

В.И. Стариков
А.С. Ходак
А.Н. Бельий

*Харьковский национальный
 медицинский университет,
 Харьков, Украина*

Ключевые слова: рак легкого, цитокератины, костный мозг, лимфатические узлы, изолированные опухолевые клетки.

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ В ДИАГНОСТИКЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ РАКА ЛЕГКОГО И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В КОСТНОМ МОЗГЕ

Резюме. С помощью моноклональных антител к цитокератинам в лимфатических узлах, считавшихся непораженными, у 21% больных раком легкого выявлены микрометастазы рака или кластеры раковых клеток. У 29,5% радикально прооперированных по поводу рака легкого больных в костном мозге выявлены изолированные опухолевые клетки, их наличие отрицательно влияет на 3-летнюю выживаемость.

ВСТУПЛЕНИЕ

В последние десятилетия во всем мире отмечается увеличение количества онкологических заболеваний, среди которых рак легкого (РЛ) занимает ведущее место. РЛ является главной причиной смерти среди мужчин от злокачественных опухолей более чем в 35 странах мира [1]. В Украине в структуре онкологических заболеваний среди мужчин РЛ занимает первое место. Стандартизованный показатель заболеваемости составил в 2008 г. 77,7 на 100 тыс. мужчин [2]. Несмотря на прогресс в развитии хирургического, лучевого и химиотерапевтического методов лечения, показатели 5-летней выживаемости существенно не улучшились. У больных, получавших комбинированное или комплексное лечение, 5-летняя выживаемость составляет от 24 до 30% по данным различных авторов [3, 4]. Неудовлетворительные результаты лечения обусловлены поздней диагностикой и высокой агрессивностью РЛ. Последняя определяет высокий метастатический потенциал, который реализуется еще на ранних стадиях заболевания в виде метастазов (М) в лимфатических узлах (ЛУ) и гематогенных М во всех, без исключения, органах и системах человека. Костный мозг (КМ) также является органом-мишенью для отдаленных М.

Основными факторами, определяющими прогноз заболевания, являются размер опухоли, ее распространенность и степень дифференцировки клеток опухоли. Известно, что большая часть оперированных больных РЛ (40–50%), которые стадированы патоморфологически $p_{T_{1-3}}N_0M_0$, то есть без М, умирают от местного рецидива или гематогенной диссеминации опухоли в течение ближайших 2 лет после операции [5]. Причиной этого может быть микрометастазирование опухолевых клеток (ОК), которое не диагностируется с помощью рутинного гистологического исследования. Это говорит в пользу того, что послеоперационное исследование не отражает истинную распространенность РЛ на момент опера-

ции. Поэтому изучение феномена метастазирования продолжает оставаться актуальной задачей экспериментальной и клинической онкологии, поскольку известно, что основной причиной смерти больных РЛ чаще всего являются отдаленные М. Давно установлено, что при солидных опухолях даже при начальных стадиях происходит попадание ОК в ток лимфы и кровеносное русло. Подавляющее большинство этих клеток погибает, однако, небольшая часть, около 0,05% имеет возможность, проделав сложный путь, попасть в результате седиментации и экстравазации в различные органы и ткани. Судьба этих ОК не одинакова, одни со временем погибают, другие — через различный период времени могут развиться в М. Поэтому в настоящее время в специальной литературе широко используется термин «минимальная остаточная болезнь», что указывает на относительность понятия «радикальная операция», которая теоретически предполагает полную эрадикацию опухоли [6]. До настоящего времени окончательно не установлено значение изолированных ОК (ИОК) в крови, КМ, ЛУ и других тканях, однако большинство авторов указывают на плохой прогноз заболевания при их выявлении [7, 8]. Установлено, что ИОК обладают низкой пролиферативной активностью, что делает их малочувствительными к проводимой системной полихимиотерапии. Интересной особенностью является и то, что в некоторых тканях, например КМ грудины, где часто выявляют ИОК, крайне редко развиваются М рака.

