

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ВЫЯВЛЕНИЯ СКРЫТЫХ МИКРОМЕТАСТАЗОВ В РЕГИОНАРНЫХ К РАКОВОЙ ОПУХОЛИ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ

Феликс Фаридович Хузин, Дмитрий Эдуардович Цыплаков

*Кафедра патологической анатомии (зав. — проф. Д.Э. Цыплаков) Казанского государственного
медицинского университета, e-mail: felixhusin@yandex.ru*

Реферат

Представлены результаты выявления скрытых микрометастазов рака в регионарных лимфатических узлах (негативных при рутинных окрасках), а также определено их влияние на пятилетнюю выживаемость онкологических больных. Наилучшим способом обнаружения микрометастазов в регионарных лимфатических узлах является сочетание иммуногистохимического метода с использованием моноклональных антител против пан-цитокератинов и серийных срезов. Наличие микрометастазов рака в регионарных лимфатических узлах является неблагоприятным прогностическим показателем.

Ключевые слова: микрометастаз, регионарные лимфатические узлы, иммуногистохимия, пан-цитокератины, серийные срезы, рак, пятилетняя выживаемость.

При прогнозировании пятилетней выживаемости у онкологических больных статус регионарных лимфатических узлов (РЛУ) считается наиболее важным показателем, так как у пациентов, имеющих в них метастазы, наблюдается более низкий показатель пятилетней выживаемости. При этом особую проблему в современной онкологии представляет прогностическое значение микрометастазов (ММ), под которыми подразумевают скопления опухолевых клеток диаметром более 0,2 мм, но менее 2,0 мм, тогда как неопластические образования меньших размеров рассматриваются как изолированные опухолевые элементы [3, 4].

Традиционный способ патогистологического исследования материала лимфатических узлов (ЛУ) подразумевает исследование 1–2 гистологических срезов каждого ЛУ, окрашенных гематоксилин-эозином, после макроскопического описания. При этом зачастую значительная часть ЛУ фактически не исследуется микроскопически, что может приводить к недостоверным результатам при выявлении метастазов. Применение серийных срезов без дополнительного использования

иммуногистохимических (ИГХ) методов также дает большой процент ошибок — до 20–30% [2].

Данные немногочисленных авторов о количестве случаев ИГХ обнаружения ММ в ЛУ варьируют от 0,9% [6] до 15,6% [5].

Оптимальный протокол гистопатологического исследования РЛУ при раке различных локализаций до сих пор не разработан. Данные о ценности исследования с использованием ИГХ методов также противоречивы [4]. Прогресс молекулярной биологии, казалось бы, улучшил возможности выявления ММ в ЛУ по сравнению с ИГХ методом. В некоторых работах [7] было продемонстрировано, что с помощью обратной транскриптазной полимеразной цепной реакции (РТ-ПЦР) на цитокератин-19 можно распознавать опухолевые клетки даже при нормальной гистологической картине ЛУ. Однако наличие псевдоген-ов цитокератина-19 снижает специфичность РТ-ПЦР, уменьшая таким образом клиническую ценность данного метода. Поэтому ИГХ метод остается на сегодняшний день самым специфичным. Вместе с тем имеются данные о низкой воспроизводимости результатов с помощью ИГХ методов [9].

Вопрос о влиянии наличия ММ в РЛУ на пятилетнюю выживаемость онкологических больных до настоящего времени остается открытым. Так, одни исследователи считают, что наличие ММ в РЛУ эквивалентно наличию макрометастазов и является неблагоприятным прогностическим показателем [5, 11, 12]. При этом некоторые авторы при наличии ММ даже указывают на необходимость классификации стадии заболевания по системе TNM как N1 [8]. Другие же, напротив, утверждают, что наличие ММ не оказыва-

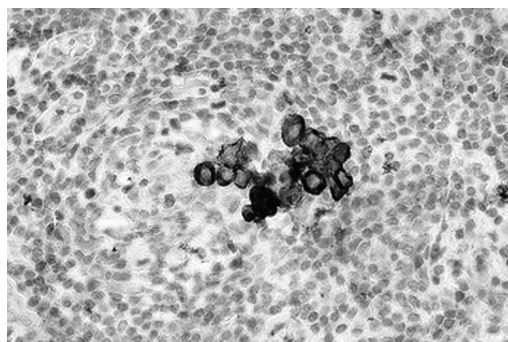


Рис. 1. Опухолевые клетки в кортикальной зоне ЛУ, не обнаруженные при окраске гематоксилин-эозином. Экспрессия пан-ЦКР. Стрептавидин-биотиновый метод с докраской гематоксилином. х 400.

