

ВЫЯВЛЕНИЕ МИКРОМЕТАСТАЗОВ В КОСТНОМ МОЗГЕ И ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ИММУНОМАГНИТНОЙ СЕПАРАЦИИ

**И.С. Стилиди¹, О.В. Лебединская², И.Ж. Шубина¹, А.В. Пирогов¹,
Б.Е. Полоцкий¹, Ф.В. Доненко¹, М.В. Киселевский¹**

*ГУ «Российский научный онкологический центр им. Н.Н. Блохина РАМН»,
лаборатория клеточного иммунитета, г. Москва¹
ГОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия
им. Е.А. Вагнера Росздрава РФ», кафедра гистологии²*

Исследована возможность выявления микрометастазов в костном мозге и лимфатических узлах больных раком лёгкого и пищевода методом магнитной сепарации с магнитными шариками, покрытыми антителами к цитокератинам. Выявлено, что данный метод позволяет получить обогащенную фракцию цитокератин-положительных клеток и может быть использован для целей интраоперационной диагностики микрометастазов. Однако при цитологическом исследовании не все выделенные клетки с фиксированными на их мембране магнитными шариками могут однозначно квалифицироваться как опухолевые. Для более точной верификации микрометастазов в костном мозге и лимфатических узлах онкологических больных необходимо дополнительное стандартное окрашивание и цитологический анализ клеток, выделенных методом положительной магнитной селекции.

Ключевые слова: рак легкого, рак пищевода, микрометастазы, магнитная селекция.

DETECTION OF MICROMETASTASES IN BONE MARROW AND LYMPH NODES OF CANCER PATIENTS USING THE METHOD OF IMMUNOMAGNETIC SEPARATION

I.S. Stilidi¹, O.V. Lebedinskaya², I.Zh. Shubina¹, A.V. Pirogov¹, B.E. Polotsky¹, F.V. Donenko¹, M.V. Kiselevsky¹
*Cell Immunity Laboratory, N.N. Blokhin Russian Research Center, RAMS, Moscow¹
Department of Gystology, E.A. Vagner State Medical Academy, Perm²*

The purpose of the study was to detect micro-metastases in bone marrow and lymph nodes of lung and esophagus cancer patients using the method of magnetic separation with magnetic balls covered with antibodies to cytokeratins. The method has been found to allow the enriched fraction of cytokine-positive cells to be obtained and it can be used for intraoperative diagnosis of micro-metastases. However, cytological examination shows that not all detected cells with magnetic balls fixed on their membranes can be verified as tumor cells. To verify more exactly micro-metastases in bone marrow and lymph nodes of cancer patients, it is necessary to conduct the additional standard staining and cytological analysis of cells detected by the method of positive magnetic selection.

Key words: lung cancer, esophagus cancer, micrometastases, magnetic selection.

Современные хирургические методы позволяют существенно повысить эффективность лечения рака пищевода и немелкоклеточного рака лёгкого. Вместе с тем у значительного количества пациентов, несмотря на оптимальное хирургическое вмешательство, неоадьювантную и адьювантную химиотерапию, в течение двух лет наблюдаются рецидивы заболевания [1, 2, 3]. Неблагоприятным прогностическим признаком на этапе предварительной диагностики является выявление метастазов в лимфатических узлах. Однако даже в случае отрицательного гистологического анализа на наличие метастазов в лимфатических узлах почти у 50 % больных с I стадией немелкоклеточ-

ного рака легкого и рака пищевода развивается рецидив заболевания. Эти факты указывают на то, что у больных могут быть скрытые микрометастазы, которые не определяются традиционными методами до- и интраоперационной диагностики. Таким образом, системное распространение процесса может происходить уже на ранних стадиях рака легкого и пищевода [17–19].

За последние 15 лет проблема выявления микрометастазов в лимфатических узлах и костном мозге стала широким полем для исследования [4–23]. Ряд сообщений свидетельствует об эффективности различных способов обнаружения микрометастазов.

