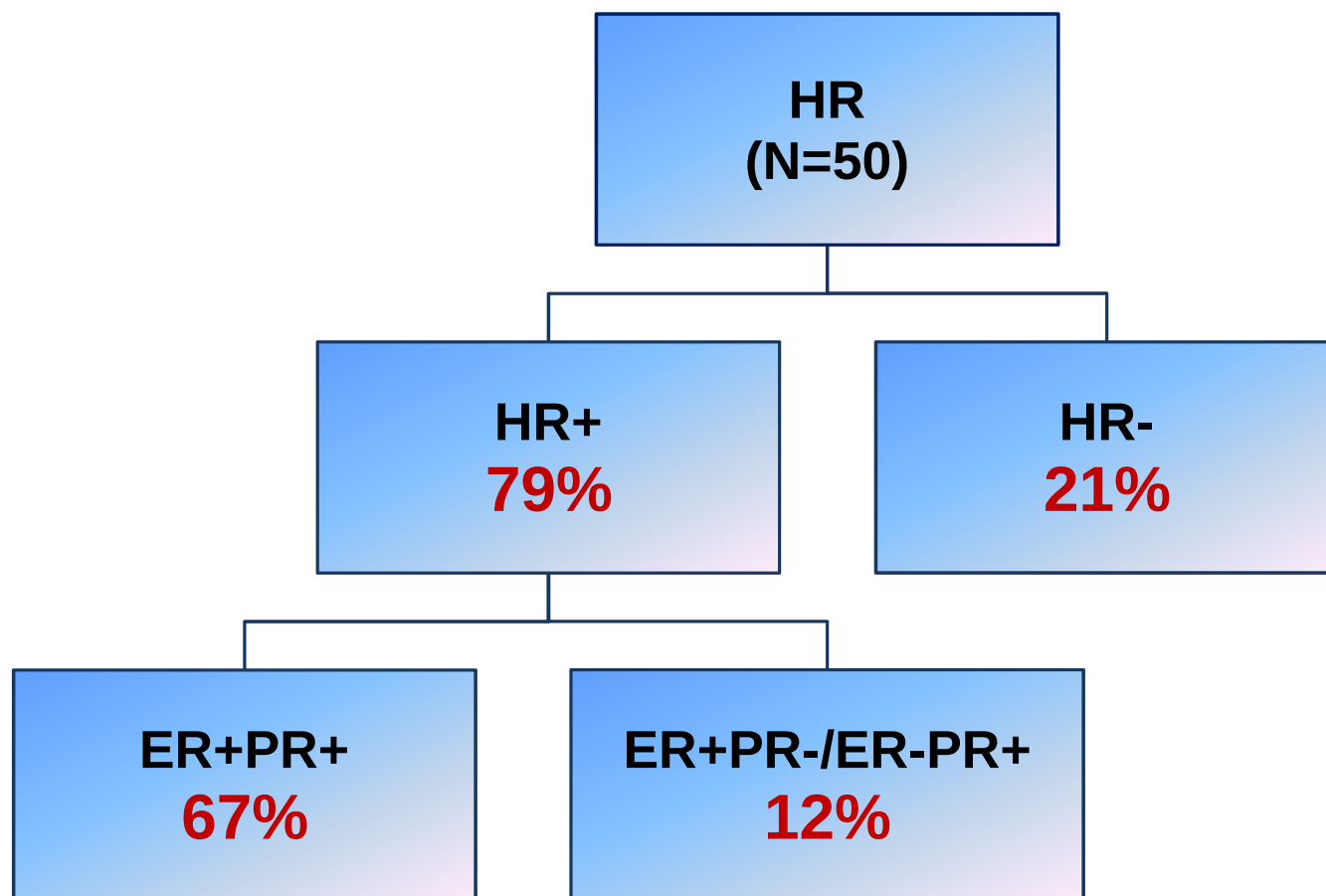
В работе использованы материалы
клинического, морфологического, иммуноцитологического обследования
50 пациенток раком молочной железы, находящихся на лечении
в ГУЗ Областной клинический онкологический диспансер
г. Ульяновска с ноября 2011г. по настоящее время



