

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Войнарович А. О., Кассиль В. Л. // Вестник ОНЦ РАМН. — 1992. — № 1. — С. 21—25.
2. Жирмунская Е. А. Клиническая электроэнцефалография (обзор литературы и перспективы использования метода). — М., 1991. — 77 с.
3. Соколова И. В. и др. Оценка функционального состояния сосудов головного мозга методом двухкомпонентного анализа реоэнцефалограммы. Метод. рекомендации. — М., 1987. — 24 с.
4. Bergerat J. P., Green C., Drewinko B. // Cancer Biochem. Biophys. — 1979. — Vol. 3. — P. 173—180.
5. Cornley P. E., Gangli D., Wood J. H., Poplack D. G. // Cancer Chemother. Pharmacol. — 1981. — N 5. — P. 257.
6. Kohn S., Fradis M., Pratt H. et al. // Laryngoscope. — 1988. — Vol. 98. — P. 865—871.
7. Lange R. C., Spender R. P., Harder H. C. // J. Nucl. Med. — 1972. — Vol. 13. — P. 328.
8. Laurell G., Jungnelius U. // Laryngoscope. — 1990. — Vol. 100. — P. 724—734.
9. Litterst C. L., Gram T. E., Dedrick R. L. et al. // Cancer Res. — 1976. — Vol. 36. — P. 2340.
10. Reddel R. R., Kefford R. F., Grand J. M. et al. // Cancer Treat. Rep. — 1982. — Vol. 66. — P. 19—23.
11. Schabel F. M., Trader M. W., Laster W. R. et al. // Ibid. — 1979. — Vol. 63. — P. 9.

Поступила 14.05.01 / Submitted 14.05.01

© Коллектив авторов, 2002  
УДК 616.24-006.6-091.8

В. В. Делекторская, А. Г. Перевоицков, Б. Е. Полоцкий, А. К. Аллахвердиев, К. К. Лактионов, М. И. Давыдов

# ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫЙ РАК ЛЕГКОГО: ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ МИКРОМЕТАСТАЗОВ В РЕГИОНАРНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ

НИИ клинической онкологии

В настоящее время значительно расширились возможности диагностики и лечения рака легкого, однако многие аспекты прогнозирования результатов лечения требуют дальнейшего усовершенствования [1, 5].

Ряд клинико-морфологических факторов определяет прогноз немелкоклеточного рака легкого после проведенного радикального хирургического лечения [2, 6]. Основным интегральным клиническим прогностическим признаком является распространенность опухоли, определяемая по TNM, и, прежде всего, метастазирование в регионарные внутригрудные лимфоузлы. Наличие метастазов в лимфоузлах средостения относится к наиболее значимым неблагоприятным факторам прогноза [1]. Так, по нашим данным, после радикальной операции 5-летняя выживаемость больных плоскоклеточным раком легкого составила в зависимости от наличия или отсутствия метастазов в регионарных лимфоузлах 56% (N0), 44% (N1) и 20% (N2) соответственно. Поэтому современные подходы к радикальному хирургическому лечению рака легкого предполагают обязательное выполнение систематической медиастинальной лимфодиссекции.

Таким образом, особую роль в оценке прогноза заболевания приобретает выявление метастазов в удаленных внутригрудных лимфоузлах и достоверное определение минимальных метастатических поражений, или так называемых микрометастазов. Вместе с тем при рутинном гистологическом исследовании в световом микроскопе часть небольших по размеру метастазов раковых опухолей не удается обнаружить без применения специальных методик [3]. Более того, по данным ряда авторов [4], при плоскоклеточном раке легкого более 60%

V.V.Delektorskaya, A.G.Perevoschikov, B.E.Polotsky, A.K.Allakhverdyyev, K.K.Laktionov, M.I.Davydov

# SQUAMOUS-CELL LUNG CARCINOMA: IMMUNOHISTOCHEMICAL IDENTIFICATION OF REGIONAL LYMPH NODE METASTASES

Institute of Clinical Oncology

There was a significant improvement in the diagnosis and treatment of lung cancer, however, many aspects of disease prognosis are still unclear [1,5].

