

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет»

Минздрава России

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

Алтайский филиал

**ГБУЗ «Бурятский республиканский клинический
онкологический диспансер»**

На правах рукописи

Чимитов Анатолий Агванович

**РОЛЬ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ РАКОВЫХ КЛЕТОК В ДИАГНОСТИКЕ
И ЛЕЧЕНИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ**

14.01.12- онкология

**Диссертация на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

Научный консультант:

Лазарев Александр Федорович

доктор медицинских наук, профессор.

Барнаул 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
Глава 1. ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ РАКОВЫЕ КЛЕТКИ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ИХ ЗНАЧЕНИЕ В ОНКОЛОГИИ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ РАЗВИТИЯ МЕДИЦИНЫ	10
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	38
2.1. Характеристика материала исследования	38
2.2. Методы исследования	41
Глава 3. Гемофилтрацитологическое исследование циркулирующих раковых клеток в венозной крови больных злокачественными новообразованиями.	43
3.1. Устройство для гемофилтрацитологического исследования на наличие ЦРК в венозной крови при подозрении на злокачественное новообразование в организме.	43
3.2. Гемофилтрацитологическое исследование периферической венозной крови у больных с подозрением на злокачественные новообразования	48
3.3. Сравнительная оценка результатов исследования на наличие ЦРК в венозной крови гемофилтрацитологическим и иммунофлуоресцентным методами.	87
Глава 4. Роль гемофилтрацитологического исследования периферической венозной крови у радикально оперированных больных раком легкого, желудка и толстой кишки в раннем послеоперационном периоде	94
Глава 5. Отдалённые результаты комбинированного лечения злокачественных новообразований легкого, желудка и толстой кишки с использованием данных гемофилтрацитологического исследования периферической венозной крови	139
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	164
ВЫВОДЫ	174
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	176
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	177
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	180

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Проблема диагностики и лечения злокачественных новообразований остается актуальной, вследствие высокой заболеваемости, распространенности и смертности [1-3]. Лишь немногим более половины больных из состоящих на диспансерном учете с первично установленными злокачественными заболеваниями наблюдаются 5 лет и более [3].

Почти четвертая-пятая часть больных злокачественными новообразованиями выявляются с запущенным опухолевым процессом. [3]. Несмотря на значительное переоснащение медицинским оборудованием лечебно-профилактических учреждений, резкого сдвига в сторону раннего выявления злокачественных новообразований не произошло [3]. Это обосновывает поиски новых подходов к диагностике злокачественных новообразований.

Не решенной проблемой остается ранняя диагностика злокачественных новообразований, особенно до визуализации, что обуславливает при выявлении высокий удельный вес опухолей III-IV стадий процесса.

Не менее трудной проблемой является профилактика и ранняя диагностика рецидивов у радикально оперированных больных, требующая её решения. Все это вновь вызывает интерес на новом уровне к проблеме иммунобиологии злокачественных новообразований, молекулярным основам опухолевого роста и трансформации клеточного клона.

Одним из направлений в последние годы были разработки получения и оценки опухолевых маркеров [4,5]. Новым аспектом в ранней диагностике возможного распространения опухолевого процесса является выявление в периферической крови циркулирующих раковых клеток (ЦРК) [6-11], что имеет важное значение в принятии решения о применении химиотерапии и т.д. Проблема представляет интерес не только с позиций диагностики циркулирующих раковых клеток, но и, решения вопроса о назначении полихимиотерапии, определения критериев для динамического наблюдения, объективизации суждения об эффективности лече-

ния, прогноза течения процесса. Осуществление вышеуказанных задач обеспечивается процессом технологии диагностики циркулирующих раковых клеток.

Цель исследования

Улучшение диагностики и лечения злокачественных новообразований путем выявления циркулирующих раковых клеток в периферической венозной крови с помощью гемофилтратоцитологического исследования для принятия решения о применении адъювантной полихимиотерапии, прогноза течения процесса у радикально оперированных больных.

Задачи исследования

1. Разработать и оценить метод диагностики циркулирующих раковых клеток в периферической венозной крови, интерпретацию результатов исследования.

2. Определить диагностическую значимость циркулирующих раковых клеток в периферической крови у больных злокачественными новообразованиями.

3. Оценить эффективность трёхлетнего наблюдения за радикально оперированными больными раком легкого, желудка, толстой кишки в зависимости от применения адъювантной химиотерапии с учетом выявления ЦРК, рецидива опухоли, летальности.

4. Исследовать влияния годичных этапов диспансерного наблюдения за радикально оперированными больными на основе выявления у них ЦРК, рецидива опухоли, летальности.

5. Определить взаимосвязь выявления ЦРК в периферической венозной крови у радикально оперированных больных раком легкого, желудка и толстой кишки с рецидивами злокачественных новообразований.

6. Исследовать влияние адъювантной полихимиотерапии у радикально оперированных больных раком легкого, желудка и толстой кишки на трехлетнюю общую и безрецидивную выживаемость.

7. Определить темпы убывания наблюдаемых радикально оперированных больных раком легкого, желудка и толстой кишки с наличием в периферической крови ЦРК с учетом адъювантной химиотерапии на протяжении трех лет после

операции.

Научная новизна

Разработан ряд новых идей, обогащающих концепции совершенствования диагностики и лечения злокачественных новообразований на основе гемофилтритроцитологического метода исследования циркулирующих раковых клеток у онкологических больных, включая радикально оперированных.

Повышена точность исследований, благодаря усовершенствованию технологий выделения ЦРК, защищенной патентами (патент на изобретение №24144710, Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам, зарегистрированным в Государственном реестре изобретений РФ 20.03.2011. Изобретение относится к физиологии и медицине. Патент на изобретение №2425385 на способ определения раковых клеток в периферической крови у больных с подозрением на злокачественные новообразования Роспатента, зарегистрированном в Государственном реестре изобретений РФ 27 июля 2011 года).

Предложена оригинальная технология гемофилтритроцитологического исследования периферической венозной крови.

Доказана возможность диагностики циркулирующих раковых клеток на основе гемофилтритроцитологического исследования периферической венозной крови у больных злокачественными новообразованиями с использованием современных технологий.

Установлено, что по цитоморфологическим признакам выделенных атипичных клеток можно определить их опухолевую природу. Показано, что применение гемофилтритроцитологического исследования периферической венозной крови у радикально оперированных больных злокачественными новообразованиями легких, желудка, толстой кишки позволяет определять показания к адъювантной полихимиотерапии, оценить ее эффективность, влияние на последующее выявление ЦРК, рецидивы опухоли, летальность, трехлетнюю общую и безрецидивную выживаемость.

Теоретическая и практическая значимость

Сформулированы новые положения и разработаны новые методики, вносящие вклад в понимание путей совершенствования ранней диагностики при подозрении на наличие злокачественных новообразований, объективизацию показаний к адъювантной полихимиотерапии у радикально оперированных больных раком легкого, желудка, толстой кишки, прогноза заболевания и коррекцию лечебной тактики.

Определена взаимосвязь между выявлением в периферической крови циркулирующих раковых клеток у радикально оперированных больных злокачественными новообразованиями и рецидивами процесса.

Установлена частота выявления циркулирующих раковых клеток в периферической венозной крови у больных злокачественными новообразованиями, включая радикально оперированных больных раком легкого, желудка, толстой кишки на 15 и 21 день после операции, а также в течение последующих 3-лет при применении адъювантной полихимиотерапии и отказе от неё.

Выявление циркулирующих раковых клеток в периферической венозной крови у больных с подозрением на злокачественные новообразования способствует установлению диагноза, а при его подтверждении может рассматриваться в качестве показания к адъювантной полихимиотерапии у радикально оперированных больных, использоваться для контроля возможного у них рецидива при диспансерном наблюдении.

Применение разработанной технологии выявления циркулирующих раковых клеток у больных с подозрением на злокачественные новообразования позволило в условиях регионального онкологического диспансера на модели Бурятского онкологического республиканского диспансера увеличить долю больных с впервые выявленными онкологическими заболеваниями с I-II стадиями в 2014 году до 39,6%, в 2015 г. - до 40,2%, а в 2016 году до 43,2%.

Внедрение в практику основных положений работы обеспечило более объективный подход к назначению адъювантной полихимиотерапии, что способствовало профилактике рецидивов заболевания.

Методология и методы исследования

Исследование носило сравнительный проспективный характер. В основу работы положен значительный клинический материал, включающий 338 больных злокачественными новообразованиями и 173 доноров. Это позволило использовать достаточное количество наблюдений для сравниваемых групп пациентов, здоровых доноров, что обеспечило их сопоставимость.

Примененные методы исследования современные, высокоинформативны, сопоставимы с лучшими образцами, применяемыми в медицине.

Положения, выносимые на защиту

1. Целесообразность диагностики циркулирующих раковых клеток в периферической венозной крови при подозрении на злокачественные новообразования для раннего выявления опухоли, а также у радикально оперированных больных с раком легкого, желудка и толстой кишки на 15 и 21 день после операции для решения вопроса о проведении адьювантной полихимиотерапии.

2. Возможность использования гемофилтрацитологического исследования периферической венозной крови у радикально оперированных больных раком легкого, желудка и толстой кишки в ближайшие 3 года для оценки эффективности адьювантной полихимиотерапии, прогноза клинического течения, диспансерного наблюдения.

3. Необходимость учета при решении вопроса об адьювантной полихимиотерапии у радикально оперированных больных раком легкого, желудка, толстой кишки разной чувствительности к ней видов опухолей: наибольшая - при раке толстой кишки, наименьшая – при раке желудка. Методом выбора для объективизации эффекта полихимиотерапии может быть III-IV уровень повреждения циркулирующих раковых клеток в периферической венозной крови.

4. Целесообразность проведения гемофилтрацитологического исследования периферической венозной крови у радикально оперированных больных раком легкого, желудка, толстой кишки в течение 3 лет, что позволяет в ряде случаев выявить циркулирующие раковые клетки (при раке легкого – у 17,2% больных,

при раке желудка - у 10,9% больных, при раке толстой кишки – у 3,7% больных) и внести коррекцию в лечебную тактику, учитывая возможность возникновения рецидивов через 5,5-6,5 месяцев с момента выявления циркулирующих раковых клеток.

5. Следует учитывать, что у радикально оперированных больных раком легкого, желудка, толстой кишки с определяемыми в периферической крови циркулирующими раковыми клетками адъювантная полихимиотерапия уменьшает статистически значимо частоту последующего выявления циркулирующих раковых клеток, рецидивов только при раке легкого и толстой кишки. Уменьшение летальности отмечается при всех трех видах злокачественных новообразований.

6. Необходимо принимать во внимание, что применение адъювантной полихимиотерапии у радикально оперированных больных раком легкого и толстой кишки с выявляемыми в периферической венозной крови циркулирующими раковыми клетками позволяет в течение трех лет после операции увеличить трехлетнюю общую выживаемость. При раке желудка общая трехлетняя выживаемость не зависит от проведения адъювантной полихимиотерапии.

