

В.Д. Захарычев
И.И. Ганусевич

Национальная медицинская академия последипломного образования им. П.Л. Шупика МЗ Украины

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина

Ключевые слова: рак легкого, криодеструкция опухоли, циркулирующие опухолевые клетки, метастазирование, общая выживаемость.

ВЛИЯНИЕ ИНТРАОПЕРАЦИОННОЙ КРИОДЕСТРУКЦИИ ОПУХОЛИ НА ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

Резюме. Изучена динамика наличия опухолевых клеток (ОК) в регионарной крови у 40 больных периферическим раком легкого (РЛ) в процессе хирургической операции с интраоперационной криодеструкцией (ИК) опухоли. До выполнения криодеструкции ОК в регионарной венозной крови выявлены у 17 (42,5%) пациентов, после криодеструкции — у 8 (20%), при этом ОК изменили свои морфологические характеристики. Показано, что применение криодеструкции опухоли увеличило 5-летнюю выживаемость больных в 2 раза. Полученные результаты дают основание полагать, что ИК РЛ снижает риск метастазирования за счет уменьшения диссеминации и жизнеспособности раковых клеток.

ВВЕДЕНИЕ

Метастазирование — основная причина смертности пациентов с солидными опухолями, так как современные методы лечения, как правило, обеспечивают излечение от первичной опухоли, но недостаточно эффективны для контроля развития метастазов.

Метастазирование опухоли является многоступенчатым процессом, в результате которого ОК диссеминируют из первичной опухоли к отдаленным органам и тканям [1]. Метастатический каскад предусматривает последовательность таких этапов: «отрыв» ОК от первичной опухоли, их миграция и интраваскуляция в сосудистое русло, циркуляция в кровотоке в составе клеточных кластеров, экстравазация в местах вторичного метастазирования, стабилизация в специфическом микроокружении и собственно формирование метастатических центров [2, 3]. Эффективность каждого шага метастатического каскада зависит от способности ОК к выживанию в организме, а значит, от определенных качеств опухоли и характера реакций организма. В процессе метастазирования ОК преодолевают множественные физиологические препятствия и включаются в ряд взаимодействий, а их фенотипическая пластичность обеспечивает селективное преимущество, а также успешное завершение каждого и всех в комплексе этапов метастатического каскада. Однако недостаточная способность большинства ОК к выживанию приводит к их гибели, вследствие чего каждую фазу метастазирования проходят только часть ОК и лишь немногие из них достигают отдаленных органов и тканей [1, 4].

В настоящее время с помощью современных высокочувствительных методов диссеминированные ОК могут быть выявлены на любой стадии опухоле-

вого процесса в региональных лимфатических узлах, кровотоке и костном мозге больных раком. Исследования диссеминированных ОК нацелены на возможность использования их в качестве маркеров прогноза течения заболевания и мишеней для направленной противоопухолевой терапии [5].

Исследования, проведенные на большом контингенте больных злокачественными опухолями, показали, что в случае обнаружения ОК только 20% из них прожили 2–5 лет. Если ОК в крови не были найдены, эту же продолжительность жизни отмечали у 38% пациентов [7]. После проведения радикальных операций, при отсутствии ОК в кровеносных сосудах, 5-летний срок прожили 75% больных. Наличие диссеминированных ОК в периферической крови предлагают использовать как маркер для определения степени агрессивности заболевания раком молочной железы [6]. В группе больных РЛ, у которых выявили ОК в кровеносном русле, отмечали значительно более высокий уровень смертности по сравнению с пациентами, в крови которых ОК не обнаружили [8]. Таким образом, наличие ОК в крови больных раком является фактором неблагоприятного прогноза, в частности развития метастазов и сокращения продолжительности жизни [9].

Один из эффективных методов, достаточно широко применяемых в онкологии при различных локализациях опухолей (рак предстательной, поджелудочной, молочной железы, печени, желудка, кожи, шейки матки), — криохирургия. Криодеструкция опухолей практически не имеет противопоказаний, но обладает рядом преимуществ по сравнению с другими лечебными воздействиями: возможность разрушения поверхностных опухолей, неоднократного

повторения процедуры, ее незначительная травматичность [10–12]. Важной особенностью метода является предотвращение диссеминации ОК в кровоток, что было показано при лечении больных раком предстательной, молочной железы, желудка [13, 14].

