

# Towards the study of bone marrow DTC in breast and ovarian cancer

Nikolay Tupitsyn

FSBI “N.N.Blokhin Russian Cancer Research Center”,  
the Russian Academy of Medical Sciences

MOSCOW, RUSSIA







# “HAEMATOPOIESIS IMMUNOLOGY” CONFERENCE 6-7 June, 2013

250 participants from 17 countries



[www.ronc.ru/videoHI-2013](http://www.ronc.ru/videoHI-2013)

# “Haematopoiesis Immunology”



Editor-In-Chief  
G. Janossy



Arguments and Facts  
- Health,  
№30, July 2013

## ВОПРОС-ОТВЕТ

### Искоренить до последней клетки?



Моя мама просит тщательное лечение по поводу рака молочной железы. Недавно обследовалась. Ей сказали, что результаты хорошие, но у нее остались в крови единичные раковые клетки. Могут ли они вновь «завестись» болезнью? И что делать, чтобы этого не произошло?

Беларусь, Могилевская обл.



Отвечает заведующий лабораторией иммунологии гематологии (профессор) – Ред.) ФГБУ «РОИЦ» им. Н.Н. Блохина» РАМН, профессор Николай ТУПИЦЫН:

– Найти ответы на поставленные вами вопросы вот уже много лет пытаются онкологи всего мира. Речь о минимальной остаточной болезни при раке и опухолях крови, когда на определенных этапах лечения создается впечатление, что болезнь полностью излечена.

Но в действительности даже наличие единичных раковых клеток в организме таят в себе большую угрозу. Спустя годы, а иногда и десятилетия эти клетки могут дать очаги роста в других органах и тканях. И справиться с ними уже будет практически невозможно. Особенно если это опухоли эпителиальной природы (рак молочной железы, простатика, предстательной железы и т.д.).

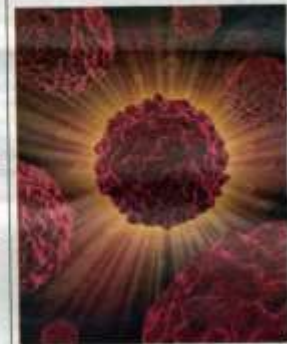
Тем не менее вопрос по-прежнему остается открытым: всегда ли нужно оставаться раковые клетки уничтожать или оставить их в покое, учитывая, что организм пациента уже и так ослаблен длительным курсом химио- или лучевой терапии? Не секрет, что методы лечения в онкологии – очень агрессивные, сложные. Воздействуя на опухоль, препараты «бьют» и по здоровым клеткам и тканям организма. Поэтому сейчас усилия онкологов (в том числе и РОИЦ им. Н.Н. Блохина) направлены на поиски селективного – избирательного – воздействия на опухолевые клетки.

Один из самых интересных подходов в этой области – воздействие на опухоль пентамерными иммуноглобулинами класса M, которые способны

связываться с раковыми клетками и специально их уничтожать. Наши медицинские коллеги разработали специальную технологию получения этих антител, выделенных из организма человека.

В Европе эта методика уже прошла вторую стадию клинических исследований при лечении рака желудка. В России подобные работы ведутся нами при раке молочной железы совместно с Институтом биоорганической химии.

Но путь от эксперимента до создания препарата очень долгий. Наряду с научными разработками, направленными на eradication (от латинского «искоренение» – Ред.) рака, в ведущих российских и зарубежных онкологических клиниках в настоящее время практикуется контроль минимальной остаточной болезни специально подобранными дозами химио- или таргетных препаратов, благодаря которым больные полноценно живут многие годы.



- CTC or DTC?

- CTC **AND** DTC!

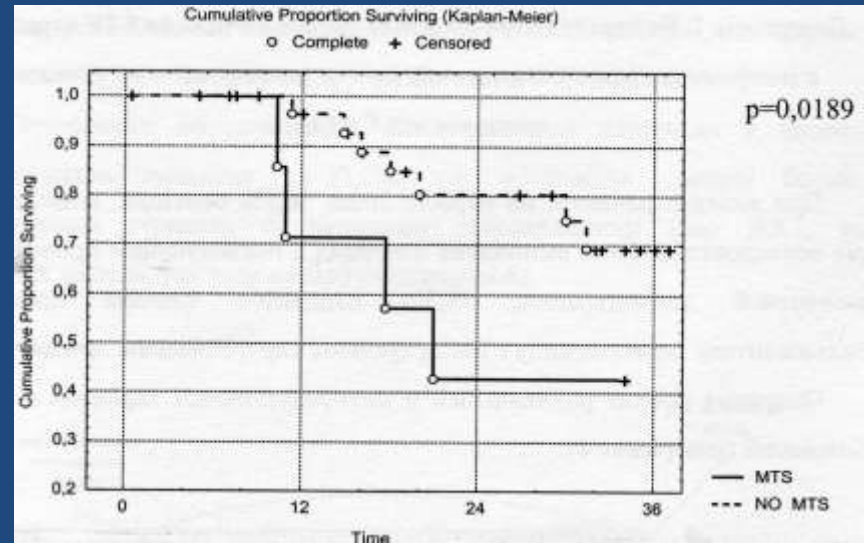
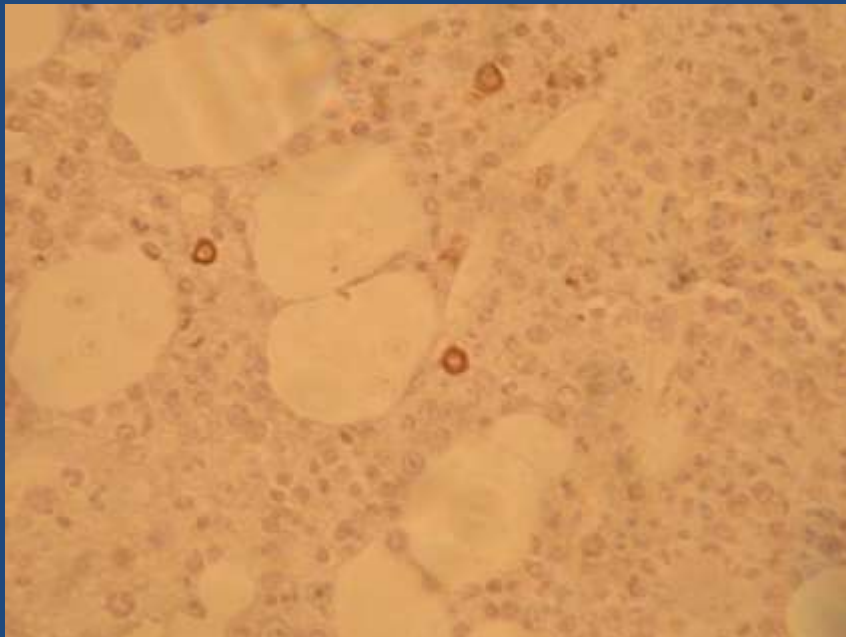
# IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF DTC IN BONE MARROW (OVARIAN CANCER)