7. Целесообразно учитывать, что адъювантная полихимиотерапия у радикально оперированных больных раком легкого с выявляемыми в периферической венозной крови циркулирующими раковыми клетками по сравнению с больными раком желудка и толстой кишки увеличивает трехлетнюю безрецидивную выживаемость.

Степень достоверности и апробация результатов.

Анализ результатов проведен с применением современных статистических и других математических методов, применяемых в биологии и медицине. Все исследования носили сравнительный, динамический характер.

Приказом №51-1 главного врача от 15.02.2010 г. гемофилтритроцитологическое исследование крови внедрено в клиническую практику ГБУЗ «Бурятского республиканского клинического онкодиспансера». Как метод морфологической диагностики постоянно применяется в работе централизованной цитологической лаборатории. Кроме того, используется в учебном процессе на кафедрах госпи-

тальной хирургии Сибирского государственного медицинского университета г. Томска и Бурятского государственного университета г. Улан-Удэ.

Результаты исследования были представлены на общероссийских и международных конференциях: на VII съезде онкологов России (29-30 октября 2009г., г. Москва), XIII Российском онкологическом конгрессе (17-19 ноября 2009 г., г. Москва), VI съезде онкологов и радиологов СНГ (1-4 октября 2010г., г. Душанбе, Республика Таджикистан), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (24-26 июня 2009г., г. Казань), на Российской научно-практической конференции с международным участием посвященной 30-летию НИИ онкологии СО РАМН (10-11 сентября 2009г., г. Томск), на итоговом совещании хирургов Министерства здравоохранения Республики Бурятия (в 2010 г.), на заседании Медицинского совета Управления здравоохранения Администрации г. Улан-Удэ (23.03.2011г.), на Международном конгрессе по био-мониторингу окружающей среды (24-26 октября 2013г., г. Касабланка, Марокко), на III съезде хирургов Забайкальского края (19-20 мая 2016 г., г. Чита), на Российской научно-практической конференции с международным участием (30 июня – 01 июля 2016 г. г. Барнаул), на Международной научно практической конференции "Ургентная медицина: Актуальные вопросы и тенденции развития"(29.09.2017г., г.Улан-Удэ, Республика Бурятия).

По теме диссертации опубликовано 26 печатных работы, из них 1 Атлас циркулирующих клеток ЗНО, 17 статей в медицинских журналах, входящих в «Перечень ведущих рецензируемых научных изданий» в т.ч. 6 статей в зарубежной печати.

Глава 1

Циркулирующие раковые клетки в периферической крови и их значение в онкологии на современном этапе развития медицины

Проблема диагностики и лечения злокачественных новообразований остается актуальной в силу высокого уровня заболеваемости и смертности. По данным М.И Давыдова и Е.М. Аксель в 2012 году заболеваемость злокачественными новообразованиями среди мужчин составила 270,9 на 100 000, среди женщин – 208,5 на 100 000, а смертность среди мужчин составила 169,3 на 100 000, среди женщин – 87,6 на 100 000 [1].

В 2016 году заболеваемость злокачественными новообразованиями мужчин в России составила 402,5 на 100 000, а женщин 413,9 на 100 000 . Смертность в 2016 году от злокачественных новообразований среди мужчин составила 234,3 на 100 000, а среди женщин – 173,4 на 100 000 [2].

Распространенность злокачественных новообразований на 100 000 населения в 2016 году составила 2399,1, а ведущими локализациями в общей структуре заболеваемости являлись: трахея, бронхи и легкое (10,1%),желудок(6,2%), ободочная кишка (6,7%) [2].

Выявляемость опухолевых процессов в I-II стадии от числа больных с впервые в жизни установленным диагнозом злокачественного новообразования в России выросла с 53,7%(2015г.) до 54,7%(2016г.). Удельный вес больных с IV стадией опухолевого процесса в 2016г. составил 20,5% (2015г. – 20,4%) [3].

Летальность больных в течение первого года с момента установления диагноза злокачественного новообразования в России практически не изменилась в 2016г.-23,2%(2015г.-23,6%). В 2016 году наблюдалось 53,3% больных более 5 лет от числа больных, состоявших на учете, а в 2015 году этот показатель был равен 52,9% [3].

Современные достижения науки и техники существенно расширили возможности распознавания злокачественных новообразований (ЗНО). Тем не менее, несмотря на широкий арсенал вспомогательных методов исследования врач, зача-

стую, по-прежнему испытывает существенные затруднения в постановке правильного диагноза, что в конечном итоге отражается на результатах лечения.

Именно на этапах обследования больных в поликлиниках и стационарах общей лечебной сети возникает наибольшее количество ошибок в диагностике, следствием которых является задержка и, нередко невозможность оказания им радикальной помощи [12].

Другая основная причина запущенности онкологических больных, обусловлена скрытым атипичным течением болезни. Серьезные трудности возникают при распознавании опухоли, развивающейся на фоне другого патологического процесса. До сих пор, например, значителен удельный вес диагностических ошибок при распознавании рака легкого у больных, страдающих хроническим туберкулезом этого органа [4].

Одним из основных критериев оценки диагностического компонента помощи онкологическим больным в учреждениях общей лечебной сети является показатель запущенности, который в 2015 году в России составил 20,4%, что конечно неадекватно современным возможностям медицины [13].

Неуклонным как в целом мире, так и в России остается рост злокачественных новообразований, например, в Российской Федерации в 2015 году впервые в жизни выявлено 589341 случая злокачественных новообразований, прирост данного показателя по сравнению с 2014 годом составил 4,0 % [13].

Расчеты, проведенные ВОЗ, показывают, что в 2008 году в мире количество всех заболевших онкопроцессами различной локализации составило 12,4 млн. человек, а умерших – 7,6 млн. Если показатели заболеваемости останутся на прежнем уровне, то к 2030 году количество заболевших составит 20,0 млн., умерших – 12,9, а при условии ежегодного однопроцентного роста – уже 26,4 и 17,0 млн., т.е. вырастут на 213,0 % и 223,0 % соответственно [14].

Учитывая тот факт, что морфологическая верификация диагноза рака до начала лечения является неременным правилом онкологической диагностики, а также то, что прирост показателя морфологического подтверждения наличия ЗНО в 2015 году в РФ имеет 1,6 %, следует рассматривать цитологическое исследова-

ние как одно из важнейших в комплексном обследовании больных.

Основной тенденцией в развитии современной онкологии остается стремление к выявлению злокачественных опухолей на раннем этапе их развития, что требует дальнейшего совершенствования методов диагностики. Важность подобного направления исследований вполне понятна, так как только при раннем выявлении ЗНО существующие на сегодняшний день методы лечения могут привести к наибольшему успеху. Так, по данным Национального центра санитарного просвещения населения РФ, самая высокая скорректированная выживаемость (95%) отмечена при I стадии процесса. Диагностика ЗНО во II стадии процесса снижает 5-летнюю выживаемость, которая составляет 79 %. Диагностика опухолей в III стадии процесса дает 55 %. Диагноз в IV стадии – это вероятность прожить 5 лет у 14,6% всех онкологических больных. Кроме того, высока стоимость лечения и реабилитационных мероприятий. Наименее затратным является лечение онкологических больных в I стадии, лечение больных во II стадии стоит в 3,2 раза дороже, в III стадии – в 5 раз и в IV стадии – в 5,5 раза.

Таким образом, неудовлетворительные результаты диагностики и как следствие лечения больных со ЗНО до настоящего времени остаются актуальными вопросами клинической онкологии.

Новые подходы, решения данной проблемы кроются и в общепринятых методах исследования, например, в цитологическом. Предлагаемый метод, который описывается в данной работе, называется гемофилтритроцитологическое исследование венозной крови и заключается в выделении с помощью микрофльтрации из крови данных больных циркулирующих раковых клеток (ЦРК) и цитоморфологическом их описании с целью установления диагноза.

По современным данным, канцерогенез представляет собой многоуровневый, многошаговый процесс, в котором многочисленные экзо-, эндогенные и наследственные факторы, являясь носителями прямых и косвенных канцерогенов и (или) их индукторами, изначально влияют на все клетки, ткани, органы и системы человеческого организма, приводя через гено- и негенотоксические механизмы к изменениям, мутациям молекулярно- генетического аппарата клетки и ее по-

следующей злокачественной трансформации [15-18].

В настоящее время выделяют три фазы взаимоотношения опухоли и иммунной системы: фаза иммунологического надзора, равновесия и ускользания. Каждая из них характеризуется определенными иммунологическими сдвигами и в большинстве случаев коррелирует со стадией заболевания [19-24]. Фаза иммунологического надзора характеризуется появлением единичных опухолевых клеток, которые распознаются и элиминируются компонентами врожденного и адаптивного иммунитета. В подавляющем большинстве опухолевых клеток наблюдается постоянная активность сигнальных каскадов, сообщающих о различных нарушениях клеточного метаболизма. В нормальных клетках такие сигналы приводят к остановке пролиферации и запуску репаративных процессов, а в случае невозможности последних – к активации программируемой клеточной гибели. Инактивация в опухолевых клетках белка p53 и других молекул, участвующих в реализации остановки клеточного цикла и апоптоза, приводит к отмене этих событий, однако не прекращает рассылку сигналов о нарушениях [25].

Одним из последствий активации данных сигнальных каскадов является экспрессия на поверхности клеток, так называемых стресс-индуцированных молекул MICA и MICB, относящихся к семейству неканонических молекул гистосовместимости Iс класса [26,27]. В частности, показано, что экспрессия этих молекул активируется в результате повреждающих ДНК воздействий [304], а также в результате аномального пролиферативного сигнала, возникающего при активирующих мутациях в киназных доменах цитоплазматической части рецепторов ростовых факторов [27].

Представленные на клеточной поверхности стресс-индуцированные молекулы распознаются рецептором NKG2D, который несут все НК-клетки, а также большинство $\gamma\delta$ T-лимфоцитов и часть CD8 $\alpha\beta$ T-лимфоцитов [28-32]. Этот рецептор лимфоцитов не имеет собственных сигнальных последовательностей в цитоплазматической части, но функционирует в связи с адаптерными молекулами DAP10 [33-35]. Адаптерные молекулы воспринимают импульс, возникающий при связывании рецептора NKG2d на поверхности лимфоцитов со стресс-

индуцированными молекулами на поверхности клеток-мишеней, и осуществляют дальнейшую передачу сигнала, который индуцирует цитотоксическое действие лимфоцита [36-39]. Таким образом, экспрессия стресс-индуцированных молекул должна приводить к иммунологическому уничтожению трансформированной клетки.

