

ВОЗМОЖНОСТИ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ЛЕЧЕБНОГО ПАТОМОРФОЗА С ПОМОЩЬЮ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЯМОЙ КИШКИ

Соловьев И.А., Деев Р.В., Литвинов О.А.,
Игнатович И.Г., Абраменков Д.П.

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

УДК: 616.351-006.6-091

Введение

Проблема лечения рака прямой кишки является актуальной, в связи с высокой заболеваемостью и смертностью данной категории больных.

Современные подходы к морфологической диагностике предписывают необходимость применения иммуногистохимического исследования опухоли с целью определения ее иммунофенотипа, гистогенеза, определения факторов прогноза, ответа опухоли на лечебное воздействие и др. Установлено, что рак прямой кишки экспрессирует белки промежуточных филаментов цитоскелета – цитokerатины №№ 8, 18, 19, при этом иммуногистохимические реакции с антителами к цитokerатину № 7 – всегда негативны [2].

Кроме того, возможна коэкспрессия белков филаментов клеток мезенхимального происхождения и нейтральных маркеров (виментин, белок S-100, нейрон специфическая енолаза и др.). Наибольшее распространение получила оценка митотической активности клеток опухоли с помощью белка Ki-67 – ядерного антигена, экспрессирующегося на всех стадиях клеточного цикла, за исключением фазы пролиферативного покоя. Данный антиген играет важную роль в мониторинге ответа опухоли на проводимую терапию [1, 3, 4].

Для изучения лечебного патоморфоза не разработано единых универсальных шкал и, зачастую, в различных лечебных учреждениях используют свои показатели, выработанные для каждого вида опухоли и метода лечения, а их оценка сопряжена с выраженным субъективизмом исследователя.

Цель исследования заключалась в определении степени лечебного патоморфоза при проведении химиолучевой терапии у больных раком прямой кишки с помощью методов иммуногистохимического анализа.

Материалы и методы

Проанализированы результаты обследования и лечения 24 пациентов раком прямой кишки, находившихся на

лечении в клинике общей хирургии Военно-медицинской академии в период с 2006 по 2009 гг. В исследуемую группу вошли 11 (45,8%) женщин и 13 (54,2%) мужчин в возрасте от 41 до 75 лет ($58,9 \pm 11,1$ года). В качестве неoadъювантного комбинированного лечения у 2 больных выполнена эндоваскулярная масляная химиоэмболизация верхней прямокишечной артерии – ЭМХЭВПА (липидол 8-10 мл, оксалиплатин 50–100 мг), у 22 больных выполнялась предоперационная лучевая терапия (СОД 22–25 Гр) в комбинации с ЭМХЭВПА.

При исследовании опухоли определяли признаки патоморфоза – некроз, появление новых морфологических элементов – гигантских уродливых клеток, фиброза, дисконфлексии и дезинтеграции опухолевого пласта и др. Кроме того, учитывали и временные характеристики – для развития указанных изменений необходимо время после воздействия лечебного фактора для выявления морфологического результата лечения. Оценку патоморфоза всегда проводили строго индивидуально для каждого пациента.

В качестве объективного критерия лечебного патоморфоза опухолей применен подсчет количества делящихся раковых клеток. Данный критерий является наиболее информативным не только в связи с тем, что в значительной степени именно митоз является мишенью большого числа химиотерапевтических средств и совершенствования известных методов лечения злокачественных опухолей, но и достоверным морфологическим критерием лечебного патоморфоза и эффективности лечения.

Для подсчета клеток в состоянии митоза использовали упрощенную методику. На общем увеличении $\times 500$ подсчитывали в поле зрения число клеток в любой из фаз кариокинеза. Подсчеты производились для каждого препарата не менее чем в 50 полях зрения, которые выбирались случайным образом. Полученный результат обрабатывался с определением среднего показателя для пациента (до (биоптат) и после операции (удаленная

опухоль)).

Для объективизации данных, полученных при исследовании процессов пролиферации в опухоли, применили метод иммуногистохимического выявления клеток, находящихся в митотическом цикле. Для этого определяли маркер Ki67, являющийся одним из негистоновых белков, экспрессирующихся не только в период кариокинеза, но и в подготовительных и постмитотических фазах, т.е. более достоверно определяющих пролиферативный потенциал опухоли. Так же определяли антитела к цитокератину 5 (клон D5/16 B4, DakoCytomation, Дания); к цитокератину 7 (клон OV-TL 12/30, DakoCytomation, Дания); к цитокератину 19 (клон RCK 108, DakoCytomation, Дания); к виментину (клон V9, DakoCytomation, Дания); S-100 (клон S1/61/69, Novocastra, Великобритания); к нейронспецифической енолазе (клон BBS/NC/VI-H14, DakoCytomation, Дания).

В единичных случаях нами определен иммунофенотип раковых опухолей с использованием широкой панели антител. Мы использовали маркеры как к нейтрально-основным цитокератинам – ЦК 5, 7, так и к кислым – ЦК 14, 18, 19. Кроме того, в панель нами были включены антитела к виментину (маркер клеток мезенхимального происхождения), белку S-100 и нейрон специфической енолазе (маркеры нейроэктодермальных клеток).