Цель этой работы заключалась в исследовании влияния ИК на диссеминацию ОК в венозный регионарный кровоток, их морфологических характеристик и установление взаимосвязи данных показателей с выживаемостью больных периферическим РЛ после радикального хирургического лечения.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследованы 40 (37 мужчин, 3 женщины) больных периферическим РЛ T2N0-1M0. Всем пациентам были проведены радикальные операции. ИК опухоли выполняли с применением криогенного аппарата «Криоэлектроника» в режиме замораживания — оттаивания (10–15 мин — замораживание, 20 мин — спонтанное оттаивание, после чего проводили аналогичный повторный цикл). Использовали трубчатые аппликаторы собственной конструкции, позволяющие промораживать опухоль максимально глубоко по всей ее поверхности.

Регионарную кровь в количестве 9–10 мл забирали из легочной вены той доли легкого, где локализовалась опухоль. Исследовали 3 пробы крови: 1-ю — сразу после торакотомии и выделения внепочечного сегмента вены для ее пункции; 2-ю — после проведенного цикла «замораживание — оттаивание» перед началом выделения и обработки элементов корня доли легкого; 3-ю — после окончания повторного цикла криодеструкции. С целью выделения ОК из крови был использован стандартный метод лейкоконцентрации, дающий наиболее полное панорамное представление о клеточном составе крови и основанный на принципе фракционирования составных частей крови за счет различия их удельного веса, а также ускорения оседания эритроцитов трилоном Б. Мазки окрашивали по Паппенгейму — Крюкову. В них определялись почти исключительно лейкоциты, тромбоциты и атипичные клетки.

Показатели продолжительности жизни пациентов представлены в виде скорректированной контролируемой 5-летней выживаемости. В исследовании в качестве контрольных использованы данные относительно 5-летней выживаемости 633 больных периферическим РЛ, которым проводили радикальное оперативное вмешательство без применения ИК.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием компьютерной программы Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В группе обследованных больных у 14 (35,0%) диагностирован плоскоклеточный РЛ умеренной и низкой степени дифференцировки, у 13 (32,5%) — аденокарцинома различной степени дифференцировки, у 3 (7,5%) — крупноклеточный, у 4 (10,0%) —

мелкоклеточный РЛ. У 6 (15,0%) пациентов интерпретация гистологической структуры опухоли вызвала затруднение, поскольку в ней преобладали некротические и дистрофические изменения клеток, наступившие в результате криодеструкции.

До проведения ИК ОК были выявлены в регионарной крови у 17 больных (42,5% обследованных). Обнаруженные в крови клеточные пласты у 3 пациентов имели признаки плоскоклеточного РЛ, у 4 больных выявлены железистоподобные структуры и отдельно располагающиеся злокачественные клетки аденокарциномы, у 2 — отдельные клетки недифференцированного рака. Во всех случаях морфология атипичных клеток в лейкоконцентрате соответствовала той форме злокачественного новообразования, которую диагностировали при гистологическом исследовании удаленной опухоли. У 8 из 17 пациентов установить природу ОК не представлялось возможным. Это были либо единичные клетки, похожие на бласты, что в большинстве случаев соответствовало недифференцированному раку, либо атипичные клетки, напоминающие цилиндрический эпителий с выраженными признаками дистрофии. Вероятно, пройдя этапы отделения от первичной опухоли и внедрения в сосудистое русло, ОК претерпевали определенные изменения, в том числе и некоторых морфологических характеристик, однако признаки злокачественности обнаруженных клеток не вызвали сомнений.

После повторного цикла ИК ОК были выявлены в регионарной крови лишь у 8 больных (20% обследованных пациентов), причем у 2 из них (5%) отмечали значительное уменьшение их количества, а у 6 (15%) в цитограммах лейкоконцентрата обнаружили ОК, изменившие свою морфологию и, возможно, жизнеспособность, а также злокачественность (расположенные раздельно и группами, с выраженными дистрофическими изменениями, частью с голыми ядрами). Таким образом, частота выявления ОК в регионарной венозной крови, исследуемой после ИК, уменьшилась более чем в 2 раза (рис. 1). У 9 (53,0%) из 17 больных, в регионарном кровотоке которых до криовоздействия определялись ОК, после ИК такие клетки не были обнаружены. Необходимо отметить, что у 23 пациентов, в регионарном кровотоке которых до ИК не выявляли ОК, после ее проведения ОК также не были обнаружены.

