

ИНФОРМАТИВНОСТЬ ИНДИКАЦИИ ЦИТОКЕРАТИНА В ЛИМФОУЗЛАХ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ

**Ю. В. Алдушкина¹, Ю. И. Должикова², К. М. Новрузов², А. Н. Грицай¹,
М. Х. Салпагаров³, Р. Я. Власенко², Н. Ю. Анисимова^{2,4,5}, М. В. Киселевский²**

¹ НИИ урологии и интервенционной радиологии имени Н. А. Лопаткина — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва

² ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва

³ Центр амбулаторной онкологической помощи им. С. П. Боткина, Москва

⁴ Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва

⁵ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

Введение. Согласно статистическим данным, у значимого количества больных раком яичников развивается рецидив заболевания после циторедуктивного хирургического вмешательства. По мнению ряда авторов, причиной высокого риска рецидива является недостаточная информативность метода изучения гистологических препаратов регионарных лимфатических узлов после окраски гематоксилином и эозином и иммуногистохимии. На данный момент нет четкого представления о том, как наличие микрометастазов в сторожевых регионарных лимфатических узлах тазовой и брюшной полостей коррелирует с клинико-морфологическими и иными характеристиками пациента, и об их прогностическом значении.

Целью настоящего исследования являлось выявление особенностей клинико-морфологических и клинико-патологических параметров, уровня онкомаркера CA125 у больных раком яичников и их взаимосвязи с уровнем цитокератин (+) клеток в визуально неизмененных лимфатических узлах, полученных при лимфаденэктомии.

Материалы и методы. В работу был включен материал удаленных лимфатических узлов 21 пациентки с раком яичников. Концентрацию клеток, экспрессирующих цитокератин, определяли с помощью проточной цитометрии.

Результаты. Проведенный корреляционный анализ показал тесную взаимосвязь высокого уровня цитокератин (+) клеток лимфатического узла и распространенности онкологического заболевания ($R = 0,5323$, $p < 0,05$). Межгрупповое сравнение свидетельствует о том, что пациенты с индексом N1 характеризовались более высоким уровнем цитокератин (+) клеток в лимфатических узлах в сравнении с группой N0: 7 (4–8) и 1 (0–1,9) % соответственно. Кластерный анализ позволил сделать вывод, что наличие у пациента сопутствующих заболеваний в виде сахарного диабета, гетерогенного рака и нарушений липидного обмена могут быть факторами риска диссеминации опухоли.

Заключение. Полученные результаты исследования указывают на высокую информативность уровня цитокератин (+) клеток в удаленных лимфатических узлах, резецированных в результате лимфодиссекции у больных раком яичников, и могут быть использованы для уточнения распространенности онкологического заболевания и коррекции тактики противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: рак яичников, цитокератин, CA125, микрометастазы, лимфодиссекция, противоопухолевая терапия, распространенность онкологического заболевания

INFORMATIVENESS OF CYTOKERATINE DETECTION IN THE LYMPH NODES OF PATIENTS WITH OVARIAN CANCER

**Yu.V. Aldushkina¹, Yu.I. Dolzhikova², K. M. Novruzov², A. N. Gritsay¹, M. Kh.Salpagarov³,
R. Ya.Vlasenko², N. Yu.Anisimova^{2,4,5}, M. V. Kiselevskiy²**

¹ Scientific Research Institute of Urology and Interventional Radiology named after N. A. Lopatkin – a Branch of Federal State Budgetary Institution "National Medical Research Center of Radiology" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

² Federal State Budgetary Institution "N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

³ Outpatient Oncology Care Center named after Botkin, Moscow

⁴ National Research Technological University "Moscow Institute of Steel and Alloys", Moscow

⁵ Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Peoples' Friendship University of Russia", Moscow

Introduction. Based on the statistical data, a significant number of ovarian cancer patients have recurrence of the disease after cytoreductive surgery. According to some authors, the reason for the high risk of recurrence is the insufficient informative value of the method of the study of histological specimens of regional lymph nodes after staining with hematoxylin and eosin and immunohistochemistry. At present, there is no clear understanding of how the presence of micrometastases in sentinel regional lymph nodes of the pelvic and abdominal cavities correlates with clinical, morphological and other characteristics of a patient, and their prognostic value.

Objective of the present study was to identify the intricacies of clinical morphological and clinical pathological parameters, the levels of CA125 tumor marker in patients with ovarian cancer and their correlation with the level of cytokeratin-positive (+) cells in visually unchanged lymph nodes obtained during lymphadenectomy.

Materials and Methods. Material of the removed lymph node specimens of 21 patients with ovarian cancer was examined. The concentration of cells expressing cytokeratin was determined using flow cytometry.

Results. The correlation analysis showed a close relationship between a high level of cytokeratin-positive (+) cells in a lymph node and the cancer spread ($R = 0.5323$, $p < 0.05$). The inter-group comparison testifies that a higher level of cytokeratin-positive (+) cells in the lymph nodes was observed in patients with index N1 in comparison with a group N0: 7 (4–8) % and 1 (0–1,9) %, respectively. The cluster analysis allowed us to conclude that the presence of comorbidities such as diabetes mellitus, heterogeneous cancer and lipid metabolism disorders may be risk factors for tumor dissemination.

Conclusion. The results of the study indicate the high informative value of the level of cytokeratin-positive (+) cells in the distant lymph nodes, resected in lymph node dissection in patients with ovarian cancer, and can be used for the assessment of cancer spread and for the correction of the strategy of antitumor therapy.