Многие годы ИОК в крови и КМ изучали с помощью световой микроскопии. Известно, что с помощью данного метода трудно идентифицировать ИОК в ЛУ и КМ из-за их сходства с ретикулярными клетками, стромой, недифференцированными кроветворными клетками, незрелыми мегакариоцитами. Световая микроскопия позволяет выявить одну ОК среди 100 нормальных клеток КМ. В течение ряда лет усилия биологов и иммунологов были направлены на поиск методик, которые позволяют на-

дежно выявлять ОК. Сейчас разработаны и успешно применяются иммуноцитохимический и иммуногистохимический методы, полимеразная цепная реакция, проточная цитометрия, метод тканевых культур. Два первые из перечисленных методов основаны на том, что ОК эпителиального происхождения характеризуются экспрессией цитokerатинов, не характерных для гемопоэтической ткани и ЛУ. Цитокератины выявляют с помощью моноклональных антител (МкАТ), что позволяет выявить одну ОК из 100 тыс. нормальных клеток КМ или ЛУ [9]. Благодаря внедрению этих методов в лабораторную практику, в последние годы появилось много сообщений о выявлении ИОК в КМ у больных раком молочной железы, поджелудочной железы, желудка, предстательной железы и др. [10–12], а с помощью МкАТ также в удаленных ЛУ при различных онкологических заболеваниях, в частности, раке пищевода и желудка [13]. В различных исследованиях с помощью иммуногистохимического метода установлено, что у 27–53% больных, которые оперированы по поводу РЛ, были выявлены ИОК в гистологически опухоль-негативных ЛУ [14, 15].

Цель нашего исследования — изучение возможности иммуноцитохимического и иммуногистохимического методов в диагностике распространенности РЛ и прогностическом значении ИОК.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовано 79 больных немелкоклеточным РЛ (НМРЛ), которым выполнены радикальные операции: 42 — пневмонэктомия, 37 — лобэктомия. Во всех случаях выполняли ипсилатеральную медиастинальную лимфодиссекцию. Средний возраст обследованных больных — 57 лет. До операции с помощью инструментальных методов исследования выявлено поражение ЛУ в 83,5% случаев. По стадиям больные представлены следующим образом: ПА — 13 (16,5%), ПБ — 37 (46,8%), ПИА — 29 (36,7%). У всех больных диагноз РЛ верифицирован до операции цитологически или гистологически. Биоптат получали при бронхоскопии, трансторакальной пункции или при трансбронхиальной биопсии.

КМ получали из грудины перед началом операции, после общего обезболивания, иглой Кассирского. Делали 4 мазка, 2 из них окрашивали гематоксилином и эозином и выполняли световую микроскопию с целью поиска ИОК. У больных, у которых не выявлены ИОК в КМ, вторую часть мазков КМ исследовали с МкАТ к цитокератинам. В тех участках, где происходила реакция МкАТ с цитокератинами, отмечали коричневое окрашивание, что расценивалось как наличие одной или нескольких ОК в этом месте.

После операции вместе с удаленным легким или долей на гистологическое исследование отправлялись и удаленные ЛУ корня легкого и средостения, которые предварительно маркировали. После стандартной проводки из всех операционных материалов изготавливали парафиновые блоки и проводи-

ли световую микроскопию. Всего исследовано 407 ЛУ, в среднем по 5 от каждого больного. В тех случаях, когда у больного не выявляли метастатического поражения ЛУ, выполняли дополнительные срезы парафиновых блоков и проводили иммуногистохимическое исследование с МкАТ к цитокератинам по стандартной методике. В местах связывания цитокератинов с МкАТ появлялось светлокорицево окрашивание, что указывало на наличие кластеров ОК или ИОК в ЛУ. Иммуноцитохимическое исследование КМ и иммуногистохимическое исследование ЛУ проведено в отделе механизмов противоопухолевой терапии Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины.

После операции прослежена 1-, 2- и 3-летняя выживаемость больных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении распространенности РЛ в интра-торакальных ЛУ на различных этапах диагностики: инструментальном, интраоперационном и морфологическом получены различные данные (таблица).