Например, показано, что иммуногистохимический и иммуноцитохимический анализы эпителиальных цитокератиновых протеинов (ЦК) являются эффективными методами выявления микрометастазов в лимфатических узлах и костном мозге [7, 10, 16, 24]. Однако методы иммуногистохимического и иммуноцитохимического анализов требуют большого количества времени и трудоёмки. Кроме того, они могут давать ложно-положительные результаты [4, 5].

В последние годы разработан метод иммуномагнитной сепарации для быстрого выделения опухолевых клеток из периферической крови и костного мозга. Результаты исследования показывают его эффективность у пациентов с остеосаркомой, злокачественной меланомой, раком молочной железы, колоректальным раком и др. [12, 22]. Данный метод приобретает большое практическое значение для интраоперационной диагностики микрометастазов с целью уточнения стадии заболевания и объёма хирургического вмешательства.

Целью нашего исследования является оценка возможности применения метода иммуномагнитной сепарации для интраоперационной диагностики микрометастазов в лимфатических узлах и костном мозге у больных немелкоклеточным раком легких и раком пищевода.

Материал и методы

Пробы для исследования были взяты у 25 пациентов в возрасте от 40 до 65 лет. Больным проводили хирургическое лечение по поводу немелкоклеточного рака легких и рака пищевода II–III стадии. По гистологическому типу опухоли относились к плоскоклеточному раку и аденокарциноме. Резецированный на этапе торакотомии сегмент ребра и удалённые в процессе операции регионарные лимфатические узлы использовали для анализа на микрометастазы.

Подготовка костного мозга и лимфатического узла

Удаленный сегмент ребра и лимфатический узел забирали непосредственно из операционной в лабораторию. Клетки костного мозга с помощью многократного промывания элюировали в среду RPMI 1640 (ICN, США). Из лимфатических узлов получали клеточную взвесь посредством механического измельчения. Из взвеси клеток костного мозга и лимфати-

ческого узла выделяли моноклеарные клетки (МНК) центрифугированием в Ficoll-Hypaque (Histopaque, Sigma, США) стандартной плотности.

Иммуномагнитная сепарация

Выделение цитокератин-положительных (ЦК+) клеток из МНК костного мозга и лимфатических узлов проводили посредством положительной селекции клеток с использованием набора для магнитной сепарации опухолевых клеток (MACS Cytokeratin Microbeads Carcinoma Cell Enrichment Kit, Miltenvi Biotec, Германия). МНК инкубировали с магнитными шариками, покрытыми моноклональными антителами к цитокератину 7/8. Процедуру иммуномагнитного разделения проводили в соответствии с протоколом, предусмотренным производителем.

Обогащённую взвесь ЦК-положительных клеток помещали на покрытые полилизинем стёкла и высушивали. Образцы, включавшие две и более клеток с шариками, прикрепленными в форме розетки, считались положительными. Для морфологической идентификации мазки окрашивали гематоксилином-эозином. Микроскопическую оценку и фотографирование производили с помощью микроскопа Zeiss Axioplan (Carl Zeiss, Jenna, Германия).

Флуоресцентная цитометрия

Обогащённую суспензию отобранных ЦК+ клеток окрашивали FITC-мечеными моноклональными антителами CD45 с соответствующим изотипическим контролем IgG1 (Caltag Laboratories, США). Цитологические пробы анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axioplan 2 (Zeiss, Германия).

Цитологическое исследование

Клетки обогащённой суспензии наносили на стёкла, покрытые полилизинем, и окрашивали гематоксилином-эозином (Gimsa-Solution Standard, Fluka Chemie, Швейцария). Микроскопическое исследование проводили с помощью микроскопа Zeiss Axioplan 2 (Zeiss, Германия).

