

А.М. Дорошенко¹, В.В. Дворниченко^{1,2}, М.А. Голодников¹, С.М. Пленкин², П.В. Миронов²,
Д.И. Наталинов¹, И.В. Лисичникова², Л.Ю. Кислицына²

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИМУНОЦИТОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ИНТРАОПЕРАЦИОННЫХ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ СМЫВОВ У БОЛЬНЫХ С НИЗКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫМ РАКОМ ЖЕЛУДКА

¹ Иркутский государственный институт усовершенствования врачей (Иркутск)
² Иркутский областной онкологический диспансер (Иркутск)

В статье изложен опыт внедрения цитологического исследования интраперитонеальных смывов у больных с низкодифференцированным раком желудка с применением иммуноцитохимического анализа. Описаны показания к проведению данного исследования, подробно изложена его методика. Исследование проведено у 12 пациентов с местно-распространенным низкодифференцированным раком желудка с подозрением на прорастание опухоли серозной оболочки. В результате после получения данных гистологического исследования удаленного препарата с учетом данных исследования перитонеальных смывов у 4-х пациентов установлена IV стадия заболевания.

Ключевые слова: рак желудка, перитонеальные смывы

USE OF CYTOLOGICAL RESEARCH WITH USE OF IMMUNOCYTOCHEMICAL ANALYSIS OF INTRAOPERATIVE PERITONEAL LAVAGES IN PATIENTS WITH LOW DIFFERENTIATED STOMACH CANCER

A.M. Doroshenko¹, V.V. Dvornichenko^{1,2}, M.A. Golodnikov¹, S.M. Plenkin², P.V. Mironov²,
D.I. Natalinov¹, I.V. Lisichnikova², L.Yu. Kisitsina²

¹ Irkutsk State Institute of Physicians' Advanced Training, Irkutsk
² Irkutsk Regional Oncological Dispensary, Irkutsk

The article describes the experience of introduction of cytological research of intraperitoneal lavages in patients with low differentiated stomach cancer with use of immunocytochemical analysis. Indications for the research and its method are described in the article. The research was carried out in 12 patients with locally invasive stomach cancer with suspicion of invasion of serous tunic tumor. As the result after receiving of data of histological study of ablated preparation and with taking of data of examination of peritoneal lavages into consideration IV stage of cancer was revealed in 4 patients.

Key words: stomach cancer, peritoneal lavages

Рак желудка был и остается одной из основных причин летальности в структуре онкологической патологии. Заболеваемость раком желудка значительно варьирует в различных регионах мира. Наиболее высокая заболеваемость в Японии, Китае, Корее (от 35 – 85 на 100 тысяч населения). В странах Западной Европы, США заболеваемость существенно ниже (4 – 8 на 100 тысяч населения). В России рак желудка занимает второе место в структуре онкологической заболеваемости. Каждый год в России регистрируют более 45 тысяч новых случаев рака желудка, более 40 тысяч больных умирают.

Радикальное лечение рака желудка предусматривает полное удаление первичной опухоли и зон возможного метастатического поражения. Абсолютное большинство пациентов поступают на лечение с распространенными стадиями болезни, поэтому истинно радикальные вмешательства удается выполнить небольшому числу пациентов. Для отбора пациентов, подлежащих такому лечению, онколог руководствуется объективными данными клинического и физикального обследования пациента. Даже при использовании современных методов диагностики, таких, как мультиспиральная

компьютерная томография, магнитнорезонансная томография и эндоскопическая ультрасонография, предоперационное клиническое стадирование рака желудка несовершенно. Сложности возникают с определением поражения регионарных лимфоузлов желудка. Также проблемой является исключение канцероматозного поражения брюшины, особенно когда оно не сопровождается накоплением в брюшной полости асцитической жидкости. Решить эту проблему частично помогает диагностическая лапароскопия, во время которой удается на доступных осмотру участках оценить состояние париетальной и висцеральной брюшины. К сожалению, микроскопическое поражение брюшины, невидимое при увеличении лапароскопической оптикой, часто остается недиагностированным.

Основным видом прогрессирования опухоли после радикального лечения является интраперитонеальный рецидив в виде канцероматоза брюшины, причиной которого является имплантанционное метастазирование опухоли, которое чаще всего возникает при прорастании всех слоев органа. По данным Katai et al. [4], канцероматоз брюшины был причиной рецидива опухоли после

радикального хирургического лечения у 44 % больных, а метастатическое поражение печени и других органов — только в 14 и 11 % случаев соответственно. Поскольку канцероматоз брюшины является основной причиной рецидива, определение групп пациентов с высоким риском имплантационного метастазирования является актуальной проблемой. Установлена зависимость частоты обнаружения имплантационных метастазов не только от глубины и площади поражения желудочной стенки, но и от макро- и микроскопического строения опухоли. Наибольший риск имеется у пациентов с низкодифференцированными гистологическими формами рака желудка при прорастании опухоли во все слои стенки желудка. Наиболее часто имплантационные метастазы обнаруживаются при перстневидноклеточном (65,0 %) и недифференцированном (60,3 %) раке, диффузно-инфильтративной форме роста опухоли (61,0 %), тотальном поражении желудка (59,0 %) [3].