Для определения доли клеток, находящихся в митотическом цикле использовали систему компьютерного анализа изображений – VideoTest-4,0 (Россия). При исследовании срезов изготавливали микрофотографии (не менее 10 полей зрения для каждого препарата) на общем увеличении $\times 250$. На основании распознавания цвета и оптической плотности высчитывали процент площади препарата, занятый окрашенными структурами, соответствующими ядрам делящихся клеток. Полученный показатель сопоставляли для каждого пациента до и после операции.

Результаты

Установлено, что аденокарциномы прямой кишки не экспрессируют цитокератины 5, 7, 14, при этом отмечается интенсивная отчетливая выработка цитокератинов 18 и 19. Экспрессия виментина регистрируется только в клетках стромы опухоли, нейроэктодермальные маркеры в опухоли не выявляются, что представляется вполне закономерным.

Реакции ставили методом EnVisionTM/HRP (DakoCytomation, Дания). Для демаскировки антигенов депарфинизированные срезы подвергали высокотемпературной обработке на водяной бане в цитратном буфере (pH=6,0) (98°C, 25 мин.). Далее срезы инкубировали с первичными антителами Ki-67 (клон MIB-1, DakoCytomation, Дания). Для визуализации продукта иммуногистохимической реакции использовали диаминобензидин DAB-kit (DakoCytomation, Дания). Результат положительной реакции: темно-коричневое ядерное окрашивание (рис. 1).

С целью демонстрации представляем клинические наблюдения

Больной Л., 62 г., предварительный диагноз – рак ниже-среднеампулярного отделов прямой кишки T3Nx+M0 (умеренно-дифференцированная аденокарцинома). В связи с анемией тяжелой степени тяжести, выраженной слабостью и истощением больного неoadъювантная лучевая терапия не проводилась. Выполнена эндоваскулярная масляная химиоэмболизация верхней прямокишечной артерии – липиодол 8 мл, оксалиплатин 100 мг, за 72 часа до операции (брюшно-промежностная экстирпация прямой кишки), перенес удовлетворительно. Послеоперационный период протекал без осложнений. Окончательный диагноз – рак ниже-среднеампулярного отделов прямой кишки T3N2M0. В адъювантном режиме проведено 6 курсов системной химиотерапии по схеме Folfox. Больной жив по настоящее время (28 месяцев после операции) без прогрессирования онкологического процесса.

При гистологическом исследовании опухоль представлена умереннодифференцированной аденокарциномой, состоящей из высоких умеренно окрашенных трансформированных эпителиоцитов, с признаками клеточного и ядерного полиморфизма, с большим количеством митозов (рис. 2).

На момент операции опухоль претерпела существенные изменения (рис. 3). В препарате имеются разобщенные псевдоацинарные структуры, образованные гиперхромными, дисконплектированными клетками. В просветах большое количество клеточного детрита массивно инфильтрированного сегментоядерными лейкоцитами и лимфоцитами.

Установлена III степень химического патоморфоза. При оценке митотической активности установлено, что до начала лечения среднее количество митозов в поле зрения составляло $6,1 \pm 2,9$, перед операцией – $1,5 \pm 0,8$. Таким образом, в ходе предоперационного лечения пролиферативная активность опухоли снизилась на 75%. Иммуногистохимическое исследование также подтверждает выявленные закономерности: до лечения процент площади маркированных структур составил 18 ± 2 , после операции $12,8 \pm 1,5$ (рис. 4, 5).

Больная М., 69 л., предварительный диагноз – рак среднеампулярного отдела прямой кишки T3NX+M0 (умеренно-дифференцированная аденокарцинома). Проведен курс неoadъювантной лучевой терапии (СОД 25 Гр) и выполнена ЭМХЭВПА за 72 часа до операции (брюшно-анальная резекция прямой кишки с низведением сигмовидной), перенесла удовлетворительно. Окончательный диагноз – рак среднеампулярного отдела прямой кишки T3N1M0. Послеоперационный период протекал без осложнений. Адъювантное лечение не проводилось (больная отказалась). Больная жива по настоящее время (36 месяцев после операции) без прогрессирования онкологического процесса. При гистологическом исследовании опухоль представлена фиброзированными