There are several clinical and morphological factors of prognostic significance for the course of non-small cell lung cancer after radical surgical treatment [2,6]. The main integral clinical prognostic factor is disease advance by pTNM classification and, first of all, regional thoracic lymph node metastasis. Mediastinal lymph node metastases are most important factors of poor prognosis [1]. For instance, the 5-year survival in squamous-cell lung cancer after radical surgery is 56% for N0, 44% for N1 and 20% for N2. Therefore, modern approaches to radical surgical treatment for lung cancer always include systemic mediastinal lymph node dissection.

In view of the above-said detection of distant intrathoracic lymph node involvement and reliable identification of minimal metastatic lesions or so called micrometastases is of much prognostic importance. However, routine histological study using light microscopy fails to detect a part of small metastases of cancer without special methods [3]. Some authors also believe [4] that more than 60% of micrometastases of squamous-cell lung carcinoma are not detected by standard morphological study.

The purpose of this study was to evaluate the role of immunohistochemical analysis for careful examination of lymph nodes dissected during radical operations and discovery of micrometastases of squamous-cell lung carcinoma using epithelial cell differentiation markers.

«скрытых» микрометастазов не выявляется при стандартном морфологическом исследовании лимфоузлов.

Целью работы явилась оценка возможности применения иммуногистохимического метода для тщательного исследования лимфоузлов, удаленных во время радикальных операций, и выявления «скрытых» микрометастазов плоскоклеточного рака легкого с использованием маркеров эпителиальной дифференцировки клеток.

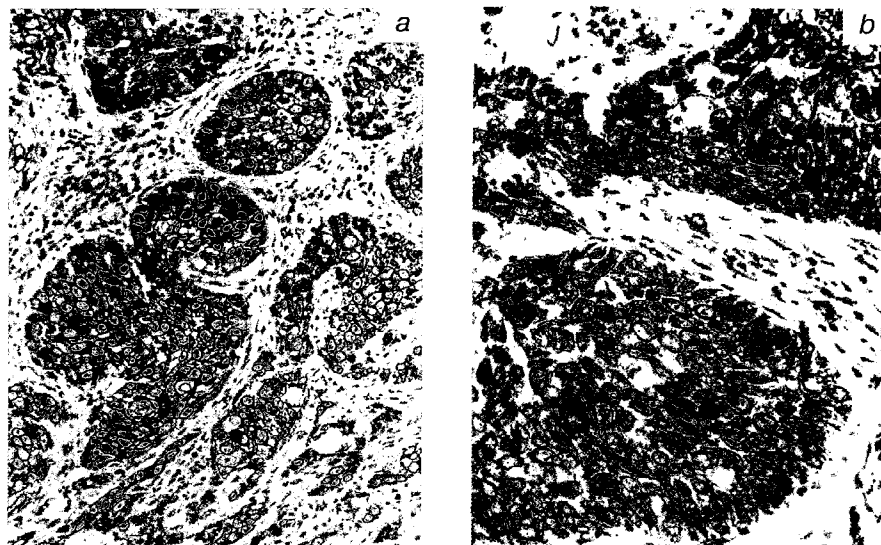
**Материал и методы.** Объектом исследования являлись клинические наблюдения и материал биопсий первичных опухолей и лимфоузлов от 120 больных плоскоклеточным раком легкого T1 — 3N0M0, оперированных в торакоабдоминальном отделении НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН в период 1985—1996 гг. Для определения гистологического типа опухоли и наличия метастазов в лимфоузлы изучали парафиновые срезы, окрашенные гематоксилин-эозином и пикрофуксином по ван Лизону. В исследование для иммуногистохимического анализа отобрано 120 первичных опухолей, имеющих гистологическое строение плоскоклеточного рака различной степени дифференцировки (высоко-, умеренно- и малодифференцированные подтипы), и 270 лимфоузлов, свободных от опухоли по данным стандартного гистологического исследования.

