

# ОНКОЛОГІЯ

УДК 616-006

© КОЛЕКТИВ АВТОРІВ, 2014

*О.І. Дронов, С.В. Земсков, Д.І. Хоменко*

## ВЛАСНИЙ ДОСВІД ВИЗНАЧЕННЯ ІЗОЛЬОВАНИХ ПУХЛИННИХ КЛІТИН В ПЕРИТОНЕАЛЬНИХ ЗМИВАХ ХВОРИХ НА РАК ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ

### Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

**Вступ.** Клінічне значення ізольованих пухлинних клітин (ІПК) в перитонеальних змивах радикально оперованих хворих на рак підшлункової залози (РПЗ) є досі невизначеним.

**Мета.** Спроба оцінити вплив ІПК в перитонеальних змивах на загальну виживаність (ЗВ), безрецидивну виживаність (БВ) у радикально оперованих хворих на РПЗ, цитологічним та імуноцитохімічним методом (ІЦХ), а також вплив хірургічного втручання на перитонеальну дисемінацію РПЗ.

**Матеріали і методи.** Обстежено 22 радикально оперованих хворих на РПЗ, у всіх випадках РПЗ було гістологічно підтверджено. Всі хворі отримували ад'ювантну хімотерапію. Медіана віку хворих складала 63 (45-74) років. Змиви в черевній порожнині під час операції брали на початку операції та наприкінці. Цитологічні препарати фарбували гематоксилін-еозином та (ІЦХ). Використовували моноклональні антитіла до СЕА (клон ІІ-1, ДАКО, Данія), до СА 19-9 (клон С241:5:1:4, Diagnostic Biosystems, США).

**Результати.** В жодного з 22 хворих на початку операції не було виявлено ІПК в перитонеальних змивах. У 2 хворих шляхом ІЦХ було виявлено ІПК на заключному етапі операції. При аналізі ЗВ та БВ не було встановлено ніяких тенденцій щодо впливу цих знахідок на прогноз хворих. Медіана БВ для групи цих хворих складала 12 місяців.

**Висновок.** ІЦХ та цитологічне дослідження перитонеальних змивів на сучасному етапі не може бути використане для оцінки інтраопераційної перитонеальної дисемінації РПЗ та прогнозу радикально-оперованих хворих на РПЗ.

**Ключові слова:** визначення, ізольовані пухлинні клітини, перитонеальні змиви, рак, підшлункова залоза.

#### ВСТУП

В світовій літературі досі існує певна невизначеність щодо клінічного значення ізольованих пухлинних клітин (ІПК) в перитонеальних змивах радикально оперованих хворих на рак підшлункової залози (РПЗ).

Є дані про кореляцію наявності ІПК в інтраопераційних перитонеальних змивах з погіршенням прогнозу [1,4]. Згідно їх досвіду, загальна виживаність (ЗВ) таких хворих, незважаючи на радикальне хірургічне видалення пухлини, не відрізнялась від ЗВ хворих після симптоматичних операцій.

Фундаментальні клінічні дослідження ІПК є ключем до розуміння біології метастазів та причин ранніх рецидивів у радикально оперованих хворих. В нашій країні, нажаль, можливість цих досліджень є обмеженою у зв'язку з відсутністю високовартісного спеціального діагностичного обладнання та доступних технологій їх виявлення ІПК [2].

Метою дослідження була спроба оцінити вплив ІПК в перитонеальних змивах на ЗВ, безрецидивну виживаність (БВ), у радикально оперованих хворих на РПЗ, цитологічним та імуноцитологічним методом, а також вплив хірургічного втручання на перитонеальну дисемінацію РПЗ.

### **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ**

Дослідження проводили протягом 2011-2012 років на базі Київського центра хірургії печінки, підшлункової залози та жовчних протоків імені В.С. Земскова (КМКЛ №10), до якого було послідовно залучено 22 хворих. Хворих радикально прооперовано з приводу РПЗ, у всіх випадках гістологічно було підтверджено протокову аденокарциному підшлункової залози. Всі хворі отримували ад'ювантну хіміотерапію відповідно рекомендацій хіміотерапевта. Медіана віку хворих складала 63 (45-74) років. Докладну характеристику хворих наведено в таблиці. Змиви під час операції брали з 3 зон (правий піддіафрагмальний простір, лівий піддіафрагмальний простір та малий таз) після того, як в черевну порожнину заливали 2л фізіологічного розчину, температура якого складала близько 37 0С, за допомогою окремого відсмоктувача. Цю процедуру робили двічі під час операції: на початку - безпосередньо після виконання лапаротомії, до виконання ревізії та будь-яких маніпуляцій з пухлиною; та наприкінці - перед встановленням дренажів та ушиванням лапаротомної рани.