Итогом первой фазы иммунного ответа на опухоль является уничтожение большинства опухолевых клеток с сохранением части опухолевых клеток, приобретающих способность в той или иной степени контролировать развитие иммунного ответа. Совместное воздействие TGF- β 1 и VEGF инициирует формирование опухолевой стромы, необходимой для обеспечения трофики опухолевых клеток, иммуносупрессивного действия и поддержки процесса метастазирования [40-43]. Таким образом, помимо уничтожения опухолевых клеток, под действием иммунной системы происходит формирование опухолевой стромы необходимой для прогрессии всех солидных опухолей. В элиминации опухолевых клеток в фазе иммунологического надзора принимают участие натуральные киллеры (NK), натуральные киллеры с T-клеточным рецептором (NKT), гамма-дельта T-клетки ($\gamma\delta$ -T), макрофаги и гранулоциты [44-46]. NK-клетки играют ключевую роль в неспецифической элиминации опухолевых клеток [47-48].

Фаза равновесия характеризуется интенсивным ростом опухоли и активацией процессов ангиогенеза. На данном этапе развития взаимодействия опухоли и иммунной системы в опухоль мигрируют предшественники дендритных клеток и незрелые T-лимфоциты как CD4+, так и CD8+ фенотипа [49]. В микроокружении опухоли появляются дендритные клетки и макрофаги. Ключевым моментом функционирования адаптивного иммунитета является презентация антигена антиген-презентирующими клетками (АПК), в роли которых в абсолютном большинстве случаев выступают дендритные клетки (DC) [50]. Дендритные клетки – это высокоспециализированная субпопуляция клеток, основной функцией которых является поглощение, процессинг и презентация антигенов в составе молекул главного комплекса гистосовместимости в комбинации с ко-стимулирующими молекулами [51-54]. Клинически опухоль чаще всего проявляет себя в виде ло-

кальных форм. В этот период иммунологические реакции аналогичны таковым в фазе надзора, однако процессы канцерогенеза превалируют над защитными механизмами. В связи с этим наблюдается постепенное увеличение объема опухолевой массы.

Вполне вероятно, что на данном этапе определяется дальнейшая последовательность взаимодействия опухоли и иммунитета: если активация АПК происходит физиологично [55,56], то существует достаточно высокая вероятность того, что дальнейшее развитие иммунного ответа вызовет ремиссию опухолевого процесса. Если же влияние опухоли модифицирует созревание АПК [57], то формируемый иммунный ответ будет неполноценным и не способным препятствовать канцерогенезу [58,59]. Реализация того или иного сценария зависит от многих аспектов, наиболее существенными из которых являются общее состояние иммунной системы и гистологическое происхождение опухоли. Факторами плохого прогноза является пожилой возраст, иммуносупрессивные вмешательства в анамнезе, происхождение новообразования из нервной ткани [60].

Фаза ускользания характеризуется сдвигом цитокиновой регуляции в сторону иммуносупрессии, дисбалансом эффекторных и супрессорных иммунокомпетентных клеток, наличием молекулярных дефектов на стадиях распознавания, презентации антигена и трансдукции сигнала внутрь клетки.

Цитокины – регуляторные пептиды, продуцируемые клетками организма [48,61-65]. Осуществляя свои функции в микроокружении опухоли, цитокины способствуют как созреванию и активации иммунокомпетентных клеток, так и формированию иммунологической толерантности. В настоящее время известно более 20 цитокинов, вовлеченных в этот процесс [16,66-72]. Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) – наиболее важный проангиогенный фактор, подавляет созревание дендритных клеток, а также через генерацию незрелых миелоидных клеток (iMC) Т-клеточную активность [73-76]

Главное «поле битвы» иммунной системы и опухоли – ее микроокружение. В фазе ускользания отмечается увеличение доли незрелых дендритных клеток и

супрессорных Т-регуляторов в общей популяции. Зрелые дендритные клетки экспрессируют на своей поверхности CD40, CD80, CD83, CD86 и характеризуются высоким уровнем продукции IL-12. Под действием VEGF, IL-6, TGF- β , IL-10, COX-2, PGE2, ганглиозидов, находящихся в микроокружении опухоли, блокируется дифференцировка и созревание дендритных клеток, что делает невозможным формирование адекватного иммунного ответа [77-81].

Регуляторные Т-клетки относятся к системе адаптивного иммунитета и созревают из незрелых Т-клеток. Они подавляют иммунный ответ путем регуляции функций эффекторных клеток. В настоящее время выделяют 3 типа регуляторных клеток: CD4+CD25+Treg, Th3, Tr1. Кроме того, имеются супрессорные клетки с фенотипом CD8+, однако их функция не до конца понятна. Наибольшее значение в иммуносупрессии у онкологических больных имеют CD4+CD25+ Treg клетки. CD4+CD25+Treg имеют костномозговое происхождение. Высокая концентрация этих клеток выявляется у больных раком молочной железы, колоректальным раком, раком легкого, поджелудочной железы. Образуются они из тех же клеток – предшественников, что и Т-хелперы под влиянием избыточных концентрацией TGF- β , IL-10 и VEGF. Механизм супрессивного действия CD4+CD25+Treg клеток связан с секрецией супрессорных цитокинов (TGF- β , IL-10), с «конкуренцией» в отношении лигандов (IL-2), индукцией толерантности дендритных клеток, и, в ряде случаев, их прямым лизисом [82-89].

Третьей характерной особенностью фазы ускользания является наличие молекулярных дефектов дендритных клеток и лимфоцитов. В частности, обнаружено снижение уровня экспрессии МНС I и II, CD80, CD86, CD154 на поверхности антиген-презентирующих клеток из опухоли, а также снижение уровня экспрессии ξ – цепи TCRT-хелперов [52,90-94].

Наиболее ясное обобщение признаков характерных для злокачественного роста предложено в 2000 г. в работе основоположников молекулярной онкологии у Douglas Hanahan и Robert Weinberg [9]. По мнению данных авторов, все или почти все опухоли характеризуются несколькими неотъемлемыми чертами, перечисленными ниже.

1. Самодостаточность в отношении сигналов пролиферации, связанная с аутопродукцией факторов роста, соответствующих рецепторов или других компонентов сигнального промитотического каскада. Существенно, что нормальная клетка никогда не делится сама по себе; для запуска пролиферативной программы необходим сигнал извне, доставляемый эндокринной системой (гормоны), паракринными механизмами (тканевые факторы роста) или через синаптические окончания нейронов (нейротрофика). Следовательно, увеличение количества клеток в норме происходит лишь в том случае, если многоклеточный организм-хозяин продуцирует сигналы к наращиванию клеточной массы. Трансформированная клетка продуцирует подобные сигналы сама для себя, вне зависимости от потребностей организма, что и приводит к безостановочному делению опухолевого клона [47,50,96-100].

2. Потеря чувствительности к сигналам, сдерживающим процесс пролиферации, обусловлена инактивацией супрессорных (антимитотических) белков. Клоны, обладающие аномальной способностью к аутоstimуляции пролиферативного каскада, могут возникать в организме достаточно часто, что связано постоянным мутационным процессом в клетках организма. В случае появления клеток со способностью к аутокринной стимуляции деления организм-хозяин продуцирует сдерживающие сигналы, доставляемые к клеткам в виде гуморальных факторов и направленные на прекращение пролиферации. Трансформированные клетки, в отличие от нормальных, утратили способность к восприятию таких сигналов. Подобная нечувствительность к супрессорным воздействиям может происходить в результате утраты соответствующих мембранных рецепторов или других компонентов сигнальных каскадов, участвующих в проведении экстрацеллюлярного сигнала к клеточному ядру [101-107].

3. Замедление процессов программируемой клеточной гибели, опосредованное дисбалансом биохимической регуляции процессов апоптоза. Наиболее изученная разновидность программируемой клеточной гибели – апоптоз – обеспечивает «плановую» элиминацию клеток; этот процесс особенно выражен в тканях с высокой интенсивностью обновления клеток – эпителии

желудочно-кишечного тракта, кожи, крови. Помимо этого, клетка способна распознавать собственные повреждения ДНК и другие биохимические изменения, представляющие угрозу с точки зрения злокачественной трансформации. При появлении подобных нарушений запускается «суицидная» программа, приводящая к самоуничтожению потенциально опасных клеток. Раковые клетки, в отличие от нормальных, утратили способность к самоэлиминации, что позволяет им сохранять жизнеспособность, несмотря на наличие повреждений ДНК и ассоциированных с гиперпролиферацией стрессовых условий существования [108-112].

4. Неограниченный репликативный потенциал клеток (преодоление «лимита Хэйфлика»), сопряженный с реактивацией экспрессии фермента теломеразы, и, как следствие, отсутствием физиологического укорачивания теломер. В 1961-1962 гг. американский ученый Leonard Hayflick установил, что нормальные клетки могут делиться не более 100-150 раз, после чего весь клон (т.е. исходная клетка и ее потомки, обладающие соответственно меньшим резервом возможных делений) утрачивает возможность к самовоспроизведению. Неограниченный репликативный потенциал опухолевых клеток принято объяснять активацией фермента теломеразы, которая компенсирует наблюдаемое в ходе клеточного деления физиологическое укорочение концевых участков хромосом [113-119].

5. Стимуляция процессов ангиогенеза в опухоли, вызванная экспрессией трансформированными клетками ангиогенных факторов и направленная на удовлетворение повышенных потребностей быстроделющихся неопластических компонентов в оксигенации. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что опухолевые клетки могут сформировать клинически распознаваемое новообразование лишь в том случае, если они продуцируют факторы неоангиогенеза [54,120-126].

Таким образом, формирование сосудистой сети опухоли происходит не само по себе, а за счёт активных, управляемых трансформированными клетками биологических процессов. К настоящему времени идентифицированы десятки факторов, провоцирующих или, наоборот, ингибирующих ангиогенез [127-129].

6. Способность к инвазии и метастазированию, ассоциированная с продукцией опухолью гистолитических ферментов (протеаз), а также факторов, угнетающих локальный иммунитет. Эта способность злокачественной трансформации почти всегда упоминается в качестве ключевых компонентов опухолевого роста [130-134].

7. Геномная нестабильность, опосредованная инактивацией систем репарации ДНК и нарушениями в молекулярном контроле клеточного цикла. Для опухолевой клетки характерно ускоренное накопление мутаций, что, по крайней мере, отчасти связано со снижением эффективности процессов репарации ДНК. Подобная особенность приводит к чрезвычайной биологической пластичности новообразований, которые способны быстро приспосабливаться к изменяющимся условиям метаболизма и разнообразным лечебным воздействиям [113,135-139].

8. Перестройка стромальных компонентов, создающая более благоприятные условия для эволюции злокачественного клона. Длительное время предполагалось, что элементы стромы образуют лишь пассивный каркас для размножающихся опухолевых клеток. Открытие последних лет установили, что подобное утверждение далеко от истины. Многочисленные факты свидетельствуют, что стромальные компоненты опухолей заметно отличаются от таковых в нормальных тканях, что фибробласты, инфильтрирующие эпителиальные новообразования, содержат соматические мутации необходимые для жизнедеятельности злокачественного новообразования [140,141].

