

УДК 616.36-006.6-033.2-07

ЦИТОКЕРАТИН 20 В ОБНАРУЖЕНИИ МИКРОМЕТАСТАЗОВ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА В ПЕЧЕНИ

О.В. Югина¹, М.О. Воздвиженский¹, С.В. Козлов²,¹Самарский областной клинический онкологический диспансер, ²ГОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет»*Югина Оксана Васильевна – e-mail: o.yugina@mail.ru*

Представлены результаты морфологического и иммуногистохимического исследования метастазов колоректального рака в печени. Проанализированы 9 клиничко-патологических переменных и факторы, влияющие на развитие микрометастазов с оценкой их прогностической значимости. Детекция микрометастазов в печени осуществлялась с использованием антител к цитокератину 20.

Ключевые слова: колоректальный рак, микрометастазы, печень, цитокератин 20, прогноз.

There are given the results of morphological and immunohistochemical examination of metastases of colorectal cancer in liver. There have been analyzed 9 clinico-pathological variables and the factors which affect the development of micrometastases with the assessment of their prognostic meaning. The detection of micrometastases in liver was done with the use of antibodies to cytokeratin 20.

Key words: colorectal cancer, micrometastases, liver, cytokeratin 20, prognosis.

Актуальность

В России число больных раком ободочной и прямой кишки ежегодно увеличивается более чем на 50 тысяч человек [1, 2]. Анализ данных литературы [3, 4, 5, 6] показал эффективность метода иммуногистохимии при обнаружении единичных клеток или кластеров клеток в лимфатических узлах или костном мозге при различных злокачественных опухолях. При анализе данных литературы оказалось, что метастазы колоректального рака (КРР) в печень рецидивируют после резекции в оставшейся

паренхиме [4, 7]. В этой связи была выдвинута гипотеза [8], что иммуногистохимическое окрашивание с использованием цитокератина 20 увеличит возможность обнаружения микрометастазов, что можно будет расценить как важный прогностический фактор в развитии рецидивов [5, 6].

Целью настоящего исследования была проверка вышеизложенной гипотезы с оценкой возможности иммуногистохимического обнаружения микрометастазов КРР в печени и определение их прогностического значения.

Материалы и методы

36 пациентам была выполнена резекция печени по поводу метастазов колоректального рака. Для контрольной группы были отобраны 18 секционных случаев прооперированных пациентов в ГУЗ СОКОД. Во всех наблюдениях смерть наступила в послеоперационном периоде от различных причин. В 7 случаях от разлитого фибринозно-гнойного перитонита, в 6 случаях от тромбоэмболии легочной артерии, в 3 случаях от острой коронарной недостаточности, в 1 случае от острой постгеморрагической анемии, в 1 случае от полиорганной недостаточности.

Из резецированной ткани печени от края самого большого метастаза делались серийные срезы через 1–2 см толщиной 1 см в количестве 5–7 блоков от каждого пациента. Выполнялась рутинная гистологическая обработка биоптатов печени с окраской на гематоксилин-эозин, а также иммуногистохимическое исследование ткани с антителом цитокератин 20, чтобы обнаружить единичные опухолевые клетки или их скопления. Микрометастазы определялись как дискретные микроскопические кластеры злокачественных клеток в ткани печени позитивных на цитокератин 20, как и доминирующий макрометастаз. Для определения корреляции между цитокератин 20 позитивными микрометастазами и 9 клинико-патологическими переменными использовался метод распределения Фишера для малых величин с применением пакета программ SAS 8.1, SPSS 6.2, STATISTICA 6.1.

В контрольной группе исследованию подвергались случайные выборки биоптатов из макроскопически неизменной ткани печени. Из обеих долей вырезались по 5–7 блоков толщиной 1–2 см, выполнялись серийные срезы, проводилась рутинная гистологическая обработка, с последующим иммуногистохимическим окрашиванием на цитокератин-20.

Пациенты

За исследуемый период были выбраны истории 36 пациентов, которые получили комбинированное лечение первичного КРР с резекцией печени. Резекция печени включала удаление всех макроскопически определяемых метастатических узлов. Группу составили 16 женщин и 20 мужчин, средний возраст 56 лет (47–70 лет) на момент выполнения резекции печени. Первичная опухоль локализовалась в толстой кишке у 14 пациентов и прямой кишке у 22 пациентов. Используя стадирование по Dukes, у 12 пациентов была стадия B (I–II), стадия C (III) у 13 пациентов и стадия D (IV) у 11 пациентов. Первичная опухоль была высокодифференцированной темноклеточной аденокарциномой у 24 пациента и умеренно дифференцированной темноклеточной аденокарциномой у 12 пациентов. Всем первично был удален основной опухолевый очаг.