На ранних этапах имплантационного метастазирования трудно обнаружить клетки опухоли в асцитической жидкости, вместе с тем установление распространенности опухолевого процесса до появления его клинических признаков имеет большое значение для правильного выбора тактики лечения. До последнего времени выявление опухолевых клеток в асцитической жидкости или перитонеальных смывах осуществлялось только традиционными методами световой микроскопии, которые часто оказывались малоэффективными. Развитие иммуноцитохимических методов исследования дает возможность выявлять даже единичные клетки опухоли, что в конечном итоге обеспечивает адекватное стадирование рака желудка и определяет прогноз. Крупное многоцентровое исследование, проводимое в Тайланде, показало, что пациенты с выявленными при микроскопии опухолевыми клетками в перитонеальных смывах не пережили 5-летний рубеж после проведения радикальной операции [7]. Выявление клеток рака в перитонеальной жидкости даже при отсутствии макроскопически видимых метастазов резко ухудшает прогноз. Исследования, проведенные в южно-азиатском регионе, показали, что пациентов с опухолевыми клетками в смывах с брюшины необходимо относить в группу с диссеминированным раком желудка и констатировать 4-ю стадию болезни.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В тесном сотрудничестве с цитологической лабораторией ИООД (зав. отд. — Л.Ю. Кислицина) разрабатывается и внедряется методика цитологического исследования с применением иммунофенотипирования, интраоперационных перитонеальных смывов у больных раком желудка. Апробация методики проводилась на базе онкологического отделения № 6 ИООД (зав. отд. — С.М. Плёткин). При световой микроскопии осадка перитонеальных смывов, равно как и при исследовании асцитических жидкостей, возникает проблема диффе-

ренциальной диагностики реактивно измененных клеток мезотелия, гистиоцитарно-макрофагальных элементов и раковых клеток. Подвергаясь реактивным изменениям, клетки пролиферирующего мезотелия приобретают черты сходства с клетками некоторых злокачественных опухолей. В то же время изолированные опухолевые клетки, попадая в несвойственное им микроокружение, могут видоизменяться и напоминать клетки реактивно измененного мезотелия и макрофаги. Для решения этой проблемы во многих отечественных и зарубежных онкологических центрах применяется иммуноцитохимическое исследование экссудатов из серозных полостей [1].

В стандарт предоперационного обследования у всех пациентов с морфологически подтвержденным диагнозом рака желудка входили эзофагогастродуоденоскопия с биопсией опухоли, рентгенконтрастное исследование желудка, ультразвуковое сканирование брюшной полости и забрюшинного пространства, фиброколоноскопия. По показаниям обследование дополнялось компьютерной томографией органов брюшной полости, эндосонографией желудка, ультразвуковым исследованием органов малого таза. При отсутствии объективных данных об отдаленном метастазировании у пациентов при отсутствии осложненного течения опухолевого процесса (кровотечение или стеноз) обследование дополнялось диагностической лапароскопией, после чего проводился окончательный отбор пациентов, подлежащих радикальному хирургическому лечению. У 12 пациентов из этой группы на операции проводили забор интраперитонеальных смывов.

Показанием для исследования считали наличие у пациента низкодифференцированной гистологической формы рака желудка и подозрение на инвазию опухоли в серозную оболочку желудка. Исследование не проводилось при выявлении на операции канцероматоза брюшины и очагов отдаленного метастазирования, подтвержденных экспресс-морфологическими методами диагностики.

Методика исследования заключалась в следующем: выполнялась верхне-срединная лапаротомия. Осуществлялся тщательный гемостаз краев лапаротомной раны с целью уменьшения вероятности попадания форменных элементов крови в исследуемый материал. Поэтапно осматривались органы брюшной полости: визуально оценивались размеры опухоли желудка, ее локализация, степень прорастания серозной оболочки, инвазии в соседние органы и структуры. При подозрении на прорастание опухоли серозной оболочки желудка пальпация органа не производилась. Проводилась визуальная и пальпаторная оценка печени, париеальной и висцеральной брюшины, органов малого таза, забрюшинного пространства и парааортальных лимфоузлов. При выявлении асцитической жидкости производился ее забор для экспресс-цитологического исследования. При обнаружении очагов, подозрительных в отношении отдаленных

метастазов, канцероматоза брюшины, производилась их биопсия и экспресс-морфологическое исследование.