**Таблиця**

### **Характеристика обстежених хворих**

Критерії	Співвідношення пацієнтів (чол./жін.)
Співвідношення в групах: чоловіки/жінки	12/10
Онкологічна стадія II/III	8/14
Тип резекції підшлункової залози: дистальна / проксимальна	5/17
Локальна поширеність пухлини T2/T3	5/17

Методика приготування цитоблоків: зразки перитонеальних змивів відстоювали у пробірках при 4°C протягом 16 годин. Надосадову рідину зливали, осад ресуспендували, розливали у форми 24x24x5 мм та заливали розплавленим агаром. Після застигання агар з розміщеним в ньому осадом переносили в гістологічні касети. Матеріал в касетах фіксувався у розчині оцтовокислого цинк-формаліну протягом 24 годин при температурі 37°C з постійним перемішуванням магнітною мішалкою. Після цього матеріал проводився через ізопропіловий спирт і просочувався парафіном у напівавтоматичному гістопроцесорі Milestone Histos 5 (Італія). Залиті в парафін блоки різали на ротаційному мікротомі Hestion ERM 3000 (Австралія). Зрізи товщиною 4 мкм розміщували на предметні скельця Menzel Super Frost (Німеччина) для забарвлення гематоксиліном і еозином і на адгезивні скельця Menzel Super Frost (Німеччина) для забарвлення імуногістохімічними методами. Зразки перитонеальних змивів – на канцероємбріональний антиген (CEA) і СА 19-9. Використовували моноклональні антитіла до CEA (клон II-1, DAKO, Данія), до СА 19-9 (клон C241:5:1:4, Diagnostic Biosystems, США). Відновлення антигенності тканин виконували в автоматичній водяній бані DAKO PT-Module (Данія). Візуалізацію первинних антитіл виконували за допомогою системи візуалізації DAKO Flex+ High pH (Данія). Забарвлені зрізи поміщали під покривне скло у покривне середовище. Досліджували препарати у мікроскопі ERMA EZ 122T. Для підрахунку позитивних клітин препарати фотографували за допомогою цифрової камери, на знімках за допомогою програми JMicroVision 1.2.7 шляхом мануального підрахунку позитивних і негативних об'єктів.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В одного з 22 хворих при первинній ревізії не було виявлено пухлинних клітин в перитонеальних змивах ні цитологічно, ні імуноцитохімічно. У 2 хворих імуноцитохімічно виявлено пухлинні клітини на заключному етапі операції. При аналізі 3В та 6В не встановлено ніяких тенденцій щодо впливу цих знахідок на прогноз хворих. Медіана 6В для групи цих хворих складала 12 місяців. В пацієнтки Б., 1937 р.н., оперованої 28.02.13 з приводу аденокарциноми хвоста підшлункової залози (ПЗ) Т3N0M0 в об'ємі дистальної резекції ПЗ зі спленектомією в перитонеальному змиві в кінці операції, до ушивання лапаротомної рани було виявлено ІПК. В п/о періоді хвора ХТ не отримувала у зв'язку з соціально обтяженим анамнезом. При контрольному візиті через 1 рік СА-19.9 = 14.83 Од/мл, на МРТ ОЧП – дані за рецидив, перитонеальну дисемінація, метастазування відсутні. В одного хворого (Т3N1M0) з позитивними знахідками в перитонеальних змивах було встановлено метакхронні метастази в печінку на 12 місяці спостереження без ознак перитонеального карцинозу, він помер від прогресування основної хвороби на 21 місяці спостереження. Другий хворий (Т2N0M0) живе без ознак рецидування 18 місяців.