Иммуногистохимическое окрашивание выполнено на серийных парафиновых срезах ткани первичной опухоли и регионарных лимфоузлов с предварительной обработкой в СВЧ-печи и использованием коммерческих моноклональных антител против общего цитокератина («Zymed», США). Инкубация с указанными антителами проводилась в течение 30 мин при комнатной температуре. Для выявления продукта реакции применяли пероксидазно-антипероксидазный метод и диаминобензидин в качестве красителя («Zymed», США). Ядра клеток во всех случаях докрашивали гематоксилином. Ставили контрольные реакции.

Результаты реакций в раковых клетках первичной опухоли и микрометастазов в лимфоузлах оценивали в зависимости от интенсивности окрашивания (слабоположительная, умеренная, выраженная), количества антигенположительных клеток и типа реакции (цитоплазматическая, мембранная, смешанная).

**Результаты и обсуждение.** Иммуногистохимическая идентификация микрометастазов проводилась с использованием в качестве маркера общего цитокератина широкого спектра действия (панцитокератина), экспрессия которого определялась в большинстве первичных эпителиальных новообразований, сохранялась в клетках метастазов и хорошо выявлялась при фиксации материала в формалине и заключении в парафин.

В ходе проведенного исследования было показано, что антитела к общему цитокератину в 100% наблюдений плоскоклеточного рака легкого реагировали с антигенами первичной опухоли. В большинстве случаев независимо от степени дифференцировки опухоли отмечались высокие показатели экспрессии: от 70 до 100% опухолевых клеток демонстрировали антигенпозитивное окрашивание цитоплазмы и высокую интенсивность реакции (рис. 1, а). Тип реакции во всех случаях был цитоплазматическим или смешанным: мембранным и цитоплазматическим (рис. 1, б). Степень выраженности экспрессии иногда варьировала в различных участках одной и той же опухоли. В 12 случаях из 120 выраженность экспрессии как по интенсивности реакции, так и по количеству антигенпозитивных клеток была слабой или умеренной.



**Рис. 1. Плоскоклеточный рак легкого, иммуногистохимическое окрашивание опухоли на эпителиальный маркер (панцитокератин).** а — цитокератин определяется в большинстве клеток опухоли.  $\times 200$ ; б — интенсивная цитоплазматическая реакция в клетках рака легкого.  $\times 400$ ; Здесь и на рис. 2: парафиновые срезы, пероксидазно-антипероксидазный метод. Ядра клеток докрашены гематоксилином. Хромоген-диаминобензидин.

**Fig.1. Squamous-cell lung carcinoma, immunohistochemical staining for an epithelial marker (pancytokeratin).** а, cytokeratin is present in most tumor cells.  $\times 200$ ; б, intensive cytoplasmic reactivity in lung cancer cells.  $\times 400$ .

Here and in fig. 2: paraffin sections, peroxidase-antiperoxidase method. Hematoxylin cell nucleus staining. Diaminobenzidine is used as a chromogen.