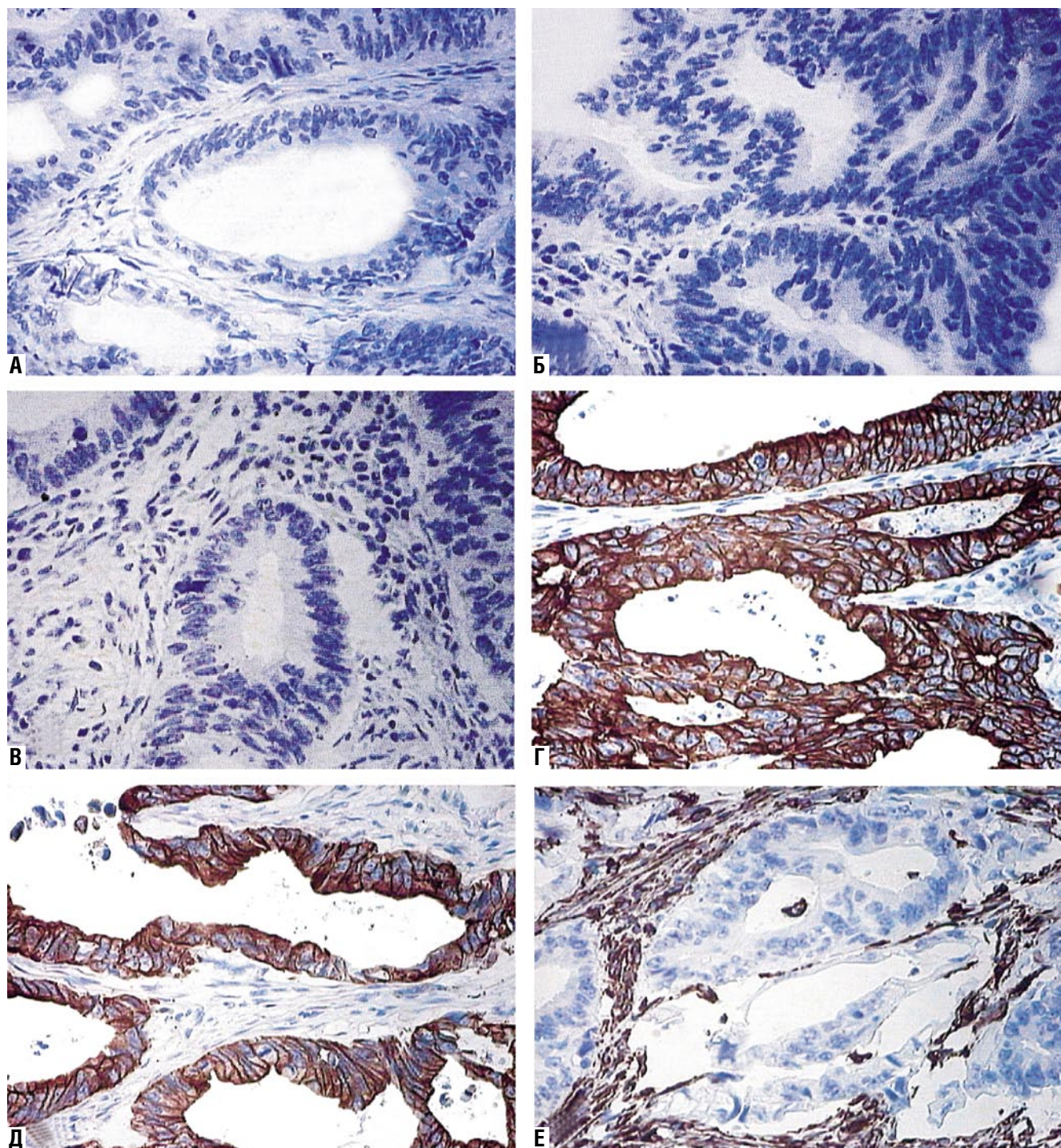


Рис. 1. Иммунофенотип аденокарциномы прямой кишки. Результаты иммуногистохимического окрашивания на: А – ЦК 5; Б – ЦК 7; В – ЦК 14; Г – ЦК 18; Д – ЦК 19; Е – виментин. А–В – реакция отрицательная; Г, Д – положительное цитоплазматическое окрашивание опухолевых эпителиоцитов; Е – положительное окрашивание клеток стромы опухоли, опухолевые эпителиоциты не содержат виментина. Докраска: гематоксилин; $\times 250$

псевдоацинарными структурами, основной объем которых состоит из разреженных, десквамированных опухолевых клеток (рис. 6), установлена III степень лечебного патоморфоза.

При оценке митотической активности установлено, что до начала лечебного воздействия среднее количество

митозов в поле зрения составляло $0,96 \pm 0,2$, перед операцией – $0,2 \pm 0,2$, таким образом, в ходе предоперационного лечения пролиферативная активность опухоли снизилась на 79%.

Больной А., 76 л., предварительный диагноз – рак среднеампулярного отдела прямой кишки T2NX+M0

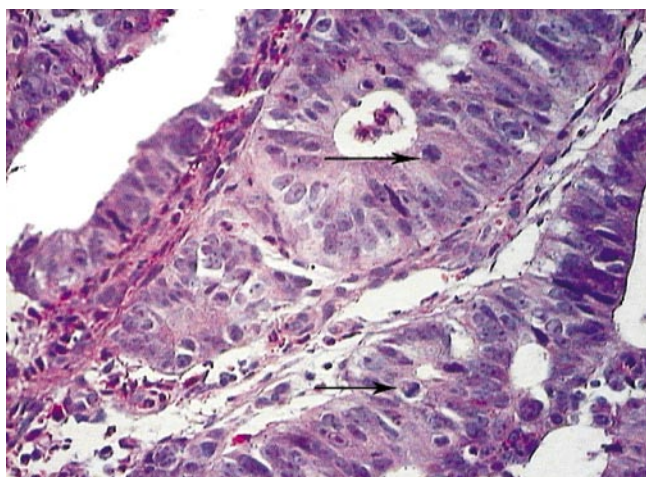


Рис. 2. Умереннодифференцированная аденокарцинома. Митозы указаны стрелкой. Окраска: гематоксилин и эозин; $\times 250$