Венцом примерно 10-летней серии экспериментов стало доказательство факта активации онкогенов в опухолях. К середине 80-х годов онкогенная теория рака приобрела удивительную стройность. Её основные положения можно упрощённо сформулировать следующим образом [142]:

- онкогеном называется ген, который, а) в норме оказывает активирующее влияние на процессы пролиферации и/или препятствует клеточной гибели; б) активируется в опухолях; в) проявляет трансформирующие свойства в экспериментах по трансфекции.

- онкогены необходимы для нормального функционирования тканей; их работа находится под строгим контролем сигнальных систем организма. Соматическая мутация в онкогене приводит к независимости клетки от внешних регулирующих влияний, т.е. клеточный клон, находясь в условиях аутостимуляции, приобретает способность к неконтролируемому размножению [143,144]. Генетические повреждения в онкогенах могут возникать вследствие случайного мутационного процесса, однако вероятность мутаций существенно повышается при увеличении канцерогенной нагрузки [145-149].

- при вирусном канцерогенезе у животных вирус содержит уже активированную версию онкогена, и, таким образом, является лишь транспортной формой последнего. У человека, напротив, большинство опухолей возникает за счёт активации (мутации) эндогенных онкогенов [150-152].

- активация одного онкогена почти всегда компенсируется. Процесс злокачественной трансформации требует сочетанных нарушений в нескольких онкогенах.

К настоящему моменту идентифицированы сотни онкогенов. Они принадлежат к самым разнообразным классам белков и могут выполнять широкий спектр клеточных функций [153-158].

Открытие антионкогенов послужило очень заметным этапом в истории молекулярной онкологии, добавив целостности и логичности к имеющимся до этих воззрений [159-165]. Антионкогеном (супрессорным геном) называется ген, который а) в норме оказывает инактивирующее влияние на процессы пролиферации и/или способствует клеточной гибели; б) инактивируется в опухолях; в) осуществляет реверсию злокачественного фенотипа в экспериментах по трансфекции.

К супрессорным генам, с оговорками можно отнести практически все гены, участвующие в поддержании геномной стабильности [166-173]. Наследственные мутации во многих из них – BRCA1, BRCA2, MLH1, MSH2, HPC1, ELAC2 - являются причиной так называемых семейных раковых синдромов [302, 303]. Многочисленные работы свидетельствуют о несомненной роли микроРНК в онкогене-

зе [128,174,175]. BRCA1 и BRCA2 кодируют непохожие друг на друга белки, однако, оба продукта этих генов играют ключевую роль в поддержании целостности генома, в частности, в процессах репарации ДНК [176-178]. Оказалось, что спектр мутаций в этих генах исключительно широк [179-181].

Главным итогом российских исследований является вывод об исключительно частой встречаемости мутации BRCA1 5382insC [182-189]. Более того, эта мутация доминирует в пограничных государствах с преимущественно славянским населением – в Польше, Белоруссии, Латвии и Литве [46,60,190,191]. Данный вариант отвечает примерно за 2-5% общей заболеваемости раком молочной железы.

Современная наука полагает, что для возникновения трансформированного клеточного клона необходимо как минимум 5-9 мутаций в разных онкогенах и антионкогенах, в то время как меньшее количество мутаций почти всегда компенсируется защитными системами организма. Подобная особенность объясняет возрастное распределение онкологических заболеваний: большинство опухолей проявляет себя лишь во второй половине жизни, так как для их манифестации необходима целая цепь мутационных событий [116,192-195].

Опухоли характеризуются широким спектром различных генетических нарушений: активации гена HRAS1 и инактивации гена hMLN1, гена p53, гена RB1 [196-199]. Многие онкогены и антионкогены поражаются посредством микромутаций – небольших изменений в последовательности ДНК, проявляющихся микроделециями, микроинсерциями или нуклеотидными заменами. Подобный тип нарушений лежит в основе активации онкогенов RAS, BRAF, EGFR, инактивации супрессорного гена p53 и т.д. [17,21,23,24,77,78]

Большинство опухолей также характеризуется нестабильностью на уровне протяжённых участков хромосом, поэтому для новообразований исключительно типичны нарушения копийности генетического материала. Увеличение копийности онкогенов обозначается термином амплификация и приводит к возрастанию количества соответствующих белковых продуктов. Значительно чаще амплификаций встречаются делеции участков хромосом [200,201]. Транслокации – перестройки хромосом, приводящие к изменению уровня экспрессии генов или обра-

зованию химерных белков – в большей степени охарактеризованы для онкогематологических патологий. Наиболее известной является транслокация BCR-ABL, приводящая к образованию так называемой филадельфийской хромосомы и наблюдаемая при хроническом миелолейкозе. Изучение транслокаций в солидных опухолях длительное время практически не проводилось, затем бурный прогресс технологий молекулярной цитогенетики подтвердил причастность данной разновидности генетических нарушений к патогенезу широкого спектра опухолей эпителиального происхождения [195,202,203].

ЦРК могут быть обнаружены в крови пациентов с эпителиальными опухолями с использованием различных аналитических подходов. Злокачественные новообразования, возникшие из эпителия, составляют большинство раковых заболеваний, и более 90% смертей среди пациентов с карциномой вызваны метастатическими опухолями [204]. В соответствии с сегодняшней моделью каскад развития метастаза включает в себя: локализованную инвазию, интравазацию (проникновение рака через базальную мембрану и кровеносные сосуды), транспортировку через циркуляцию, задержку в микрососудах, кровоизлияние, формирование микрометастаза, фазу затишья и, наконец, развитие кровеносных сосудов (неоангиогенез), колонизацию и формирование макрометастаза [56,205-207]. Пока опухолевые клетки транспортируются в сердечно-сосудистой системе, на них ссылаются как на ЦРК в кровотоке и рассеянные опухолевые клетки в костном мозге [208-210]. ЦРК прогностически значимы, имеют отношение к клинической стадии, рецидиву болезни, опухолевому метастазированию, отклику на лечение и последующей выживаемости пациентов в ходе терапии [211-214, 306]. Появляется все больше работ демонстрирующих, что ЦРК являются новой заменой и независимым маркером для оценки риска возникновения рецидива, корректировки курса терапии и мониторинга лечения [6-9,11,214,307].

Были приложены значительные усилия для выработки новых надежных биомаркеров, чтобы усовершенствовать деление больных, отслеживать реакцию на лечение и выявить потенциальные новые терапевтические цели [208,215]. В последние годы внимание сфокусировалось на идентификации ЦРК в перифери-

ческой крови раковых пациентов [216], которые отделяются от первичной опухоли и курсируют посредством циркуляции в отдаленные места, где потенциально могут развиваться во вторичные опухоли [217,218]. Присутствие ЦРК коррелирует с неблагоприятным клиническим исходом и поэтому выявление ЦРК может быть клинически значимым в качестве фактора прогнозирования [219-221]. Молекулярный анализ ЦРК может также предоставить многообещающие результаты для оценки успешности лечения [222-225].

Изоляция, подсчет и молекулярная диагностика ЦРК крайне сложна [226]. Эти клетки могут быть выявлены и подсчитаны с достаточной чувствительностью и специфичностью с использованием различных автоматических и полуавтоматических методик. Однако при цитометрических методах фоновая экспрессия возможных маркеров, таких как цитокератин (ЦК) -8, -18 и -19 в нормальных эпителиальных клетках может дать ложные положительные результаты [227]. С другой стороны, методики, в основе которых лежит нуклеиновая кислота (например, обратная транскриптаза ПЦР в режиме реального времени), не позволяют проводить анализ клеточной морфологии [228]. В дополнение, одна из наиболее важных задач текущего исследования – это идентификация подмножеств ЦРК и их характеристика на молекулярном уровне, для выявления механизма, позволяющего индивидуально адаптировать лечение [229,230].

Критический момент при изучении ЦРК, особенно в свете возможного клинического использования, это разработка эффективного анализа для их определения. Поскольку ЦРК немногочисленны в сравнении с циркулирующими клетками крови, существуют значительные технические сложности с определением этих редких клеток и с их дифференциацией от более распространенных гематологических клеток и нормальных эпителиальных клеток.

ЦРК сначала должны быть обогащены и отделены от других клеток крови, и в настоящий момент существует целая совокупность методов как сделать это [231]. Восприимчивые методы обогащения опухолевых клеток могут значительно увеличить «урожай», в дальнейшем изолированные клетки могут подвергнуться диагностике с использованием прямых методик, основанных на иммуно-

цитохимии, для определения протеинов, характерных для рака; или путем оценивания нуклеиновой кислоты, используя метод обратной транскриптазы ПЦР в режиме реального времени в попытке выявить транскрипты молекул РНК, специфичные для опухоли.

Однако клиническое применение результатов исследований ЦРК было осложнено использованием нестандартизованных, часто неспецифичных и/или невосприимчивых методов определения, дающих противоречивые результаты. По сути дела, идеального метода на сегодня не существует, некоторые ограничения присущи каждому методу, которые частично могут быть преодолены при комбинированном подходе [227].

Отделение ЦРК от других клеток в крови на основе градиента плотности может быть выполнено с использованием коммерчески доступных жидких наборов градиента плотности (Ficoll [GE, Healthcare, AmershamBiosciences, USA], Lymphoprep™ [NycomedPharmAS, Oslo, Norway]; OncoQuick® [GreinerBioOne, Frickenhausen, Germany]) или других похожих жидкостей [232,233]. Этот процесс генерирует разделение клеток по слоям на основе их плотности. У этого метода есть определенные ограничения: в частности, возможная потеря ЦРК вследствие нежелательной миграции в слои плазмы, а также формирование неспецифических скоплений, содержащих ЦРК на дне градиента.

Прямое обогащение эпителиальных клеток путем фильтрации основано на наблюдении, что подавляющее большинство клеток периферической крови являются в числе наименьших по размеру в человеческом теле. Они могут быть выделены путем фильтрации крови с использованием поликарбонатного мембранового калиброванного фильтра с порами [234]. Эти фильтры использовались в клинических исследованиях [235,236], но эффективность их применения в процессе обогащения ЦРК не была полностью подтверждена.

Усовершенствованием в этой области является новая платформа определения рака, измеряющая активность теломеразы из жизнеспособных ЦРК, захваченных парилен-Ц гнездовым микрофильтром. Захваченные клетки сохраняют нормальную морфологию, что подтверждено сканированием электронным микроско-

пом и легко могут быть подвергнуты манипуляциям и дальнейшему анализу [237].

Не так давно была изобретена новая концепция 3-D микрофльтрации для обогащения ЦРК. Устройство уже показало себя как ценный прибор для оценки и диагностики обогатенных, жизнеспособных клеток, как в клинических, так и в исследовательских целях [238].

Иммуномагнитное выделение клеток – широко используемая техника обогащения ЦРК [239]. Выбор маркеров, специфически выраженных ЦРК, осложнен тем, что антигены, разделенные с другими циркулирующими неопухолевыми клетками, дефицитны. Антитела, специфичные для эпителиальных антигенов, такие как ЦК, EpCAM и VerEP4, наиболее широко используемые маркеры определения эпителиальных опухолевых клеток, несмотря на различные показатели ложно положительных и отрицательных окрашиваний.