У группы пациентов с отсутствием асцитической жидкости, отдаленных метастазов и канцероматоза в брюшную полость вводился подогретый до температуры тела изотонический раствор хлорида натрия (NaCl 0,9 %). Пациентам с массой тела до 80 кг вводилось 400 мл, с массой тела более 80 кг — 600 мл раствора 0,9% NaCl. Экспозиция жидкости составляла 7–10 минут, в это время выполнялся лаваж левого и правого поддиафрагмальных пространств, боковых каналов брюшной полости и малого таза. Затем перитонеальные смывы эвакуировали из брюшной полости посредством вакуумного отсоса в чисто вымытую обработанную ёмкость. Полученную жидкость пропускали через восьмислойную марлю, играющую роль фильтра, для максимального удаления фрагментов жировой клетчатки, усложняющей дальнейшее цитологическое исследование. К отфильтрованной перитонеальной жидкости добавляли цитрат натрия (*Sol. Natrii Citratis* 5 %) из расчета 1,5 мл к 100 мл, который играет роль стабилизатора. Полученный раствор немедленно доставляли в цитологическую лабораторию, центрифугировали при помощи цитоцентрифуги Cytospin-4 (Shandon, Германия) при 1000 об. в течение 5 мин и обычным способом на центрифуге Elmi-6 (Латвия) при 1500 об. в течение 5 мин. Из полученного осадка готовили цитологические препараты. Два препарата окрашивали азур-эозином по методу Паппенгейма и исследовали методом световой микроскопии. Четыре препарата, приготовленных методом Cytospin, высушивали на воздухе, затем фиксировали в абсолютном ацетоне в течение 30 сек. и использовали для проведения иммуноцитохимических реакций по протоколу авидин-биотинового метода. Для выявления опухолевых клеток использовали панель моноклональных антител (мкАТ), рекомендованную Д.Ф. Глузманом, Л.М. Скляренко, В.А. Надгорной, И.А. Крячок [2]: к карциноэмбриональному антигену (СЕА), эпителиальному антигену клон Вег ЕР 4, мезотелину, CD15. Такая комбинация антител, по мнению авторов, позволяет подтвердить наличие опухолевых клеток у 83 % больных с метастатическим поражением серозных оболочек.

Иммуноцитохимическое исследование проводили в тех случаях, когда при световой микроскопии обнаруживали клетки, подозрительные в отношении карциномы, однако уверенно поставить диагноз рака было затруднительно, а также в случаях с отрицательным цитологическим результатом.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Интраоперационный забор перитонеальных смывов, учитывая показания, был проведен у 12 пациентов. При световой микроскопии в мазках осадка перитонеального смыва у 8 пациентов были найдены реактивно измененные клетки мезотелия и элементы воспаления, опухолевые клетки не об-

наружены. В 2 случаях у цитологов при световой микроскопии возникло подозрение на карциному. У 2 пациентов были обнаружены отчетливые структуры аденокарциномы.

Тем пациентам, у которых клетки карциномы не были обнаружены при световой микроскопии (8), а также пациентам с подозрением на карциному (2) было проведено иммуноцитохимическое исследование с мкАТ к СЕА, Вег ЕР4, мезотелину, CD15.

При этом в двух случаях была получена позитивная реакция в отдельных клетках с мкАТ к Вег ЕР4 и СЕА, т.е. диагноз карциномы подтвердился. Однако у одного из этих пациентов результаты ИФТ не повлияли на стадирование, поскольку это был первый опыт проведения иммуноцитохимического исследования перитонеальных смывов. У остальных 8 пациентов экспрессия маркеров карциномы не обнаружена.

Всем пациентам выполнена гастрэктомия, лимфодиссекция D2, спленэктомия по показаниям.

По результатам патолого-гистологического заключения у пациентов были выставлены следующие стадии болезни: I стадия — 2 человека, у них не было гистологически подтвержденного прорастания опухоли серозной оболочки, инвазия распространялась до субсерозного слоя; II стадия — 3 пациента; III стадия — 3 пациента; IV стадия диагностирована у 4 пациентов. Именно у последней группы больных при исследовании интраперитонеальных смывов были выявлены опухолевые клетки (33 %).

Пациентам, у которых в перитонеальных смывах были обнаружены опухолевые клетки после проведения гистологического исследования операционного материала стадия по классификации TNM были выставлена следующим образом:

1-й больной: pT4N0M1. Пациенту поставлена 4-я стадия болезни. Имелось прорастание опухоли брыжейки поперечно-ободочной кишки (индекс T4), при исследовании 55 лимфоузлов их метастатического поражения не обнаружено. Критерий M1 присвоен на основании иммуноцитохимически подтвержденного наличия опухолевых клеток в перитонеальных смывах.

2-й больной: pT3N3M1. Пациентке была выставлена 4-я стадия болезни на основании положительных перитонеальных смывов и распространенного лимфогенного метастазирования, в 23 из 49 исследованных лимфоузлов выявлены метастазы, гистологически подтвержденное прорастание серозной оболочки желудка.