(Mabs KL-1, CAM5.2, CK-20 - the same reaction pattern)

Frequency: 9/41 (22%)

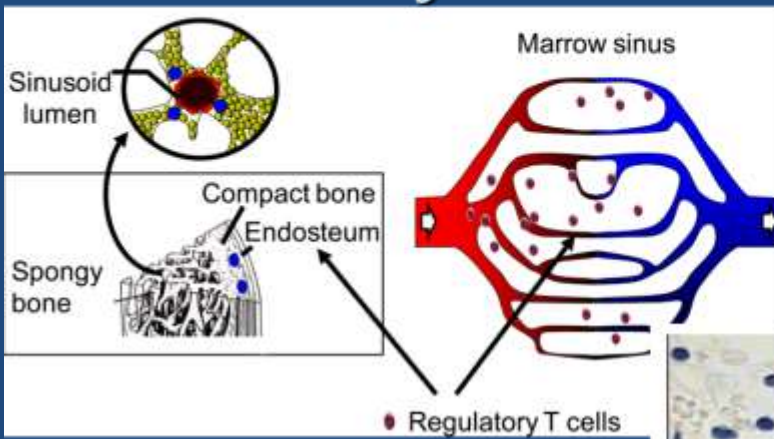
DTC-positive group of ovarian cancer Pts  
has a poorer prognosis (OS) at a 3-year  
follow-up

( $p= 0.0189$ ). Bokin I., 2010

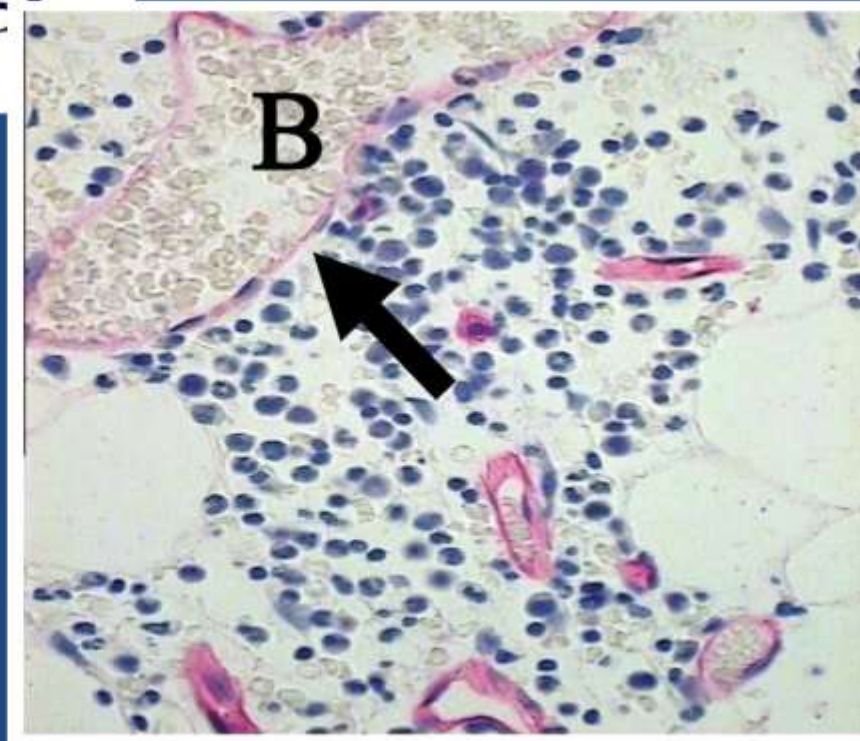




# Bone marrow sinuses



CD34 staining  
(vessels,  
sinuses)



# Problem: dilution of BM with PB

Abrahamsen J.E. et al.,  
Cytometry 1995,  
V.19, P.77-85:

No PB admixture  
in low BM volume  
( $<0.2$  ml)