Маркеры, специфичные для конкретного органа, включая антиген, характерный для простаты, карциноэмбриональный антиген или рецептор эпидермального фактора роста 2 (EGFR2/HER2) также используются [227].

Новый иммуномагнитный автоматический разделитель клеток, theMagSweeper™ (DavisRWetal., LelandStanfordJuniorUniversity, PaloAlto, CA, USA), аккуратно накапливает целевые клетки, прикрепленные к магнитным частицам. TheMagSweeper способен обогащать ЦРК из крови в количестве 10^8 ; клетки могут быть выделены индивидуально на основе их физических параметров, в то же время всякие клетки, неспецифически связанные с шариками, исключаются из анализа. Устройство может перерабатывать 9 мл крови в час и очищенные клетки, представляющие интерес, могут быть индивидуально отобраны для последующего биохимического анализа, т.к. данная технология сохраняет клеточную функцию и не нарушает генную экспрессию [240].

За вышеуказанными методами обогащения следует этап выявления, который в идеале должен защитить целостность выявленных ЦРК, вместе с тем позволяя провести дополнительные биологические исследования. Некоторые методы сочетают в себе обогащение с определением, другие проводят

исследования по выделению клеток, используя небогатенную кровь, поскольку обогащение может вызвать неизбежную потерю ЦРК.

В литературе известны различные методы анализа циркулирующих раковых клеток [127,146]: поиск клеток[™], потоковая цитометрия, методы, опирающиеся на образ, RT-PCR, технология иммуносорбентного пятна, связанная с энзимами, AdnuTest[™], Telomescan[™], ЦРК - чип.

Принимая во внимание недостатки потоковой цитометрии, связанные с подсчетом «редких явлений» в больших объемах жидкости и с ограниченной способностью сортировать субпопуляцию клеток, представляющую интерес, в осуществимых условиях, недавно был разработан новый подход к иммуномагнитному обогащению ЦРК из периферической крови и к финальному захвату этих клеток в центральной точке предметного стекла (микроскопа), подходящего для обычного микроскопического анализа [241]. Запатентованная система (Micro-Count[™] - Микроподсчет) эксплуатирует утвержденную технологию магнитных шариков со специфическими преимуществами традиционной микроскопии в исследовании образца, состоящего из очень малого количества клеток.

Система состоит из пластины, вмещающей в себя разные виды высокоэффективных неодимовых магнитов, расположенных на дне стандартной склянки с шестью емкостями, используемой для обогащения/разделения. Квадратное 20-мм покровное стекло (расположенное на дне емкости) может быть использовано для восстановления ЦРК в конце процедуры. Данное покровное стекло может с легкостью послужить для последующей цитологической диагностики. В качестве альтернативы (или в параллельной емкости) отделенные клетки могут быть непосредственно восстановлены на дне емкости для дальнейших молекулярных исследований. Особые преимущества системы заключаются в следующем:

- нет необходимости подвергать магнитному воздействию образец внутри стандартного магнитного столба, где «положительно отобранные» клетки должны быть освобождены вследствие механического толчка;
- отсутствии «вымывания»/лизиса, что гарантирует меньшие манипуляции и минимальное вмешательство в жизнеспособность клетки;

- хранении образца после подсчета для постоянной записи случаев, в которых допускается последующий анализ (любыми традиционными или иммунопроцедурами).

Опыт, накопленный в связи с микрофлюидовой обработкой, относящейся к так называемым «чиповым исследованиям», способствует совершенствованию клеточных манипуляций внутри микроустройств многоцелевого использования. Эти устройства функционируют в полностью контролируемом микропространстве, где различные физические и/или электрофизические процессы задействуются для проведения специфических манипуляций над целевыми клетками в различных условиях и по возможности максимально без ручного вмешательства или без маркирования [240].

В этой сфере Stott и др. недавно разработали микрофлюидовое устройство второго поколения, чип в виде елочки (колоса). Данное устройство значительно отличается от других ЦРК-чипов благодаря своему геометрическому дизайну, позволяющему вызывать микровихревое смешивание, разрушающее ламинарное движение образцов крови и увеличивающее число взаимодействий «клетка-поверхность» в устройстве, на которое нанесен слой антитела. Сверх того, камеры были сделаны из прозрачных материалов, позволяющих запечатлеть захваченные ЦРК, используя при этом традиционные гистопатологические красители, микроскопию с проводимым светом, а также антитела, связанные с иммунофлуоресценцией [242]. Чип в форме елочки был протестирован в РСЗ клеточной линии рака простаты и на пациентах с метастатическим раком простаты, сверяя при этом результаты с полученными в ходе анализа при помощи ЦРК-чипа: чип в виде елочки показал более высокий коэффициент потока и более высокие значения эффективности и чистоты захвата ЦРК; такие же выводы были сделаны в качестве предположения при похожем исследовании пациентов с раком легкого.

Другая трудность в подобного рода исследованиях связана с нахождением условий, позволяющих минимизировать вмешательство нежелательных клеток и одновременно максимизировать сигнал(ы) (флуоресценция либо любая другая физическая информация). Благодаря тому, что ЦРК всегда редкие явления, систе-

ма выявления по большей части включает в себя измерение и уточнение не интересующих нас сигналов [243-248]. Наконец, было сконструировано несколько других новых приборов, комбинирующих разные устоявшиеся принципы анализа с выявлением в «микространстве», чтобы гарантировать высокоэффективный и/или чувствительный подход к идентификации и дифференциации субпопуляции клеток, представляющей интерес [53,249-255]. Большинство этих комбинированных технических методик направлены на минимальное воздействие на клетки с целью их дальнейшего исследования. Важно, что некоторые из них предназначены не только для прогнозирования/ диагностирования, но также могут быть частью терапии по удалению ЦРК после их обнаружения [256,257].

Во время фильтрации постоянное давление, составляющее примерно 3.45×10^3 Pa, применяется для движения образцов крови через устройство. Весь процесс фильтрации занимает 3-5 минут. Количество захваченных клеток подсчитывается вручную под флуоресцентным микроскопом сразу после фильтрации [238,254].

Повреждение для отдельно взятой клетки может возникнуть на одной из двух стадий фильтрационного процесса. Первая стадия наступает, когда клетка начинает взаимодействовать с гранью поры, пока не попадет в ловушку полностью. Этот динамический процесс в экспериментальных условиях происходит в пределах миллисекунды. Вторая стадия длится от полного захвата до конца всего фильтрационного процесса. На этой стадии клетка будет испытывать статическое давление. Концентрированное давление, оказываемое гранями устройства – основной источник повреждений.

В настоящее время в мире стала шире использоваться основанная на вакуумной фильтрации технология выделения ЦРК по размеру (ISET), которая характеризуется высокой чувствительностью, так и специфичностью [258].

Согласно методике, разведенная буферным раствором кровь фильтруется через одноразовый пластиковый фильтрационный модуль, состоящий из 5 отсеков объемом 10 мл и 1 отсека объемом 50 мл. Данный модуль позволяет осуществлять фильтрацию количества крови от 1 до 10 мл. Разведенная кровь с по-

мощью вакуумного насоса фильтруется через поликарбонатную пористую мембрану с калиброванными цилиндрическими порами диаметром 8 мкм. После фильтрации мембрана извлекается из модуля, высушивается, промывается фосфатно-буферным раствором и раствором Мэй-Грюнвальд и окрашивается по Гимзе либо гематоксилином. Окрашенные препараты анализируются врачом-цитологом с помощью светового микроскопа.

ЦОК представляют собой гетерогенную популяцию клеток опухоли, которые попали в кровеносное русло. По последним данным, ЦОК могут включать фракцию стволовых опухолевых клеток, а также претерпевать фенотипические изменения, известные как эпителиально-мезенхимальная трансформация, которые позволяют им распространяться к месту формирования метастазов, будучи нечувствительными к воздействию обычных цитостатических агентов [218].

В ряде работ показано, что ЦОК могут обнаруживаться при ранних стадиях болезни, в том числе до ее клинических и рентгенологических проявлений [259,260]. По мере развития опухоли число ЦОК возрастает и достигает пика в терминальной фазе заболевания. Показано, что динамика количества ЦОК в ходе лечения коррелирует с эффективностью терапии распространенного рака молочной железы, простаты, толстой кишки [212,261,262].

В то же время, изучение феномена ЦОК затруднено разнообразием и недостаточной эффективностью применяемых методик, поскольку речь идет о выявлении единичных клеток в среде, насчитывающей миллиарды обычных клеток крови. Наиболее распространенные на сегодняшний день иммунные и молекулярно-генетические методики выявления и анализа ЦОК высокочувствительны, однако, недостаточно специфичны и не позволяют изучать морфологические особенности ЦОК [263,264].

В случае заболевания на ранней стадии использование таких индикаторов как размер опухоли или ее класс для предсказания исхода и улучшения клинической практики принятия решений хорошо зарекомендовало себя, но не является идеальным. В то же время хотя сегодня используются в качестве инструментов прогнозирования несколько специфических биомаркеров, они также не вполне

определенные [265]. Поэтому существует потребность в усовершенствованных инструментах для точного и надежного прогноза исхода заболевания. ЦРК могут послужить новым прогностическим маркером, однако их изучение в дополнительных (адьювантных) условиях затруднено из-за очень малого количества ЦРК, подлежащих выявлению, и из-за того, что соотношение пациентов с определяемыми ЦРК ниже, чем при запущенном заболевании, поэтому их значимость на ранней стадии болезни остается неясной.

ЦРК могут быть обнаружены у 20-54% пациентов с раком легкого на ранней стадии с применением анализов на основе RT-PCR для СК-19 [266-268] и у 10-31% пациентов при использовании системы CellSearch [269,270]. Во многих случаях ЦРК связывают с плохим исходом заболевания с учетом показателей отсутствия прогрессирования и общей выживаемости [271]. Подобным образом у пациентов, перенесших хирургическую резекцию по причине колоректального рака ранней стадии, ЦРК, обнаруженные при помощи СК-20 и карциноэмбрионального антигена положительности молекулы РНК в течение 24 часов после резекции, указывали на возможный рецидив, особенно в сочетании с нодальным статусом [44]. Это открытие недавно было подтверждено другими авторами [272-275]. Другое изучение локализованного рака простаты не обнаружило такой взаимосвязи – анализ ЦРК, проведенный либо с использованием системы CellSearch, либо RT-PCR для разных транскриптов, продемонстрировал, что ЦРК редко обнаруживались у пациентов с локализованным заболеванием [276].

В общем и целом, клиническая роль ЦРК при заболевании на ранней стадии не подвергалась такому обширному изучению, как при метастатической стадии. При раке груди в особенности нет достаточных доказательств того, что выявление и подсчет ЦРК может быть полезным для принятия клинических решений в адьювантной среде, и будущие клинические исследования должны послужить основанием для подтверждения использования данного анализа в качестве прогностического биомаркера [277]. В этой области рекомендательный Совет Американского общества клинической онкологии по опухолевым маркерам все еще считает, что доступные в настоящий момент ЦРК результаты, связанные с раком груди на

ранней стадии, следует признать недостаточными для принятия решений в текущей стандартной клинической практике [278].