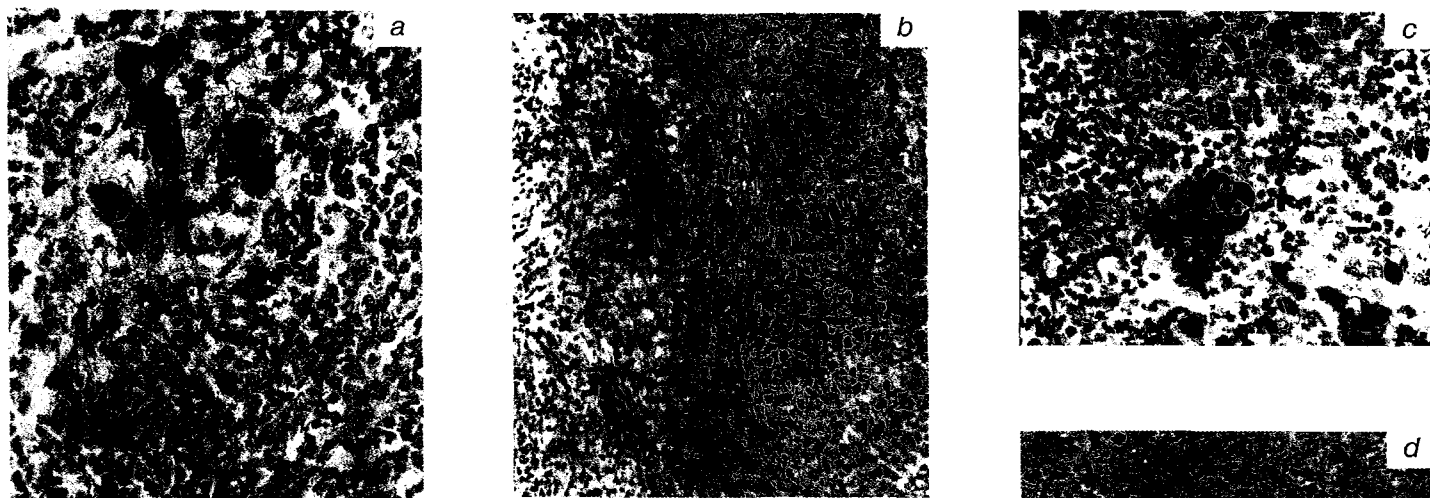
**Materials and Methods.** The study was performed on clinical findings and bioptic specimens of primary tumors and lymph node metastases from 120 patients with squamous-cell lung carcinoma T1-3N0M0 undergoing surgery at the Institute of Clinical Oncology, N.N.Blokhin CRC, during 1985-1996. Paraffin sections after hematoxylin-eosin and van Gieson staining were studied to establish tumor histology and to detect lymph node metastases. 120 specimens of primary well, moderately and poorly differentiated squamous-cell carcinomas and 270 lymph nodes free from disease by standard histological study were selected for immunohistochemical analysis.

Immunohistochemical staining was performed in series of paraffin sections of the primary tumors and regional lymph nodes previously exposed to microwave treatment using commercial monoclonal antibody to common cytokeratin (Zymed, USA). Incubation with the antibody was carried out for 30 min at room temperature. Reaction product identification was performed by peroxidase-antiperoxidase method and using diaminobenzidine as a dye (Zymed, USA). Additional hematoxylin staining was performed for cell nuclei. The experiments were performed under controlled conditions.

Reactivity in cancer cells of the primary and lymph node micrometastases was assessed by staining intensity (weakly positive, moderate, marked), number of antigen-positive cells and reaction type (cytoplasmatic, membrane, mixed).

**Results and Discussion.** Immunohistochemical micrometastasis identification was performed with a broad-spectrum cytokeratin (pancytokeratin) that was expressed in most primary epithelial neoplasms, preserved in metastases and well seen after formalin fixation and paraffin embedding of samples.

The study demonstrated that antibody to common cytokeratin readily reacted with antigens of the primary in 100% of specimens from squamous-cell carcinoma. Most specimens demonstrated high expression irrespective of tumor differentiation: 70-100% of tumor cells had antigen-positive cytoplasm staining and high-intensity reactivity (fig.1a). Reaction type was cytoplasmatic or mixed (membrane and cytoplasmatic) in all cases



**Рис. 2. Микрометастазы плоскоклеточного рака легкого в регионарных лимфоузлах.** *a* — цитокератин определяется в цитоплазме отдельных раковых клеток.  $\times 400$ ; *b* — небольшие группы раковых клеток. Позитивное окрашивание на панцитокератин  $\times 200$ ; *c* — высокая интенсивность реакции в цитоплазме клеток микрометастаза рака легкого.  $\times 400$ ; *d* — экспрессия цитокератина в клетках микрометастаза на фоне антигеннегативных лимфоидных элементов.  $\times 200$ .

**Fig.2. Regional lymph node metastases of squamous-cell lung cancer.** *a*, cytokeratin is present in cytoplasm of some cancer cells.  $\times 400$ ; *b*, small cancer cell clusters. Positive staining for pancytokeratin.  $\times 200$ ; *c*, high-intensity reactivity in cytoplasm of a lung cancer micrometastasis.  $\times 400$ ; *d*, cytokeratin expression in a micrometastasis cells against the background of antigen-negative lymphoid elements.  $\times 200$ .