Correct volume of BM



**FSBI "RUSSIAN CANCER RESEARCH CENTER"  
HAEMATOPOIESIS IMMUNOLOGY Lab.**

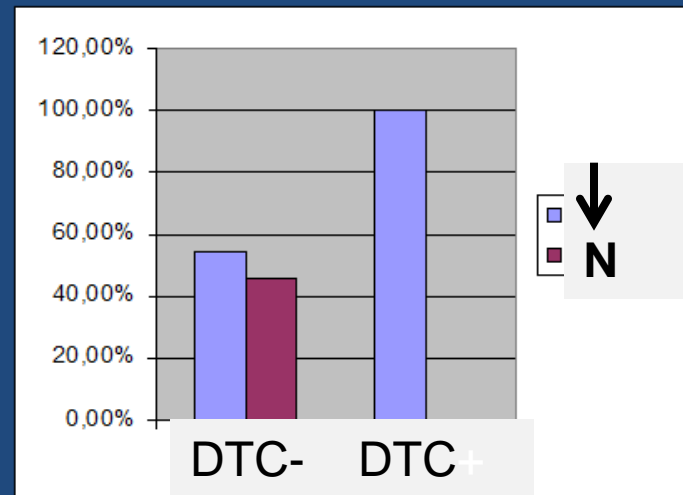
**MYELOGRAM**

<b>N case hist.</b>	13/08700	Date	20.08.13.
<b>NAME</b>	BOUKOVA.	Department	
<b>Diagnosis</b>	Breast Cancer		
<b>Cellularity</b>	218 000/mcl (41,6-195)	<b>Megacaryocytes:</b>	enough
<b>Number of cells</b>	500	100	
<b>Blasts</b>	0,8 (0,2-0,6)		
<b>Granulocytic Row</b>			
<b>Promyelocytes</b>	1,0 (1,0-4,1)		
	<b>neutrophils</b>	<b>eosinophils</b>	<b>basophils</b>
<b>Myelocytes</b>	9,8 (7,0-12,2)	0 (0-1,0)	0
<b>Metamyelocytes</b>	11 (8,0-15,0)	0 (0-1,2)	0
<b>Bands</b>	23,8 (12,8-23,7)	0,2 (0,1-1,2)	0
<b>Segments</b>	16,6 (13,1-24,1)	0,6 (0,4-2,4)	0 (0-0,4)
<b>Sum of granulocytes</b>		63,0 (57,1-66,5)	
<b>Index of neutrophil maturation</b>		0,5 (0,5-0,9)	
<b>Monocytic Row</b>			
<b>Monoblasts</b>	0		
<b>Promonocytes</b>	0		
<b>Monocytes</b>	2,2 (0,7-3,1)		
<b>Lymphoid Row</b>			
<b>Lymphoid cells</b>	0	<b>Plasmablasts</b>	0
<b>Prolymphocytes</b>	0	<b>Proplasmacyte</b>	0
<b>Lymphocytes</b>	3,4 (4,3-13,7)	<b>Plasmacytes</b>	1,6 (0,1-1,8)
<b>Erythroid Row</b>			
<b>Pronormoblasts</b>	0 (0,2-1,1)		
<b>Normoblasts Basophylic</b>	2,2 (1,4-4,6)		
<b>Normoblasts Polychromatophylic</b>	17,2 (8,9-16,9)		
<b>Normoblasts oxyphylic</b>	9,6 (0,8-5,6)		
<b>Sum of erythroid cells</b>	29,0 (14,5-26,5)		
<b>Index of erythroid cell maturation</b>	0,9 (0,7-0,9)		
<b>Leuco-erythroid ratio</b>	2,2 (2,1-4,5)		

**Description**

Bone marrow is hyper cellular. Enough megacaryocytes.  
Myelogram is normal.  
Metastatic cells are not found (6 smears investigated).

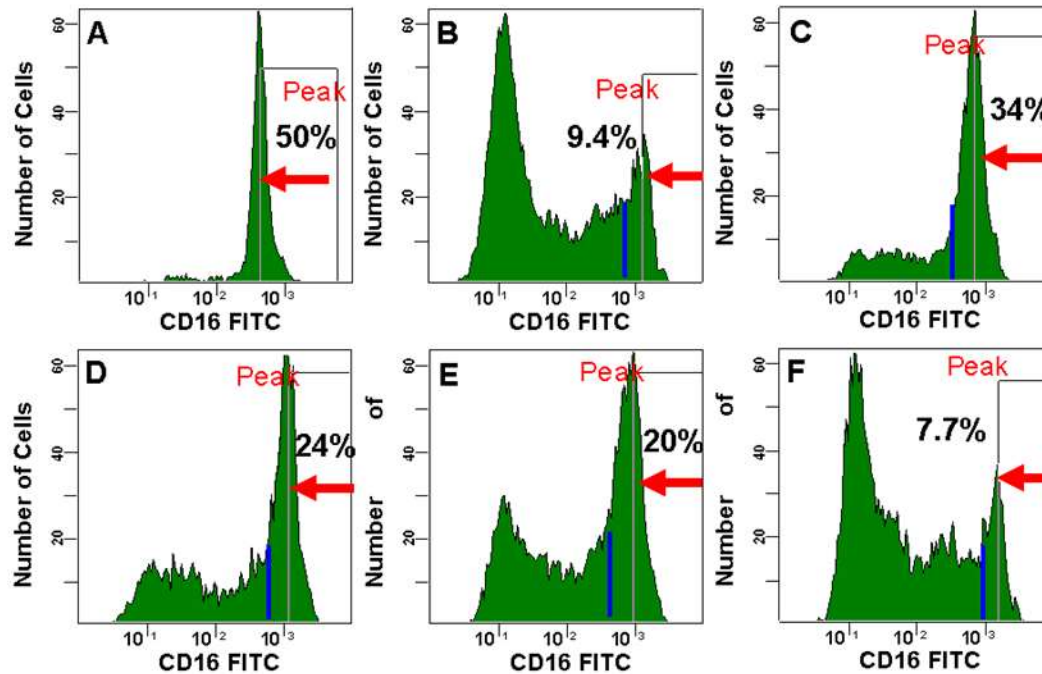
Signatures of Physicians



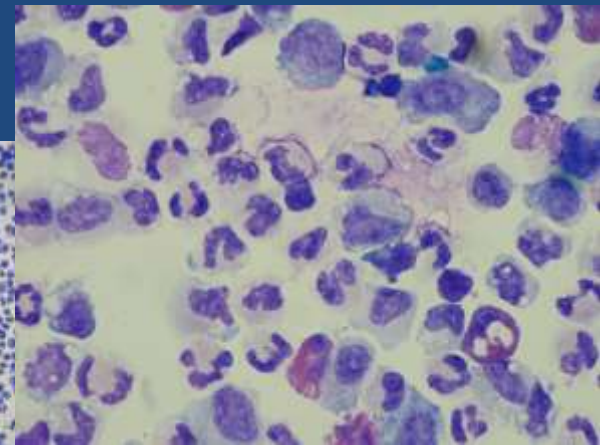
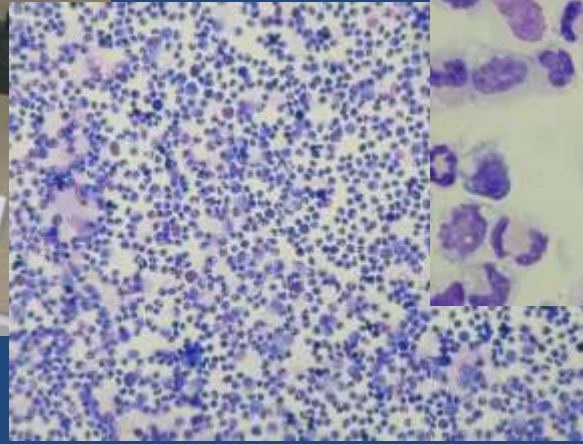
P=0,02

Diminution of Polychromatophylic NBLs in cases of DTC of squamous cell cancer of head & neck