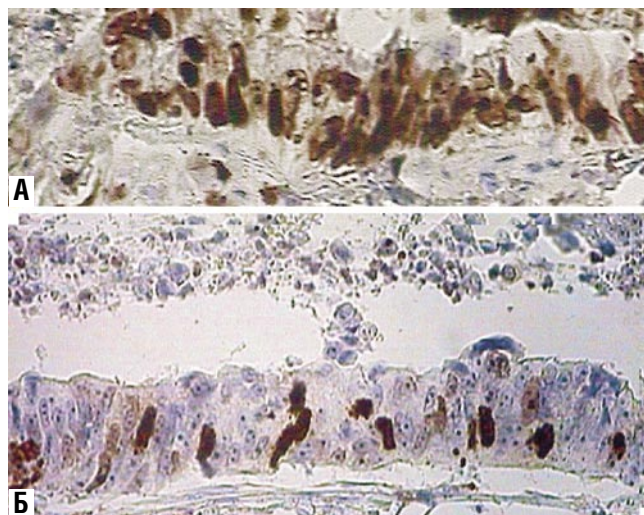


Рис. 4. ИГХ-реакция на Ki67 трансформированных эпителиоцитах до лечения (А) и после лечения (Б). Продукт ИГХ-реакции окрашен диаминобензидином (коричневый цвет), докраска гематоксилином; $\times 400$

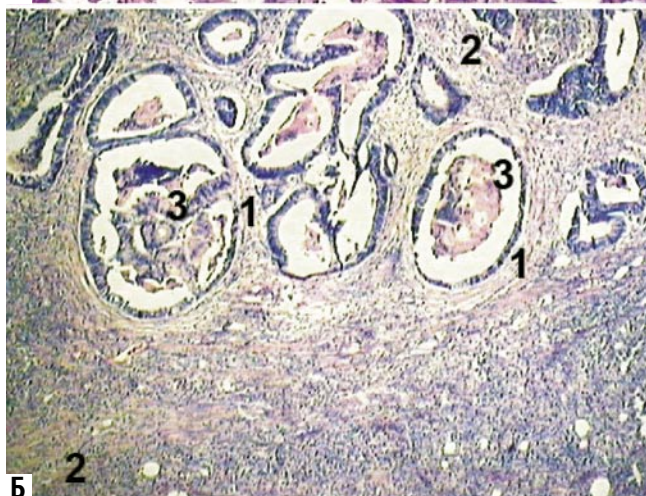
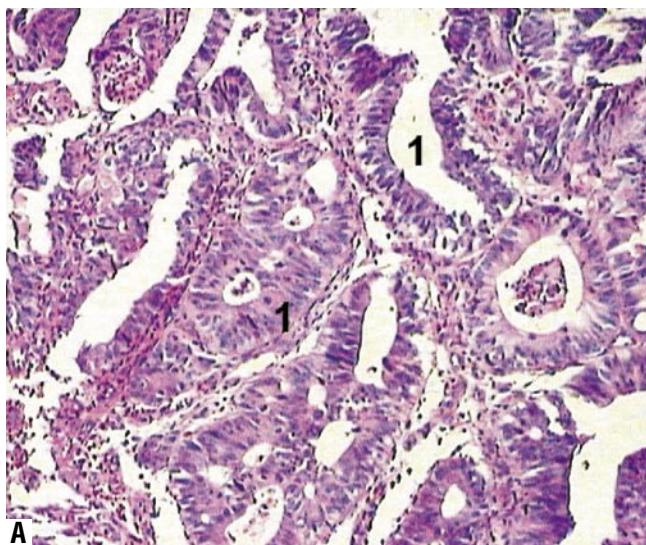


Рис. 3. Строение опухоли до лечения (А) и перед операцией (Б): 1 – псевдо-ацинарные структуры; 2 – поля плотной волокнистой соединительной ткани; 3 – клеточный детрит. Окраска: гематоксилин и эозин; А – $\times 100$, Б – $\times 32$.

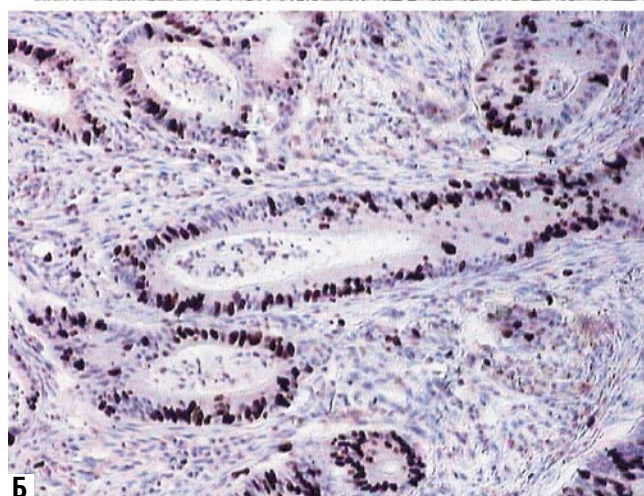
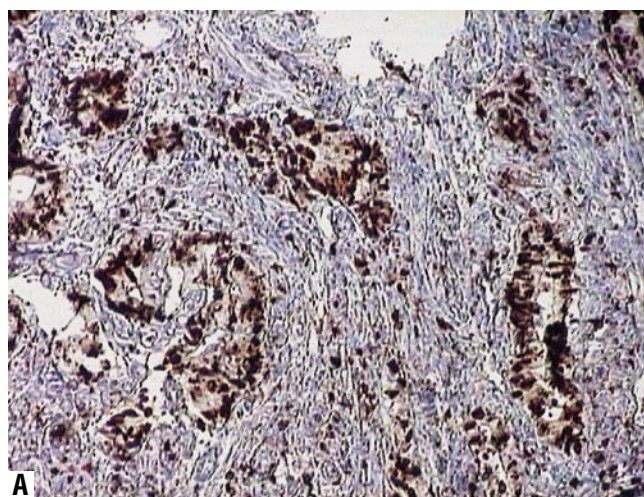