ет существенного влияния на прогноз заболевания [9, 10]. Существует также мнение, что ввиду низкой чувствительности существующих на сегодняшний день методов исследования, прогностическое значение ММ нельзя считать окончательно выясненным [3, 4].

Целью настоящего исследования являлись ИГХ идентификация скрытых ММ на серийных срезах РЛУ (негативных при рутинных окрасках) с оценкой их влияния на пятилетнюю выживаемость онкологических больных.

Было исследовано 482 РЛУ, полученных от 50 пациентов (37 женщин и 13 мужчин, средний возраст — $58,5 \pm 24,5$ года) во время операций по поводу рака наиболее распространенных локализаций (молочная железа, толстая кишка, желудок). Исследованию подвергались только те ЛУ, в которых при окраске гематоксилин-эозином метастазы выявлены не были. Материал серийно нарезался через каждые 100 мк толщиной 5–7 мк и ИГХ окрашивался стрептавидин-биотиновым методом («DAKO», Дания) с использованием моноклональных антител (МКАТ) против пан-цитокератинов (пан-ЦКР). В качестве позитивного контроля для ИГХ исследования брали срезы первичной опухоли, а негативного — инкубировали срезы с сывороткой животного, от которого были получены первые антитела. Метастатические образования были классифицированы как ММ, если их диаметр был от 0,2 до 2,0 мм. Полученный материал был разделен на 2 группы в зависимости от наличия или отсутствия ММ в РЛУ. Показатель пятилетней выживаемости определялся прямым мето-

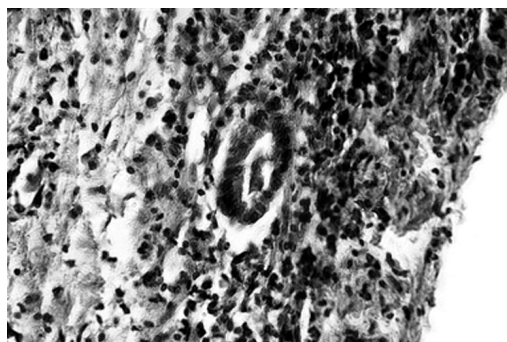


Рис. 2. ММ аденокарциномы в субкапсулярной области ЛУ, который не был выявлен. Окраска гематоксилин-эозином. х 400.

дом [1]. О пациентах, живших в момент завершения исследования, учитывалась следующая информация: 1) жив без признаков опухоли; 2) жив с признаками рака: а) рецидив, метастаз; б) наличие первичной опухоли. Пациентов, умерших в течение наблюдения, подразделяли на 2 группы: 1) умершие от рака; 2) умершие без признаков опухоли от интеркуррентных заболеваний.

Статистический анализ полученных данных производился с помощью программы Microsoft Excel с определением доверительного интервала для средней (по Р. Фишеру) и величины р. Степень достоверности наблюдений оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при 95% уровне значимости ($p < 0,05$).

При помощи ИГХ метода скрытые ММ были выявлены в 23 (4,8%) РЛУ у 9 (18%) пациентов (рис. 1). При ретроспективном просмотре препаратов, окрашенных гематоксилин-эозином, ММ в РЛУ были обнаружены у 3 из этих пациентов. После проведения серийных срезов ММ были определены дополнительно в 7 (1,5%) РЛУ у 2 (4%) больных. Однако у одного пациента в 2 РЛУ, в которых ранее при помощи ИГХ метода были идентифицированы ММ, после изучения серийных срезов они были переклассифицированы в макрометастазы.

Таким образом, при сочетании серийных срезов и ИГХ метода удалось выявить ММ в 28 (5,8%) РЛУ у 10 (20%) пациентов (рис. 2, 3).

Сравнительная характеристика эффективности различных методов исследования представлена в таб. 1.

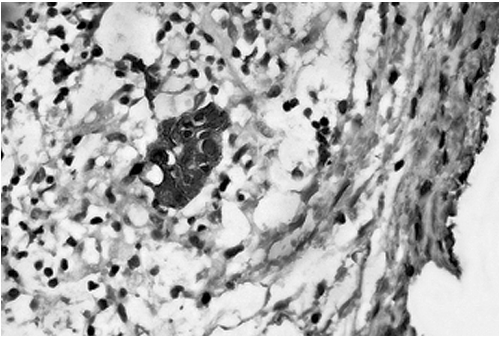


Рис. 3. Тот же случай, что и на рис. 2 (серийный срез). Экспрессия пан-ЦКР в опухолевых клетках. Стрептавидин-биотиновый метод с докраской гематоксилином. х 400.