В условиях наличия метастазов новые клинические средства, способные указать на прогрессирование болезни и/или предсказать реакцию на терапию будут особенно полезными при выборе режима терапии, который будет оказывать воздействие с наибольшей вероятностью и с наименьшей токсичностью. В настоящее время подсчет ЦРК очень многообещающ для обнаружения распространения метастазов, которые, в конечном счете, ассоциируют с плохим прогнозом [279].

Выявление ЦРК в периферической крови пациентов с метастатическим раком показывает значительную вариацию между разного рода исследованиями, выполненными с использованием разнообразных методик определения. Большинство доказательств в поддержку клинического применения ЦРК было получено при использовании системы CellSearch [280]. Общие имеющиеся данные свидетельствуют в пользу использования ЦРК в качестве прогностического маркера у пациентов с метастатическим раком груди [213]. Одним из ранних сигналов их прогностического потенциала являлся отчет 2004 года Cristofanilli и коллег, которые пришли к наблюдению, что 60-70% больных с метастатическим раком груди имеют ≥ 2 ЦРК на 7.5 мл крови, в то время как в контрольных группах ЦРК обнаруживались редко. Они также заметили, что пациенты с ≥ 5 ЦРК на 7,5 мл крови в качестве исходного значения имели худшие показатели прогрессирования болезни и общей выживаемости, чем пациенты с ЦРК < 5 на тот же объем крови. Последующие изучения продемонстрировали подобные результаты для метастатического рака простаты и колоректального рака, но с отличными пороговыми числами ЦРК. Для больных с раком простаты критерий отбора в группу с плохим прогнозом был ≥ 5 как стартовый коэффициент и ≥ 3 для пациентов с колоректальным раком [261,262].

Подсчет ЦРК может быть особенно полезен при отслеживании реакции на терапию. У пациентов с метастатическим раком груди, простаты и колоректальным раком, у которых невозможно определить масштаб болезни, снижение уров-

ня ЦРК от 2 до 5 недель после начала системной терапии коррелировало с улучшившимися показателями отсутствия прогрессирования и общей выживаемости. [212,214]. В некоторых случаях было обнаружено, что ЦРК анализ более надежен в прогнозировании реакции на лечение, чем обычноприменяемые методы, как радиологическая оценка при раке груди [211] и измерение антигена, специфичного для рака простаты.

Тем не менее, отсутствует информация для исследования на предмет того, улучшает ли исход болезни изменение лечения на основе изменений числа, подсчитанных ЦРК. Этот вопрос будет изучаться в предполагаемом исследовании III стадии, проводимом Юго-западной онкологической группой (SWOG 0500) и финансируемом Национальным раковым институтом. Это клиническое испытание охватит 500 женщин с метастатическим раком груди, у которых будет произведен подсчет ЦРК на старте и после одного курса первичной химиотерапии. Исследование протестирует стратегию изменения химиотерапии в сравнении с продолжением прежней химиотерапии для пациентов с метастатическим раком груди, у которых наблюдается повышенный уровень ЦРК во время первого промежуточного оценивания. Те, у кого постоянно повышенное число ЦРК, на данном этапе будут в произвольном порядке отобраны либо для продолжения первоначальной терапии пока не будут получено клиническое или радиологическое подтверждение прогрессирования болезни, либо для перехода на другой химиотерапевтический агент. Этот эксперимент предположительно предоставит информацию касательно того, что является более эффективным – изменять схему лечения в период увеличения ЦРК или ждать клинического прогрессирования заболевания[227].

Роль HER2-положительных ЦРК при метастатическом раке груди [281,222] также в настоящий момент изучается в клинических испытаниях. Примером такого продолжающегося исследования является изучение лапатиниба (*lapatinib*) у пациентов с метастатическим раком груди с не увеличивающейся HER2 первичной опухолью и HER2-положительными (или EGFR-положительными) ЦРК.

Текущие руководящие положения по опухолевым маркерам Американского общества клинической онкологии пока не одобряют регулярное использование

анализа ЦРК с целью установления стадии болезни и/или принятия клинических решений при метастатическом раке груди и других типах рака [282,283] в основном из-за широкого диапазона используемых методологий [248].

Основная техническая сложность определения ЦРК возникает из-за их редкости, на уровне одной ЦРК в 7,5 мл крови (или одна ЦРК против 10^{10} клеток крови), тем самым, делая эффективное обогащение предварительным условием обнаружения ЦРК в большинстве случаев. Различные методы обогащения ЦРК используют важные различия между эпителиально полученными ЦРК и кровяными клетками крови. Традиционно используется центрифугирование с градиентом плотности для обогащения мононуклеоцитной фракции, в которую входят ЦРК из-за их схожей плавучей (*способной держаться на поверхности*) плотности [285-287]. Интерпретирование результатов иммунофлуоресцентного окрашивания требует наличие обученного патолога, чтобы он(а) исследовал(а) каждый слайд на присутствие ЦРК, что затратно по времени и субъективно. Кроме того, центрифугирование с градиентом плотности имеет максимальный коэффициент восстановления – около 70%. Более новые технологии извлекают преимущества из особых антигенов с эпителиальным покрытием, как молекула сцепления эпителиальной клетки (EpCAM) для избирательного захвата ЦРК. Cellsearch™ - единственная одобренная Американской администрацией по контролю продуктов и лекарств автоматизированная система для захвата и оценки ЦРК с целью прогнозирования и мониторинга лечения при метастатическом раке молочных желез, простаты и колоректальном раке. Он основан на иммуномагнитном разделении [216, 288-290], при котором EpCAM- сопряженные магнитные шарики используются для захвата EpCAM- положительных ЦРК из крови под воздействием магнитного поля. И хотя множество клинических исследований подтверждали его прогнозную значимость, анализ дорогостоящ, трудозатратен и имеет большой диапазон значений коэффициента восстановления (9-90%) во многом из-за изменчивой экспрессии поверхностных маркеров. Не так давно основанный на иммунном сходстве «ЦРК-чип», когда ЦРК захватываются антителами, сопряженными с поверхно-

стью из микроклемм в микропотоковой камере, с успехом продемонстрировал захват ЦРК и обнаружил множество метастатических опухолей из образцов крови пациентов [227]. Несмотря на то, что могут быть получены хорошо очищенные жизнеспособные ЦРК, эффективность захвата ограничена изменчивостью экспрессии поверхностного антигена, также пропускная способность и время обработки ограничены скоростью потока.

С другой стороны, изоляция ЦРК на основе размера клетки проявила себя как потенциально эффективный, недорогой и быстрый способ обогащения ЦРК [291-295], возвращаясь обратно к 60-м годам. ЦРК в большинстве случаев являются эпителиальными клетками; считается, что они значительно превосходят окружающие их клетки крови [254]. Размер поры около 8 μm (*мкм = микрометр*) в диаметре был показан как идеальный для удерживания ЦРК [296]. Однако, ранее описанные поликарбонатные фильтры сделаны с использованием направления гравирования (*вытравливания*), которое может генерировать поры только в случайных местах. Невысокая частота пор и множественное объединение пор приводят к низкой эффективности захвата ЦРК (примерно 50-60%) и частому закупориванию образца в фильтре. Недавно созданные микрофильтры больше обнадеживают в плане обогащения ЦРК на основе размера. Ранее уже описана полезность сконструированного двухслойного (2D) микрофильтра для обогащения ЦРК [120,234]. Фильтры с часто посаженными единообразными круглыми порами были сделаны, используя процессы фотолитографии. Устройство показало хорошие результаты в обогащении ЦРК из клинических образцов, взятых у пациентов с метастатическим раком. В другом исследовании – ловушки в микрожидкостном потоке камеры захватывают раковые клетки из крови под низким давлением сдвига с большой чистотой (беспримесностью) и жизнеспособностью [297]. Более позднее микрополостное устройство, созданное путем никельного электроформирования (*гальванопластика*), продемонстрировало высокую эффективность поимки и жизнеспособность выявленных опухолевых клеток из крови [252].

Версия 3D микрофильтрового устройства с порами подходит для подсчета ЦРК в крови метастатических раковых пациентов, отличаясь при этом высокой

долей восстановления клеток и недолгой длительностью самого процесса обработки. Способность захватывать жизнеспособные и пролиферативные ЦРК может подготавливать почву для функциональных исследований, таких как недавно предложенные раковые стволовые клетки, порождающие рецидив у раковых больных [298-300].

Отделение и подсчет редко встречающихся чужеродных клеток, обычно не присутствующих в периферической крови, вызывали большой интерес в последние 10 лет, и на сегодня это явление закрепилось как т.н. «анализ редких явлений». У этого анализа есть важные биологические и клинические следствия, в частности, эпителиальные ЦРК, часто обнаруживаемые в крови раковых пациентов, а также их подсчет – играют роль прогностического биомаркера, что в свою очередь может помочь подобрать системную терапию.

С технической точки зрения был достигнут существенный прогресс в изоляции и количественном подсчете ЦРК. Тем не менее, с учетом вариативности, присущей определению редких явлений, нужны дополнительные исследования для установления порогов чувствительности, кроме того, методы необходимо стандартизировать при помощи крупных мультиинституциональных испытаний до широкого применения данных тестов в клинической практике.

Молекулярная диагностика ЦРК, в особенности, может осуществить важный вклад в наше понимание феномена метастаз. Однако новые возникающие технологические платформы, специально предназначенные для данного типа исследований, все еще нуждаются в значительной оптимизации для надежной изоляции жизнеспособных ЦРК, прежде чем известные на сегодня молекулярные подходы могут получить распространение.

Критическая роль специфического числа ЦРК в фиксированном объеме крови, необходимая для разграничения плохого и хорошего прогнозов, также должна быть уточнена. С биологической точки зрения логично предположить, что чем большее число ЦРК в крови пациента, тем агрессивнее заболевание, но это до сих пор не было полностью подтверждено. Поэтому следует с осторожностью использовать пороговые числа для разделения пациентов на различные прогнозные

подгруппы. Вдобавок, другие факторы могут повлиять на статистическую точность различных ЦРК анализов, включая эффективность восстановления/сохранения ЦРК во время подготовки образца, качество первичной пробы, частота встречающихся явлений, специфичность выбранных маркеров и вариативность (изменчивость, непостоянство) операторов/лабораторий.

Все эти факторы считают важными, в особенности для определения возможного клинического влияния ЦРК на ранней стадии болезни. Несколько исследований по оценке количественного измерения ЦРК и их диагностике на ранних этапах развития рака продолжают в настоящий момент, однако необходимо больше данных и длительное наблюдение, чтобы дать окончательный ответ.