Рис. 5. ИГХ-реакция на Ki67 в тканях опухоли до лечения (А) и после лечения (Б). Продукт ИГХ-реакции окрашен диаминобензидином (коричневый цвет), докраска гематоксилином; $\times 100$

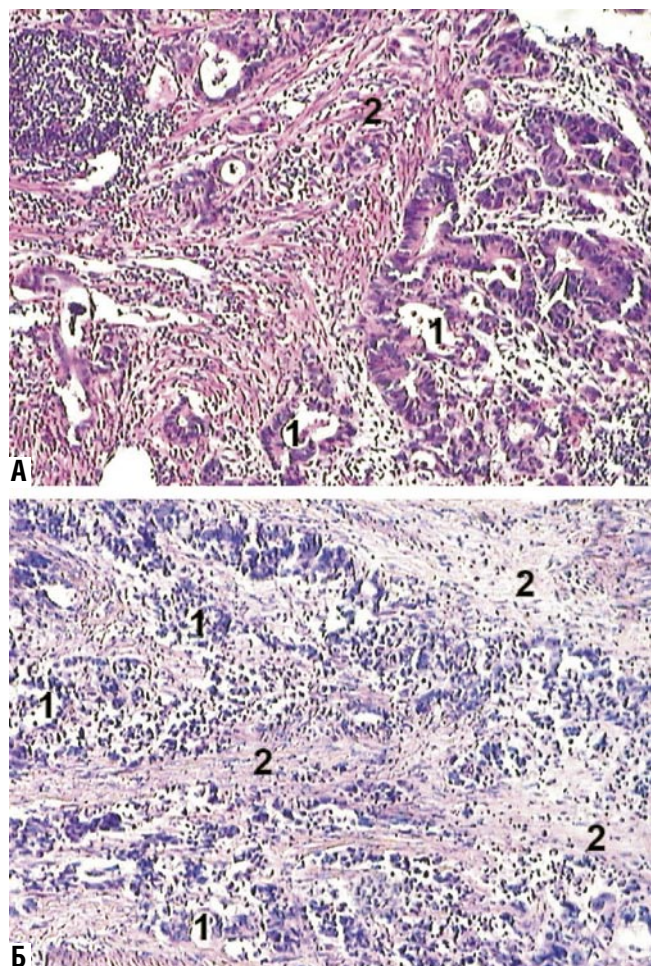


Рис. 6. Умереннодифференцированная аденокарцинома до лечения (А) и перед операцией (Б): 1 – псевдоацинарные структуры; 2 – соединительная ткань в составе стромы опухоли. Окраска: гематоксилин и эозин; $\times 100$

(высоко-дифференцированная аденокарцинома). Проведен курс неoadъювантной лучевой терапии (СОД 22 Гр) и выполнена ЭМХЭВПА за 72 часа до операции, перенес удовлетворительно. Выполнена брюшно-анальная резекция прямой кишки с низведением сигмовидной. Окончательный диагноз – рак среднеампулярного отдела прямой кишки T2N0M0. Послеоперационный период протекал без осложнений. Адъювантное лечение не проводилось. Жив по настоящее время (20 месяцев после операции) без прогрессирования онкологического процесса.

При гистологическом исследовании определяется аденокарцинома с большим количеством митозов (рис. 7). Для клеток характерны все признаки клеточного атипизма, формирование многослойных пластов в псевдоацинарных структурах.

После лечения отмечаются признаки лечебного полиморфизма: уменьшение опухоли в размерах, некроз и мутиляция некоторых структур (рис. 8), частичная деструкция опухоли, некроз эпителия, его дисконплексация, десквамация, выраженный фиброз стромы

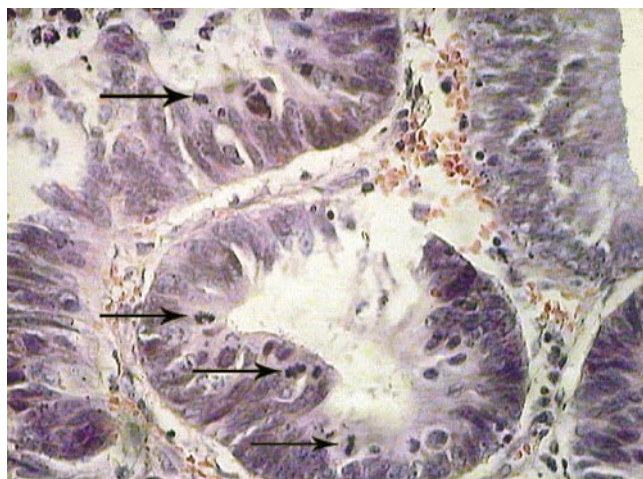


Рис. 7. Множественные митозы ракового эпителия в псевдоацинарных структурах опухоли (указаны стрелкой). Окраска: гематоксилин и эозин; $\times 400$

(рис. 9). Следует отметить, что данные изменения носят мозаичный характер и, наряду с поврежденными участками, встречаются жизнеспособные структуры. При исследовании пролиферативной активности установлено, что наибольшее количество пролиферирующих клеток находится в глубоких отделах опухоли, в то время, как на вершинах папиллярных выростов преобладают процессы деструкции и десквамации.

