

© Коллектив авторов, 2013  
УДК 616.24-006.6-076

А. И. Арсеньев, А. А. Барчук, Е. А. Желбунова, Д. Е. Мацко, А. С. Барчук,  
Е. В. Левченко, К. Э. Гагуа, К. А. Костицын, С. А. Тарков, А. О. Нефёдов

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ, ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДИСПЛАЗИЙ, ПРЕИНВАЗИВНЫХ И ИНВАЗИВНЫХ ФОРМ ЦЕНТРАЛЬНОГО РАКА ЛЁГКОГО

ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России  
(дир. — проф. А. М. Беляев), Санкт-Петербург

**Ключевые слова:** рак лёгкого, бронхоскопия, биопсия, аутофлюоресценция

**Введение.** Рак лёгкого (РЛ) занимает одно из первых мест в мире по показателям заболеваемости злокачественными новообразованиями — более 1,3 млн случаев РЛ, что составляет 12% от всех злокачественных новообразований, при этом погибают от него более 1,2 млн человек (18% от всех смертей от рака и 2,2% от общей смертности). Соотношение «заболеваемость — смертность» при РЛ самое неблагоприятное — умирают 95,6% заболевших [1, 5, 7]. Остающаяся нерешённой на сегодняшний день проблема ранней диагностики РЛ приводит к тому, что основная масса больных (более 75%) поступают в специализированные лечебные учреждения в III–IV стадии заболевания. Статистические данные свидетельствуют, что РЛ является одним из наиболее часто встречающихся и характеризующихся неблагоприятным прогнозом онкологических заболеваний [2, 5, 9].

Эффективность клинических мероприятий напрямую связана со стадией, при которой обнаружен опухолевый процесс, а решение проблемы улучшения результатов лечения РЛ лежит на пути его раннего выявления [2, 5, 7–9]. Очевидно, что даже восстановление системы ежегодного профилактического флюорографического обследования

и использование такой перспективной диагностической модели как скрининг РЛ с помощью низкодозной КТ окажутся недостаточно эффективны при выявлении ранних форм центрального РЛ. Известно, что чёткие рентгенологические признаки этой клинико-анатомической формы заболевания проявляются достаточно поздно, а решающая роль в её распознавании отводится эндоскопической диагностике с обязательной морфологической верификацией опухолевого процесса [2, 3, 6, 8, 9].

На современном этапе развития онкологии именно проведение гистологического, иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследования образцов опухолевой ткани позволяет адекватно оценить предиктивные и прогностические факторы и определить рациональный алгоритм специального лечения, индивидуализировав его. Однако при этом возникают затруднения, связанные со сложностями оценки значительного количества различных параметров в небольших образцах тканей, нередко повреждённых в процессе их получения. Отдельную проблему представляет собой определение точного места для выполнения прицельной биопсии даже при распространённых процессах, когда участки опухолевого роста в бронхах могут сочетаться или чередоваться с зонами реактивных и диспластических изменений. А при

### Сведения об авторах:

Арсеньев Андрей Иванович (e-mail: andrey.arseniev@mail.ru), Барчук Антон Алексеевич (e-mail: anton.barchuk@gmail.com), Желбунова Елена Алексеевна (e-mail: lelamorph@mail.ru), Мацко Дмитрий Евгеньевич, Барчук Алексей Степанович (e-mail: anton.barchuk@gmail.com), Левченко Евгений Владимирович (e-mail: onco.lev@gmail.com), Гагуа Кетеван Элдуджаевна (e-mail: kety87@mail.ru), 197110, Костицын Кирилл Александрович (e-mail: ars@biokemis.com), Тарков Сергей Александрович (e-mail: tarkov.s.a@mail.ru), Нефёдов Андрей Олегович (e-mail: herurg78@mail.ru), Научно-исследовательский институт онкологии им. Н. Н. Петрова, 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68

целенаправленном поиске и выявлении дисплазий, преинвазивного и микроинвазивного рака респираторного эпителия возможности традиционного бронхоскопического исследования и вовсе следует признать весьма ограниченными [2, 4–6, 9].

Таким образом, оптимизация методов эндоскопической и морфологической диагностики центрального РЛ является одним из приоритетных направлений современной онкологии, а многие аспекты рационального подхода к разрешению этой актуальной проблемы остаются нерешёнными и требуют дальнейшего изучения.