Таблица

Данные о поражении ЛУ на различных этапах исследования

Нодальный статус (n = 79)	Данные инструментальных методов		Интраоперационная оценка		Данные световой микроскопии	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
N ₀	13	16,5	15	18,6	25	31,6
N ₁	37	46,8	33	41,2	18	22,8
N ₂	29	36,7	31	39,2	36	45,6

Интраоперационная ревизия у больных с инструментально установленным нодальным статусом N₀ позволила установить наличие макроскопических изменений ЛУ дополнительно у 2,5% больных. Напротив, у 5% больных с дооперационным нодальным статусом N₁ при ревизии ЛУ М не выявлены. То есть, данные инструментальных методов исследования могут иметь как ложноотрицательный, так и ложноположительный характер. Проведенное гистологическое исследование удаленных ЛУ показало, что только в 68,4% случаев ЛУ были поражены (N₁ + N₂) М РЛ, тогда как до операции этот показатель оценивали как 83,5%. Это говорит о том, что в некоторых ЛУ, которые были увеличены, М не выявлены. Наряду с этим в подгруппе больных с нодальным статусом N₀ у 7 (8,9%) гистологически были выявлены М РЛ. Это является особенно важным, так как указывает на частое отсутствие визуальных изменений при метастатическом поражении ЛУ на целесообразность удаления всех интраторакальных ЛУ на стороне поражения.

Как уже отмечалось, рутинное гистологическое исследование имеет недостатки, так как осмотру подлежит только малая часть поля зрения морфолога. Кроме этого, при обычных методах окрашивания трудно выявить ИОК или их кластеры в ЛУ без морфологических признаков неоангиогенеза и стромальной реакции. Поэтому возникает необ-

ходимость повышения уровня морфологического исследования регионарных ЛУ с целью выявления occultных М. Были отобраны ЛУ больных, у которых при световой микроскопии не выявили М РЛ (статус N_0), и проведено их исследование с МкАТ к цитокератинам. С целью негативного контроля препараты обрабатывали МкАТ к CD45 (общелейкоцитарный антиген) для подтверждения правильного проведения реакции. Были обследованы дополнительно 73 ЛУ 19 больных. У 4 (21%) больных в ЛУ выявлены небольшие скопления клеток (кластеры) с коричневым окрашиванием, что соответствует цитокератин-позитивным ОК (рисунок); в отношении ко всем обследованным больным количество дополнительно выявленных пораженных ЛУ составило 5%. В целом количество больных со статусом $N_{1,2}$ возросло с 68,4 до 73,4%.

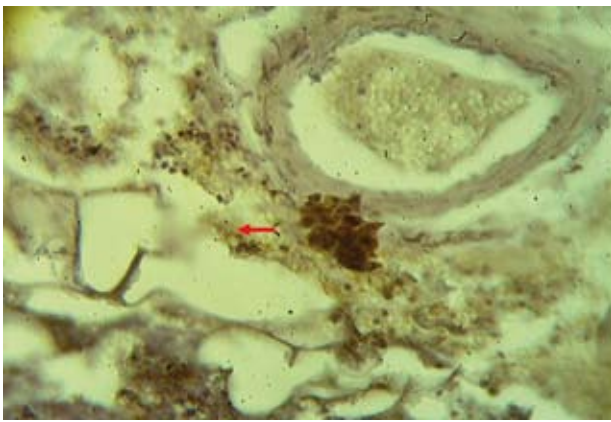


Рис. 1. Микрофотография ЛУ; цитокератин-позитивные ОК имеют коричневую окраску. $\times 400$

Полученные данные свидетельствуют, что интраоперационная визуальная и мануальная оценка ЛУ и даже послеоперационное морфологическое исследование не позволяют выявить все метастатически измененные ЛУ. Исходя из этого, стратегия локального лечения РЛ должна заключаться в удалении пораженной доли или легкого со всеми регионарными ЛУ. Тактически это достигается путем выполнения ипсилатеральной медиастинальной лимфодиссекции. Дополнение морфологического исследования удаленных ЛУ иммуногистохимическим методом расширяет возможности уточнения распространенности РЛ.