В целом, на фоне лечения достигнута существенная редукция опухолевого роста: по количеству кариокинезов в поле зрения – 63% ($4,1 \pm 2,3$ – на момент биопсии и $1,5 \pm 0,9$ – при исследовании операционного материала). При иммуногистохимическом определении делящихся клеток отмечено 50% снижение пролиферации ($24,5 \pm 3,1$ – до начала лечения и $12,3 \pm 6,4$ – на момент операции). Ki-67-положительные клетки выявляются, преимущественно, в виде одиночных эпителиоцитов, в участках массивированного фиброза – в большем количестве, включая клетки центральных зон многослойных пластов и десквамированные массивы. По совокупности морфологических данных данную степень патоморфоза можно определить как III.

У больной В., 78 лет, с диагнозом – рак среднеампулярного отдела прямой кишки T3N1M0 выполнена ЭМХЭВПА в неoadъювантном режиме. При микроскопии отмечается десквамация в большей доле псевдоацинарных структур, полнокровие опухолевых сосудов, геморрагическое пропитывание стромы опухоли, лимфоцитарная инфильтрация (рис. 10). Клеточный детрит в просветах псевдоацинарных структур богат эозинофильными гранулоцитами. Кроме того, обнаруживаются единичные гигантские многоядерные «раковые монстры» (рис. 11), содержащие элементы слизи.

В сохранившемся опухолевом эпителии обнаруживаются внутриэпителиальные опухолевые пролифераты,

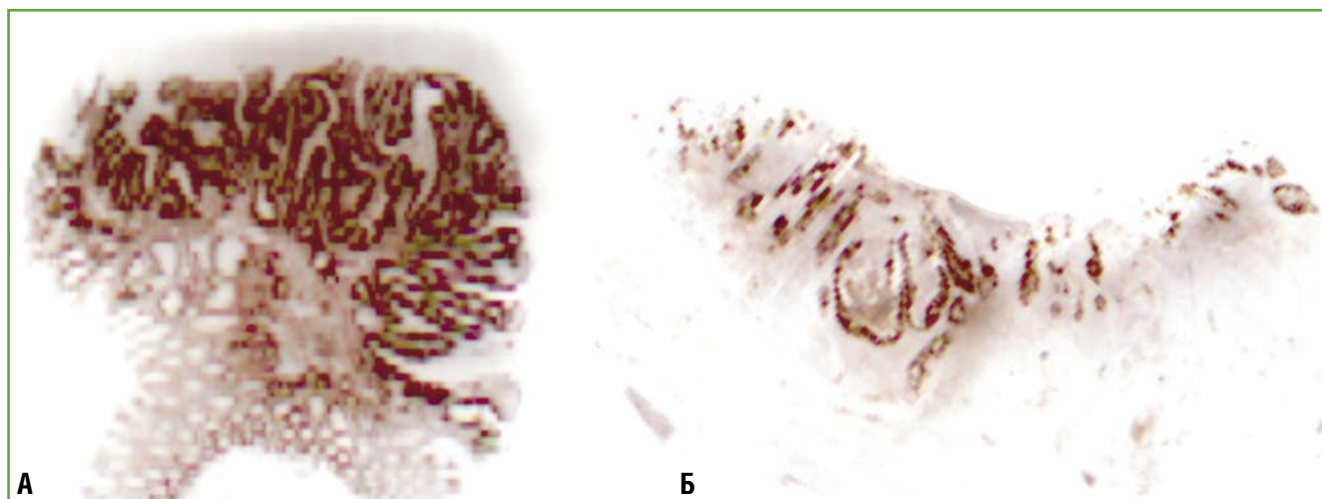


Рис. 8. Пroliferативная активность опухолевых эпителиоцитов: до лечения (А) и перед операцией (Б). Продукт ИГХ-реакции окрашен диаминобензидином (коричневый цвет); $\times 10$