В рекомендаціях NCCN зазначено, що прогноз радикально оперованих хворих на РПЗ, у яких в інтраопераційних перитонеальних змивах, цитологічно виявляють пухлинні клітини є еквівалентним до тих, що мають метастатичну форму хвороби з посиланням тільки на одне дослідження групи Ferrone CR [1].

До цього дослідження залучено 462 хворих на РПЗ, з них 217 хворих (47%) - радикально оперовані, 245 хворим (53%) не було виконано радикальних втручань з причини метастатичної, або локально-поширеної форми РПЗ, що було встановлено при первинній хірургічній ревізії. Змиви брали під час ревізії з 3 зон, як в нашому дослідженні. Цитологічне підтвердження пухлинних клітин в перитонеальних змивах було отримано у 17% (77/462) хворих. Серед нерадикально оперованих хворих позитивні перитонеальні змиви не впливали на виживаність цих хворих. Серед радикально оперованих хворих частота позитивних перитонеальних змивів становила 5% (10/217). Різниця 2-річної виживаності у останніх дорівнювала 23% з 117 з негативною цитологією і 12% з 10 у хворих з позитивною цитологією,  $p=0,006$ . Такий показник в цьому дослідженні співпадає з 2-річною виживаністю хворих з метастатичним РПЗ (загальною кількістю 150), яких не було радикально оперовано.

На наш погляд, критику, по-перше, викликає відсоткова кількість хворих, що вижили з позитивною цитологією: 12% від 10. Мабуть, автори мали на увазі, що 2 роки прожив тільки 1 хворий з 10. По-друге, серед цих 10 пацієнтів у 8 виявлено метастази в регіонарних лімфовузлах, що власно саме є незалежним фактором, який погіршує виживаність, водночас посиляє частоту уражень лімфовузлів у хворих з негативною цитологією для адекватного порівняння ми в статті не знаходимо. Таким чином, на наш погляд, висновок про те, що прогноз радикально оперованих хворих на РПЗ з цитологічно позитивними перитонеальними змивами можна прирівняти до таких з метастатичним РПЗ не є достатньо обґрунтованим. Підтверджує нашу думку Meszoely IM з співавторами [3], які провели дослідження перитонеальних змивів у 135 радикально оперованих хворих на РПЗ. У 13 з них (9,6%) змиви виявились позитивними. При порівнянні медіани часу до настання рецидиву та медіани загальної виживаності хворих з позитивними й негативними змивами між ними не було встановлено статистично значної різниці.

## **ВИСНОВКИ**

Наш досвід показав, що імуноцитохімічне дослідження перитонеальних змивів, незважаючи на більшу його чутливість і специфічність, в порівнянні з рутинним цитологічним дослідженням, на сучасному етапі не може бути використане для оцінки інтраопераційної перитонеальної дисемінації РПЗ та прогнозу радикально-оперованих хворих на РПЗ. Враховуючи досвід останніх світових досліджень та наші критичні зауваження, наявність пухлинних клітин РПЗ в перитонеальних змивах не є протипоказом до радикальної операції в потенційно резектабельних випадках. Довгострокову виживаність можна досягти у хворих на РПЗ, навіть за наявності ракових клітин в перитонеальних змивах, за умов адекватного мультиmodalного лікування.

## Література

1. The influence of positive peritoneal cytology on survival in patients with pancreatic adenocarcinoma / Ferrone C.R., Haas B., Tang L. [et al.] // J. Gastrointest. Surg. – 2006. – Vol.10. – P.1347-1353.
2. Гетерогенность циркулирующих опухолевых клеток / А.А. Ковалев, Т.В. Грудинская, Т.П. Кузнецова [с соавт.] // Онкология. 2012. - Т.14. - С. 126-129.
3. Peritoneal cytology in patients with potentially resectable adenocarcinoma of the pancreas./ Meszoely I.M., Lee J.S., Watson J.C. [et al.] // Am Surg. – 2004. –Vol. 70, N 3.– P.208-213.
4. Prognostic significance of free gastrointestinal tumor cells in peritoneal lavage detected by immunocytochemistry and polymerase chain reaction./ Broll R.1., Weschta M., Windhoevel U. [et al.] // Langenbecks Arch Surg. – 2001. – Vol. 386, N 4. – P. 285-292.