У 11 пациентов уже были синхронные метастазы в печени во время удаления первичной опухоли, тогда как у 25 пациентов были метастазы, реализовавшиеся в сроки от 6 месяцев до 2,8 лет (18 мес.). Удаление метастазов КРР проводилось в виде анатомической резекции печени. В контрольной группе пациенты распределились по полу: мужчин – 12, женщин – 6, средний возраст 67,5 лет (39–84 года). Локализация опухоли в толстой кишке – у 5, в прямой – у 10, в толстой и прямой кишке – у 3. По стадиям пациенты распределились: A (I) – 1 пациент, B (I–II) – 8 пациентов, C (III) – 5 пациентов, D (IV) – 4 пациента (из них у 2 метастазы

ТАБЛИЦА 1.

Корреляция между печеночным микрометастазом и 9 клинико-патологическими переменными для 29 пациентов с положительными на цитокератин-20 метастазами в печень

Переменная	Кол-во пациентов с печеночными микрометастазами (n=22)	Кол-во пациентов без печеночных микрометастазов (n=7)	Значение P
Пол			0,518
-Мужской	13	5	
-Женский	9	2	
Возраст оперированных пациентов			0,445
<=60	10	1	
>60	11	6	
Местоположение первичной опухоли			0,435
-Толстая кишка	8	2	
-Прямая кишка	14	5	
Модифицированная стадия Dukes			0,528
-A or B (I-II)	8	3	
-C (III)	9	-	
-D (IV)	5	4	
Гистопатологическая градация первичной опухоли			>0,999
-Хорошо дифференцируемая	12	7	
-От умеренно к плохо дифференцируемой	10	-	
Время обнаружения печеночных метастазов			0,725
-Синхронный	9	3	
-Метастазный	13	4	
Размер наибольшего печеночного метастаза (см)			0,265
<3	7	7	
>3	15	-	
Число печеночных метастазов			0,035
1	8	7	
>2	14	-	
Распределение печеночных метастазов			0,045
-Билобарное	5	-	
-Монолобарное	17	7	

в легкие, 1 метастаз в печень, 1 метастаз в ректовагинальную перегородку).

Определение печеночных микрометастазов

Микрометастазы в ткань печени выявлялись как окрашенные коричневым цветом дискретные микроскопические кластеры злокачественных клеток (от единичных раковых клеток до скоплений клеток) в пределах печеночной паренхимы или порталных трактов, окружающих доминирующую макроскопическую печеночную опухоль (рис.).

Иммуногистохимическое обнаружение микрометастазов

Из резецированной ткани печени от края самого большого метастаза были сделаны через 1–2 см серийные срезы толщиной 1 см в количестве 5–7 блоков (медиана 4 блока) в каждом случае. Выполнены серийные парафиновые микро-срезы ткани печени толщиной 4 микрона, проведена депарафинизация и дегидратация срезов, затем демаскировка антигенов на водяной бане, выполнена блокировка эндогенной пероксидазы – инкубация дегидратированных срезов 15 минут в 3% растворе перекиси водорода и инкубация с моноклональным антителом цитокератин-20 и хромоген-субстратом (DAB). Все срезы были контрастно докрашены гематоксилином. В контрольной группе микрометастазы в печени определялись по аналогичной методике.

ТАБЛИЦА 2.

Распределение пациентов в контрольной группе

Переменная	Количество пациентов с печеночными макро-микрометастазами (n=1)	Количество пациентов без печеночных макро-микрометастазов (n=17)
Пол		
-Мужской	1	11
-Женский	-	6
Возраст оперированных пациентов		
<=60	1	4
>60	-	13
Местоположение первичной опухоли		
-Толстая кишка	-	5
-Прямая кишка	1	12
Модифицированная стадия Dukes		
-A or B (I-II)	-	10
-C (III)	-	4
-D (IV)	1	3
Гистопатологическая градация первичной опухоли		
-Хорошо дифференцируемая	1	8
-От умеренно к плохо дифференцируемой	-	9

Факторы, влияющие на развитие микрометастазов в печени

Были исследованы 9 клинико-патологических переменных: пол, возраст, местоположение первичной колоректальной опухоли, модифицированная стадия Dukes, гистологический тип первичной опухоли, время обнаружения метастазов КРР в печень, размер самого большого метастаза, число макроскопических метастазов, распределение макроскопических печеночных метастазов.