Результаты исследования

В результате проведения магнитной сепарации образцов костного мозга, взятых у 25 онкологических больных раком пищевода и лёгких, в 15 из них обнаружены от 2 до 15 клеток, окруженных мечеными антителами к цитокератинам магнитными шариками

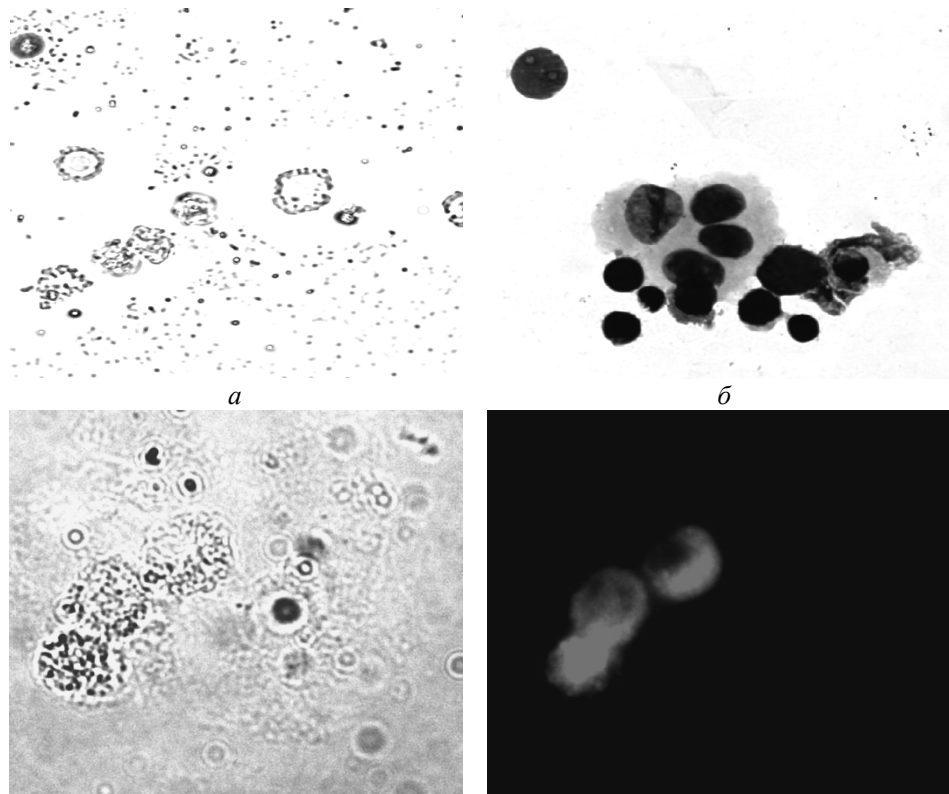


Рис. 1. Цитокератин-позитивные клетки, изолированные методом положительной магнитной селекции из костного мозга онкологических больных:
а (ок. 10, об. 40), *в* (ок. 10, об. 90) – клетки, образующие розетки с магнитными шариками, мечеными антителами к цитокератинам, на неокрашенном препарате; *б* – клетки цитокератин-положительной пробы, окрашенные азуром II-эозином (ок. 10, об. 90); *г* – CD45+ клетки цитокератин-положительной пробы, окрашенные фикоэритрин-мечеными антителами (ок. 10, об. 90)