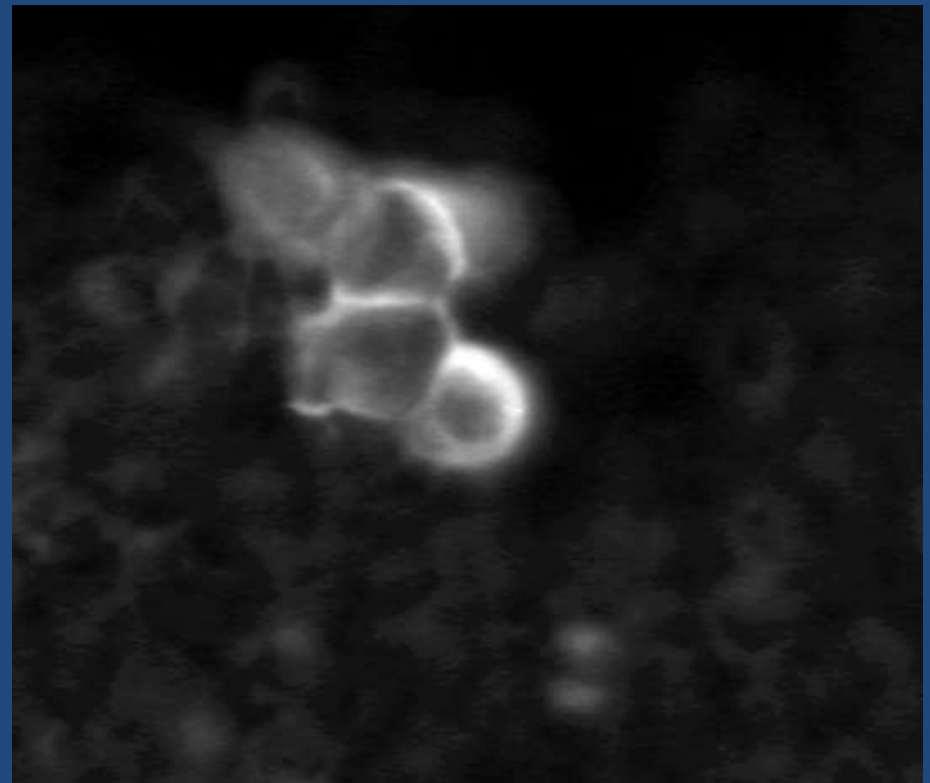
# Loken M. et al., 2010 (Haematopiesis Immunology)



A - blood,  
B,F - no dilution of BM  
C-E - BM dilution with  
blood



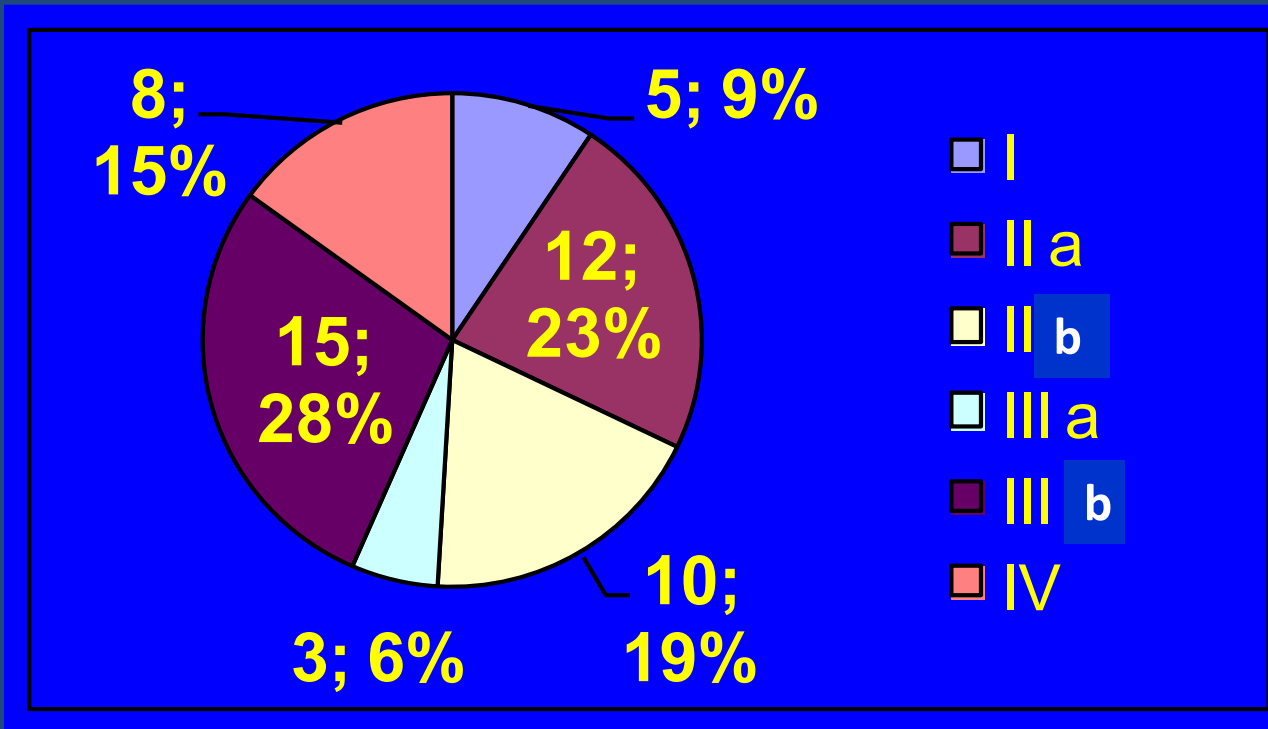
Immunofluorescent  
detection of breast  
cancer cells  
in bone marrow.  
Antibodies CAM 5.2