Цель исследования — определить морфологические, иммуногистохимические и спектральные характеристики дисплазий, преинвазивных и инвазивных форм центрального РЛ при использовании комбинированного эндоскопического метода диагностики, включающего выполнение бронхоскопии и спектрометрии в отражённом и аутофлюоресцентном режимах.

**Материал и методы.** Клинические наблюдения включали проспективные данные обследования 167 больных, которым было выполнено комбинированное эндоскопическое исследование. Среди пациентов преобладали мужчины — 111 (66,5%), в то время как женщин было лишь 56 (33,5%). Средний возраст пациентов в изучаемой группе составил 59,4 года. Диагноз РЛ, по результатам бронхобиопсии, был подтверждён у 25,1% (n=42) больных, а отвергнут — у 74,9% (n=125).

Обязательным этапом комбинированного эндоскопического метода была морфологическая верификация процесса, а перед выполнением щипцовой биопсии производилась обязательная спектрометрия из подозрительного участка. В общей сложности при реализации разработанного алгоритма у 167 больных выполнено 620 биопсий. Проведённый морфологический анализ всех 620 биопсий показал, что 20,0% (95% CI:17,0–23,4%; n=124) микропрепаратов были по разным причинам расценены как недостаточно информативные, что закономерно было обусловлено небольшими размерами изучаемых участков бронхиальных стенок и артефициальными изменениями в них, связанными с раздавливанием тканей при щипцовой биопсии.

В 47,6% случаев микроскопическая картина соответствовала нормальному строению бронхиальной стенки либо реактивным изменениям в ней. Гиперплазия респираторного эпителия обнаружена в 22,9% микропрепаратов, метаплазия — в 2,3% (n=14), дисплазия — в 1,5% (n=9). Инвазивный рак обнаружен в 36 биоптатах, что составило 5,7% от общего количества образцов. Таким образом, предопухолевым и опухолевым изменениям соответствовал 201 микропрепарат — 32,4% от всего морфологического материала и 40,5% — от объёма всех информативных биоптатов (n=496).

Комбинированный эндоскопический метод подразумевал использование современной высокотехнологичной эндоскопической системы «ClearVu Elite», разработанной в лаборатории компании «Perceptonix Medical Inc.» в сотрудничестве с Противораковым Агентством Британской Колумбии

(Канада) и при непосредственном участии сотрудников НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова. Сущность метода заключалась в последовательном проведении бронхоскопии и спектрометрии, в отражённом и аутофлюоресцентном режимах.

В качестве подозрительных были определены участки бронхиальной стенки, хоть как-то отличающиеся от обычной картины. Основным эндоскопическим признаком раннего центрального РЛ и предопухолевых изменений была определена локальная гиперемия стенки бронха либо в обоих режимах, либо только в аутофлюоресцентном, тогда этот признак визуализировался как красное свечение на зеленом фоне. На выполнение эндоскопических исследований, согласно принятому диагностическому алгоритму, требовалось дополнительно не более 3–5 мин к обычному времени, необходимому для выполнения стандартной фибробронхоскопии.

В последующем микропрепараты, соответствующие критериям одного из этапов канцерогенеза (n=201), были подвергнуты углублённому морфологическому и иммуногистохимическому исследованию. Оценивались тенденции ангиогенеза (CD31 и CD34), пролиферативная активность (Ki-67) и уровень апоптоза (P53). По уровню экспрессии EGFR оценивали пролиферативную активность, способность к дифференцировке, инвазии и метастазированию, индукции ангиогенеза и опухолевой трансформации респираторного эпителия.

Для обеспечения объективного контроля полученных результатов биопсийный материал одновременно исследовался в двух центрах. Первичная подготовка микропрепаратов и получение гистологического заключения, согласно градации WHO/IASLC, выполнялись в отделе морфологии опухолей НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова. Затем гистологические микропрепараты направлялись на пересмотр в патолого-анатомическую лабораторию Противоракового Агентства Британской Колумбии (Канада), а в случае несовпадения диагноза препараты в третий раз пересматривались в независимой лаборатории.