Keywords: ovarian cancer, cytokeratin, CA125, micrometastases, lymph node dissection, antitumor therapy, cancer spread

Введение

Рак яичников (РЯ) является одним из наиболее распространенных и неблагоприятно протекающих опухолевых заболеваний, на него приходится до 90 % выявленных случаев опухолей этого органа. При этом РЯ имеет самую высокую летальность в сравнении с другими онкологическими заболеваниями женской репродуктивной системы, а результаты лечения остаются неудовлетворительными, несмотря на определенные успехи диагностики и терапии. Чаще всего РЯ диагностируется в запущенных стадиях. Например, частота РЯ, выявленного на III стадии заболевания, составляет до 58 % [1]. На данном этапе исследований не рассматривали подстадии РЯ, т. к. были нацелены на получение

первичных данных о целесообразности нашего подхода.

Также присутствует обратная корреляция между пятилетней выживаемостью и распространенностью опухолевого процесса [1]. Достигнутый прогресс в увеличении пятилетней выживаемости (с 37 % в 70-х годах до 45 % в 90-х годах прошлого века, по данным SEER-регистра) никак не сказался на снижении смертности от этого заболевания. Несмотря на эффективность первой линии химиотерапии (ХТ) у 80 % больных РЯ, у 60 % больных выявляли рецидив опухоли в различные сроки после окончания этого лечения. Наличие метастатического поражения лимфоузлов значительно ухудшает пятилетнюю выживаемость онкологических

Таблица 1

Взаимосвязь стадии РЯ с частотой обнаружения и выживаемостью (%)

Стадия	Описание	Частота обнаружения	Пятилетняя выживаемость
I	Опухоль в пределах яичников	20	73
II	Распространение в пределах малого таза	5	45
III	Поражение брюшной полости и забрюшинных лимфатических узлов	58	21
IV	Отдаленные метастазы	17	5

больных. Однако прямая зависимость этих показателей была выявлена только при наличии метастазов большого объема (макрометастазов) либо при тотальном замещении лимфатических узлов опухолевой тканью [2]. В то же время весьма часто при гистологическом исследовании регионарных лимфатических узлов, удаленных во время хирургического вмешательства по поводу злокачественных новообразований различной локализации, выявляют как отдельные опухолевые клетки, так и микрометастазы в виде скопления небольших групп клеток (кластеров). В этом случае возникает вопрос о рестадировании заболевания и определения дальнейшей тактики лечения и прогноза заболевания.

Риск рецидива после удаления опухолей женской репродуктивной системы остается высоким, даже если хирургическое лечение проведено на ранней стадии онкологического заболевания без явных признаков метастазирования [3]. Одной из очевидных причин можно считать наличие микрометастазов или изолированных опухолевых клеток (ИОК), в т. ч. в нерезецированных лимфатических узлах. В соответствии с действующими клиническими рекомендациями тотальная тазовая, поясничная и парааортальная лимфаденэктомия до уровня почечных сосудов при I стадии рака яичника (кроме муцинозной аденокарциномы) обязательна только для решения вопроса о необходимости адъювантной химиотерапии, во всех остальных случаях решение принимается индивидуально [4]. При РЯ II стадии и выше выполнение лимфаденэктомии рекомендовано при наличии увеличенных, подозрительных на метастатическое поражение лимфоузлов по данным предоперационного обследования (индекс N по классификации TNM выше 1) или интраоперационной ревизии. Последующее морфологическое исследование удаленных лимфатических узлов является основанием для уточнения диагноза, что может существенно повлиять на тактику лечения. Поэтому выявление микрометастазов в лимфатических узлах является важной задачей современной диагностики. Поскольку при стандартном окрашивании гематоксилин-эозином шанс обнаружить микрометастазы размером менее 2,0 мм и тем более

ИОК невелик, то их идентификацию осуществляют с помощью иммуногистохимии. Для этих целей используют моноклональные антитела к цитокератинам, позволяющие идентифицировать неопластические клетки эпителиального происхождения в образцах лимфатических узлов, полученных при лимфодиссекции [5, 6]. О важности выявления микрометастазов для прогноза течения заболевания и выбора тактики лечения свидетельствует система стадирования, разработанная Американским объединенным комитетом по раку (AJCC), которая предписывает их учитывать при ряде гинекологических злокачественных новообразований, включая рак шейки матки, эндометрия, яичников и вульвы [7]. Тем не менее нет четкого представления о том, как наличие микрометастазов и ИОК в сторожевых регионарных лимфатических узлах тазовой и брюшной полостей коррелирует с клинико-морфологическими и иными характеристиками пациента и об их прогностическом значении.

Целью настоящего исследования являлось выявление особенностей клинико-морфологических и клинико-патологических параметров, уровня онкомаркера СА125 у больных раком яичников и их взаимосвязи с уровнем цитокератин (+) клеток в визуально неизмененных лимфатических узлах, полученных при лимфаденэктомии.