# 53 patients, Breast Cancer

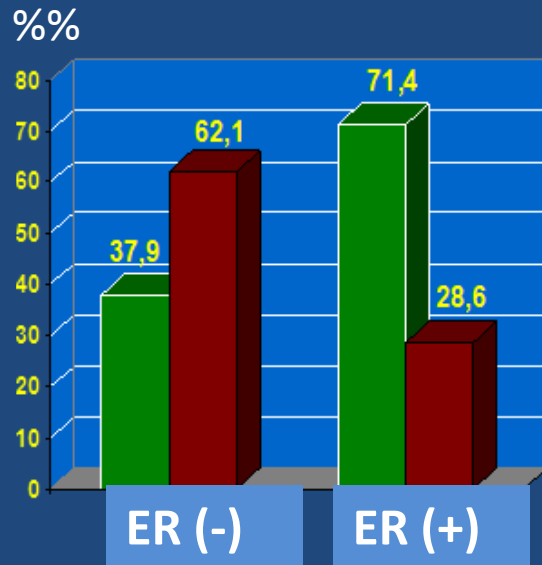
## Stages



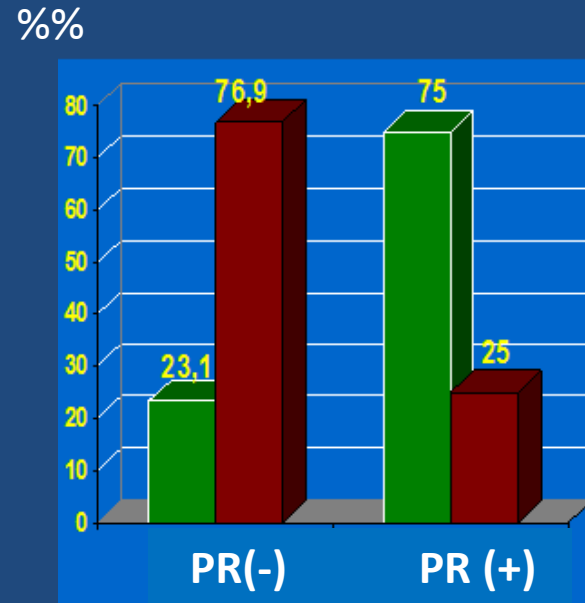
DTCs were found in 45% cases (at least 1 cell per 1 mln)

# DTC and receptor status (p<0.05)

## Estrogen receptors (ER)



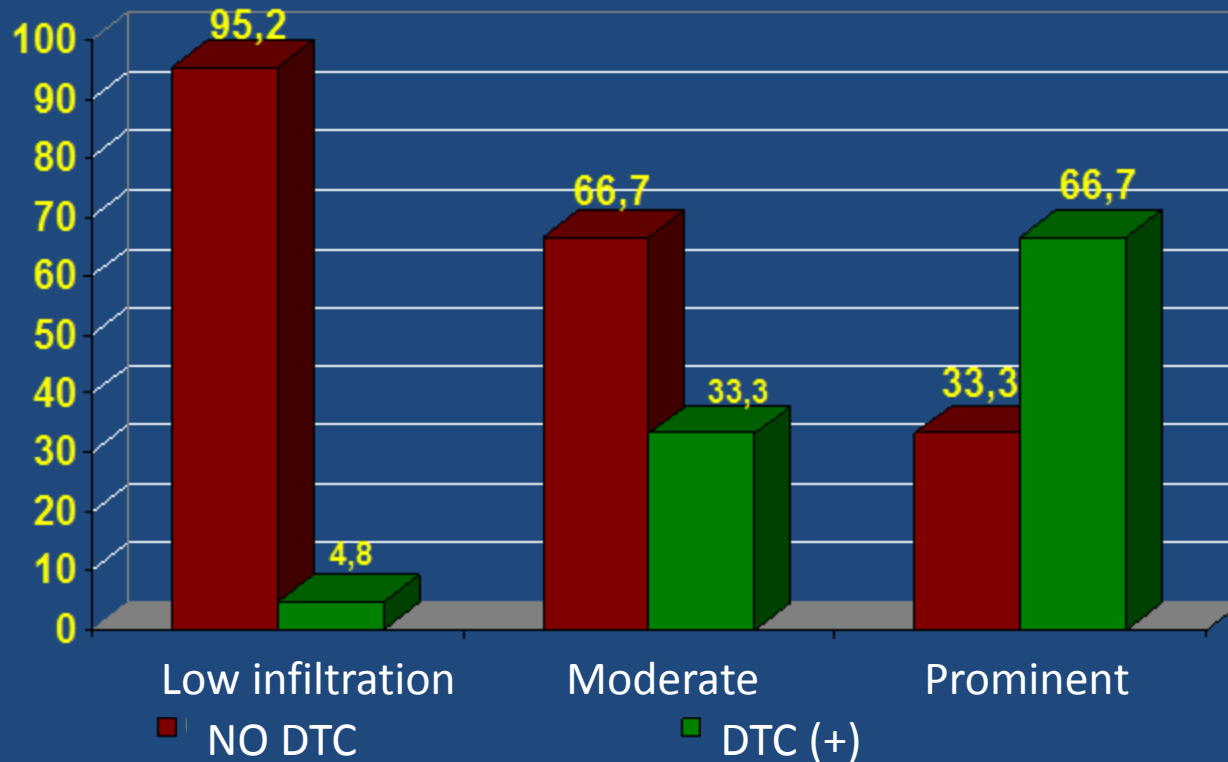
## Progesterone receptors (PR)



DTC(+)

DTC (-)

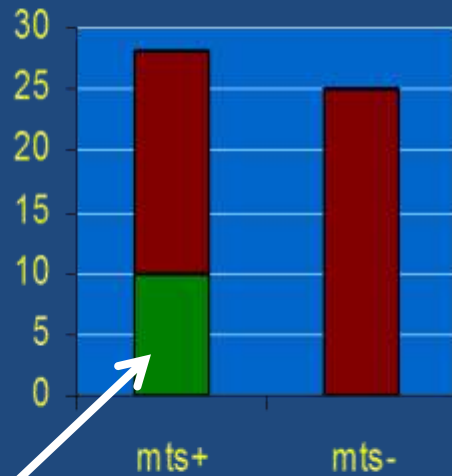
# Relationship between DTC and lymphoid tumor infiltration ( $p < 0.05$ )