Результаты исследования

Нормальные гепатоциты и клетки эпителия желчных протоков оказались негативно окрашенными на цитокератин-20 во всех случаях, тогда как метастатические узлы в печени оказались положительными на цитокератин 20 у 29 пациентов (80,5%). У этих 29 пациентов с метастатическими опухолями, положительными на цитокератин 20, микрометастазы в печени были найдены у 22 пациентов (75,9%). Наличие микрометастазов было взаимосвязано с большим числом макрометастазов в печени ($p=0,035$). У пациентов с макрометастазами возникает более высокая вероятность внутрипеченочного рецидива по сравнению с пациентами без макрометастазов.

Наблюдение после удаления метастазов КРР из печени показало внутрипеченочные рецидивы у 16 из 36 пациентов (44,4%) и внепеченочные рецидивы у 20 пациентов (55,6%). В контрольной группе микрометастазы были определены в одном случае стадии D в виде единичных скоплений раковых клеток, позитивных на цитокератин 20 в печеночных синусоидах. В остальных 14 случаях стадий A, B, C в ткани печени были определены дистрофические изменения различной степени выраженности и застойное венозное паренхиматозное полнокровие. Дистрофические процессы были представлены белковой и жировой дистрофией гепатоцитов. Венозное полнокровие проявлялось «мускатной» печенью.

Иммуногистохимическое обнаружение микрометастазов.

Нормальные гепатоциты и внутрипеченочные желчные протоки в резецированных фрагментах были отрицательными при окрашивании на цитокератин 20 во всех случаях. Доминирующие метастазы КРР в печени были положительными у 29 пациента (80,5%) и отрицательными у 7 пациентов (19,5%).

Микрометастазы в печени были обнаружены иммуногистохимическим способом у 22 из этих 29 пациентов (75,9%) с цитокератин 20 позитивными опухолями. Микрометастазы были расположены в пределах печеночных синусоид у 6 пациентов или в пределах портальных трактов у 5 пациентов, или и в пределах печеночных синусоид и в пределах портальных трактов у 11 пациентов (рис.).

Различия между контрольной и исследуемой группой в обнаружении и характере микрометастазов не наблюдались. Во всех случаях наличия позитивных на цитокератин 20 раковых клеток они выглядели как окрашенные коричневым цветом дискретные микроскопические кластеры. В одном контрольном случае с макрометастазом в печени позитивные раковые клетки определялись в окружающей паренхиме и отсутствовали при имеющихся метастазах в легких и ректовагинальную перегородку. Можно предположить возможную предрасположенность к микрометастазированию при наличии макрометастаза в печени.

Корреляция между микрометастазами и другими факторами.

Обсуждение

В последнее время все чаще проводят резекции печени для лечения метастазов КРР. Следовательно, важно определять возможность возникновения внутрипеченочного рецидива у данной категории пациентов. Роль микрометастазов в развитии таких рецидивов весьма существенна. Текущее