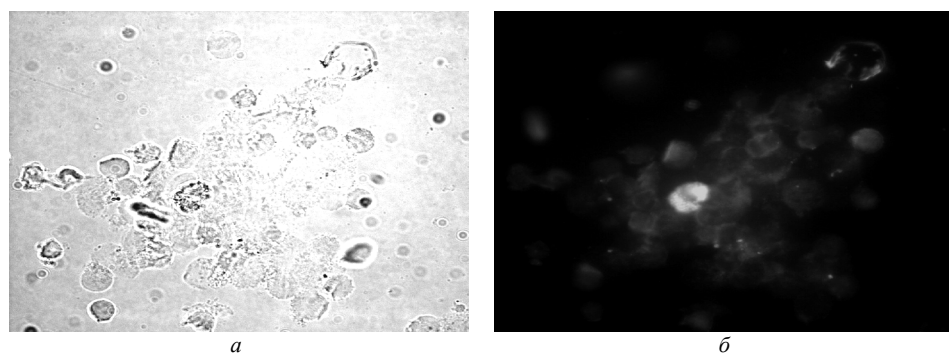


Рис. 2. Цитокератин-отрицательные клетки, изолированные методом отрицательной магнитной селекции из костного мозга онкологических больных:
а – клетки, свободные от магнитных шариков, меченных антителами к цитокератинам, на неокрашенном препарате (ок. 10, об. 40); *б* – CD45+ клетки цитокератин-отрицательной пробы, окрашенные фикоэритрин-мечеными антителами (ок. 10, об. 40)

в виде розеток (рис. 1а). Во всех образцах костного мозга с выявленными при иммуноцитохимическом окрашивании ЦК+ клетками также были идентифицированы клеточные комплексы с магнитными шариками. В позитивных образцах при окрашивании гематоксилином-эозином выявлялись крупные клетки с ядрами округлой или овальной формы, которые, однако, при цитологическом анализе не могли быть квалифицированы как опухолевые (рис. 1б). Иммунофлуоресцентное исследование клеток с фиксированными на мембране магнитными шариками пока-

зало, что они экспрессируют маркер гемопоэтических клеток – CD45 (рис. 1в, г) так же, как и ЦК-негативные мононуклеарные лейкоциты костного мозга (рис. 2а, б).

В образцах пораженных метастазами лимфатических узлов обнаружено большое количество окруженных магнитными шариками клеток, которые при последующем стандартном цитологическом исследовании квалифицированы как опухолевые (рис. 3а, б). У 4 пациентов в морфологически интактных лимфатических узлах обнаружены единичные ЦК-позитив-