5-летняя выживаемость больных, которым выполнили ИК, составила $61,5 \pm 5,6\%$ и почти в 2 раза превысила выживаемость в контрольной группе пациентов ($33,0 \pm 1,8\%$, $p < 0,05$). При этом важно обратить внимание на то, что наиболее высокие показатели продолжительности жизни ($78,4 \pm 7,3\%$) отмечали у больных, в регионарном кровотоке которых после ИК не определяли ОК. В то же время у пациентов, у которых такие клетки обнаружили и после ИК, уровень выживаемости был в 1,8 ($p < 0,05$) раза ниже и составил $44,7 \pm 3,5\%$ (рис. 2). Таким образом, высокие по сравнению с контрольными показатели продолжительности жизни в группе боль-

ных, которым проводили ИК, обусловлены прежде всего высоким уровнем выживаемости тех из них, в кровотоке которых после ИК не определяли ОК.

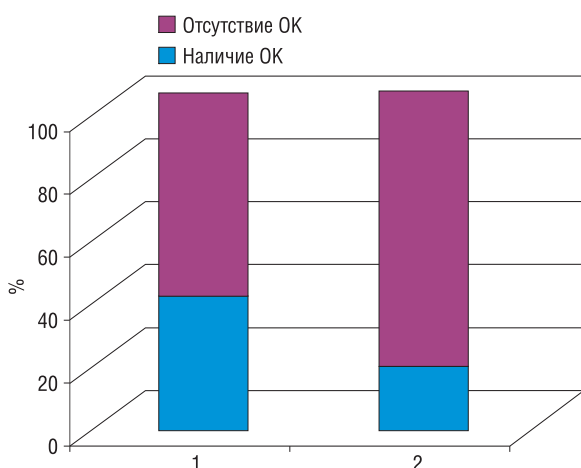


Рис. 1. Частота обнаружения ОК (%) в регионарном кровотоке больных РЛ до (1) и после (2) проведения ИК опухоли

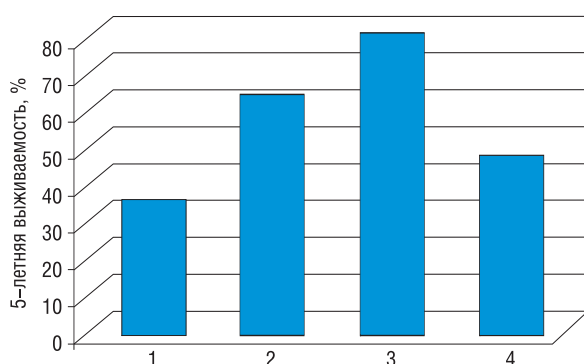


Рис. 2. Выживаемость больных РЛ после радикального оперативного вмешательства без применения ИК (1), с применением ИК (2), при отсутствии (3) и при наличии ОК в регионарном кровотоке после ИК (4)

Известно, что наличие ОК в кровотоке является результатом их эффективного «отрыва» от первичной опухоли, миграции и интравасации. Ряд ферментов, факторов, цитокинов, рецепторов регулируют выживаемость ОК на ранних этапах метастатического каскада, обеспечивая деградацию межклеточного матрикса, изменение структуры стенки сосудов, образование клеточных агрегатов в кровотоке [4, 15]. Существует также мнение, что хирургическая травма способствует проникновению ОК в кровоток. Хирургическое вмешательство, нарушая состояние гомеостаза, приводит к многочисленным нарушениям, способствующим усилению метастазирования [16, 17].

К факторам, обуславливающим деструкцию клеток при их замораживании, относятся: значительная дегидратация клеток, механическое повреждение клеточных мембран кристаллами льда, денатурация фосфолипидов в клеточных мембранах, прекращение подвижности внутриклеточной жидкости. В процессе замораживания в ткани возникает также резкое замедление и стаз кровотока, мелкие сосуды в очаге деструкции тромбируются, что приводит к развитию очагов

ишемического некроза. В сосудах большого диаметра после замораживания восстанавливается нормальное кровообращение, однако структура сосудистой стенки претерпевает изменения, что сказывается на снижении ее эластичности. Замораживание опухоли способствует криофиксации ОК. Кроме того, местное низкотемпературное воздействие на ткани, как правило, сопровождается общими реакциями организма, приводящими к изменению биохимических и иммунологических показателей крови [10–14]. Все вышеперечисленные эффекты криовоздействия не только обуславливают повреждение и гибель ОК непосредственно в очаге замораживания, но и препятствуют их отделению от первичной опухоли, интравасации, а также выживанию в агрессивной среде кровотока, прерывая метастатический каскад на ранних этапах.

Таким образом, наши исследования показывают, что применение ИК за счет активации и реализации ряда антиметастатических механизмов предотвращает диссеминацию ОК в регионарный опухолевый кровоток, что позволяет значительно улучшить результаты лечения больных периферическим РЛ.

ВЫВОДЫ

Почти у половины (42,5%) обследованных больных периферическим РЛ в регионарном кровотоке обнаруживают ОК.