**О.И. Дронов, С.В. Земсков, Д.И. Хоменко**

**Собственный опыт определения изолированных опухолей клеток в перитонеальных смывах больных раком поджелудочной железы  
Национальный медицинский университет имени А.А.Богомольца**

**Введение.** Клиническое значение изолированных опухолевых клеток (ИОК) в перитонеальных смывах радикально оперированных больных раком поджелудочной железы (РПЖ) до сих пор не определено.

**Цель.** Оценить влияние ИОК в перитонеальных смывах на общую выживаемость (ОВ), безрецидивную выживаемость (БВ) больных РПЖ цитологическим и иммуноцитохимическим методом (ИЦХ), а также влияние хирургического вмешательства на перитонеальную диссеминацию РПЖ.

**Материалы и методы.** В исследование последовательно было вовлечено 22 радикально оперированных пациента с РПЖ. У всех пациентов РПЖ был гистологически подтвержден. Все пациенты получали адъювантную химиотерапию. Во время операции смывы брали из 3 зон в начале операции и в конце, перед установкой дренажей. Из клеточного материала перитонеальных смывов готовили парафиновые блоки. Цитологические препараты окрашивали гематоксилин-эозином и ИЦХ. Использовали моноклональные антитела к СЕА (клон II-1, ДАКО, Дания), к СА 19-9 (клон С241:5:1:4, Diagnostic Biosystems, США).

**Результаты.** Ни у кого из 22 пациентов в начале операции не было обнаружено ИОК в перитонеальных смывах. У 2 пациентов ИЦХ методом были обнаружены ИОК в конце операции. При анализе ОВ и БВ не было установлено влияния этих находок на прогноз пациентов. Медиана БВ для всей группы составила 12 месяцев.

**Выводы.** ИЦХ и цитологическое исследование преитонеальных смывовна современном этапе не может быть использовано для оценки интраоперационной перитонеальной диссеминации РПЖ и прогноза радикально оперированных пациентов с РПЖ.

**Ключевые слова:** определение, изолированные опухолевые клетки, перитонеальные смывы, рак, поджелудочная железа.

**O. I. Dronov, S.V.Zemskov, D.I. Khomenko**  
**Own experience in defining isolated tumor cells in**  
**the peritoneal lavage of pancreatic cancer patients**  
**O.Bohomolets National Medical University**

**Intoduction.** Clinical role of isolated tumor cells (ITC) in peritoneal lavage of pancreatic cancer (PC) patients is disputable.

The aim of this study was to evaluate the influence of ITC in peritoneal lavage of PC patients after curative resection on overall survival (OS) recurrence free (RFS) survival and investigate the role of surgery in peritoneal dissemination of PC.

**Materials and methods.** 22 resected patients with PC were consequently involved into the study. PC was proved histologically in all cases. All patients underwent adjuvant chemotherapy. Median age was 63 (45-74) years. Peritoneal lavage was aspirated from 3 areas intraoperatively. Aspiration was performed at laparotomy and at the end of surgery. Paraffin blocks were made of the aspirates sediment. Cytological samples were investigated histologically and immunocytochemically (ICC). CEA monoclonal antibodies (MAB) (clone II-1, DAKO, Danmark) and CA 19-9 MAB assays (clone C241:5:1:4, Diagnostic Biosystems, USA) were applied.

**Results and discussion:** ITC were registered in none of 22 patients at laparotomy. In 2 patients ITC were identified by ICC. No influence on patients prognosis was seen when analyzing OS and RFS. Median RFS was 12 months.

**Conclusion.** ICC and cytological examination can not be used as an adequate tool in evaluation of intraoperative peritoneal dissemination of PC or in prognosis of resected patients with PC.

**Key words:** definition, isolated tumor cells, peritoneal lavage, cancer, pancreas.

**Відомості про авторів:**

**Дронов Олексій Іванович** - професор, зав. кафедри загальної хірургії №1 НМУ імені О.О.Богомольця. Адреса: Київ, пр. Голосіївський, 59Б, тел.: (044) 524-59-42.

**Земсков Сергій Володимирович** – к.мед.н., кафедра хірургії №1 НМУ імені О.О.Богомольця.

**Хоменко Дмитро Іванович** - старший лаборант кафедри загальної хірургії №1 НМУ імені О.О. Богомольця.