Материалы и методы

Исследовали образцы тканей 21 больной раком яичников, которым проводили операционное вмешательство с целью циторедуктивной терапии. Возраст пациенток варьировал от 33 до 72 лет. Распределение больных в соответствии с клинической стадией было следующим: у шести пациенток диагностировали I стадию, у одной — II стадию, у 11 пациенток — III стадию, у трех пациенток — IV стадию рака. Степень распространенности процесса описывали согласно классификации TNM. Значения индексов N и M соответствовали следующим значениям: N0 — 18 случаев, N1 — три случая, M0 — 18 случаев, M1 — три случая, из которых один был зарегистрирован как M1a, а один как M1b. Диагноз был установлен по результатам

комплексного стандартного обследования, включающего ультразвуковое исследование области брюшной полости и малого таза, регионарных лимфатических узлов и зон регионарного метастазирования, компьютерную томографию органов малого таза и брюшной полости, рентгенографию органов грудной клетки, морфологическое и цитологическое исследование опухоли. У пациенток были диагностированы опухоли следующих гистологических типов: серозная аденокарцинома (17 случаев: 12 G3, 3 G1 и 2 G2), эндометриоидная аденокарцинома (два случая: 2 G1), светлоклеточная аденокарцинома (два случая: G неизвестно). Отдельно регистрировали количество деторождений, наступление менопаузы, сопутствующую гинекологическую патологию, наличие сопутствующих хронических заболеваний (сахарный диабет, онкологический процесс иной этиологии), наличие признаков нарушения липидного обмена (ожирение 1–3 стадий). До операции у пациенток определяли уровень СА125 в сыворотке крови, отмечали наличие асцита. В ходе хирургического вмешательства проводили биопсию регионарных лимфатических узлов брюшной и тазовой полостей. Для выявления экспрессии клетками цитокератина ткань лимфоузла гомогенизировали, клетки сепарировали, пермобилизовали и окрашивали антителами к цитокератину, конъюгированные с флуорохромом, в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию клеток, экспрессирующих цитокератин, определяли с помощью проточной цитометрии на приборе Novocyte (ACEA Bioscience, USA), анализируя не менее 50 000 событий в каждой пробе.

Статистическую обработку данных производили с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft, USA). Описывали совокупность данных, указывая значения медианы, а также размах 25 и 75 % квартилей. Сравнительный анализ двух групп производили с помощью *U*-критерия Манна — Уитни, а сравнение большего количества групп производили путем дисперсионного анализа с помощью критерия Краскела — Уоллиса. Средства регрессионного анализа применяли для качественной оценки степени взаимосвязи различных параметров с использованием рангового кри-

терия Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Анализ индивидуальных данных позволил установить, что возраст 75 % обследованных пациенток превышал 48 лет, соответствуя 53 (48–65) годам. Размеры опухоли в данной группе соответствовали преимущественно стадии T3, которая была отмечена в 66,6 % случаев при отсутствии в большинстве случаев верифицированных регионарных и отдаленных метастазов (N0 и M0). Распространённость патологического процесса в подавляющем количестве случаев описывалась индексами N1 и M1 (86 % пациенток в группе), указывающими на вовлеченность лимфатических узлов и наличие отдаленных метастазов, соответственно.

Для проведения анализа пациентки были разделены на две группы в зависимости от выявленного или необнаруженного поражения лимфатических узлов в дооперационном периоде инструментальными методами. Среди обследованных пациенток у 14,3 % наблюдали поражение регионарного лимфатического узла (N1), тогда как у большинства изменений лимфоузлов не обнаруживали (N0). Проведенный в этих группах сравнительный анализ показал отсутствие достоверных отличий по такому параметру как возраст пациенток (табл. 2). Сравнительный анализ групп пациентов с различным размером опухоли (T1–T3) также не показал наличия статистически достоверных межгрупповых отличий. Однако можно отметить, что все пациенты группы N1 характеризовались большим объемом опухоли, соответствующей стадии T3, отнесенной по своему гистологическому типу к серозной аденокарциноме. Последнее обстоятельство вряд ли следует рассматривать как специфичный признак, поскольку в данной группе количество пациентов с серозной аденокарциномой (71 %) значительно преобладало над числом больных эндометриоидной аденокарциномой (9,5 %) и светлоклеточной аденокарциномой (9,5 %). Примененный сравнительный анализ не позволил установить достоверной разницы в группах N0 и N1 по количеству деторождений, а также случаев с наступившей менопаузой.

Характеристика больных по клинико-морфологическим показателям

Параметр	N0	N1	p
Возраст, лет	53 (46–65)	60 (56–64)	0,2782
Размер опухоли (T)			
T1	29 (6)	0 (0)	0,3098
T2	4,7 (1)	0 (0)	
T3	53 (11)	14 (3)	
Наличие отдаленных метастазов (M)			
M0	4,7 (1)	9,5 (2)	0,1386
M1	81 (17)	4,7 (1)	
Гистологический тип опухоли			
Серозная аденокарцинома	67 (14)	14 (3)	0,4840
Эндометриоидная аденокарцинома	9,5 (2)	0 (0)	
Светлоклеточная аденокарцинома	9,5 (2)	0 (0)	
Количество деторождений			
0	9,5 (2)	0 (0)	0,6757
Более 1	71,4 (15)	14 (3)	
Менопауза			
Нет	28,6 (6)	0 (0)	0,2482
Да	52,4 (12)	14 (3)	

Выявить статистически достоверных отличий между группами по количеству случаев с подтвержденным асцитом, наличием сопутствующей гинекологической патологии или хронического заболевания также не удалось (табл. 3).

Учитывая клиническую значимость онкомаркера СА125, нами также были предприняты попытки оценить взаимосвязь его содержания в сыворотке крови с величиной опухоли и распространённостью опухоли в организме пациентов.