Наряду с исследованием ЛУ проведено изучение КМ у 61 больного РЛ, которым выполнены радикальные операции. Поиск ИОК проводили, как указано выше, с помощью световой микроскопии КМ и иммуноцитохимическим методом. При световой микроскопии КМ у 13 (21,3%) больных выявлены клетки больших размеров, округлой неправильной формы, содержащие несколько ядер с гипербазофильной вакуализацией цитоплазмы, которые были оценены как ОК. Наиболее часто отмечали комплексы из нескольких ОК. Мазки КМ 48 больных РЛ, у которых при световой микроскопии не выявлены ИОК, были исследованы с помо-

щью МкАТ к цитокератинам. У 5 из них выявлены ИОК, которые имели розовое окрашивание. Таким образом, общее количество больных с наличием ИОК в КМ составило 18 (29,5%). Достаточно высокий процент дополнительно выявленных иммуноцитохимическим методом больных с ИОК указывает на высокую чувствительность метода. В то же время более низкая выявляемость ИОК при световой микроскопии связана с их сходством с родоначальными клетками КМ, а также большим полиморфизмом самих ОК.

Для определения возможной корреляции между поражением ЛУ и КМ было проведено сопоставление этих данных у 61 больного РЛ. Установлено, что из 48 больных с поражением ЛУ у 12 выявлены ИОК в КМ, то есть поражение ЛУ в 25% сочеталось с поражением КМ. В то же время было установлено, что у 6 больных с ИОК в КМ отсутствовало метастатическое поражение ЛУ. Этот факт свидетельствует в пользу теории одновременного лимфогенного и гематогенного метастазирования с «транзитным» прохождением ОК ЛУ. Ранее считалось, что метастазирование происходит последовательно с поражением сначала регионарных ЛУ, а затем КМ.

Для выяснения прогностического значения ИОК в КМ изучена 1-, 2- и 3-летняя выживаемость больных. Больные с одновременным поражением ЛУ и наличием ИОК в КМ умерли в первые 2 года после операции от рецидивов и М. Общая выживаемость больных без М в ЛУ, но с наличием ИОК в КМ была несколько выше, однако все они умерли в 3-летний период (рис. 2) от отдаленных М (в основном М в кости и головной мозг). В связи с этим можно предположить, что наличие ИОК в ЛУ и КМ имеет как диагностическое, так и прогностическое значение. Однако необходимо определить, существуют ли количественные критерии опухолевой нагрузки на КМ. Определение ИОК в КМ при световой микроскопии указывает на более высокую их концентрацию в КМ по сравнению с больными, у которых ИОК выявлены только с помощью МкАТ к цитокератинам.

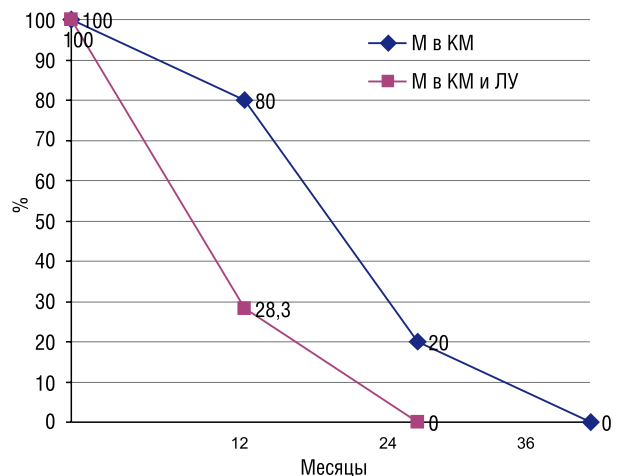


Рис. 2. Зависимость выживаемости больных РЛ от поражения ЛУ и КМ

ВЫВОДЫ

1. Исследование удаленных ЛУ при РЛ иммуногистохимическим методом с МкАТ к цитокератинам позволяет более точно установить распространенность опухолевого процесса.

2. Исследование КМ при РЛ методом световой микроскопии и иммуногистохимическим методом с МкАТ к цитокератинам позволяет выявить ИОК у 28,6% радикально прооперированных больных.