После проведения ИК опухоли частота выявления ОК в регионарном кровотоке уменьшается в 2 раза по сравнению с исходными данными.

5-летняя выживаемость пациентов, которым в процессе радикального оперативного вмешательства была применена ИК, почти в 2 раза превысила выживаемость в контрольной группе ($p < 0,05$), причем наиболее высокие показатели продолжительности жизни отмечали у больных, в регионарном кровотоке которых после ИК ОК определены не были.

ИК, повреждая ОК в процессе замораживания и активируя антиметастатические механизмы, препятствует диссеминации в регионарный кровоток, что снижает риск метастазирования, а также позволяет значительно улучшить результаты лечения пациентов с периферическим РЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Cambers AF, Groom AC, MacDonald IC.** Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 563–72.
2. **Pantel K, Brakenhoff RH.** Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004; **4**: 448–56.
3. **Geho DH, Bandle RW, Claire T, et al.** Physiological mechanisms of tumor-cell invasion and migration. *Physiology (Bethesda)* 2005; **20**: 194–200.
4. **Чехун ВФ.** Строма — регулятор прогрессии опухолевых клеток. *Онкология* 2009; **11** (3): 164–5.
5. **Alix-Panabieres C, Riethdorf S, Pantel K.** Circulating Tumor Cells and Bone Marrow Micrometastasis. *Clin Cancer* 2008; **14** (16): 5013–21.
6. **Ameri K, Luong R, Zhang H, et al.** Circulating tumour cells demonstrate an altered response to hypoxia and an aggressive phenotype. *Br J Cancer* 2010; **102**: 561–9.

7. Гуляев ДВ. Эффективность и перспективы применения антикоагулянтов при лечении больных со злокачественными новообразованиями. Онкология 2000; **2** (3): 218–25.

8. Laskin JJ, Sandler AB. First – line treatment for advanced non-small-cell lung cancer. Oncology 2005; **19** (13): 1671–6.

9. Prandoni P. Antitrombotic strategies in patients with cancer. Thromb Haemost 2007; **78**: 141–4.

10. Егоренков ВВ. Лечение злокачественных опухолей печени с применением методов локальной деструкции. Практик онкол 2008; **9** (4): 201–8.

11. Niu L, Wang J, Zhou L, *et al.* Complications of cryoablation in 644 lung cancer patients and its treatment. Zhongguo Fei Ai Za Zhi 2010; **13** (8): 832–4.

12. McTaggart RA, Dupuy DE. Thermal ablation of lung tumors. Tech Vasc Interv Radiol 2007; **10** (2): 102–13.

13. Atlas of Cryosurgery. / Eds: N Korpan / New York-Wien: Springer, 2002: 579 p.

14. Alperovich AE. Basics of Cryosurgery. / Eds: N Korpan / New York-Wien: Springer, 2002.

15. Ганусевич ИИ. Роль матричных металлопротеиназ (ММП) при злокачественных новообразованиях. II. Участие ММП в ангиогенезе, инвазии и метастазировании опухолей. Онкология 2010; **12** (2): 108–17.

16. Копнин БП. Современные представления о механизмах злокачественного роста. X Росс онкол конгресс. Москва, 2006: 99–102.

17. Трахтенберг АХ, Франк ГА, Колбанов КИ и др. Опухоли легких. В: Руководство по онкологии. / Под ред: ВИ Чисова, СЛ Дарьяловой / Москва: МИА, 2008: 309–49.

EFFECT OF INTRAOPERATIVE TUMOR CRYODESTRUCTION ON CIRCULATING TUMOR CELLS AND LIFE SPAN OF PATIENTS WITH LUNG CANCER

V.D. Zakharychev, I.I. Ganusevych

Summary. *The dynamics of tumor cells (TC) occurrence in regional blood in 40 patients with peripheral lung cancer in process of surgical intervention with intraoperative cryodestruction of tumor was studied. Before carrying out of cryodestruction the TC were detected in regional venous blood in 17 (42,5%) patients, after destruction – in 8 (20%), meanwhile TC changed their morphological characteristics. It was revealed that application of tumor cryodestruction increases 5-year survival rate of patients twofold. Obtained results give evidence to suppose that intraoperative cryodestruction of lung cancer decreases risk of metastasis at the expense of TC decrease of dissemination and their vital capacity.*

Key Words: lung cancer, tumor cryodestruction, circulating tumor cells, metastasis, overall survivals.

Адрес для переписки:

Захарычев В.Д.

03022, Киев, ул. Ломоносова, 33/43