Клиническая значимость ЦРК может послужить как в сфере клинической онкологии, так и в биологии рака, способствуя выявлению индивидуальной терапии. Характеристика генотипа и фенотипа этих клеток приведет к дополнительным открытиям и откроет новые направления в противораковых исследованиях. И хотя крупномасштабных клинических данных о том, как молекулярная диагностика ЦРК может быть использована в качестве средства принятия клинических решений, все еще не хватает, данный вид анализа весьма перспективен в плане лучшего биологического понимания метастатического процесса и, в ближайшем будущем, определения генетического профиля каждой опухоли при помощи ЦРК.

По этим причинам крайне важно разрабатывать более чувствительные методики, позволяющие избегать давления (нагрузки) на клетки во время манипуляций, чтобы сохранить жизнеспособность клеток и их способность к пролиферации, а также чтобы способствовать последующей культуре *in vitro* для дальнейшего молекулярного анализа ЦРК. Безусловно, стоимость таких методов – другой важный вопрос, который следует изучать в свете более широкого клинического применения [227].

Резюме

Проблема диагностики и лечения злокачественных новообразований оста-

ется актуальной в силу их практически повсеместной распространенности, запущенности и высокой смертности.

Не решенной проблемой остается ранняя диагностика злокачественных новообразований, особенно до визуализации, что обуславливает высокий удельный вес III-IV стадий процесса при выявлении опухолей.

Не менее трудной проблемой остается профилактика и ранняя диагностика рецидивов у радикально оперированных больных, требующих новых подходов к её решению.

Все это вновь вызывает интерес на новом уровне к проблеме иммунобиологии злокачественных новообразований, молекулярным основам опухолевого роста и трансформации клеточного клона.

Среди новых подходов в диагностике злокачественных опухолей в последние годы привлекает внимание выявление ЦРК, что имеет важное значение в оценке риска развития злокачественных новообразований, в принятии решения о применении химиотерапии, возможных методах контроля качества её проведения и т.д. В настоящее время литературные сведения по этим проблемам противоречивы и крайне недостаточны. Развитие научного познания в этих направлениях обеспечивается прогрессом в создании новых методов и технологий в выявлении циркулирующих раковых клеток.

Глава 2

Материал и методы исследования

2.1. Характеристика материала исследования

В основу работы положены данные о 584 лицах, у которых с целью определения циркулирующих раковых клеток применялось гемофилтритроцитологическое исследование венозной крови.

Среди них было 411 больных злокачественными новообразованиями и 173 здоровых донора. У 138 больных злокачественными новообразованиями гемофилтритроцитологическое исследование проводилось до и после операции, а у 200 – только после операции.

Характер злокачественных новообразований представлен в таблице 1.

Таблица 1. Характер заболеваний у больных, обследованных с применением гемофилтритроцитологического исследования венозной крови

Локализация злокачественного новообразования	Абс. число	%
Легкие	112	27,2
Желудок	81	19,7
Ободочная и прямая кишка	145	35,3
Поджелудочная железа	12	2,9
Молочные железы	24	5,8
Яичники	37	9,0
Всего:	411	100,0

Разработка и обоснование гемофилтритроцитологического исследования на наличие ЦРК в венозной крови при подозрении на злокачественные новообразования и после радикального их удаления включала следующие направления научных изысканий:

- 1) разработка устройства для гемофилтроцитологического исследования на наличие в венозной крови ЦРК;
- 2) гемофилтроцитологическое исследование периферической венозной крови у больных с подозрением на злокачественные новообразования;
- 3) сопоставление результатов гемофилтроцитологического исследования периферической венозной крови у больных с подозрением на злокачественное заболевание и последующего патоморфологического исследования препаратов, биопсийного материала;
- 4) сравнительная оценка результатов исследования на наличие ЦРК в периферической венозной крови гемофилтроцитологическим и иммунофлуоресцентным методами.

Для решения этих задач были определены две группы лиц. Основную группу составили 211 больных злокачественными новообразованиями следующих локализаций: лёгких (47 больных), желудка (50 пациентов), ободочной и прямой кишки (41 пациент). Поджелудочной железы (12 пациентов), молочной железы (24 пациента), яичников (37 пациентов). Контрольная группа включала 173 здоровых доноров.

С целью оценки роли гемофилтроцитологического исследования периферической крови в раннем послеоперационном периоде у радикально оперированных больных злокачественными новообразованиями оно выполнено у 338 лиц. Среди них было 112 пациентов раком лёгкого, 81 больной раком желудка, 145 больных раком толстой кишки. В качестве контрольных использовались результаты обследования 173 доноров. Таким образом, всего обследованных гемофилтроцитологическим методом было 511 человек.

В ходе исследования изучены следующие данные:

- 1) возможность выявления ЦРК в раннем послеоперационном периоде у больных радикально оперированных по поводу злокачественных новообразований лёгких, желудка, толстой кишки;

- 2) частота выявления ЦРК в периферической венозной крови у радикально оперированных больных по поводу злокачественных новообразований лёгких, желудка, толстой кишки;
- 3) эффективность применения адъювантной химиотерапии у радикально оперированных больных злокачественными новообразованиями лёгкого, желудка, толстой кишки при выявлении ЦРК в периферической венозной крови в раннем послеоперационном периоде;
- 4) зависимость эффективности повреждения ЦРК в венозной крови в раннем послеоперационном периоде у радикально оперированных больных раком лёгкого от распространенности патологического процесса;
- 5) уровень повреждения ЦРК в периферической венозной крови у радикально оперированных больных раком лёгкого, желудка, толстой кишки в зависимости от количества циркулирующих в крови раковых клеток.

Отдалённые результаты комбинированного лечения злокачественных новообразований лёгкого, желудка и толстой кишки с использованием данных гемофильтрационного исследования периферической венозной крови изучены на протяжении 1-3 лет после радикальных операций.

Исследование проведено в течение 1 года у 259 больных, 2-х лет – у 257 больных, 3-х лет – у 252 пациентов. Оно носило сравнительный характер. В 1 группу вошли больные, у которых применялась адъювантная химиотерапия. В этой группе количество наблюдавшихся больных составило соответственно с течением 1 – 2 лет 185 человек, 3 года – 184 пациента. Во 2 группу вошли больные, которые отказались от адъювантной химиотерапии. В течение 1 года наблюдались 74 пациента, 2-х лет – 72 пациента, 3-х лет – 68 пациентов.

При исследовании в отдалённом периоде состояния радикально оперированных больных раком лёгкого, желудка, толстой кишки оценивалось выявление ЦРК в периферической венозной крови, рецидивы заболевания и летальность.

2.2 Методы исследования. Диагноз у 338 больных со злокачественными новообразованиями устанавливался на основании данных физикального и инструментального обследования до операции, интраоперационной диагностики, а также морфологического подтверждения диагноза. Инструментальное обследование больных включало в себя весь современный, в том числе и высокотехнологичный комплекс лучевой и эндоскопической диагностики, направленный на установление причины заболевания. Лучевая диагностика начиналась согласно общепринятым стандартам обследования больных с обязательных методов рентгеноскопии, рентгенографии, ультразвукового исследования внутренних органов и заканчивалась уточняющими видами: компьютерной томографией, магнитно-резонансной томографией. Эндоскопические методы исследования, а именно фибробронхоскопия, фиброзофагогастроскопия, фиброколоноскопия и ректороманоскопия кроме визуального распознавания опухолей, главное дали возможность забора биопсийного материала. Наконец, применение гистологического исследования вышеупомянутого материала окончательно подтверждало наличие у больных злокачественного новообразования.

Кроме инструментального обследования онкологическим больным проводились следующие лабораторные методы исследования: клинический анализ крови и мочи, биохимический анализ крови, включающий определение амилазы, общего белка, креатинина, мочевины, кальция, хлоридов. Натрий, калий, кальций определяли ион селективным методом на анализаторе ABL-800FLEX. Общий холестерин, мочевины, амилазу кинетическим методом, сахар глюкозооксидным методом, общий белок биуретовым методом, креатинин методом Яффе, общий билирубин методом Йендрашика-Грофа оценивали на анализаторе mindrayBS-400. Тимоловую пробу проводили методом осаждения на аппарате StatFaxc. Также исследовались наиболее информативные серологические опухолевые маркеры: при раке легкого - РЭА, Cyfra 21-1, SCC; при раке желудка СА 72-4, РЭА, СА-19-9; при раке толстой кишки-РЭА, СА-19-9,СА 72-4 и других солидных опухолях.

Для выявления в периферической венозной крови циркулирующих раковых клеток у 338 онкологических больных осуществлено гематофилтроцитологическое

исследовании периферической венозной крови с последующим анализом отпечатка фильтрата венозной крови с целью диагностики в нем циркулирующих раковых клеток.

Статистическая обработка полученных данных. В работе применялись методы вариационной статистики. Использовались методики расчета медико-статистических показателей в онкологии, рекомендованные Г.В. Петровой с соавт. 2014 [301].

Проверка гипотезы о значимости на основе критерия χ^2 (хи-квадрат) была использована в нашем исследовании при статистических непараметрических данных, которые были обработаны критерием Пирсона χ^2 .

В работе также применялся стандартный Z-критерий (универсальный критерий Фишера), что обеспечивалось достаточным количеством наблюдений в каждой из групп и в каждой из таблиц. Для связанных выборок использовался критерий Манна-Уитни. Большие массивы данных обрабатывались на компьютере с помощью программы SPSS21.0.

Резюме.

В основу работы положены данные о 511 лицах, у которых с целью определения ЦРК применялось гемофильтроцитологическое исследование. Из них было 338 больных и 173 донора. Количество обследованных лиц и их характеристика были достаточными для решения поставленных в работе задач. Сравнимые группы обследованных лиц были сопоставимы по основным характеристикам.

Количество наблюдений больных злокачественными новообразованиями, численность лиц, составивших контрольную группу, пациентов группы сравнения и их сопоставимость с основной группой достаточное и позволяет решить задачи, поставленные в научном исследовании.

Глава 3. Гемофильтрацитологическое исследование циркулирующих раковых клеток в венозной крови больных злокачественными новообразованиями.

Для проведения гемофильтрацитологического исследования венозной крови разработано и внедрено специальное устройство, которое делает процесс выделения ЦРК проще, качественнее и быстрее. Преимуществом данного прибора является использование в качестве фильтра – полимерной пленки из лавсана (полиэтилентерефталат). Лавсан – высоко биосовместимый полимер не выделяет в фильтрат низкомолекулярной примеси (нет побочного влияния на результат).

Предлагаемое устройство имитирует собой искусственную макрососудистую модель, способную выявлять циркулирующие раковые клетки в венозной крови. Для выделения ЦРК в данном приборе создаются условия кровотока максимально приближенные к естественным, чтобы не допустить отрицательного результата вследствие повреждения клеток.

Для выявления в периферической венозной крови циркулирующих раковых клеток у 211 больных с подозрением на наличие злокачественного новообразования и 173 здоровых доноров проведено гемофильтрацитологическое исследование венозной крови.

3.1. Устройство для гемофильтрацитологического исследования на наличие ЦРК в венозной крови при подозрении на злокачественное новообразование в организме.