Анализ этого параметра ожидаемо показал нарастание уровня СА125 при увеличении объема опухоли ($p < 0,05$) (рис. 1а). В частности, было установлено, что при наличии отдаленных метастазов уровень СА125 в сыворотке крови пациентов возрастал, хотя статистическая достоверность обнаруженных различий была невысока ($p = 0,05$). Зависимость уровня анализируемого маркера от критерия N не была подтверждена методами статистического анали-

за ($p > 0,05$). Так, было показано, что в группе N0 превышение уровня СА125 относительно нормативных значений (более 30 Ед/мл) отмечали в 83 % случаев, тогда как в группе N1 — в 100 %. Таким образом, этот параметр был информативен только в 27 % случаев. Поэтому можно заключить, что в качестве фактора, позволяющего дифференцировать наличие или отсутствие регионарных метастазов, определение уровня СА 125 является малоинформативным.

Исследования уровня экспрессии цитокератина клетками, выделенными из резецированных лимфатических узлов, позволили выявить различия в группах T0 и T2–T3 (рис. 2а, б).

Данные корреляционного анализа показали тесную взаимосвязь высокого уровня цитокератина в визуально неизменённых лимфатических узлах и распространённости онкологического заболевания ($R = 0,5323, p < 0,05$). Межгрупповое сравнение показало, что пациенты с индексом N1 характеризовались повышенным содержанием цитокератин (+) клеток в лимфатических

Характеристика пациентов по патофизиологическим факторам

Параметр	N0	N1	p
Наличие асцита до операции			
Есть	48 (10)	9,5 (2)	0,8341
Нет	38 (8)	4,5 (1)	
Сопутствующая гинекологическая патология			
Есть	19 (4)	0 (0)	0,3758
Нет	62 (13)	14,3 (3)	
Сопутствующее хроническое заболевание (рак иного генеза, сахарный диабет)			
Есть	19 (4)	4,8 (1)	0,273
Нет	62 (13)	9,5 (2)	
Нарушение липидного обмена (ожирение)			
Есть	14,3 (3)	0 (0)	0,287
Нет	67 (14)	14,3 (3)	

узлах в сравнении с группой N0, 7 (4–8) и 1 (0–1,9) % соответственно (рис. 2в). Таким образом, в группе N1 более чем в 75 % случаев этот показатель превышал 4 %, а в 90 % случаев — 2 %. В группе N0 цитокератин (+) клетки от 2 % были выявлены у 22 % больных.

Для оценки значимости уровня цитокератин (+) клеток в качестве маркера распространённости онкологического заболевания использовали ROC-анализ с расчетом полной площади под ROC-кривой (AUC), которая дает представление о вероятности правильного прогноза при наблюдении тестовой переменной (рис. 2г) [8]. Проведенный анализ показал, что AUC построенной ROC-кривой соответствует 0,763, что, со-

гласно экспертной шкале оценок AUC, свидетельствует о хорошем качестве данной модели [8]. Рассчитанная специфичность данного теста составила 91,7 %.

Вышеизложенное позволяет заключить, что обнаружение более 2 % цитокератин (+) клеток в ткани лимфатических узлов может указывать на высокую вероятность (более 76 %) поражения регионарных лимфатических узлов при отсутствии других признаков метастазирования. Так, в нашем случае 22 % пациенток в группе N0 характеризовались наличием в ткани лимфатических узлов цитокератин (+) клеток в концентрации, превышающей 2 %, тогда как в группе N1 этим характеризовались 90 % пациентов.

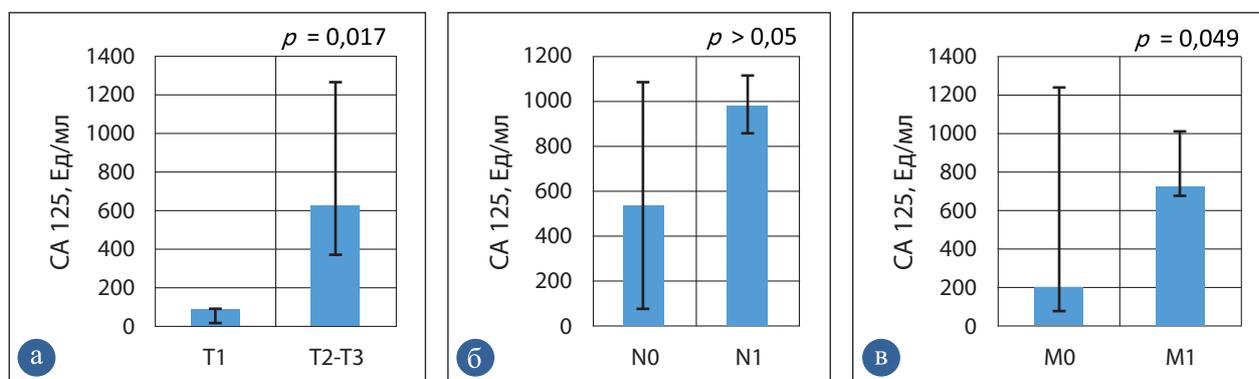


Рис. 1. Концентрация CA125 в сыворотке крови больных раком яичников с малым (T1) и большим объемом опухоли (T2–T3) (а), без признаков поражения регионарных лимфатических узлов (N0) и с морфологически измененными лимфатическими узлами (N1) (б), с наличием (M1) и отсутствием отдаленных метастазов (M0) (в)