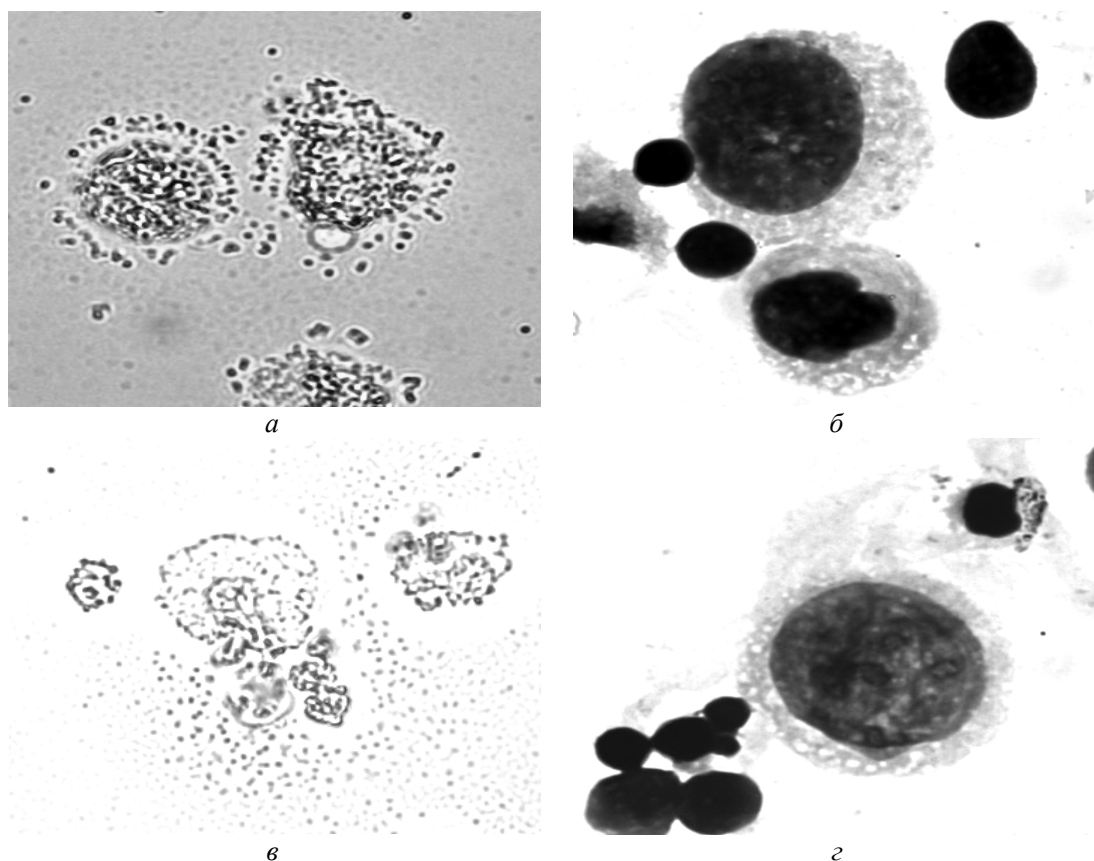


Рис. 3. Цитокератин-позитивные клетки, изолированные методом положительной магнитной сепарации из метастатических и интактных лимфатических узлов онкологических больных:

а – клетки метастатического узла, образующие розетки с магнитными шариками, меченными антителами к цитокератинам, на неокрашенном препарате (ок. 10, об. 90); б – клетки цитокератин-положительной пробы метастатического узла, окрашенные азуром II-эозином (ок. 10, об. 90); в – клетки интактного узла, образующие розетки с магнитными шариками, меченными антителами к цитокератинам, на неокрашенном препарате (ок. 10, об. 90); г – клетки цитокератин-положительной пробы интактного узла, окрашенные азуром II-эозином (ок. 10, об. 90)

ные клетки, которые при окрашивании гематоксилин-эозином также были расценены как опухолевые (рис. 3в, г).