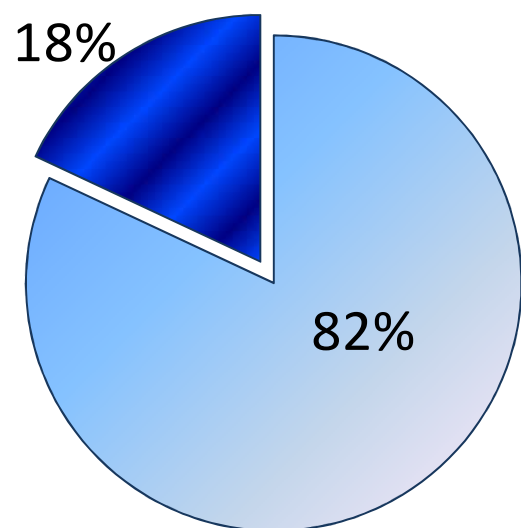
Распределение больных по стадиям

Стадия	N	%
I	3	6,0
IIA	12	24,0
IIB	9	18,0
IIIA	5	10,0
IIIB	7	14,0
IIIC	9	18,0
IV	5	10,0

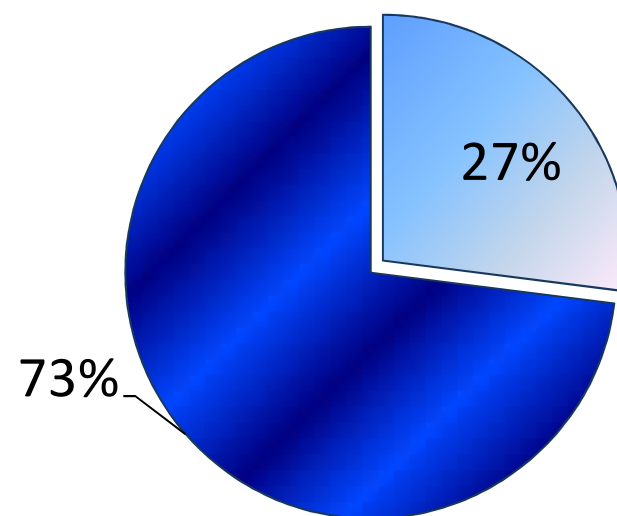
РЕЗУЛЬТАТЫ ИГХ-ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЦЕПТОРОВ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ (HR)



ИГХ- ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ HER2/neu и ИНДЕКСА ПРОЛИФЕРАЦИИ Ki67 В КЛЕТКАХ ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ



- HER2/neu - отрицательный статус
- HER2/neu - положительный статус



- ki-67 < 14%
- ki-67 > 14%

Методы исследования костного мозга

- Морфологические:

 - цитологический и гистологический

- Иммуноцитологический:

 - проточная цитофлуориметрия с

 - использованием МКА к молекуле

 - адгезии эпителиальных клеток ЕpCAM

Проточная цитофлоуметрия

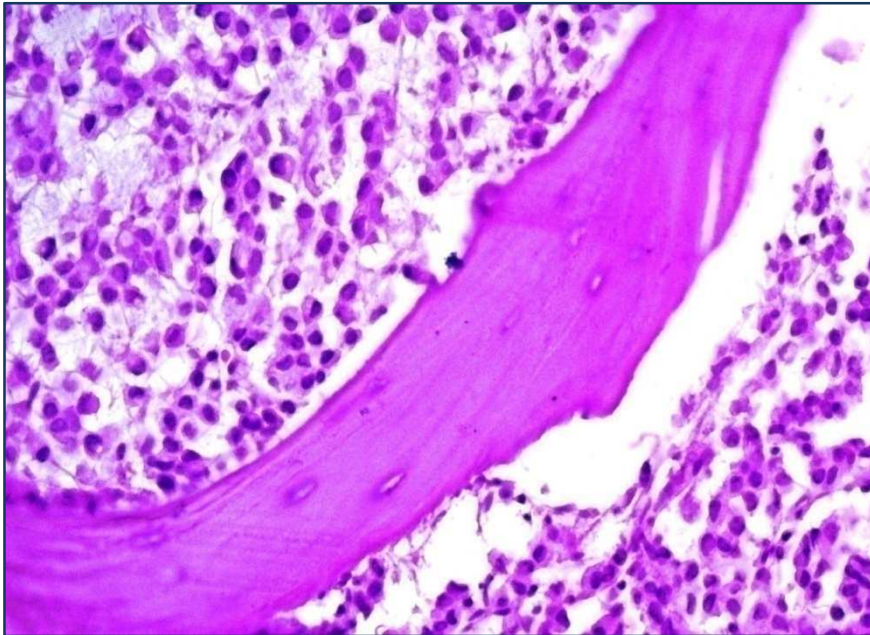
- CD45 (панлейкоцитарный антиген) VS CD326 (панэпителиальный антиген)
- Предварительно было проведено иммуномагнитное обогащение клеток, связывающих антитела CD326 (ErCAM)
- Это позволило оценивать до 50 млн. миелокариоцитов у одного больного
- Пороговый уровень = 1 опухолевая клетка на 1 млн. миелокариоцитов