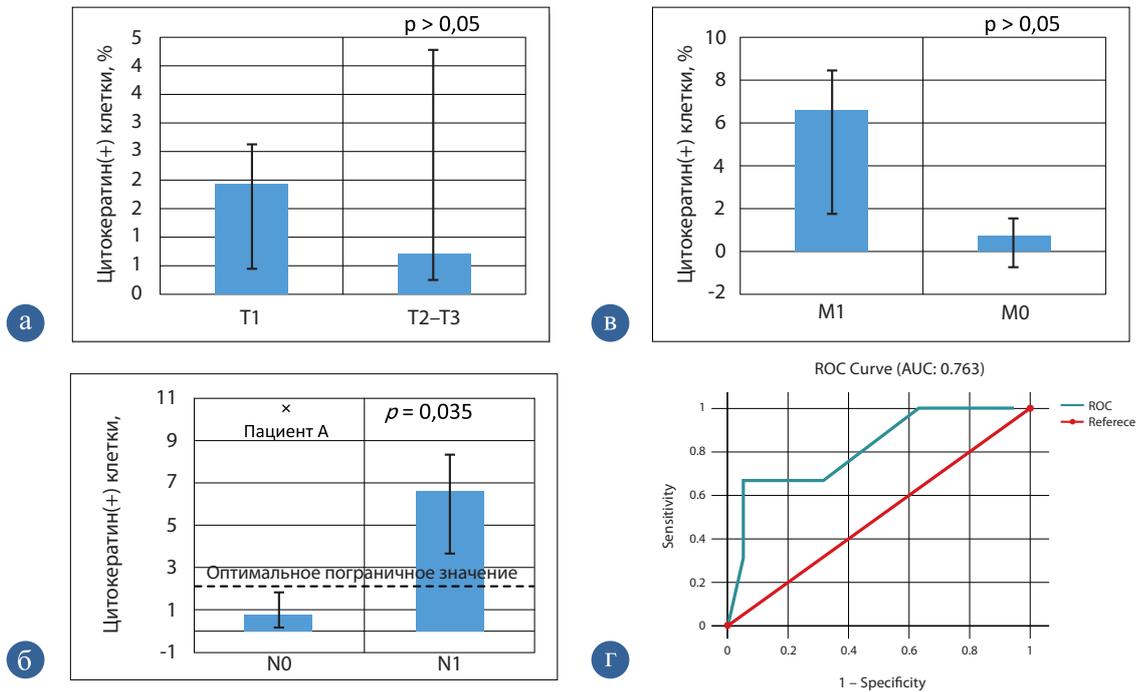


Рис. 2. Экспрессия цитокератина в клетках сторожевых лимфатических узлов у больных раком яичников с разным объемом опухоли, характеризующихся индексами T1 и T2-T3 (а) и индексами M0 и M1, указывающими на выявление отдаленных метастазов (б), пациентов с различной стадией распространенности заболевания, характеризующихся индексом N0 или N1 (в), ROC анализ информативности изучения этих параметров с расчетом площади под ROC кривой (AUC) (г)

Для изучения взаимосвязи между всеми проанализированными признаками был проведен кластерный анализ. Целью применения этого многомерного структурного анализа являлось разделение исследуемой группы пациентов, характеризующих наследственными факторами, фенотипическими, клинко-морфологическими и патофизиологическими особенностями на однородные группы (кластеры), и определение расстояния или связи (меры близости) между ними в ситуации, когда отсутствует априорная информация относительно их групповой принадлежности. При этом, в отличие от использованного нами ранее однофакторного дисперсионного анализа, пациенты в кластерах могут быть объединены по целому набору признаков. Проведенный кластерный анализ позволил сформировать дендрограмму, которая показывает степень близости отдельных параметров и наглядно демонстрирует последовательность их объединения в кластеры, а также степень удаленности кластеров относительно друг друга (рис. 3). В результате были созданы три кластера сходных между собой признаков и визуализи-

рована степень их вложенности относительно друг друга. В частности, было показано, что первый кластер близких параметров (уровень связи третьего порядка) составляют индексы N и M, свидетельствующие о распространенности в организме пациента онкологического заболевания, наследственном факторе, наличии патологий липидного обмена и таких сопутствующих заболеваний, как сахарный диабет или рак иного генеза, а также обнаружение в сторожевых лимфатических узлах повышенной концентрации цитокератин (+) клеток. При этом можно отметить, что наиболее тесная связь показателей индексов N и M была с наследственным фактором, свидетельствующим о выявлении онкологических заболеваний у кровных родственников пациента. Вторым кластером являются данные о наличии асцита и менопаузы у пациентов, взаимосвязан через уровень второго порядка с первым кластером. Третий кластер объединяет количество деторождений и показатель размера опухоли (T). Именно третий кластер, с вложенными вторым и первым кластерами, демонстрирует взаимосвязь всех проанализированных

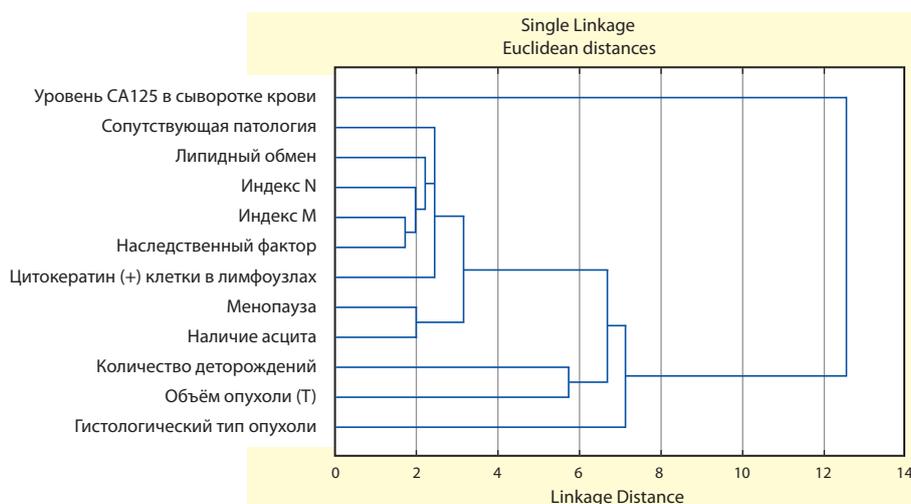


Рис. 3. Дендрограмма иерархической классификации параметров пациентов. По оси ординат — объединяемые объекты, по оси абсцисс — близость кластеров (усл. ед.)