Для обработки спектрометрических данных была использована математическая модель, описывающая спектральные показатели ткани, предложенная Y. Fawzy (2008 г.) [5]. Вычислялись 4 основные спектральные характеристики: 1) доля объёма крови в ткани (BI-V); 2) параметр насыщения крови кислородом ( $O_2\text{sat}$ ); 3) содержание сатурированного гемоглобина ( $BI-V \times O_2\text{sat}$ ;  $HbO_2$ ); 4) содержание десатурированного гемоглобина [ $BI-V \times (1 - O_2\text{sat})$ ]; 5) показатель Infra-Red Green Ratio (IRG), соответствующий отношению средней интенсивности флюоресцентного спектра в околоинфракрасной области (715–835 нм) к средней интенсивности в зеленой области (495–515 нм) (рассчитывался в аутофлюоресцентном режиме). Биномиальный доверительный интервал (CI) (95 и 99%) для представленных значений был рассчитан по методу Клоппера—Пирсона. Точный тест Фишера применялся при установлении критерия независимости для таблиц сопряженности признаков. Для расчета корреляций между показателями был использован коэффициент Спирмена. Часть исследования основана на анализе характеристических (ROC) кривых.

**Результаты и обсуждение.** Проведённый анализ безопасности системы продемонстрировал, что ни у одного пациента не

было клинически значимых осложнений, потребовавших проведения лечебных мероприятий, а метод, соответственно, не сопряжен с каким-либо дополнительным риском для пациентов. Такие побочные явления (общая слабость, головокружение, тошнота, длительный дискомфорт при глотании) отмечены у 47,3% (n=79) больных, что вообще характерно для обычных фибробронхоскопий под местной анестезией, а сравнительный анализ с собственными (p=0,03) и литературными данными (p=0,022) не выявил статистически значимых различий в их частоте.

Чувствительность комбинированного эндоскопического метода составила 94,74% при специфичности 79,95% и весьма высокой прогностической ценности отрицательного эндоскопического диагноза — 99,4%.

Установлено, что спектрометрические показатели в группах больных с инвазивным опухолевым ростом (n=36) и диспластическими изменениями в бронхиальных стенках (n=9) имели статистически значимые различия для коэффициентов  $O_2\text{sat}$  (p=0,026), Hb (p=0,019) и IRG (p=0,001). Ещё более показательным оказалось сопоставление таких объединённых групп, как норма/реактивные изменения/гиперплазия/ метаплазия против дисплазия/преинвазивный рак, CIS/инвазивный рак — различия между всеми спектрометрическими показателями были однозначно статистически значимыми (p<0,001).

Сопоставление спектрометрических показателей группы с диспластическими и преинвазивными (CIS — cancer in situ) изменениями в бронхах (дисплазия/CIS) и объединённой группы, включающей норму/реактивные изменения/гиперплазию/ метаплазию, позволило доказать статистическую значимость полученных различий для всех предлагаемых параметров (для  $O_2\text{sat}$  p=0,041211, для остальных коэффициентов p<0,0001). Использование спектрометрических коэффициентов (BI-V,  $O_2\text{sat}$ , Hb $O_2$ , Hb, IRG) позволяет обнаружить статистически значимые (p=0,00042–0,00037) различия между опухолевыми и прочими изменениями бронхиальных стенок, точно локализовать подозрительные участки для выполнения прицельной биопсии. Проведённые расчёты показали, что использование комбинированного эндоскопического метода со спектрометрией в отражённом и аутофлюоресцентном режимах позволяет уменьшить количество ненужных биопсий на 40% без потери чувствительности и на 70% — при потере чувствительности в 10%, тем самым минимизировав травматичность исследования и существенно

снизив нагрузку на морфологические подразделения.

Для наиболее информативных спектрометрических коэффициентов были построены характеристические (ROC) кривые и рассчитаны площади под ними, а различия для всех показателей оказались статистически значимы. Соответственно площади под характеристическими кривыми AUC группы «инвазивные опухоли/CIS/дисплазии» составили для BI-V s=0,76, для  $dO_2$  s=0,83, для IRG s=0,83, а при использовании регрессионного анализа ( $dO_2$  и IRG) s=0,89 несомненно, статистически значимо отличаясь от случайных показателей ( $H_0$ : Area $\leq$ 0,5;  $H_1$ : Area>0,5).

В соответствии с современными представлениями, канцерогенез респираторного эпителия проходит несколько этапов: 1) гиперплазия (обратимый процесс); 2) метаплазия; 3) дисплазия; 4) преинвазивный рак (carcinoma in situ — CIS); 5) инвазивный рак. Исходя из этой модели, в исследовании был произведён сравнительный анализ гистологических и иммуногистохимических характеристик каждого из последовательных этапов, критериям которых соответствовало 40,5% всех информативных образцов (n=201).