Результаты морфологических методов исследования

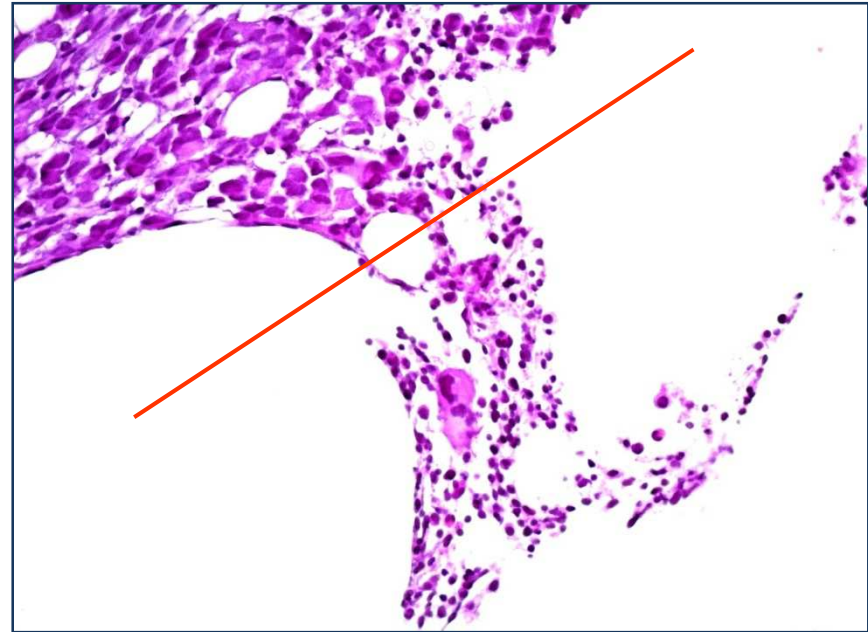
- При цитологическом и гистологическом исследованиях метастазы в костный мозг были выявлены у 1 (2,0%) и 2 (4,0%) из 50 пациенток, соответственно

Микрофото метастаза инфильтрирующего рака молочной железы в костный мозг подвздошной кости с двух сторон у больной М., 53 лет.

Окр. гематоксилином и эозином, х 400.



Тотальное замещение клеточного костного мозга подвздошной кости справа опухолевыми клетками



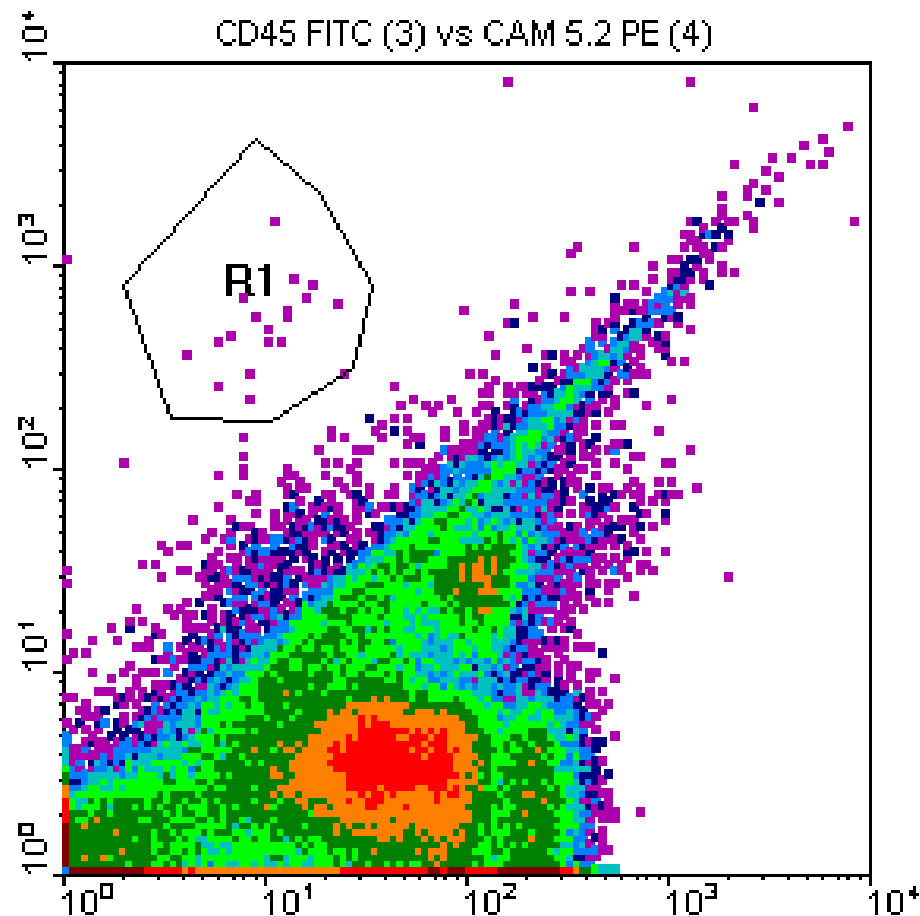
Место инвазии клеточного костного мозга подвздошной кости слева опухолевыми клетками