параметров с концентрацией в сыворотке крови СА125. Отсюда следует, что такие факторы, как наличие у пациента сопутствующих заболеваний в виде сахарного диабета и гетерогенного рака, положительного наследственного фактора, а также нарушений липидного обмена, могут быть факторами риска распространения опухолевого процесса в организме, тогда как уровень цитокератин (+) клеток в сторожевых лимфоузлах может рассматриваться как его маркер.

В данном исследовании мы не стали анализировать подстадии онкологического заболевания, чтобы сосредоточиться на получении начального ответа о целесообразности проводимых изысканий. Ответ получен, и в дальнейшем планируем рассмотреть и этот фактор.

Ввиду не очень большой выборки цитокин (+) образцов, превосходящих уровень 2 %, сделать вывод о взаимосвязи с гистологическим типом опухоли, ее дифференцировки не представляется возможным и требуется дальнейшее изучение.

Клинический случай

Пациентка А., 67 лет, диагноз рак яичников 3С стадии, асцит. Проведено шесть курсов полихимиотерапии с последующим хирургическим лечением. Множественная биопсия брюшины, при гистологическом исследовании опухолевых клеток в ткани лимфатических узлов обнаружено не было. Через шесть месяцев контрольные

исследования с использованием ПЭТ КТ не показали данных за локальный рецидив, но был выявлен метаболически активный параортальный лимфоузел вторичного характера. Пациентке выполнено хирургическое лечение. Стандартное гистологическое исследование не подтвердило наличия в лимфатических узлах метастазов. Однако проведенное методом проточной цитометрии исследование фенотипа клеток удаленных параортальных лимфоузлов выявило повышенный уровень экспрессии цитокератин (+) клеток, соответствующий 10 %, что, согласно нашим расчетам, характерно для пациентов с вовлеченными лимфатическими узлами (индекс N1). Эти результаты, в отличие от проведенного гистологического исследования, могут подтверждать наличие микрометастазов в ткани параортальных лимфатических узлов, выявленных при ПЭТ.

Обсуждение

Несмотря на то что в настоящее время нет четкого представления о прогностической значимости микрометастазов в лимфатических узлах, ряд исследователей приводит свидетельства о снижении выживаемости онкологических больных с выявленными в лимфатических узлах цитокератин (+) клетками. В частности, опубликованы данные о взаимосвязи обнаружения микрометастазов и неблагоприятного клинического исхода при раке желудка [9],

немелкоклеточном раке легкого [10], раке шейки матки и яичников [11, 12]. Вместе с тем данных о взаимосвязи микрометастазов и ИОК у пациенток с ранними стадиями гинекологических злокачественных новообразований с морфологическими и клиническими характеристиками недостаточно, чтобы сформулировать клинические рекомендации.

Большое количество работ, направленных на выявление микрометастазов в лимфатических узлах и оценку их прогностической значимости, посвящено раку молочной железы. Согласно имеющимся данным, у больных раком молочной железы с невыявленной распространенностью опухоли в 10–13 % случаев цитокератин (+) клетки обнаруживают в ткани сторожевых лимфатических узлов и в 4,9–14,6 % случаев — в несторожевых лимфатических узлах [13]. Известно, что индикация в лимфатических узлах онкологических пациентов небольшого количества эпителиальных клеток не обязательно свидетельствует о распространенности процесса. Так, по свидетельству Tamhane с соавт., эпителиальные клетки присутствовали в лимфатических узлах, дренирующих место недавней биопсии молочной железы, при отсутствии инвазивной опухоли являлись артефактом недавней операции, а не микрометастазами опухоли [14]. В работе И. Д. Троценко с соавторами методами иммуногистохимии был изучен уровень цитокератин-19 (+) клеток в лимфатических узлах больных раком молочной железы [15]. Проведенный многоуровневый статистический анализ позволил авторам удостовериться в наличии тесной корреляции между уровнем экспрессии клетками этого внутриклеточного белка и частотой выявления метастазов у пациенток. Это дало возможность исследователям сделать вывод о перспективности использования цитокератина-19 для дифференциальной диагностики метастазов рака молочной железы в региональных лимфоузлах. В других исследованиях авторы обосновывают возможность применения теста на выявление цитокератин (+) клеток в лимфатических узлах в качестве прогностического фактора при иных типах рака. Например, Y. Doki с соавторами изучали экспрессию цитокератина (AE1/AE3)

в ткани лимфатических узлов, удаленных во время операции у 41 пациента с местнораспространенным раком пищевода без вовлеченности лимфатических узлов (T3–T4, N0), выявив наличие в этой группе цитокератин (+) микрометастазы у 27 % пациентов, характеризующихся сниженной в 2,8 раза пятилетней выживаемостью в сравнении с остальными пациентами [16].