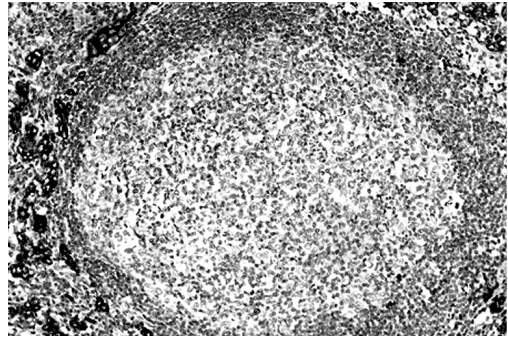


Рис. 5. Отдельные скопления опухолевых клеток в мантийной зоне фолликула с выраженным реактивным центром. Экспрессия пан-ЦКР. Стрептавидин-биотиновый метод с докраской гематоксилином. х 400.

Таблица 1
Эффективность различных методов исследования ЛУ

Методы исследования	Количество ЛУ с выявленными ММ, %
Рутинные гистологические методы	79,5±8,5
Рутинные гистологические методы на серийных срезах	86,5±3,5
ИГХ метод (пан-ЦКР)	93±6
ИГХ метод на серийных срезах	99,5±0,5

Как нам удалось установить, в группе с ММ пятилетняя выживаемость была достоверно ниже чем у пациентов без метастазов (в среднем 60,5±9,5 против 36±5%; $p<0,05$).

Сравнительная характеристика показателя пятилетней выживаемости в зависимости от локализации первичной опухоли и степени метастатического поражения РЛУ приведена на рис. 4.

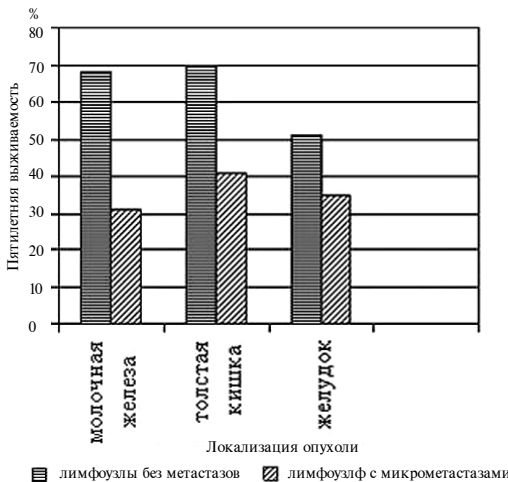


Рис. 4. Пятилетняя выживаемость онкологических больных в зависимости от локализации первичной опухоли и степени метастатического поражения РЛУ.

Как показали наши исследования, лучшим способом выявления ММ в РЛУ является сочетание серийных срезов и ИГХ метода, поскольку их использование повышает эффективность распознавания ММ. При изучении одного среза ММ может просто не попасть в данный уровень среза, если он расположен выше или ниже. Кроме того, в срез, сделанный только на одном уровне, может попасть лишь небольшая часть макрометастаза, симулируя таким образом в гистологическом препарате ММ. Если этого не учитывать, можно получить весьма недостоверные результаты, в чем мы убедились.

Нам также удалось установить, что наличие ММ в РЛУ достоверно ухудшает прогноз заболевания. В то же время в литературе имеются сведения, что ММ могут эффективно уничтожаться иммунокомпетентными клетками ЛУ вне зависимости от пола, возраста пациентов, локализации и гистологического типа опухоли, а пятилетняя выживаемость онкологических пациентов определяется не столько наличием ММ, сколько характером реактивных изменений в РЛУ [2]. Так, например, при наличии паракортикальной гиперплазии и синусного гистиоцитоза прогноз у пациентов с ММ в лимфатические узлы лучше, чем у больных с непораженными лимфатическими узлами, но с наличием гипоплазии паракортикальной зоны, отсутствием синусного гистиоцитоза и фолликулярной гиперплазии. Чтобы избежать противоречий в оценке прогностического значения, наличие ММ в РЛУ, вероятно, необходимо рассматривать параллельно с реакциями окружающей лимфоидной

ткани, так как специфические иммуноморфологические реакции (паракортикальная гиперплазия, фолликулярная гиперплазия, синусный гистиоцитоз и др.) характеризуют состояние местного иммунного ответа. Так, следует признать ошибочным мнение, что при наличии метастазов в РЛУ реактивные изменения в них слабо выражены или отсутствуют. Например, выраженная фолликулярная гиперплазия часто сочетается с наличием опухолевых клеток, даже непосредственно вокруг фолликулов со светлыми центрами (рис. 5). Возможно, именно различные комбинации наличия ММ и реактивных изменений окружающей лимфоидной ткани в основном и влияют на прогноз заболевания у пациентов без метастазов в РЛУ.