Результаты проточной цитофлоуметрии

- Единичные эпителиальные (опухолевые) клетки в костном мозге были выявлены у 8 (16,0 %) из 50 пациенток
- Количество ДОК - от 1 до 10 (в одном случае – 44) клеток на 1 млн. миелокариоцитов
- Четкий кластер опухолевых клеток – микрометастаз - был выявлен у 4 (8,0%) из 50 пациенток; при этом в 3 из 4 случаев число клеток было очень низким и составило менее 1 клетки на 1 млн. миелокариоцитов

Цитограмма больной раком молочной железы Б., 74 лет, IIВ стадия, с микрометастазом в костном мозге, выявленным методом проточной цитометрии.

R1 - это «кластер» из 20 CD45-негативных клеток (ось абсцисс), положительных в реакции с антителами к ЕpCAM (CD326) (ось ординат)



Результаты проточной цитофлоуметрии

- Таким образом, метод проточной цитометрии в сочетании с иммуномагнитным обогащением популяции опухолевых клеток позволил диагностировать ДОК у 11 (22,0%) из 50 больных

Распределение больных РМЖ с наличием ДОК в костном мозге по стадиям

Стадия	Больные (N=50)	Число больных с ДОК с костном мозге	
		абс.	%
I	3	0	0
IIA	12	2	16,7
IIB	9	3	33,3
IIIA	5	1	20,0
IIIB	7	1	14,3
IIIC	9	0	0
IV	5	4	80,0

M1 vs M0

- Метод проточной цитометрии позволил определить ДОК в костном мозге у 80% и у 15,5% больных со стадиями M1 и M0, соответственно
- Самое высокое среднее число ДОК на 1 млн. миелокариоцитов - при M1 : $11,4 \pm 8,34$ клетки

Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA

Корреляция обнаружения ДОК с

- Размером опухолевого узла ($p > 0,05$)
- Степенью злокачественности ($p > 0,05$)
- Рецепторным статусом ($p > 0,05$)
- Статусом регионарных л/узлов ($p > 0,05$)
- Суммарным баллом злокачественности ($p = 0,009$)