3. Предварительные данные свидетельствуют о влиянии на прогноз заболевания ИОК в КМ и указывают на необходимость проведения дальнейших исследований для определения возможной критической опухолевой нагрузки на КМ, при которой наступает реализация плохого прогноза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stewart BW, Kleihnes P. World Cancer Report. Lyon: LARC Press, 2003. 351 p.
2. Рак в Україні, 2008–2009. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. Бюл Нац канцер-реєстру України 2010; (11): 42–3.
3. Бондарь ГВ, Глушков АН, Гриценко СВ и др. Заболеваемость злокачественными новообразованиями населения Донецкой и Кемеровской областей за 1990–2005 гг. Новоутворення 2007; (2): 46–50.
4. Давыдов МИ, Полоцкий БЕ, Волков СМ. Оценка эффективности хирургии немелкоклеточного рака легкого. Материалы V съезда онкологов и радиологов СНГ. Ташкент, 2008: 189.
5. Berenson JR. Managing bone complications of solid tumors. Cancer Biol Ther 2006; 5: 1086–9.
6. Осинский СП, Глузман ДФ, Клифф Й и др. Молекулярная диагностика опухолей: фундаментальные основы и практическое применение. Киев: ДІА, 2007: 210–28.
7. Lee E, Chae Y, Kim J. Prognostic relevance of immunohistochemically detected lymph node micrometastasis in patients with gastric carcinoma. Cancer 2002; 94: 2868–72.
8. Osaki T, Oyama T, Yu CD. Prognostic impact of micrometastatic tumor cells in the lymph nodes and the bone marrow of patients with completely resected stage I non-small lung cancer. J Clin Oncol 2002; 20: 2930–6.
9. Осинский СП, Глузман ДФ, Черный ВА и др. Опухолевые клетки в периферической крови и костном мозге онкологических больных. Семинары по гематологии (выпуск 14). Киев, 2005. 39 с.

10. Осинский ДС. Комплексне лікування хворих на поширений нерезектабельний рак підшлункової залози із застосуванням внутрішньоартеріальної хіміотерапії та променевої терапії. Автореф [Дис ... канд мед наук]. Київ, 2004. 20 с.

11. Zilleby W, Nesland JM, Fossa SD, et al. The prognostic impact of cytokeratin positive cells in bone marrow of patients with localized prostate cancer. Int J Cancer 2003; 103: 91–6.

12. Benoy JH, Elst H, Philips M, et al. Real — time RT — PCR detection of disseminated tumor cells in bone marrow has superior prognostic significance in comparison breast cancer. Br J Cancer 2006; 94: 672–80.

13. Harrison ZE, Choe JK, Yoldaen M, et al. Prognostic significance of immunohistochemical micrometastases in lymphnode negative gastric cancer patients. J Surg Oncol 2000; 73: 153–7.

14. Акопов АЛ. Недостатки и противоречия современной системы стадирования рака легкого. Вопр онкологии 2006; 52 (1): 107–11.

15. Шубин ИФ, Стилиди ИС, Пирогов АВ и др. Определение микрометастазов в костном мозге и лимфатических узлах у больных раком пищевода и немелкоклеточным раком легкого. Вест РОНЦ им ННБлохина 2007; 18 (2): 64–71.

THE ROLE OF MOLECULAR MARKERS IN DIAGNOSTICS OF LUNG CANCER SPREADING AND PROGNOSTIC IMPORTANCE OF ISOLATED TUMOR CELLS

V.I. Starikov, A.S. Khodak, A.N. Belyi

Summary. *Micrometastases of cancer or clusters of cancer cells were found in lymph nodes earlier estimated as not affected with help of monoclonal antibodies to cytokeratines in 21% of lung cancer patients. In 29.5% radically operated patients with lung cancer isolated tumor cells were found in bone marrow and established their negative influence on 3-year survival.*

Key Words: lung cancer, cytokeratines, bone marrow, lymph nodes, isolated tumor cells.

Адрес для переписки:

Ходак А.С.

61145, Харьков, ул. Космическая, 11, кв. 81

E-mail: a.khodak@i.ua