

УДК 616-006.04:618.19:616.419

²А.В. ЖИЛЬЧУК, ¹Н.І. СЕМЕСЮК, ¹Ю.Й. КУДРЯВЕЦЬ¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України, Київ;²Рівненський обласний онкологічний диспансер, Рівне**ОПТИМІЗАЦІЯ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА РАК ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД НАЯВНОСТІ ДИСЕМІНОВАНИХ ПУХЛИННИХ КЛІТИН ТА РІВНЯ ПЕВНИХ ЦИТОКІНІВ У КІСТКОВОМУ МОЗКУ**

Наявність ДПК та ФНП в кістковому мозку свідчить про високий ризик прогресії захворювання у хворих на РГЗ. У хворих з наявністю в КМ ДПК та високого рівня ФНП передопераційна поліхіміотерапія за схемою Ас→Р з наступним застосуванням бісфосфонатів у післяопераційному періоді є більш ефективною у порівнянні зі схемою АС. Нова схема дозволяє суттєво зменшити ймовірність прогресії захворювання та частоту виникнення кісткових метастазів. У хворих на РГЗ в стадії захворювання Т1-4N1-2, де спостерігалась гіперекспресія маркера HER 2/neu та негативний статус рецепторів стероїдних гормонів, мала місце висока частота ДПК у кістковому мозку. Для переважної більшості хворих на гормоночутливий РГЗ в стадії захворювання Т1-4 N1-2 властивий низький рівень ФНП в кістковому мозку.

Ключові слова: рак молочної залози, кістковий мозок, дисеміновані пухлинні клітини, фактор некрозу пухлин альфа, бісфосфонати

Вступ. Рак грудної залози залишається найчастішим захворюванням у всьому світі. Не дивлячись на суттєві досягнення клінічної онкології, смертність від РГЗ продовжує неухильно зростати у всьому світі, за винятком країн Західної Європи та Північної Америки, де смертність від РГЗ зменшується за рахунок впровадженого скринінгу та застосування системної терапії. Саме ця ситуація піднімає дуже важливе питання: чи повинні всі хворі, в котрих вперше було діагностовано РГЗ, підлягати всім можливим діагностичним та терапевтичним засобам обстеження заради забезпечення зниження смертності від РГЗ. На жаль, наявність серйозних побічних ефектів, висока токсичність лікувальних засобів, їхня вартість породжують ряд дискусій про необхідність та раціональність впровадження в практичну онкологію подібної стратегії. Саме тому виглядає переконливим та обґрунтованим такий підхід до даної проблеми, як застосування точних, достовірних, перевірених прогностичних та предиктивних методів дослідження, які повинні бути обов'язковими з метою покращення ефективності ад'ювантної системної терапії.

Сьогодні, поруч зі стандартними прогностичними факторами (клінічне та патоморфологічне стадіювання захворювання, розміри пухлини, статус регіонарних лімфатичних вузлів) та стандартними предиктивними факторами (статус рецепторів стероїдних гормонів, рівень експресії HER-2/neu), найбільш перспективними, з точки зору рутинного застосування в клініці, є виявлення метастазів у кістковому мозку до початку лікування та через декілька років від початку спостереження [1]. Концепція визначення метастазів у кістковому мозку у хворих на солідні пухлини була впроваджена в клінічну онкологію більше 25 років тому завдяки науковим працям Pantel [2, 3], Dearnaley та

інших дослідників; було доведено, що, не зважаючи на проведення радикальної хірургічної операції, у хворих на РГЗ залишається ризик появи метастазів, які зумовлені наявністю скритих пухлинних клітин у кістковому мозку. Варто зауважити, що саме кістковий мозок відіграє найбільш значиму роль серед видалених органів як орган-індикатор розвитку прогресії захворювання [4].

Близько 10 років тому подібні пухлинні клітини у кістковому мозку отримали назву "мікрометастази" та були включені в систему TNM в її редакції, отримавши наступні трактування за категорією рМ: ізольовані пухлинні клітини, які знайдені в кістковому мозку за допомогою гістологічних методів –Мо (i+), а за допомогою негістологічних методів (молекулярних методів)–Мо(mol+). Подібні клітини розцінюються як депоновані або дисеміновані, в залежності від знаходження їх в крові або у кістковому мозку. Наявність таких клітин в організмі онкологічних хворих розцінюють як мінімальну залишкову хворобу.