Таким образом, метод магнитной сепарации позволяет получить обогащенную фракцию цитокератин-положительных клеток и может быть использован для целей интраоперационной диагностики микрометастазов. Однако наличие в препаратах клеток с фиксированными на их мембране магнитными шариками, покрытыми антителами к цитокератинам, не дает оснований однозначно квалифицировать выделенные клетки как опухолевые. Для более точной верификации микрометастазов в костном мозге и лимфатических узлах онкологических больных необходимо дополнительное стандартное окрашивание клеток с последующим цитологическим исследованием.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аксель Е.М., Давыдов М.И., Ушакова Т.И. Статистика рака лёгкого, желудка и пищевода: состояние онкологической помощи, заболеваемость и смертность // Вестник РАМН. 2001. № 9. С. 61–65.
2. Давыдов М.И., Волков С.М., Полоцкий Б.Е. Состояние и перспективы хирургического лечения больных немелкоклеточным раком лёгкого // Онкология и радиология Казахстана. 2005. № 2. С. 71–78.
3. Тюляндин С.А. Немелкоклеточный рак лёгкого в 2004 г. // Практическая онкология. 2005. № 1. С. 43–49.
4. Borgen E., Beiske K., Trachsel S. et al. Immunocytochemical detection of isolated epithelial cells in bone marrow: non-specific staining and contribution by plasma cells directly reactive to alkaline phosphatase // J. Pathol. 1998. Vol. 185. P. 427–434.
5. Borgen E., Naume B., Nesland J.M. et al. Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood. I. Establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells // Cytotherapy. 1999. Vol. 1. P. 377–388.
6. Braun S., Pantel K., Mailer P. et al. Cytekeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer // Engl. J. Med. 2000. Vol. 342. P. 525–533.
7. Celebioglu F., Sylvan M., Perbeck L. et al. Intraoperative sentinel lymph node examination by frozen section, immunohistochemistry and imprint cytology during breast surgery – A prospective study // Eur. J. of Cancer. Vol. 42, № 5. P. 617–620.
8. Diel I.J., Kaufmann M., Costa S.D. et al. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status // J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda). 1996. Vol. 88. P. 1652–1658.
9. Gebauer G., Fehm T., Merkle E. et al. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up // J. Clin. Oncol. 2001. Vol. 19. P. 3669–3674.
10. Gerber B., Krause A., Møller H. et al. Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors // J. Clin. Oncol. 2001. Vol. 19. P. 960–971.
11. Jauch K.W., Heiss M.M., Gruetzner U. et al. Prognostic significance of bone Marrow micrometastases in patients with gastric cancer // J. Clin. Oncol. 1996. Vol. 14. P. 1810–1817.
12. Lindemann F., Schlimok G., Dirschedl P. et al. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients // Lancet. 1992. Vol. 340. P. 685–689.
13. Mansi J.L., Gogas H., Bliss J.M. et al. Outcome of primary-breast-cancer Patients with micrometastases: a long term follow up study // Lancet. 1999. Vol. 354. P. 197–202.
14. de Manzoni G., Pelosi G., Pavanel F. et al. The presence of bone marrow cytokeratin-immunoreactive cells does not predict outcome in gastric cancer patients // Br. J. Cancer. 2002. Vol. 86, № 7. P. 1047–1051.
15. Naume B., Borgen E., Kvalheim G. et al. Detection of isolated tumor cells in Bone marrow in early-stage breast carcinoma patients: comparison with preoperative clinical parameters and primary tumor characteristics // Clin. Cancer Res. 2001. Vol. 7. P. 4122–4129.
16. Naume B., Wiedswang G., Borgen E. et al. The Prognostic Value of Isolated Tumor Cells in Bone Marrow in Breast Cancer Patients // Clin. Cancer Res. 2004. Vol. 10. P. 3091–3097.
17. Osaki T., Oyama T., Gu Ch.-D. et al. Prognostic impact of micrometastatic tumor cells in the lymph nodes and bone marrow of patients with completely resected stage I non-small-cell lung cancer // J. Clin. Oncol. 2002. Vol. 20. P. 2930–2936.
18. Pantel K., Izbicke J., Passlick B. et al. Frequency and prognostic significance of isolated tumor cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases // Lancet. 1996. Vol. 347. P. 649–653.
19. Salerno C.T., Frizelle S., Niehans G.A. et al. Detection of Occult Micrometastases in Non-Small Cell Lung Carcinoma by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction // Chest. 1998. Vol. 113. P. 1526–1532.
20. Trawee S.T., Liu J., Battifora H. Keratin gene expression in nonepithelial tissues: Detection with polymerase chain reaction // Am. J. Pathol. 1993. Vol. 142. P. 1111–1118.
21. Trocciola S.M., Hoda S., Osborne M.P. et al. Do Bone Marrow Micrometastases Correlate with Sentinel Lymph Node Metastases in Breast Cancer Patients? // J. Am. Coll. Surg. 2005. Vol. 200, № 5. P. 720–726.
22. Wang G.Y., Wang S.J., Li Y. et al. Detecting bone marrow micrometastasis of gastric cancer by magnetic activated cell sorting combined with fluorescent activated cell sorting // Ai. Zheng. 2005. Vol. 24, № 5. P. 605–610.
23. Wiedswang G., Borgen E., Keresen R. et al. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer // J. Clin. Oncol. 2003. Vol. 21. P. 3469–3478.
24. Yokoyama N., Shirai Y., Hatakeyama K. Immunohistochemical detection of lymph node micrometastases from gallbladder carcinoma using monoclonal anticytokeratin antibody // Cancer. 1999. Vol. 85. P. 1465–1469.

Поступила 17.11.06