Суммарный балл злокачественности

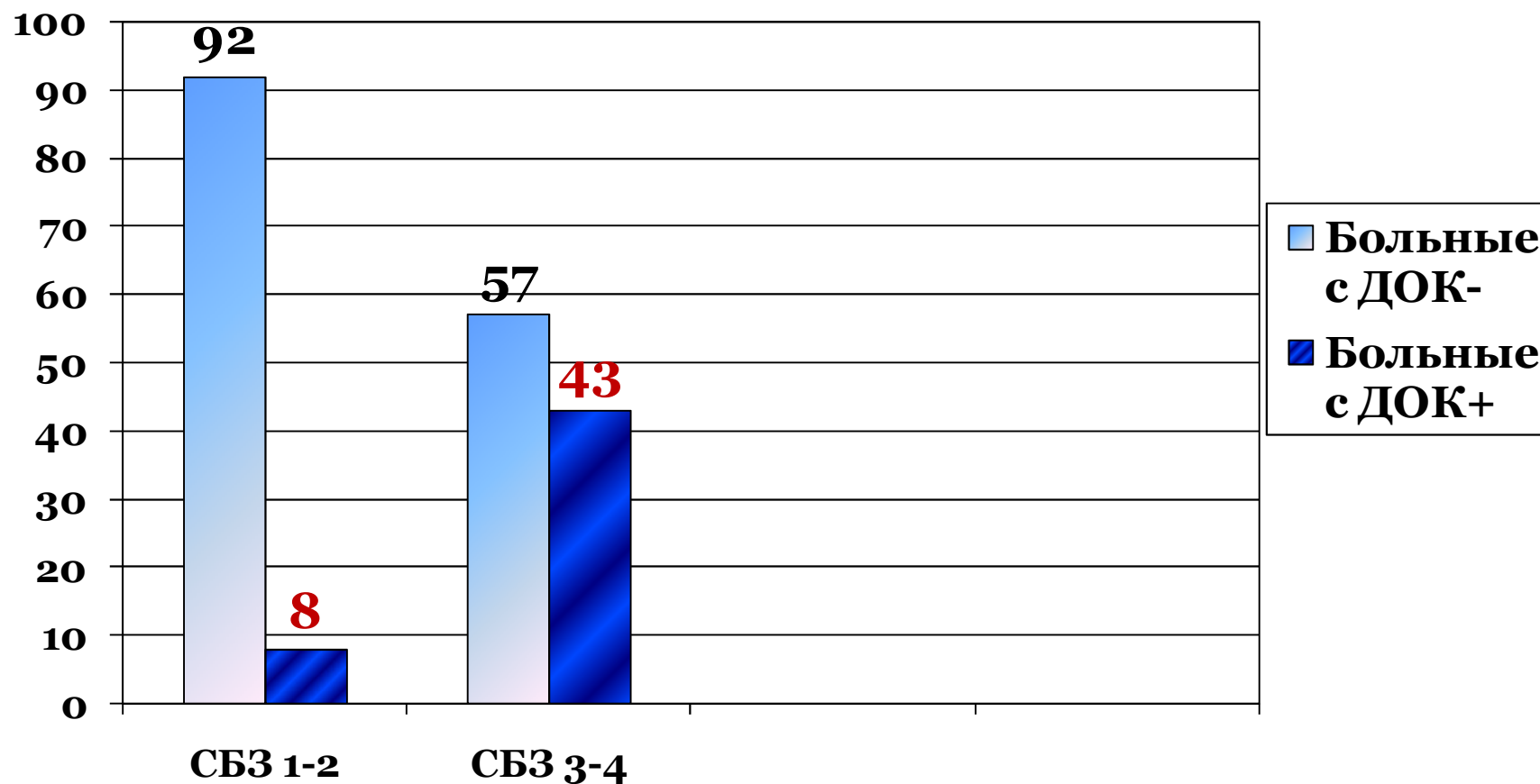
В.В. Занкин, В.В. Родионов, Р.М. Хайруллин, В.В. Кометова, М.М. Лазаревский
(2009)*

$$\text{СБЗ} = \text{НСБ (СД+П+М)} + \text{ЛИ} + \text{ИК} + \text{Э}$$

- Степень дифференцировки опухоли (наличие в опухолевой ткани структур с отчётливым просветом) (1-3 балла);
- Полиморфизм опухолевых клеток (1-3 балла);
- Митотическая активность опухолевых клеток (1-3 балла);
- Инфильтративный компонент (1-5 баллов);
- Лимфоидная инфильтрация стромы опухолевого узла (0-3 баллов);
- Опухолевые эмболы в сосудах стромы (0-3 баллов).

*Материалы VI Российской научно-практической конференции «Модниковские чтения» по теме: «Высокотехнологичные методы диагностики и лечения в онкологии». — Ульяновск, 2009. — с. 48-50.

**Распределение больных РМЖ в зависимости
от суммарного балла злокачественности (СБЗ)
первичной опухоли и выявления ДОК в костном
мозге**



Выводы

Возможность выявления единичных опухолевых клеток в костном мозге вследствие большей чувствительности является главным преимуществом метода проточной цитометрии в диагностике диссеминированных клеток рака молочной железы в костном мозге по сравнению с морфологическими методами исследования: в 11 (22,0%) и 2 (4,0%) случаях из 50, соответственно. В то же время обнаружение малого количества опухолевых клеток сложно трактовать в тех случаях, где они не формируют четкого кластера. При выявлении такого кластера микрометастазы могут быть констатированы даже при наличии менее 1 опухолевой клетки на 1 млн. миелокариоцитов.

БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ !