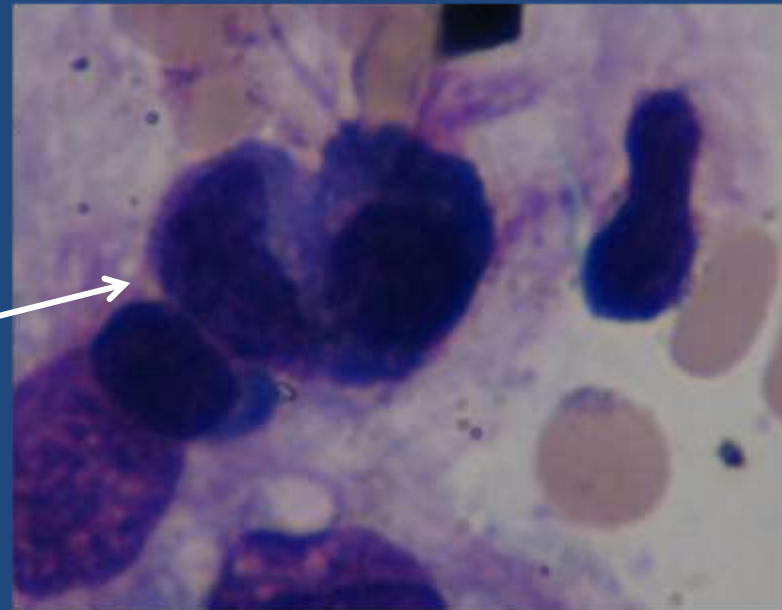


# DTCs and plasma cell clusters in BM

Number of Pts

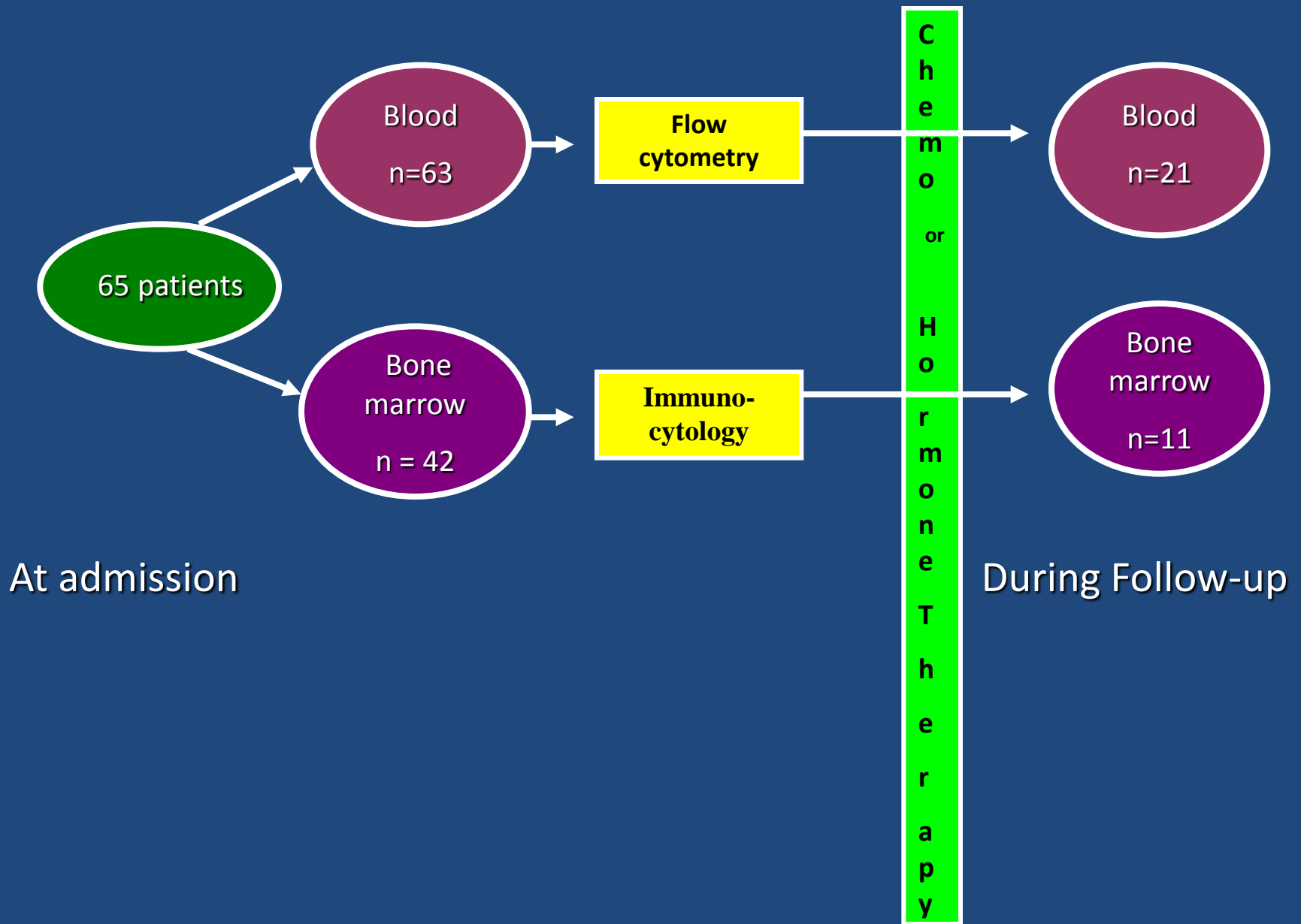


Plasma  
Cell clusters

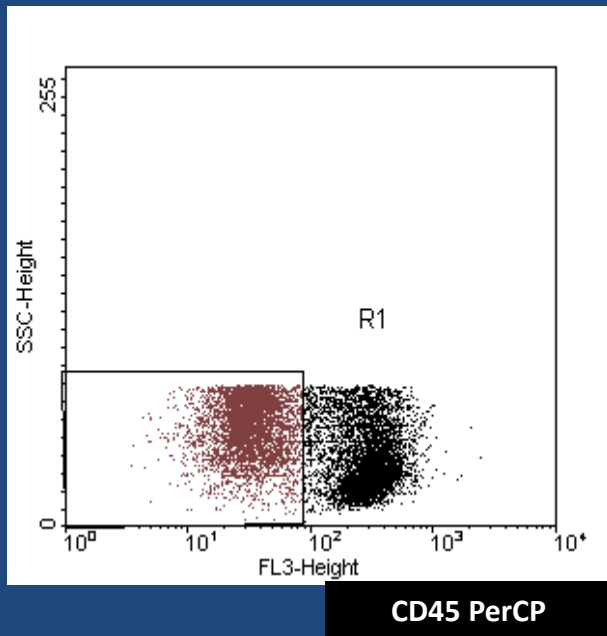


P = 0,01

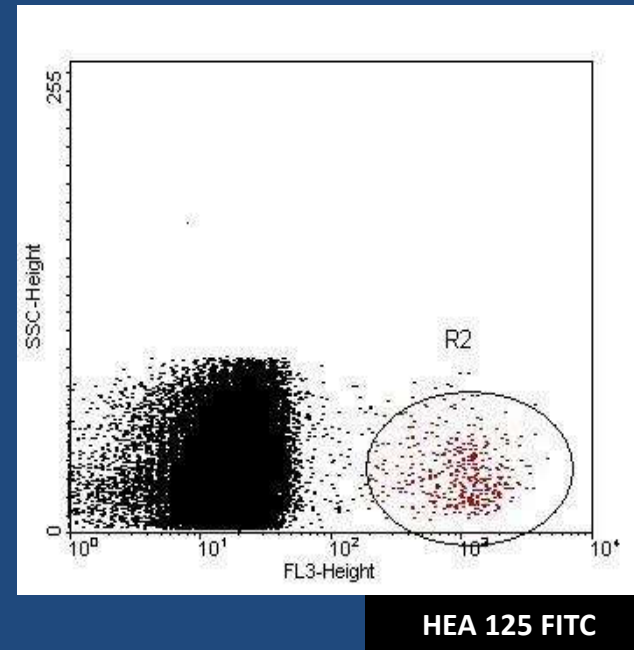
# *Disseminated breast cancer*



# *High CTC content in disseminated breast cancer (example)*



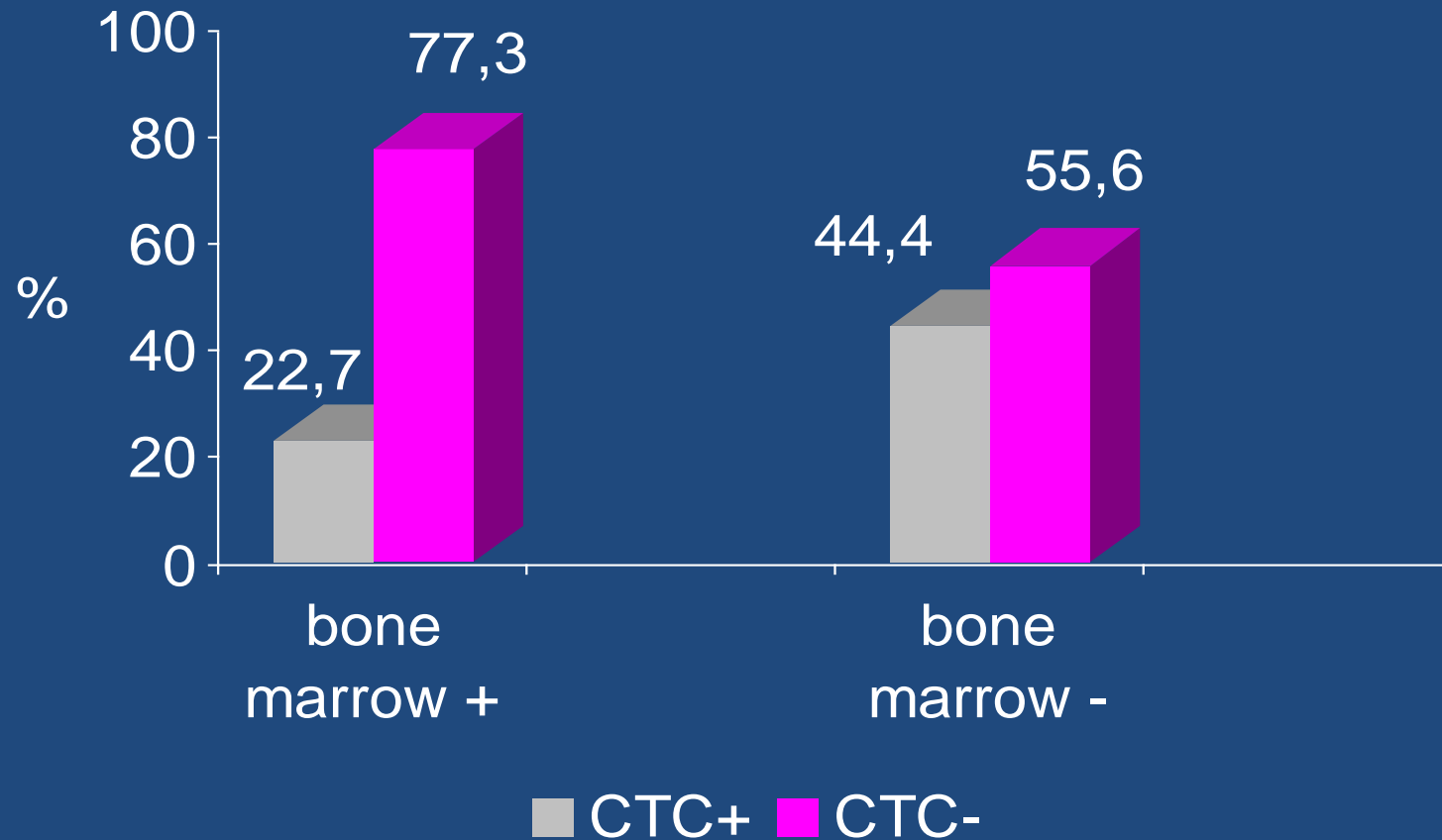
R1 – gate of CD45-negative cells



R2 -HEA-125+ cells: 400 cells per 1 mln

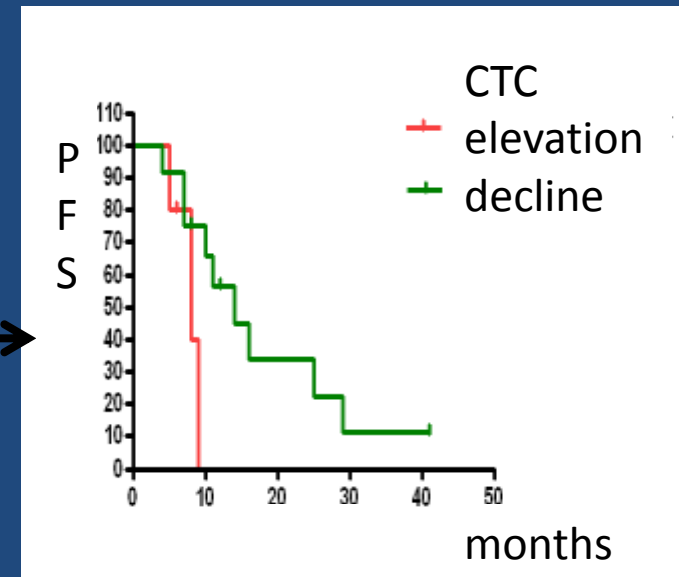


# *Comparison of CTC and DTC in disseminated breast cancer (n = 40)*



# Prognostic role of CTC changes in disseminated breast cancer after treatment

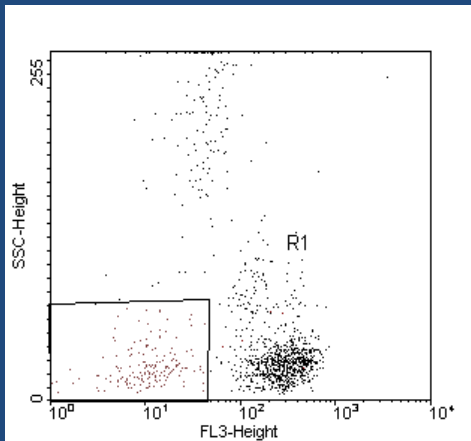
	Changes in CTC level		P-value
	↓	↑	
Median time to progression, months	14	8	0.0127
Median OS, months	26	20	>0.05