При окраске регионарных лимфоузлов антителами к общему цитокератину в 17 (14%) случаях удалось идентифицировать единичные микрометастазы рака, которые при сопоставлении с данными стандартного гистологического анализа в удаленных лимфоузлах не определялись. Наиболее часто микрометастазы были представлены в виде отдельных элементов опухоли (рис. 2, *a*) или небольших групп раковых клеток (рис. 2, *b*), которые располагались под капсулой лимфоузла, в периферических синусах или в корковом слое. Экспрессия общего цитокератина в клетках микрометастазов, как и в клетках первичной опухоли, отличалась некоторой гетерогенностью, однако преобладал высокий уровень интенсивности окраски и цитоплазматический тип реакции (рис. 2, *c*). Небольшие по размеру комплексы раковых клеток определялись на фоне антигеннегативных лимфоидных элементов (рис. 2, *d*).

Ретроспективное сравнительное исследование клинического течения заболевания после проведенного хирургического лечения позволило выявить группу больных (59 случаев) с благоприятным прогнозом, в которой выживаемость после операции составила более 3 лет, и группу больных (61 случай) с плохим прогнозом, в которой пациенты умерли в течение 3 лет от прогрессирования основного заболевания. При клиноморфологическом анализе материала с учетом 3-летней выживаемости показано, что экспрессия цитокератина в клетках «скрытых» микрометастазов чаще выявлялась в случаях с плохим прогнозом (19%), чем в группе больных с благоприятным прогнозом (0,8%).

В 5 наблюдениях были идентифицированы единичные антигенпозитивные клетки, которые не были расценены как микрометастазы. Вопрос о вероятности развития метастазов при

(fig.1*b*). Expression degree was sometimes different in different areas of the same tumor. 12 of 120 specimens presented with weak to moderate expression as assessed both by reaction intensity and by the number of antigen-positive cells.

17 (14%) of regional lymph nodes stained with antibody to common cytokeratin had solitary cancer micrometastases which were not detectable by standard histological study. Most micrometastases were represented by individual tumor elements (fig.2*a*) or small cancer cell clusters (fig.2*b*) located under lymph node capsules, in peripheral sinuses or cortex. Common cytokeratin expression in micrometastases and primary tumors was somewhat heterogeneous though high staining intensity and cytoplasmatic reaction type were predominating (fig.2*c*). Small cancer cell clusters were seen against the background of antigen-negative lymphoid elements (fig.2*d*).

Retrospective analysis of disease clinical course after surgical treatment identified a group of patients (59) with favorable prognosis and a postoperative survival reaching 3 years or more, and a poor prognosis group of patients (61) dying within 3 years from cancer progression. Clinicomorphological analysis of specimens with respect to the 3-year survival demonstrated that cytokeratin expression on cells from dormant micrometastases was detected more frequently in cases with poor (19%) versus favorable (0.8%) prognosis.

Solitary antigen-positive cells which were not considered micrometastases were identified in 5 cases. It is not clear, whether metastases develop or not from such cells [3]. Besides, additional identification of histogenetic markers in other tissues (CLA, S-100 protein and others) should be made to exclude non-epithelial origin of the solitary antigen-positive cells. Immunohistochemical analysis using a broad antibody panel is more informative, though

наличии подобных клеток в лимфоузлах остается нерешенным [3]. Кроме того, для исключения неэпителиальной природы единичных цитокератинпозитивных клеток следует дополнительно определять гистогенетические маркеры других тканей (ОЛА, белок S-100 и др.). Иммуногистохимическое исследование, проведенное с использованием широкой панели антител, является более информативным, однако при поиске метастазов плоскоклеточного рака легкого ключевая роль принадлежит антителам, выявляющим цитокератины.

**Заключение.** Полученные данные демонстрируют ценность современных иммуногистохимических методик, широкое применение которых для исследования регионарных лимфоузлов, удаленных в ходе радикальных операций по поводу плоскоклеточного рака легкого, позволяет улучшить качество морфологической диагностики и более достоверно судить о распространенности и прогностических особенностях заболевания. В частности, использование маркеров эпителиальной дифференцировки клеток позволяет идентифицировать минимальные метастатические поражения лимфоузлов, которые не определяются при стандартном гистологическом анализе. Выявление в 14% наблюдений микрометастазов в регионарных лимфоузлах еще раз подтверждает целесообразность выполнения расширенной систематической медиастинальной лимфодиссекции. Такой подход позволяет реально оценить внутригрудную распространенность опухоли, повышает радикализм вмешательства и способствует оптимизации дополнительного противоопухолевого лечения.

Работа выполнена в рамках проекта РФФИ № 00-15-97939.

© Коллектив авторов, 2002  
УДК 616.24-006.6-059

В. В. Жарков, В. П. Курчин, П. И. Моисеев, Б. Е. Полоцкий

## РОЛЬ ПРЕДОПЕРАЦИОННОГО ОБЛУЧЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ ОПЕРАБЕЛЬНЫХ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

Отделение грудной хирургии и онкологии НИИ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова, Минск, Беларусь; НИИ клинической онкологии

В настоящее время отмечается снижение интереса к проведению исследований по изучению эффективности предоперационной лучевой терапии в сочетании с радикальным хирургическим лечением операбельных больных раком легкого, что проявляется в незначительном количестве публикаций по этой проблеме за последние годы. С одной стороны, концепция улучшения «локального контроля» путем изменения биологических свойств злокачественной опухоли предоперационной лучевой терапией и повышения абластики радикальной

cytokeratin-recognizing antibodies play the key role in identification of metastases of squamous-cell lung cancer.

**Conclusion.** Our findings render significant modern immunohistochemical approaches that improve morphological diagnosis and provide more reliable assessment of disease advance and prognosis when used in the analysis of regional lymph nodes. In particular, cell epithelial differentiation markers identify minimal metastases in lymph nodes that are undetectable by standard histological assay. The detection of regional lymph node metastases confirms reasonable wide systemic dissection of mediastinal lymph nodes. This approach helps to evaluate intrathoracic disease advance, to increase radicality of surgical intervention and to optimize further antitumor treatment.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Давыдов М. И., Полоцкий Б. Е. Рак легкого. — М., 1994.
2. Трахтенберг А. Х. Рак легкого. — М., 1987.
3. Франк Г. А., Пугачев К. К., Шабалова П. И. и др. //Арх. патол. — 1990. — Т. 52, №8. — С. 70—74.
4. Chen Zhao-Lun, Perez Sol, Holmes E. Carmack et al. //J. Nat. Cancer Inst. — 1993. — Vol. 85, N 6. — P. 493—498.
5. Gail M., Eagan R., Feld R. et al. //Cancer. — 1984. — Vol. 54, N 9. — P. 1802—1813.
6. Sendus E., Iassen I., Kamika-Modkowska V. et al. //Pneumonol. Allergol. — 1994. — Vol. 62, N 5. — P. 233—238.

Поступила 23.03.01 / Submitted 23.03.01

V.V.Zharkov, V.P.Kurchin, P.I.Moiseyev, B.E.Polotsky

## THE ROLE OF PREOPERATIVE IRRADIATION IN THE TREATMENT FOR OPERABLE LUNG CANCER

Thoracic Surgery and Oncology Department, N.N.Alexandrov Institute for Oncology and Medical Radiology, Minsk, Belarus; Institute of Clinical Oncology

There was a decreasing interest to study of the role of preoperative radiotherapy in combination with radical surgery in the treatment for operable lung cancer which is reflected by few publications tackling this problem over the recent years. On the one hand, improvement of local control through alteration of cancer biology as a result of preoperative irradiation and increasing radicalism of surgery was not confirmed by clinical experience, on the other hand, synthesis of new effective drugs for lung cancer opened good prospects for adjuvant chemotherapy which seemed