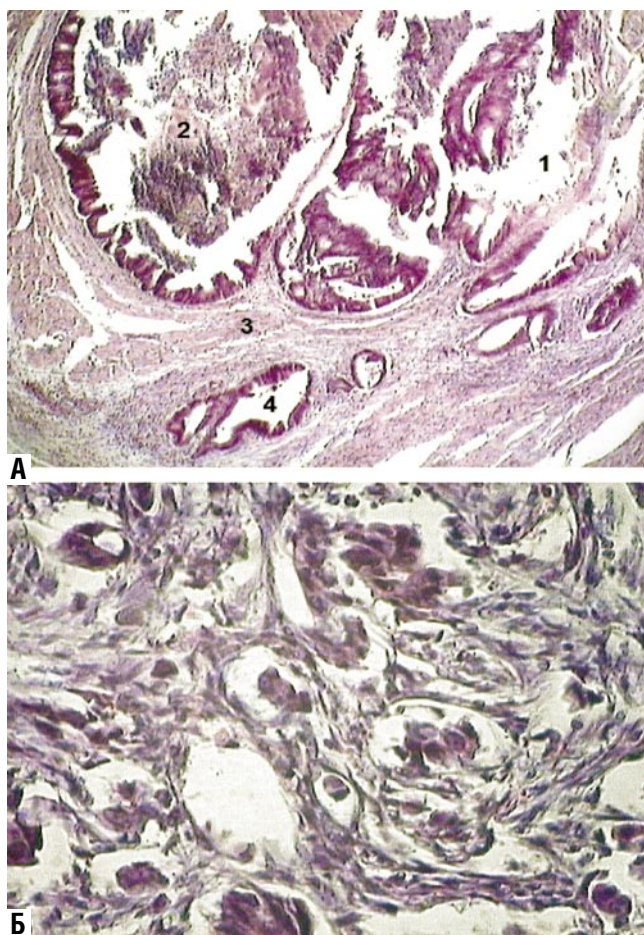


Рис. 9. Лечебный патоморфоз опухоли: А. 1 – опухолевые структуры в состоянии деструкции и десквамации эпителия; 2 – инфильтрированный различными лейкоцитами клеточный детрит в просвете расширенной псевдоацинарной структуры опухоли; 3 – фиброзная ткань; 4 – жизнеспособные структуры опухоли; Б. десквамация опухолевого эпителия и начало фиброизирования стромы. Окраска: гематоксиллин и эозина; А $\times 32$, Б $\times 250$.

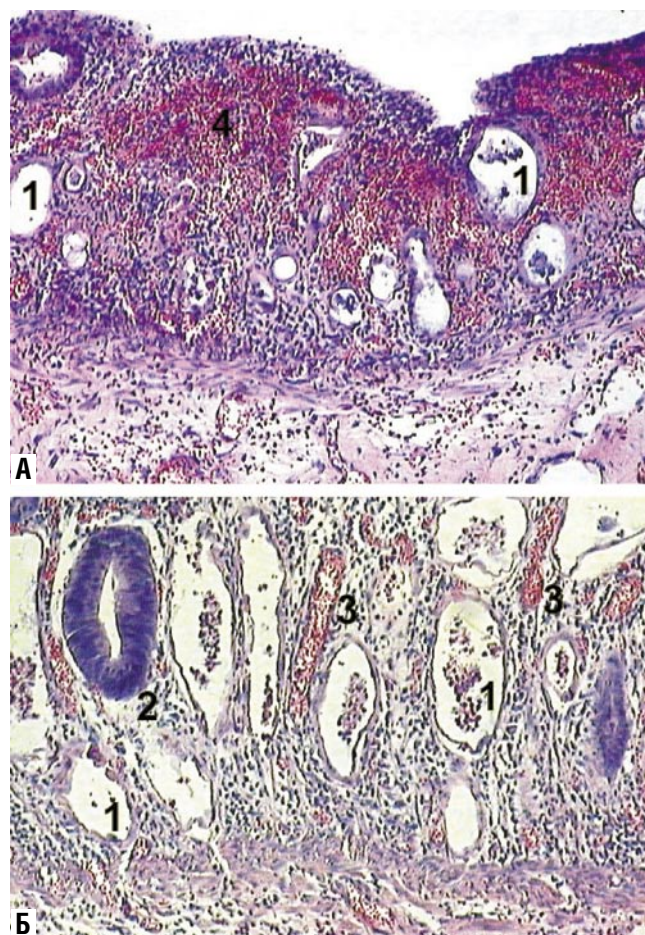


Рис. 10. Патоморфоз опухоли: 1 – псевдоацинарные структуры с десквамированным раковым эпителием; 2 – псевдоацинарные структуры с сохраненным злокачественным эпителием; 3 – полнокровные кровеносные сосуды опухоли; 4 – геморрагическое пропитывание и лимфоцитарная инфильтрация опухоли. Окраска: гематоксиллин и эозин; А. $\times 32$, Б. $\times 100$.

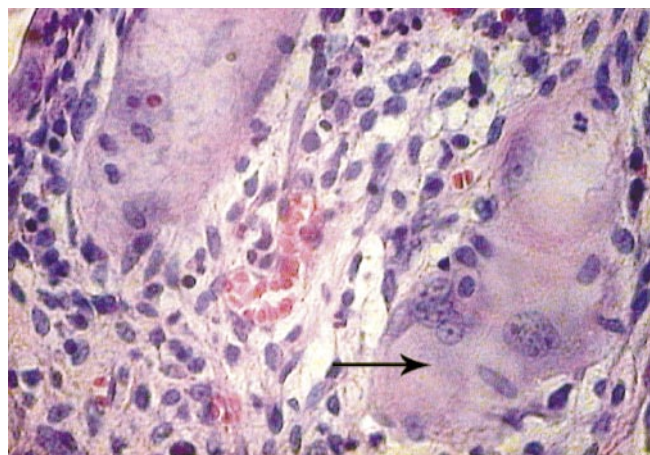


Рис. 11. Гигантская многоядерная клетка, нагруженная слизью (указано стрелкой). Окраска: гематоксилин и эозин; $\times 400$