Данные, полученные нами, подтверждают результаты вышеупомянутых исследователей. При изучении иммунофенотипа сторожевых лимфатических узлов брюшной и тазовой полостей, резецированных в ходе хирургических операций у больных раком яичников, было установлено, что пациенты группы N1 с верифицированной распространённостью опухоли в целом характеризовались более высоким уровнем цитокератин (+) клеток в сравнении с группой N0. Медианные значения этого параметра в этих группах различались в 7 раз ($p < 0,05$). С использованием статистических методов удалось доказать существование тесной взаимосвязи между группами N0 или N1 и наличием в сторожевых лимфатических узлах цитокератин (+) клеток. Произведенные расчеты показали, что оптимальным пограничным значением этого параметра, определяющим его информативность, является 2 % цитокератин (+) клеток. Следует отметить, что в группе N1 цитокератин (+) клетки были обнаружены у 90 % пациенток, тогда как в группе N0 только у 22 %. Однако в одном случае было определено довольно высокое содержание цитокератин (+) клеток (10 %) в визуально неизменённых регионарных лимфатических узлах, что может быть расценено как наличие микрометастазов, свидетельствуя о распространенности опухолевого процесса, не выявленного во время дооперационного обследования. Это указывает на потенциальную информативность для клинической практики определения уровня цитокератин (+) клеток в сторожевых лимфатических узлах в качестве фактора, влияющего на тактику лечения пациента. Отдельно следует отметить, что, в отличие от большинства опубликованных исследований, применявших иммуногистохимические методы оценки цитокератин

(+) клеток, в наших исследованиях использовали метод проточной цитометрии, что позволяет проводить скрининг среди большого количества клеток в образце (10 000–50 000), повышая вероятность выявления целевого маркера при условии значительного сокращения времени на пробоподготовку образца. При условии использования высококвалифицированного персонала и оптимальной эргономики аналитического процесса данный тест может быть проведен в режиме экспресс-диагностики для интраоперационного уточнения стадии заболевания, коррекции алгоритма хирургического лечения, а также последующей тактики адъювантной терапии.

Применение методов кластерного анализа позволило сформировать группы признаков, объединяющих пациентов. Этот подход дал возможность рассматривать параметры внутри кластера как маркерные для данной группы. Согласно полученным данным, наибольшую степень однородности с выраженностью критериев распространенности опухолевого процесса (индексы N и M) наряду с генетической предрасположенностью к развитию онкологических заболеваний, наличием патологий липидного обмена и хронических заболеваний продемонстрировал факт обнаружения в сторожевых лимфатических узлах повышенной концентрации цитокератин (+) клеток, что свидетельствует

о перспективах его использования в качестве маркера распространенности процесса.

Заключение

Дополнение стандартного диагностического арсенала новыми инновационными методами, направленными на выявление отдельных опухолевых клеток и микрометастазов, повышает их информативность, может служить уточнению диагноза и методов применяемой терапии. Этому также способствует высокая скорость проведения исследований с использованием проточной цитометрии (30–40 мин) и большой объем анализируемых клеток (10 000–500 000 клеток в одной пробе). Полученные результаты показали информативность метода проточной цитометрии для обнаружения в регионарных лимфатических узлах цитокератин (+) клеток, ассоциируемых с микрометастазами опухолей эпителиального происхождения. Разработка дополнительных мультимаркерных критериев на основе индивидуальных иммунологических показателей пациентов может способствовать более мотивированному выбору тактики хирургического вмешательства и адъювантной терапии. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о целесообразности проведения лимфодиссекции у больных раком яичников и могут быть использованы при послеоперационном рестадировании.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Каприн А. Д., Старинский В. В., Петрова Г. В. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). — М.: МНИОИ им. П. А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. — 2019. — 250 с.
2. Takehana T., Imada T., Matsumoto A. Clinico-pathological studies on the lymph node metastases of the gastric cancer invading to proper muscle layer. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*. 1993; 90(9):2083–2089.
3. Ku F. C., Wu R. C., Yang L. Y., et al. Clear cell carcinomas of the ovary have poorer outcomes compared with serous carcinomas: results from a single-center Taiwanese study. *J Formos Med Assoc*. 2018;117(2):117–125.
4. Клинические рекомендации. Рак яичников, рак маточной трубы, первичный рак брюшины. Министерство здравоохранения Российской Федерации. 2020.
5. Hermanek P., Hutter R. V., Sobin L. H., Wittekind C. International Union against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer*. 1999;86(12):2668–2673.
6. Cooper D., Schermer A., Sun T. T. Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications, and limitations. *Lab Invest*. 1985;52(3):243–56.
7. Gress D. M., Edge S. B., Gershenson J. E., et al. Principles of cancer staging. *AJCC cancer staging manual* (8th ed.), Springer, New York. 2017: 3–30.
8. Ковалев А. А., Кузнецов Б. К., Ядченко А. А., Игнатенко В. А. Оценка качества бинарного классификатора в научных исследованиях. *Проблемы здоровья и экологии*. 2020;4:105–113.