3-й больной: pT3N3M1. Выставлена 4-я стадия болезни на основании положительных перитонеальных смывов и поражения лимфатического аппарата желудка: в 26 лимфоузлах — метастазы аденокарциномы. Опухоль прорастала во все слои стенки желудка.

4-й больной: pT3N3M1. выставлена 4-я стадия болезни на основании положительных перитонеальных смывов и обширного метастатического поражения удаленных лимфоузлов: в 25 лимфоуз-

лах — метастазы аденокарциномы. Индекс ТЗ установлен за счет прорастания опухоли в переднюю стенку желудка.

ВЫВОДЫ

Первый опыт проведения в ИООД интраоперационного забора перитонеальных смывов у больных раком желудка и их цитологического исследования с применением иммуноцитохимической диагностики показал, что у большего процента пациентов (33 %), имеющих низкодифференцированную опухоль желудка с вовлечением всех его слоев, обнаруживаются опухолевые клетки в свободной брюшной полости. У большинства больных из этой группы (75 %) данный факт сочетается с обширным метастатическим поражением удаляемых при операции лимфоузлов. Цитологическое исследование интраоперационных перитонеальных смывов с применением иммуноцитохимии с целью обнаружения изолированных опухолевых клеток позволяет более точно устанавливать стадию опухолевого процесса и прогнозировать исход заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисова О.С. Современные возможности цитологического метода в исследовании плевральных и перитонеальных экссудатов : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.12. — Москва, 2010. — 31 с.
2. Глузман Д.Ф., Склярченко Л.М., Надгорной В.А., Крячок И.А. Диагностическая иммуноцитохимия опухолей. — Киев : МОРИОН, 2003. — 156 с.

3. Неред С.Н. Хирургическое и комбинированное лечение больных раком желудка с высоким риском имплантационного метастазирования // Заседание московского онкологического общества. — 2006. — № 529.

4. Никулин М.П. Минимальная резидуальная болезнь при раке желудка // Иммунология гемопоза. — 2007. — № 2 (4). — С. 132—147.

5. Поддубный Б.К., Губин А.Н., Шолохов В.Н., Вакурова Е.С. Возможности лапароскопического внутриполостного ультразвукового исследования (ВУЗИ) у больных раком желудка // Возможности современной онкологии в диагностике и лечении злокачественных заболеваний. — М., 2003. — С. 43.

6. Поддубный Б.К., Губин А.Н., Шолохов В.Н., Вакурова Е.С. и др. Современные методики лапароскопической диагностики опухолевых заболеваний органов брюшной полости // Современная онкология. — 2005. — Т. 3, № 3. — С. 130—133.

7. Euanorasetr C., Lertsithichai P. Prognostic significance of peritoneal washing cytology in Thai patients with gastric adenocarcinoma undergoing curative D2 gastrectomy // Gastric Cancer. — 2007. — № 10 (1). — P. 18—23.

8. Homma Y., Ushida S., Yamada M., Kobayashi H. et al. Positive peritoneal washing cytology in multiple cavities can predict poor prognosis of advanced gastric cancer patients // Ann. Surg. Oncol. — 2009. — № 17 (2). — С. 455—460.

Сведения об авторах

Дорошенко Антон Михайлович — врач-ординатор кафедры онкологии ГОУ ДПО «Иркутский государственный институт усовершенствования врачей Министерства здравоохранения и соцразвития РФ» (г. Иркутск, ул. Лермонтова, д. 67, кв. 46; тел.: 8 (914) 009-47-24).

Дворниченко Виктория Владимировна — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой онкологии ГОУ ДПО «Иркутский государственный институт усовершенствования врачей Министерства здравоохранения и соцразвития РФ», главный врач ГУЗ «Иркутский областной онкологический диспансер», главный онколог Сибирского федерального округа.

Голодников Михаил Андреевич — аспирант кафедры онкологии ГОУ ДПО «Иркутский государственный институт усовершенствования врачей Министерства здравоохранения и соцразвития РФ».

Пленкин Сергей Михайлович — заведующий онкологическим отделением № 6 ГУЗ «Иркутский областной онкологический диспансер».

Миронов Павел Владимирович — врач онкологического отделения № 6 ГУЗ «Иркутский областной онкологический диспансер».

Наталинов Данил Игоревич — аспирант кафедры онкологии ГОУ ДПО «Иркутский государственный институт усовершенствования врачей Министерства здравоохранения и соцразвития РФ».

Лисичникова Ирина Викторовна — врач цитологической лаборатории ГУЗ «Иркутский областной онкологический диспансер».

Кислицына Лада Юрьевна — заведующая цитологической лабораторией ГУЗ «Иркутский областной онкологический диспансер».