Діагностика дисемінованих пухлинних клітин (ДПК), на жаль, не стала складовою рутинного визначення стадії захворювання, хворих не лікують із врахуванням факторів індивідуального ризику. В той же час, діагностика ДПК є вкрай необхідною, оскільки саме завдяки цьому можуть бути виділені групи хворих з високим ризиком розвитку рецидивів та метастазів, для долікування яких повинні бути застосовані відповідні підходи. Јанні та співавтори встановили, що у хворих на РГЗ з негативними регіонарними лімфовузлами, в яких у кістковому мозку були виявлені пухлинні клітини, властивий більш високий ризик несприятливого перебігу захворювання, ніж у пацієнтів з негативними лімфовузлами, в яких у кістковому мозку пухлинні клітини не були виявлені. Метааналіз

результатів іншого дослідження (Braun et al 2005) хворих на РГЗ показав, що наявність ДПК у кістковому мозку (КМ) є підставою передбачувати розвиток метастазів не тільки в кістках, але і в інших тканинах та органах. Виходячи із результатів подібних досліджень, які показали клінічну значимість визначення ДПК та циркулюючих пухлинних клітин (ЦПК) у хворих на РГЗ в 2007 році вищезгадані типи клітин були вперше оцінені в ASCO як потенційні пухлинні маркери (Harris et al. 2007); таким чином, наявність метастазів у кістковому мозку асоціюється з гіршим прогнозом, однак залишається зовсім незрозумілим, як варто застосовувати подібні дані в клініці.

Не менш актуальною та важливою залишається проблема розробки високочутливих методів ідентифікації пухлинних клітин, одержання їх молекулярної характеристики, проблема пошуку зв'язку особливостей біології первинної пухлини з появою дисемінованих та циркулюючих пухлинних клітин; отже, механізми дисемінації клітин злоякісних пухлин та їх депонування у кістковому мозку онкологічних хворих є на цей час не розкритими. На сьогоднішній день основними методами виявлення ДПК/ЦПК залишаються імуноцитологічний (імуноцитохімічний, проточна цитометрія) та молекулярно-біологічний методи. Загальним недоліком обох методів є відсутність можливості розрізнити життєздатні та апоптичні клітини. За останній час з'явився новий метод аналізу ДПК/ЦПК, який дозволяє провести це важливе дослідження-метод EPISPOT (Epithelial Immuno SPOT). Подібна технологія передбачає визначення поодиноких клітин з особливими властивостями завдяки їх реакції з моноклональними антитілами (МКАТ). Подібні антитіла часто використовують в комбінаціях з метою розпізнавання типу та біологічних властивостей клітин-мішеней. Не викликає сумніву, що диференціювання життєздатних та апоптичних ДПК/ЦПК, а також визначення їх біологічних характеристик, які ініціюють метастазування, безумовно, має велике значення; розроблений новий метод аналізу EPISPOT дозволяє виявити життєздатні ЦПК/ДПК у онкологічних хворих, однак подібні технології в Україні на сьогоднішній день, на жаль, відсутні [5, 6].

Саме тому, не меншої уваги заслуговує напрямок, який спрямований на дослідження ролі певних цитокінів у пунктатах кісткового мозку та в сироватці периферійної крові. Саме цитокіни кісткового мозку можуть відігравати важливу роль специфічного мікрооточення, яке сприяє як депонуванню пухлинних клітин у кістковому мозку, так і їх подальшій дисемінації. Особливої уваги, зокрема, заслуговують ті цитокіни, які виявлені в пухлинному мікродовкіллі, сироватці крові, кістковому мозку та пригнічують клітинну проліферацію. Їх джерелом можуть бути як пухлинні клітини, так і клітини організму. До цієї групи цитокінів належать фактор некрозу пухлин, трансформую-

чий фактор росту-бета (Тфр- β), маммастатин, інтерферон (ІФН). Останній, як відомо, володіє вираженою цитостатичною активністю щодо трансформованих клітин, вираженою противірусною активністю тощо. Цитокіни цього класу залучені до процесів регуляції ангиогенезу, регуляції диференціації та проліферації імуніцитів, проявляючи, таким чином, імуномодельючу активність та опосередковано впливаючи на пухлинну прогресію.