Опухоли придатков матки

9. Maehara Y, Oshiro T, Endo K, Baba H., et al. Clinical significance of occult micrometastasis lymph nodes from patients with early gastric cancer who died of recurrence. *Surgery*, 1996;119(4):397–402.
10. Mineo T. C., Ambrogi V., Pompeo E., Baldi A. Immunohistochemistry-detected microscopic tumor spread affects outcome in en-bloc resection for T3-chest wall lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2007;31(6):1120–1124.
11. Colturato L. F., Signorini Filho R. C., Fernandes R. C., et al. Lymph node micrometastases in initial stage cervical cancer and tumoral recurrence. *Int J Gynaecol Obstet*. 2016;133(1):69–75.
12. Wang Y. C., Wu R. C., Jung S. M., et al. Detection and prognostic significance of isolated tumor cells and micrometastases in pelvic lymph nodes of patients with early ovarian clear cell carcinoma. *J Formos Med Assoc*. 2021;120(10):1869–1875.
13. Smith J., Leonard C., Carter D. L., Tole S. Does the Presence of Cytokeratin Positive Individual Tumor Cells (N0(I+)) in sentinel lymph nodes affect clinical outcomes in breast cancer patients treated with accelerated partial breast irradiation. *Breast Cancer*. 2021;29(13):513–517.
14. Tamhane R., Dahlstrom J. E., McCallum D. D., Buckingham J. M. The clinical significance of cytokeratin-positive cells in lymph nodes at the time of mastectomy from patients with ductal carcinoma-in-situ. *Ann Surg Oncol*. 2002;9(10):999–1003.
15. Троценко И. Д., Тацян А. А., Затиров Г. М. и др. Анализ экспрессии цитокератина-19 в лимфатических узлах для верификации метастазов рака молочной железы // Вестник РНЦПР. — № 14. URL: http://vestnik.rncpr.ru/vestnik/v14/papers/bozhenko_v14.pdf
16. Doki Y, Ishikawa O., Mano M., et al. Cytokeratin deposits in lymph nodes show distinct clinical significance from lymph node micrometastasis in human esophageal cancers. *J Surg Res*. 2002;107(1):75–81.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Алдушкина Юлия Владимировна, врач-гинеколог отделения реконструктивно-пластической гинекологии и онкологии, НИИ урологии и интервенционной радиологии имени Н. А. Лопаткина — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 105425, Москва, 3-я Парковая ул., 51, с. 1, ORCID: 0000-0002-9486-2028, e-mail: Juliaald@mail.ru

Aldushkina Yulia V., Gynecologist, Department of Reconstructive Plastic Gynecology and Oncology, N. A. Lopatkin Research Institute of Urology and Interventional Radiology, a branch of the National Medical Research Center of Radiology, Ministry of Health of Russia, Russia, 105425, Moscow, 3rd Parkovaya st., 51, bldg. 1, ORCID: 0000-0002-9486-2028, e-mail: Juliaald@mail.ru

Должилова Юлия Ивановна, научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета, ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское шоссе 24, ORCID: 0000-0003-2138-7323, e-mail: julius.87@mail.ru

Dolzhiyeva Yulia I., Researcher Laboratory of Cellular Immunity, Medical Rehabilitation of Federal State Budgetary Institution «N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye sh., 24, ORCID: 0000-0003-2138-7323, e-mail: julius.87@mail.ru

Новрузов Керям Мурсали оглы, научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета, ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское шоссе 24, ORCID: 0000-0002-0773-255X, e-mail: nkeryam@gmail.com

Novruzov Keryam Mursali ogly, Researcher Laboratory of Cellular Immunity, Medical Rehabilitation of Federal State Budgetary Institution «N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye sh., 24, ORCID: 0000-0002-0773-255X, e-mail: nkeryam@gmail.com

Грицай Анатолий Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением неконструктивно-пластической гинекологии и онкологии, НИИ урологии и интервенционной радиологии имени Н. А. Лопаткина — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 105425, Москва, 3-я Парковая ул., 51, с. 1, ORCID: 0000-0001-5235-6509, e-mail: gritsay69@gmail.com

Gritsay Anatoly N., Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Non-Constructive Plastic Gynecology and Oncology, N. A. Lopatkin Research Institute of Urology and Interventional Radiology, a branch of the National Medical Research Center of Radiology, Ministry of Health of Russia, Russia, 105425, Moscow, 3rd Parkovaya st., 51, bldg. 1, ORCID: 0000-0001-5235-6509, e-mail: gritsay69@gmail.com

Салтагаров Магомет Хасанович, врач-онколог, ЦАОП им. Боткина, 1252842 Москва, 2-й Боткинский пр-д, д. 5, корп. 28, e-mail: magometonco@mail.ru

Salpagarov Magomet H., Botkin Outpatient oncology Center, 1252842 Moscow, 2nd Botkinsky Prospect, 5, build. 28, e-mail: magometonco@mail.ru

Власенко Раймонда Яновна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24, e-mail: vlasenko2002@bk.ru

Vlasenko Raimonda Y., PhD in Medical sciences, Senior Researcher Laboratory of Cellular Immunity, Medical Rehabilitation of Federal State Budgetary Institution «N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye sh., 24, e-mail: vlasenko2002@bk.ru

Анисимова Наталья Юрьевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, e-mail: n_anisimova@list.ru

Anisimova Natalya Yu., Doctor of Medical Sciences, Leading Researcher Laboratory of Cellular Immunity, Medical Rehabilitation of Federal State Budgetary Institution «N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye sh., 24, e-mail: n_anisimova@list.ru

Киселевский Михаил Валентинович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией клеточного иммунитета, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, e-mail: kisele@inbox.ru

Kiselevskiy Mikhail V., Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of Laboratory of Cellular Immunity, Medical Rehabilitation of Federal State Budgetary Institution «N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye sh., 24, e-mail: kisele@inbox.ru