# CTC subpopulations

## 3-color flow cytometry

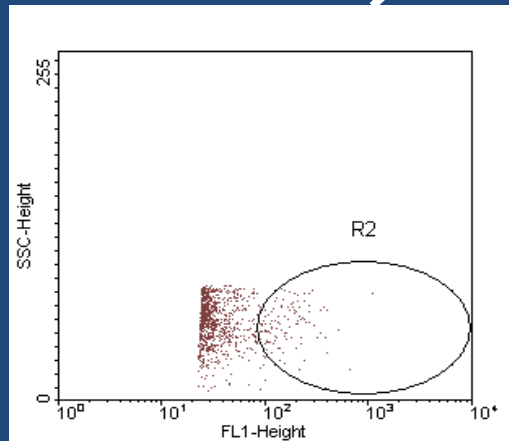
CD45 - negative  
HEA-125 - positive  
CD95 (FAS/APO-1 receptor)  
HLA-DR (HLA class II molecules)



CD45 PerCP

R1

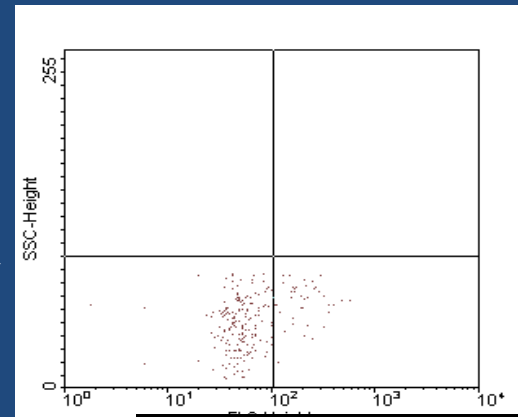
Gate of CD45-negative cells



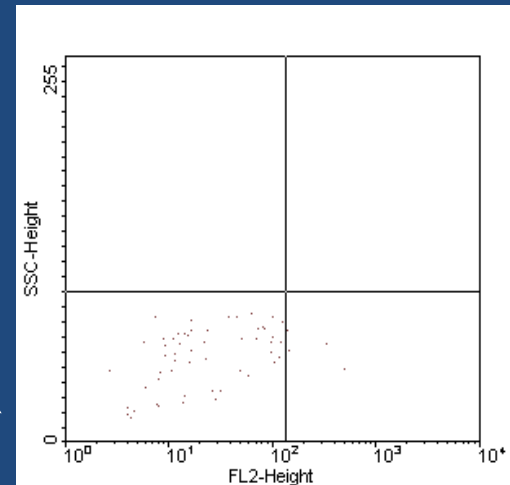
HEA 125 FITC

R2

Gate of HEA125-positive cells



HEA 125+HLA-DR+



HEA 125+CD95+



# *Changes in CTC subpopulations during treatment*

Expression of HLA-DR and CD95 on CTC before and after treatment (percent of CTC)

<b>Antigen</b>	<b>Before treatment</b>	<b>After treatment</b>	<b>P-value</b>
HLA-DR+	31.6%	15.2%	0.06
CD95+	14.8%	5.3%	0.02

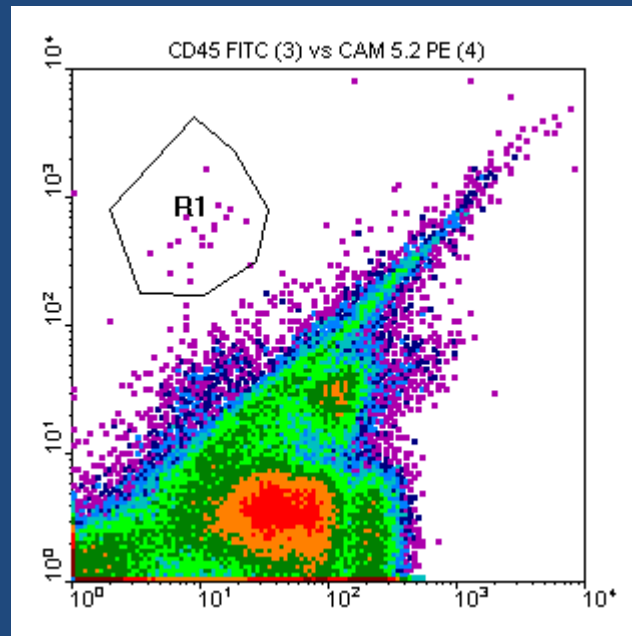
# MRD detection in hematology malignancies – FLOW CYTOMETRY

- ALL
- Multiple Myeloma
- CLL

FC sensitivity -  $1 \times 10^{-4}$

In March 2013 FDA approved this method in CLL  
(Andy Rawstron, Haematopoiesis Immunology,  
2013, №1-2).

R1 – a cluster of 20 CD45-CD326+ cells  
isolated from 29 million  
myelokaryocytes in a patient with  
operable breast cancer (stage IIb)



## Dr. Bill Telford Testimonial



Dr. Bill Telford, Director Flow Cytometry Core, National Cancer Institute.



“The acoustic focusing on the Life technologies **Attune** is the most significant advance in cell delivery to a flow cytometer since hydrodynamic focusing was optimized over 40 year ago. There should be major payoffs from this new technology – faster flow rates with minimal loss of signal resolution, allowing faster sample throughput for large samples with rare cells. The ability to control the flow rate should also give increased fluorescence sensitivity at lower flow rates, and improved scatter resolution.”

We've identified CTC or DTC...

What next?



There are no selective methods  
for CTC/DTC elimination

Several chemotherapy protocols are  
now in progress to assess their  
efficacy (CTC/DTC elimination) in  
adjuvant treatment

Urgent need in methods for  
selective DTC eradication

Thank you for your attention!

Merci beaucoup pour votre  
attention!