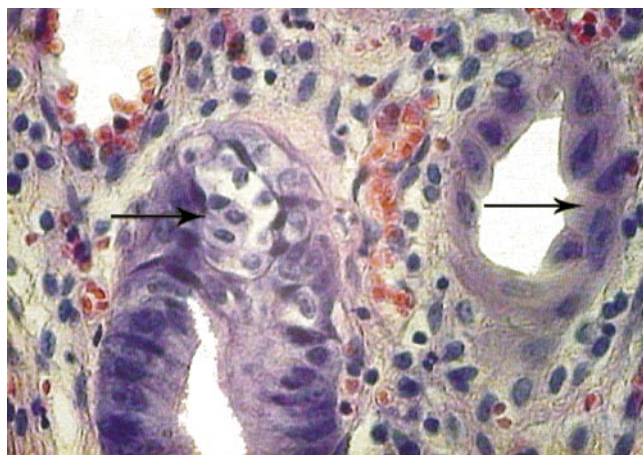


Рис. 12. Внутриэпителиальные пролифераты злокачественных клеток (указано стрелками) в сохранивших жизнеспособность опухолевых структурах. Окраска: гематоксилин и эозин; $\times 400$

что свидетельствует о сохранении опухолью потенций к росту (рис. 12). При этом среднее количество митозов в поле зрения до начала лечения составило $1,5 \pm 0,4$, в ходе комбинированного лечения – по результатам исследования операционного материала $0,8 \pm 0,4$, т.е. митотическая активность опухоли, определяемая по числу кариокинезов, снизилась почти в два раза.

Иммуногистохимическое исследование подтвердило ранее сделанные находки. Так, пролиферирующий эпителий регистрировался только в псевдоацинарных структурах с сохранившимися эпителиоцитами, при этом число клеток, вышедших из G0 периода и не погибших в результате лечения, было невелико (рис. 13). Подсчет удельного объема меченных ядер в биоптате показал умеренную пролиферацию опухоли – $9,2\% \pm 1,4$. В ходе лечения данный показатель снизился на треть и составил $6,4\% \pm 2$. В целом, в данном случае картина патоморфоза соответствует II/ III степени, со склонностью к III.

При проведении морфометрического анализа изменения митотической активности опухолевых клеток под воздействием комбинированного неoadъювантного лечения выявлено, что у всех исследованных пациентов пролиферация снижалась. Вместе с тем, выраженность лечебного патоморфоза была различной.

Требуют отдельного дальнейшего обсуждения данные, полученные с помощью иммуногистохимического метода выявления пролиферативной активности, особенно в части, касающейся отличий «дельты» до и после лечения в сопоставлении с данными обычного определения митотической активности. Дело в том, что в соответствии с традиционной методикой определяются не собственно митоз, а только кариокинез. При этом остальные его фазы остаются вне детекции. Этого недостатка лишен метод ИГХ определения негистонового белка Ki-67, экспрессирующегося в течение всего митоза. Исследование этого маркера позволяет определить «скрытый» пролиферативный потенциал конкретной опухоли, и, кроме того – судить о прогнозе, последний обратно пропорционален

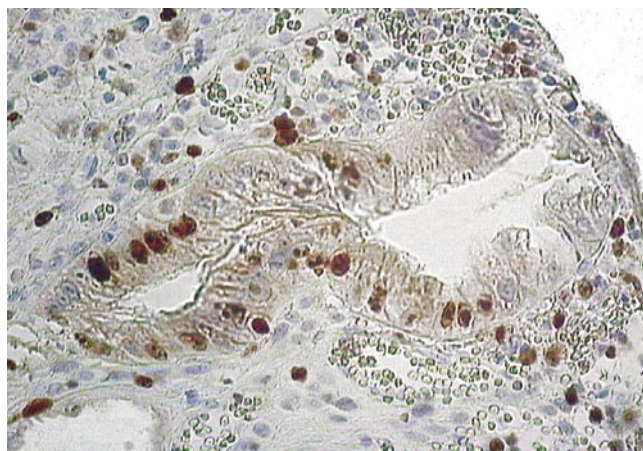


Рис. 13. ИГХ-реакция на Ki67 в тканях опухоли после ЭМХЭВПА: низкая пролиферативная активность сохранившихся злокачественных эпителиоцитов. Продукт ИГХ-реакции окрашен диаминбензидином (коричневый цвет), докраска гематоксилином; $\times 400$

величине экспрессии Ki-67.

Литература

1. Патоморфологическая диагностика опухолей человека: Руководство в 2 томах. Т. 1 / Под ред. Н.А. Краевского, А.В. Смольяникова, Д.С. Саркисова. – 4-е изд. – М.Ж Медицина, 1993. – 560 с.
2. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / Под ред. С.В. Петрова, Н.Т. Райхлина. Изд-е 2-е, перераб. и доп. Казань, 2000. – 288 с.
3. Brown D.C., Gatter K.C. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. 1990. – № 17. – P. 489–503.
4. Locker A.P., Birrell K., Bell J.A. et al. Ki-67 immunoreactivity in bre-t carcinoma: relationships to prognostic variables and short term survival. Fur. J. Surgical Oncology. 1992. – №18. – 224–229.

Контактная информация