Важливим компонентом мікрооточення пухлинних клітин є фактор некрозу пухлин (ФНП) або кахектин-поліпептид, який складається із 157 амінокислот та синтезується макрофагами, НК-клітинами, злоякісними пухлинами, В,-Т-лімфоцитами, гранулоцитами, міоцитами, фібробластами, гранульозними клітинами тощо. Вперше цей цитокін було ідентифіковано завдяки його протипухлинній активності: у експериментальних тварин, зокрема, мишей з пухлинами під час гострої бактеріальної інфекції було виявлено геморагічний некроз пухлин, пов'язаний з підвищенням в організмі тварин продукції поліпептиду, який і назвали фактором некрозу пухлин. Пізніше з'ясувалось, що ФНП є важливим компонентом гострої запальної реакції та імунної відповіді і здатен модифікувати клітинні властивості та міжклітинні стосунки [7]. Сказане свідчить про актуальність досліджень, пов'язаних з виявленням ДПК у кістковому мозку, з дослідженням прогностичної (предиктивної) ролі цього феномену та з пошуками шляхів корекції лікувальних схем у хворих з наявністю ДПК та певних цитокінів у кістковому мозку.

Мета дослідження. Визначити наявність ДПК та біологічну активність цитокінів (ФНП, ІФН, КСФ) у кістковому мозку, а також біологічну активність даних цитокінів у периферійній крові.

Матеріали та методи. Дана дослідницька робота проводилась під час лікування 119 хворих на РГЗ в стадії захворювання T1-4N1-2Mo, у яких забір кісткового мозку проводили шляхом стерильної пункції до початку лікування; одночасно проводили забір проб периферичної крові.

Визначали наявність ДПК та біологічну активність цитокінів (ФНП, ІФН, КСФ) у кістковому мозку, а також біологічну активність даних цитокінів у периферійній крові.

Результати досліджень та їх обговорення. Дослідження показали, що у 47 хворих (39,4 %) мала місце наявність ДПК до початку лікування. Ці хворі були розподілені на 2 групи. 1 група хворих (n=20) – ті, яким була проведена передопераційна системна терапія за схемою Ас (доксорубіцин 60 мг/м² + циклофосфан 600 мг/м² в/в на кожну 21 добу – 4 цикли. 2 група хворих (n=27) – ті, яким була проведена передопераційна системна терапія за схемою АС→Р: доксорубіцин 50мг/м² в/в +циклофосфан 500мг/м² в/в – 4 цикли з інтервалом 14 дб, після чого паклітаксел 175 мг/м² в/в 4 цикли з інтервалом 14 дб; в

післяопераційному періоді всім хворим 2 групи лікування було доповнене шляхом застосування біосфосфонатів за схемою: Зомета 4 мг/в/в на кожну 28 добу № 6.

Тактика лікування тієї частини пацієнтів, у яких до початку лікування не були виявлені ДПК у кістковому мозку, залежала від рівня ФНП в КМ

та сироватці крові: адже, згідно з нашими попередніми даними (табл. 1) у 100 % хворих з наявністю вторинного пухлинного процесу рівень ФНП в КМ значно підвищений (>150 пкг/мл; у хворих, що перебували в стадії ремісії захворювання, ФНП переважно відсутній у КМ, або його рівень <100 пкг/мл).

Таблиця 1

Рівень ФНП та ГМ-КСФ у КМ та ПК у залежності від клінічного статусу (ремісія /прогресія) хворих на РМЗ

Рівень цитокінів Наявність (ДПК)	Кількість хворих			
	Ремісія n=14		Прогресія n=19	
	КМ	ПК	КМ	ПК
ФНП (+)	1	2	19	17
ФНП (-)	13	12	0	2
ГМ-Ксф (+)	0	1	3	15
ГМ-Ксф (-)	14	13	16	4
ДПК	1	-	11	-

За характером прогресії у 15 пацієнтів із 19 мало місце метастатичне ураження кісток, у 3 хворих – легені і середостіння, і у 1 пацієнтки – спостерігалися вісцеральні метастази.

Таким чином, наші дослідження показали, що у хворих з прогресією захворювання має місце високий рівень ФНП в КМ, що корелює з високою частотою кісткових метастазів, при цьому в 63,6 % випадків виявлені ДПК в КМ. Саме тому, варіант первинного лікування 72 хворих, де не були виявлені ДПК в КМ, залежав від рівня ФНП у кістковому мозку. Ці хворі так були розподілені на 2 групи:

1 група (n=19) – хворі, в яких не виявлено високого рівня ФНП в КМ і які лікувалися в передопераційному періоді за схемою АС і 2 група

(n=53) – хворі, в яких виявлено високий рівень ФНП в КМ і яка складалася з 2-х підгруп:

Підгрупа А (n=26) – хворі лікувалися за схемою АС; а підгрупа В (n=27) – хворі лікувалися за схемою АС→Р+ Золендронна кислота.