Большинство образцов бронхиальных стенок — (70,6 $\pm$ 3,2)% (n=142) пришлось на те или иные варианты гиперплазии слизистой оболочки бронхов: (6,9 $\pm$ 1,7)% (n=14) — на метаплазию, (4,5 $\pm$ 1,5)% (n=9) — на дисплазию различной тяжести и CIS, а (17,9 $\pm$ 2,7)% (n=36) — на инвазивный рак бронхов.

При оценке тенденций ангиогенеза отмечено симметричное нарастание уровня экспрессии CD31 и CD34 от этапа к этапу канцерогенеза в зависимости от степени выраженности патологии бронхиальной стенки. Так, если при гиперплазии респираторного эпителия уровень экспрессии CD31 и CD34 оценивался в 1 балл, то при метаплазии и дисплазии он достигал 1,5 баллов, при CIS — 2 баллов, а при инвазивном раке увеличивался до 2,5 баллов (p=0,031–0,042). Уровень экспрессии EGFR при гиперплазии был минимальным (1 балл), для процессов метаплазии, дисплазии и CIS был характерен одинаковый средний уровень в 2 балла, а при инвазивных карциномах он увеличивался до 3 баллов (p=0,029–0,044). Прослежена чёткая динамика нарастания пролиферативной активности по мере усугубления патологических процессов в бронхиальной стенке. Если при гиперплазии слизистой оболочки бронхов уровень Ki-67 не превышал 6%, то на этапе метаплазии и дисплазии он статистически

значимо ( $p=0,002-0,003$ ) повышался до 32 и 30% соответственно. Причём существенных различий в уровне экспрессии Ki-67 между метаплазией и дисплазией не было ( $p>0,1$ ). Однако на этапе собственно опухолевого процесса вновь отмечено значительное увеличение ( $p=0,002-0,004$ ) пролиферативной активности (Ki-67 — 60%) в равной степени для CIS и инвазивного рака. Ещё более показательными оказались данные, полученные при оценке уровня апоптоза в биоптатах бронхиальной стенки. Так, если при гиперплазии респираторного эпителия уровень экспрессии P53 был менее 1%, то при метаплазии он несколько увеличивался (до 5%;  $p=0,08$ ), на этапе дисплазии стремительно нарастал до 30% ( $p=0,0009$ ), а при CIS и инвазивном раке вновь делал статистически значимый ( $p=0,0006$ ) скачок до 80 и 70% соответственно. Причём уровень апоптоза после завершения опухолевого развития существенно не различался между CIS и инвазивным раком ( $p=0,07$ ).

Литературные данные свидетельствуют о том, что в группе риска развития РЛ в России находятся не менее 9 млн человек (курильщики старше 55 лет). Предварительные прогнозы, основанные как на собственных расчётах, так и на данных крупных рандомизированных исследований [2, 6, 8, 9], дают основания надеяться, что более широкое внедрение современных скрининговых программ снизит смертность от РЛ на 15–20%, что позволит спасти жизни более чем 10 000 человек.

Основными направлениями оптимизации скрининга РЛ в современных условиях следует признать: 1) научно обоснованное формирование групп риска; 2) стандартизация подходов к диагностическим и лечебным мероприятиям и повышение контроля за их качеством (обучение специалистов); 3) создание и внедрение новых высокотехнологичных методов диагностики (низкодозная КТ, автоматизированная цитометрия, новые эндоскопические методы).

**Выводы.** 1. Существующий алгоритм диагностики центрального РЛ, особенно ранних его форм, целесообразно дополнить проведением комбинированного эндоскопического исследования доступных обзорно бронхов и трахеи, включающего бронхоскопию в обычном свете, отраженную спектрометрию, аутофлюоресцентную бронхоскопию и спектрометрию. Предлагаемый метод продемонстрировал высокую диагностическую информативность, безопасность, простоту практической реализации при отсутствии дополни-

тельного риска или существенного дискомфорта для пациентов, высокую чувствительность при достаточной специфичности.

2. Получаемые в ходе комбинированной эндоскопической диагностики патологии воздухоносных путей образцы бронхиальных стенок (биоптаты) требуют тщательной подготовки к гистологическому, а в ряде случаев иммуногистохимическому исследованию в связи со сложностями интерпретации данных, обусловленными небольшими размерами биоптатов и артефициальными изменениями.

3. При дифференциальной диагностике реактивных, предопухолевых, преинвазивных и инвазивных изменений в бронхиальной стенке проведение иммуногистохимического исследования с оценкой пролиферативной активности, уровня ангиогенеза и апоптоза (CD31, CD34, EGFR, Ki-67, P53) позволяет делать объективные заключения и избегать ошибочных интерпретаций микроскопической картины.