ВЫВОДЫ

1. Использование только рутинных методов гистологического исследования ЛУ, удаленных во время операций по поводу рака, является малоэффективным и может привести к выбору неадекватной тактики лечения.

2. Для эффективного выявления ММ в РЛУ необходим комплексный подход: использование серийных срезов через каждые 100 мк и ИГХ метода с помощью МКАТ против пан-ЦКР.

3. Наличие ММ рака в РЛУ является неблагоприятным прогностическим показателем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березкин Д.П. Расчет показателя относительной выживаемости и медианы наблюдений выживаемости онкологических больных // *Вопр. онкол.* — 1985. — № 2. — С. 13 — 16.
2. Цыплаков Д.Э. Рак и регионарные лимфатические узлы (иммуногистохимическое и ультраструктурное исследование): Автореф. дисс.... докт. мед. наук. — СПб, 1997. — 45 с.
3. Deyaney K.O., Rinaldo A., Ferlito A. Micrometastases in cervical lymph nodes from patients with squamous carcinoma of the head and neck: should they be actively sought? // *Ann. J. Otolaryngol.* — 2007. — Vol. 28 (4). — P. 271 — 274.
4. Kleysath M.B., Bobrow L.G., Pinder S.E., Purushotham A.D. The value of immunohistochemistry in sentinel

lymph node histopathology in breast cancer // *Br. J. Cancer.* — 2005. — Vol. 92 (12). — P. 2201 — 2205.

5. Kurahara H., Takao S., Maemura K. et al. Impact of lymph node micrometastasis in patients with pancreatic head cancer // *World J. Surg.* — 2007. — Vol. 31 (3). — P. 483 — 490.

6. Lentz S.E., Muderspach L.I., Felix J.C. et al. Identification of micrometastases in histologically negative lymph nodes of early-stage cervical cancer patients // *Obstet. Gynecol.* — 2004. — Vol. 103 (6). — P. 1204 — 1210.

7. Makino H., Tajiri T., Onda M. et al. Detection of lymph node micrometastasis in esophageal carcinoma // *Hepatogastroenterology.* — 2003. — Vol. 50 (53). — P. 1407 — 1410.

8. Natsugoe S., Mueller J., Stein H.J. et al. Micrometastasis and tumor cell microinvolvement of lymph nodes from esophageal squamous cell carcinoma: frequency, associated tumor characteristics, and impact on prognosis // *Cancer.* — 1998. — Vol. 83 (5). — P. 858 — 866.

9. Noura S., Yamamoto H., Miyake Y. et al. Immunohistochemical assessment of localization and frequency of micrometastases in lymph nodes of colorectal cancer // *Clin. Cancer Res.* — 2002. — Vol. 8 (3). — P. 759 — 767.

10. Tojima Y., Nagino M., Ebata T. et al. Immunohistochemically demonstrated lymph node micrometastasis and prognosis in patients with otherwise node-negative hilar cholangiocarcinoma // *Ann. Surg.* — 2003. — Vol. 237 (2). — P. 201 — 207.

11. Wu Z.Y., Li J.H., Zhan W.H. et al. Effect of lymph node micrometastases on prognosis of gastric carcinoma // *World J. Gastroenterol.* — 2007. Vol. 13 (30). — P. 4122 — 4125.

12. Yasuda K., Adachi Y., Shirajshi N. et al. Prognostic effect of lymph node micrometastasis in patients with histologically node-negative gastric cancer // *Ann. Surg. Oncol.* — 2002. — Vol. 9 (8). — P. 771 — 774.

Поступила 12.04.09.

PROGNOSTIC VALUE OF DETECTION OF LATENT MICROMETASTASIS IN THE LYMPH NODES REGIONAL TO THE CANCER

F.F. Khuzin, D.E. Tsyplakov

Summary

Presented were the results of detection of latent cancer micrometastases in regional lymph nodes (negative in routine staining), and determined was their effect on the five-year survival of cancer patients. The best method to detect micrometastases in regional lymph nodes is a combination of immunohistochemical technique using monoclonal antibodies against pan-cytokeratins and serial tissue sections. The presence of cancer micrometastases in regional lymph nodes is an unfavorable prognostic indicator.

Key words: micrometastases, regional lymph nodes, immunohistochemistry, pan-cytokeratin, cancer, five-year survival.