Гормонотерапія в ад'ювантному режимі шляхом застосування антиестрогенів (Фарестон) або інгібіторів ароматази (Аромазин) проводилась у 21 хворого, в котрих виявлені ДПК в КМ та у 37 хворих, у яких не виявлено ДПК в КМ до початку лікування. Овареальна супресія шляхом застосування агоністів релізінг-гормонів проводилось 16 пацієнткам, а хірургічна кастрація мала місце у 11 випадках. Спостереження за хворими проводилось протягом 24 місяців. Результати лікування представлені у таблиці 2.

Таблиця 2

Порівняльна оцінка ефективності лікувальних схем ПХТ АС та АС→Р+Зомета в залежності від наявності ДПК та ФНП у кістковому мозку та ПК у хворих на РГЗ в стадії захворювання Т1-4 N1-2 Мо

Лікувальні схеми	Дисеміновані ПК в КМ (+) n=47			Дисеміновані ПК в КМ (-) n=72					
	ФНП в КМ (+) n=31	ФНП в КМ (-) n=16		ФНП в КМ (+) n=53			ФНП в КМ (-) n=19		
АС	20 хворих			А 26 хворих			19 хворих		
	Ремісія	Прогресія	Померло	ремісія	прогресія	померло	ремісія	прогресія	померло
	5	11	4	11	11	4	15	4	0
АС→Р+Золендронна Ки-та	27 хворих			В 27 хворих					
	Ремісія	Прогресія	Померло	ремісія	прогресія	померло			
	23	3	1	22	4	1			

Як видно із таблиці 2, питома вага хворих, які знаходяться в стані ремісії протягом 30 місяців від

початку спостереження приблизно однакова в обох групах хворих, де спостерігалися ДПК в КМ і

де вони були відсутні становить 59,5 % та 60,2 % відповідно, але при порівнянні ефективності двох лікувальних схем АС та АС→Р+золендронова кислота у хворих з ДПК (А) в КМ виявлена значно більша кількість хворих, які перебували в ремісії, з меншою частотою прогресії захворювання та мінімальною кількістю померлих серед пацієнтів, що лікувалися за схемою АС→Р+Золендронова кислота (48,9 % проти 10,6 %) (В).

Аналогічна картина прослідковується під час порівняння тих же лікувальних схем у хворих з відсутністю ДПК в КМ, де до початку лікування мав місце високий рівень ФНП в КМ. Встановлено, що питома вага пацієнтів, які перебували в

стані ремісії, була найбільшою, кількість хворих в стані прогресії була мінімальною, а померлих не було серед хворих, які лікувалися за схемою АС→Р+Зомета.

Слід зауважити, що із загальної кількості хворих, які перебувають в стані прогресії та лікувалися за схемою АС, питома вага хворих з метастазами в кістки мала місце у 19 із 26 пацієнтів; прогресія захворювання у хворих, які лікувалися за схемою АС→Р+Зомета, мала місце лише в 7 випадках, де було констатоване метастатичне ураження легень (2 випадки) та кісток (5 випадків). Рівень експресії рецепторів стероїдних гормонів та маркера HER 2|neu висвітлено в таблиці 3.

Таблиця 3

Рівень експресії рецепторів стероїдних гормонів та маркера HER 2|neu в пухлинних клітинах у хворих на РМЗ в стадії захворювання Т1-4N1-2

HER 2 neu Рецептори стероїдних гормонів	Кількість хворих	
	HER 2 neu (-) n=98	HER 2 neu (+) n=21
PE+PP+ PE (-) PP + PE (+) PP - n=76	58	18
PE (-) PP (-) n=43	40	3

Особливої уваги заслуговує розподіл рівня експресії рецепторів стероїдних гормонів та маркера HER 2|neu в пухлинних клітинах у залежності від

наявності або відсутності ДПК у кістковому мозку та рівня ФНП (табл. 4).

Таблиця 4

Рівень експресії рецепторів стероїдних гормонів та маркера HER 2|neu в пухлинних клітинах у хворих на РМЗ в залежності від наявності ДПК та ПК у хворих на РМЗ в стадії захворювання Т1-4N1-2

Експресія рецепторів стероїдних гормонів та маркера HER 2 neu в пухлинних клітинах	Кількість хворих			
	Депоновані ПК в КМ (+) n=47		Депоновані ПК в КМ (-) n=72	
	ФНП в КМ (+) n=31	ФНП в КМ (-) n=16	ФНП в КМ (+) n=53	ФНП в КМ (-) n=19
PE+PP+ PE (-) PP + PE (+) PP -	15	20	18	23
PE (-) PP (-)	28	4	8	-
HER 2 neu(-)	22	16	41	19
HER2 neu(+)	14	-	4	-

Як видно із таблиці 4, гіперекспресія HER 2|neu найчастіше спостерігалася в пухлинах тих хворих, у яких були виявлені ДПК у кістковому мозку (14 випадків із 18 (78 %)); щодо хворих, у яких мав місце низький рівень ФНП в кістковому мозку, гіперекспресії HER 2|neu в пухлинних клітинах не спостерігалось. Аналогічна картина прослідкову-

ється у хворих з негативним статусом стероїдних гормонів: у 28 випадках із 40 (70 %) була встановлена наявність ДПК у кістковому мозку.