4. Для точного и обоснованного определения подозрительных в отношении центрального РЛ участков бронхиальных стенок и прицельного получения образцов ткани в ходе комбинированной бронхоскопии целесообразно использовать спектрометрические коэффициенты (BI-V,  $O_2\text{sat}$ ,  $HbO_2$ , Hb, IRG), что позволит снизить количество биопсий, минимизировать травматичность процедуры и уменьшить нагрузку на морфологические подразделения.

5. Помимо реализации диагностического потенциала, комбинированное эндоскопическое исследование может быть использовано как метод объективного эндоскопического контроля эффективности химиолучевого лечения при центральном РЛ для определения истинной границы опухолевой инфильтрации слизистой оболочки бронхов и планирования объема последующего оперативного вмешательства.

6. Для совершенствования скрининга и ранней диагностики РЛ в перспективе целесообразно предложить создание отдельных специализированных централизованных диагностических структур либо подразделений, функционирующих в условиях ныне существующих диагностических центров, использующих весь спектр современных методов раннего выявления злокачественных новообразований.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Мерабишвили В. М., Щербук Ю. А. Онкологическая служба в Санкт-Петербурге и районах города в 2008 году (заболевае-

- мость, смертность, выживаемость). Ежегодник Популяционного ракового регистра. СПб., 2009. 240 с.
2. Bach P. B., Jett J. R., Pastorino U. et al. Computed tomography screening and lung cancer outcomes // JAMA. 2007. Vol. 7. 297(9). P. 953–961.
  3. Becker H. D. Bronchoscopy: the past, the present, and the future // Clin. Chest Med. 2010. Vol. 31(1). P. 11–18.
  4. Chapman A. D., Kerr K. M. The association between atypical adenomatous hyperplasia and primary lung cancer // Br. J. Cancer. 2000. Vol. 83. P. 632–636.
  5. Fawzy Y. S., Zeng H. Determination of scattering volume fraction and particle size distribution in the superficial layer of a turbid medium by using diffuse reflectance spectroscopy // Appl. Opt. 2006. Vol. 45(16). P. 3902–3912.
  6. Ganti A.K, Mulshine J. L. Lung cancer screening // Oncologist. 2006. Vol. 11(5). P. 481–487.
  7. Gilbert S., Luketich J. D., Christie N. A. Fluorescent bronchoscopy // Thorac. Surg. Clin. 2004. Vol. 14(1). P. 71–77.
  8. Jemal A., Siegel R., Ward E. et al. Cancer statistics, 2010 // CA Cancer J. Clin. 2010. Vol. 58(7). P. 71–96.
  9. Jett J. R., Midthun D. E. Commentary: CT Screening for Lung Cancer – Caveat Emptor // Oncologist. 2008. Vol. 13(4). P. 439–444.
  10. Lam S., MacAulay C., leRiche J. C., Palcic B. Detection and localization of early lung cancer by fluorescence bronchoscopy // Cancer. 2000. Vol. 1. 89(11). P. 2468–2473.

Поступила в редакцию 22.05.2013 г.

A.I. Arseniev, A. A. Barchuk, E.A Zhelbunova, D. E. Matsko, A. S. Barchuk, E. V. Levchenko, K. E. Gagua, K. A. Kostitsyn, S. A. Tarkov, A. O. Nefyodov

#### **MORPHOLOGICAL, IMMUNOHISTOCHEMICAL AND SPECTRAL CHARACTERISTICS OF DYSPLASIA, PREINVASIVE AND INVASIVE FORMS OF LUNG CANCER**

N. N. Petrov research institute of oncology

An analysis of modern methods of diagnostics such as morphological, immunohistochemical and spectral, which included the bronchoscopy and spectrometry by using reflectance and autofluorescent regime, was made. The data involved the results of prospective follow-up study of 167 patients (620 biopsies). An obligatory spectrometry of suspicious area was carried out before the forceps biopsy. The microslides, which met the requirements of criteria of one of the carcinogen steps (n=201), were subjected to the in-depth morphological and immunohistochemical investigations. The tendency of angiogenesis (CD31 and CD34), proliferative activity (Ki-67), level of apoptosis (P53), EGFR expression were estimated. The sensitivity of combined endoscopic method was 94,74% by specificity 79,95% and high prognostic value of negative endoscopic diagnosis — 99,4%.

**Key words:** lung cancer, biopsy, autofluorescence, bronchoscopy