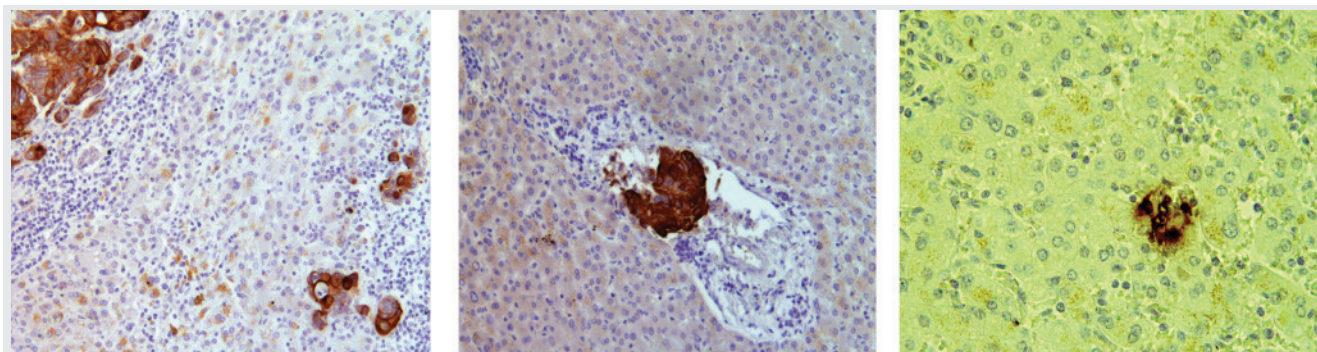


РИС.

Микрометастазы в синусоидах и среди печеночных балок. Иммуногистохимическое окрашивание на цитокератин 20 (x 200, 400).

исследование продемонстрировало, что иммуногистохимический метод позволяет с высокой степенью точности определять микрометастазы и предсказывать повышенный риск внутрипеченочного рецидива после резекции печени.

Цитокератин 20 позитивные клетки находятся в желудочном и кишечном эпителиях, уротелии и клетках Меркеля придатков кожи. Хотя экспрессия цитокератин 20 часто наблюдается в опухолевой ткани КРР, но экспрессия цитокератин 20 отсутствует в нормальных гепатоцитах и эпителии желчных протоков. Результаты нашего исследования подтвердили это наблюдение; большинство метастазов КРР экспрессировали цитокератин 20, в то время как в нормальных гепатоцитах и эпителии желчных протоков отсутствовала экспрессия на цитокератин 20. Высокая специфичность метода иммуногистохимического обнаружения микрометастазов КРР в печени позволила нам легко различать печеночные микрометастазы от нормальной ткани печени. Хотя иногда печеночные микрометастазы могут быть обнаружены при помощи рутинного гистологического исследования с помощью окраски гематоксилином и эозином, но обнаружение единственной раковой клетки или мелких скоплений опухолевых клеток, их дифференцирование от нормальных структур печени часто невозможно. Таким образом, иммуногистохимическое окрашивание намного чувствительнее рутинного метода. Не удивительно, что наличие микрометастазов КРР в печени было связано с большим количеством метастатических очагов, и можно предположить, что микрометастаз — индикатор толерантности ткани печени, который предска-

зывает повышенный риск внутрипеченочного рецидива и более худший длительный прогноз.

Заключение

Резекция печени — метод выбора для лечения пациентов с операбельными метастазами КРР.

Эффективное обнаружение микрометастазов у больных с метастазами КРР в печень возможно.

Наличие внутрипеченочных микрометастазов является важным прогностическим фактором повышенного риска внутрипеченочного рецидива после резекции печени.



ЛИТЕРАТУРА

1. Статистика злокачественных новообразований в России и СНГ в 2007 г. /Под ред. академика РАН и РАМН Давыдова М.И., д. б. н. Аксель Е.М. 2007. С. 18-19.
2. Клинические рекомендации ESMO по диагностике, адъювантной терапии и наблюдению при раке ободочной кишки. 2002. С. 17-18.
3. Ambiru S., Miyazaki M., Isono T. et al. Hepatic resection for colorectal metastases: analysis of prognostic factors. Dis Colon Rectum. 1999. № 42. P. 632-639.
4. Nanko M., Shimada H., Yamaoka H. et al. Micrometastatic colorectal cancer lesions in the liver. Surg. Today. 1998. № 28. P. 707-713.
5. Kell M.R., Winter D.C. et al. Biological behaviour and clinical implications of micrometastases, Br J Surg. 2000. № 87. P. 1629-1639.
6. Moll R., Lowe A., Laufer J., Franke W.W. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. Am J Pathol. 1992. № 140. P. 427-447.
7. Shimonishi T., Miyazaki K., Nakanuma Y. Cytokeratin profile relates to histological subtypes and intrahepatic location of intrahepatic cholangiocarcinoma and primary sites of metastatic adenocarcinoma of liver. Histopathology. 2000. № 37. P. 55-63.
8. Little V.R., Warren R.S., Moore D., Pallavicini M.G. Molecular cytogenetic analysis of cytokeratin 20-labeled cells in primary tumors and bone marrow aspirates from colorectal carcinoma patients. Cancer. 1997. № 79. P. 1664-1670.