Щодо хворих із позитивною експресією рецепторів стероїдних гормонів, то у переважній більшості з них (43 із 76 (56,6 %)) спостерігався низький рівень ФНП у кістковому мозку.

Висновки.

1. Наявність ДПК та ФНП у кістковому мозку свідчить про високий ризик прогресії захворювання у хворих на РГЗ.

2. Передопераційна поліхіміотерапія за схемою Ас→Р з наступним застосуванням бісфосфонатів у післяопераційному періоді у хворих з наявністю ДПК в КМ та високим рівнем ФНП в КМ є більш ефективною у порівнянні зі схемою АС.

3. Застосування бісфосфонатів у післяопераційному періоді у хворих з наявністю ДПК та ви-

соким рівнем ФНП у КМ здатна суттєво зменшити ймовірність прогресії захворювання та частоту виникнення кісткових метастазів.

4. У хворих на РГЗ у стадії захворювання Т1-4N1-2, де спостерігалась гіперекспресія маркера HER-2/neu та негативний статус рецепторів стероїдних гормонів, мала місце і висока частота ДПК у кістковому мозку.

5. Для переважної більшості хворих на гормоночутливий РГЗ у стадії захворювання Т1-4 N1-2 властивий низький рівень ФНП у кістковому мозку.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Чехун В.Ф., Осинский С.П. Минимальная остаточная болезнь при солидных опухолях. / В.Ф.Чехун, С.П. Осинский // Здоров'я України. — 2011. — № 4. — С. 14—15.
2. Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. / M. Lacroix // Endocrine-Related Cancer, 2006. — Vol. 13. — P. 1033—67.
3. Lianidou E.S. What's new on circulating tumor cells? A meeting report. / E.S. Lianidou, D. Mavroudis, G. Sotiropoulou [et al.] // Breast Cancer Res, 2010. — Vol. 12. — P. 307-18.
4. Pantel K, Schlimok G, Braun S et al. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. / K. Pantel, G. Schlimok, S. Braun [et al.] // J Natl Cancer Inst, 1993. — Vol. 85. — P. 1419—24.
5. Pantel K., Woelfle U. Detection and molecular characterization of disseminated tumor cells: implications for anti-cancer therapy. / K. Pantel, U. Woelfle // Biochim Biophys Acta, 2005. Vol. 1756. P. 53—64.
6. Ross J.S. Circulating and disseminated tumor cells in the management of breast cancer. / J.S. Ross, E.A. Slodkowska // Am J Clin Pathol, 2009. — Vol. 132. — P. 237-45.
7. Waterston A. TNF and cancer: good and bad? / A. Waterston, M. Bower // Cancer Ther, 2004. Vol. 2. — P. 131-48.

²A.V. ZHYLCHUK, ¹N.I. SEMESYUK, ¹YU.Y. KUDRYAVETS

¹*Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology. RE Kavetsky Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;*

²*Regional Oncologic Dispensary Exactly, Rivne*

OPTIMIZING TREATMENT OF BREAST CANCER BASED ON THE PRESENCE OF DISSEMINATED TUMOR CELLS AND THE LEVELS OF CERTAIN CYTOKINES IN BONE MARROW

The presence of DTC and high level of TNF in bone marrow confirm to increase the risk of progression of disease in breast cancer patients. Preoperative chemotherapy with Ac→P followed by bisphosphonates in postoperative period of breast cancer patients with DTC and increased level of TNF in BM was more effective than AC scheme. New scheme led to a significant reduction cases with progression of disease and decreasing of the incidence of bone metastasis. The negative status of steroid hormone receptors and Her2/neu hyperexpression in patients with T1-4N1-2 was correlated with high incidence of DTC in BM. The most patients with T1-4N1-2 hormone-sensitive breast cancer had low level of TNF in BM.

Key words: breast cancer, bone marrow, disseminated tumor cells, tumor necrosis factor alpha, bisphosphonates.

Стаття надійшла до редакції: 1.03.2013 р.