Специальное устройство для проведения гемофильтрацитологического исследования венозной крови представлено на рисунке 1.

На данное устройство получен патент на изобретение № 24144710 Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам, зарегистрированное в Государственном реестре изобретений РФ 20.03.2011 г. Изобретение относится к физиологии и медицине.



Рисунок 1. Устройство для гемофилтритроцитологического исследования периферической венозной крови

Схема устройства для гемофилтритроцитологического исследования периферической венозной крови представлена на рисунке 2.

Устройство содержит стеклянный цилиндр (1), который заключен в пластиковый кожух (2). На дне стеклянного цилиндра установлена пластмассовая решетка (3) с закрепленным на ней с помощью металлического кольца (4) калиброванным фильтром (5). Диаметр пор у калиброванного фильтра равен 6000 нм (6 мкм). Внутри стеклянного цилиндра установлен поршень (6) со штоком (7), который ввинчен не до упора. В поршне выполнены два разных по диаметру канала (8), на стыке которых расположен металлический шарик (9), выполняющий назначение выпускного клапана для воздуха. Стеклянный цилиндр имеет верхнее входное отверстие (10) для подачи венозной крови и нижнее выходное отверстие (11) для оттока венозной крови, последнее снабжено приспособлением (12) для осуществления положений «открыто» и «закрыто».

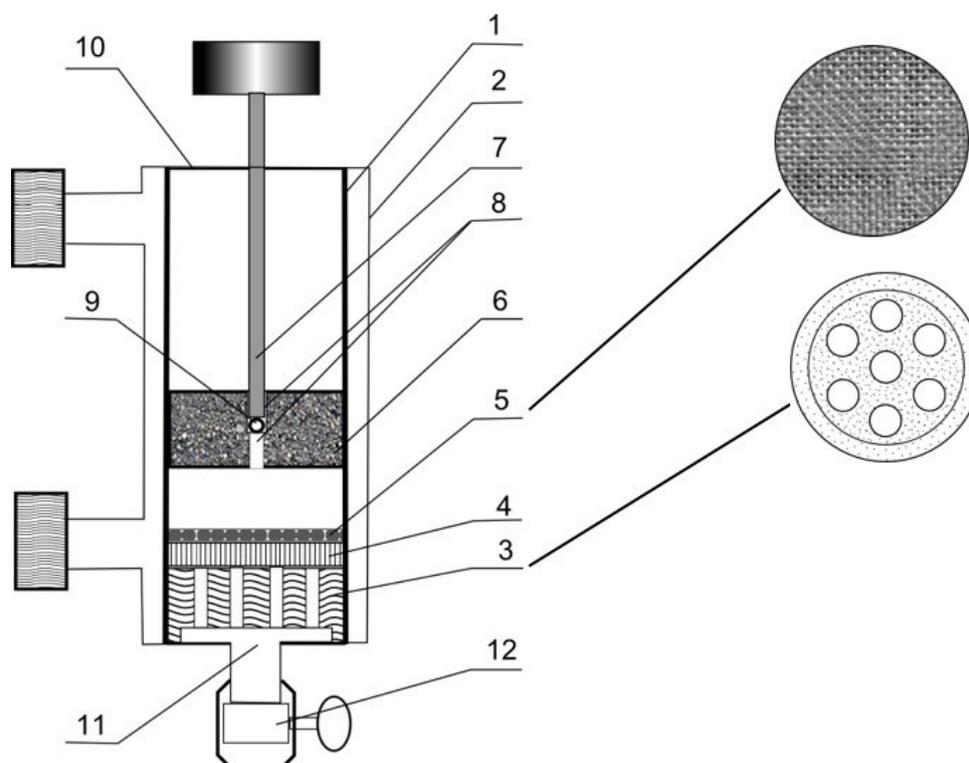


Рисунок 2. Схема устройства для гемофилтритроцитологического исследования периферической венозной крови.

На предложенный способ определения раковых клеток в периферической венозной крови у больных с подозрением на ЗНО Роспатентом после соответствующей экспертизы также выдан патент на изобретение № 2425385 зарегистрированный в Государственном реестре изобретений РФ 27 июля 2011 года.

Способ определения раковых клеток в периферической венозной крови у больных с помощью вышеописанного устройства проводился следующим образом. Накануне из локтевой вены обследуемого берется в две пробирки типа вакутайнер с антикоагулянтом ЭДТА (динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты) по 4мл. венозной крови, независимо от приема им пищи. В день исследования осуществляли сборку устройства. На дно стеклянного цилиндра, заключенного в пластиковый кожух, помещали пластмассовую решетку с закрепленным на ней с помощью металлического кольца калиброванным фильтром.

Для проведения гемофилтритроцитологического исследования при закрытом

положении нижнего выходного отверстия, в стеклянный цилиндр через верхнее входное отверстие наливали из пробирки венозную кровь обследуемого больного в количестве 12 мл. В стеклянный цилиндр вводили поршень со штоком, ввинченным не до упора.

Поршень продвигался до уровня жидкости в стеклянном цилиндре, при этом воздух из цилиндра выпускали через каналы в поршне с помощью металлического шарика, выполняющего назначение выпускного клапана.

Затем шток завинчивали до упора в поршне и тем самым зажимали металлический шарик (выпускной клапан закрыт). Далее приспособление нижнего выходного отверстия стеклянного цилиндра ставилось в положение «открыто» и пропускали всю исследуемую венозную кровь через калиброванный фильтр, при этом происходила задержка раковых клеток в осадке на калиброванном фильтре.

Осадок наносили на предметные стекла, предварительно обезжиренные и охлажденные, для лучшего прилипания клеток и высыхания. Фиксировали мазки-отпечатки 3% спиртовым раствором Лейшмана 2-4 минуты. Затем смывали дистиллированной водой и красили азур-эозиновой смесью в соотношении 3:1 в течение 6-8 минут.

После покраски промывали дистиллированной водой, сушили на воздухе и приступали к просмотру под микроскопом. Окрашенные мазки - отпечатки анализировали с помощью световой микроскопии, используя следующую методику: в начале скрининг при увеличении 200 для поиска циркулирующих клеток, а затем осмотр при увеличении 1000 с масляной иммерсией для детального цитоморфологического исследования. В настоящее время в специальной литературе изучены и описаны цитологические картины большинства опухолей, исходя из которых (размеры, форма, структура) были определены и описаны выделенные из крови циркулирующие раковые клетки.

ЦРК можно распознать с помощью цитологических критериев злокачественности, традиционно используемых в рутинной цитологии. Учитываются следующие критерии: наличие цитоплазматических изменений ядерной оболочки (ядра неправильной формы), увеличение размеров ядер более 24 мкм, анизонук-

леоз (индекс $>0,5$), высокий ядерно-цитоплазматический индекс и наличие трехмерных клеточных комплексов[310]. Обнаруженные гемофилтритроцитологическим исследованием ЦРК характеризовались наличием вышеперечисленных признаков.

Уверенное цитологическое заключение о наличии злокачественного новообразования (рака, саркомы), совпадающее с клиническими симптомами и данными других диагностических исследований, следует расценивать как морфологическое подтверждение диагноза злокачественной опухоли. Оно является основанием для назначения больному лечения без выполнения биопсии, что особенно ценно в тех случаях, когда произвести ее невозможно или крайне нежелательно [12]. Уверенное цитологическое заключение о наличии злокачественной опухоли не может быть отвергнуто клиницистом без гистологического исследования, даже если данные и результаты других диагностических исследований противоречат картине злокачественной опухоли и ставят цитологический диагноз под сомнение. Форма клеток зависит от генеза опухоли: плоскоклеточный или железистый. Клетки плоскоклеточного рака содержат крупные ядра, занимающие почти всю клетку, встречаются многоядерные клетки. Контуры ядер неровные, фестончатые, с инвагинациями, с «надкусанными» краями. Структура хроматина в ядрах грубая, комковатая, глыбчатая, бугристая. Цитоплазма скудная, может быть без четких границ или в виде узкого ободка. Клетки могут располагаться одиночно, группами или образовывать симпласты. Клетки железистого рака в периферической венозной крови при микроскопии, в основном, одиночно расположенные или небольшими рыхловатыми скоплениями. Отличительной чертой этих клеток от стволовых клеток гемопоэза является эксцентричность расположения ядер, но при низкодифференцированных вариантах, ядра занимают центральное положение. Клетки призматической и округлой формы, в ядрах содержатся по 1-2 ядрышка, цитоплазма может быть скудной, обильной, расплывчатой без четких границ.

Таким образом, при просмотре под световым микроскопом мазка-отпечатка специалист выявляет наличие в периферической крови опухолевых клеток. В 1 мл крови в среднем присутствует 10 миллионов лейкоцитов и 5 миллиардов эритроцитов. Предполагается, что обнаружение одной ЦРК на 1мл будет клинически

значимым, из этого следует, что в кровообращении присутствует 5000 ЦРК [310].. Это означает, что опытные цитологи могут достоверно определять ЦРК, применяя классические цитологические критерии [310].

В том случае, если получено предположительное цитологическое заключение о злокачественной опухоли, необходимо выполнять повторное исследование, более тщательно проводя забор материала для мазков. Это повышает эффективность цитологической диагностики рака на 7-10 % и позволяет дать уверенное заключение в 90% наблюдений[12]. Гистологический контроль за правильностью цитологических заключений о раке по результатам сопоставления цитологических и гистологических диагнозов, проведенный в 4746 наблюдениях, показал, что частота правильных цитологических ответов составила $92,2 \pm 5,2\%$ [12].

3.2. Гемофилтритроцитологическое исследование периферической венозной крови у больных с подозрением на злокачественные новообразования

С целью оценки диагностической значимости гемофилтритроцитологического метода определения ЦРК в венозной крови проведено исследование образцов крови у 384 лиц. Из них 211 были пациентами с подозрением на наличие злокачественных новообразований, они составили основную группу. У них злокачественные новообразования в последующем подтверждены.

В нее вошли 47 больных с раком лёгкого, 50 – с раком желудка, 41 – с раком ободочной и прямой кишки, 12 – с раком поджелудочной железы, 24- с раком молочной железы, 37 – с раком яичников.

В контрольную группу вошли 173 донора без признаков каких-либо заболеваний.

В соответствии с целью исследования были поставлены следующие задачи:

- 1) оценка реальных возможностей гемофилтритроцитологического исследования в установлении предположительного диагноза онкологическим больным;
- 2) определение гемофилтритроцитологическим исследованием наличия или отсутствия ЦРК у доноров.

В основной группе, больных с подозрением на злокачественное новообразо-

вание преобладали женщины, в среднем на 25,2%, по сравнению с мужчинами. В контрольной группе среди доноров женщин также было больше чем мужчин, на 14,0% (таблица 2).

Таблица 2. Распределение пациентов и доноров по полу

Пол	Группы обследованных лиц				р
	основная		контрольная		
	абс. число	%	абс. число	%	
Мужчины	79	37,4	75	43,0	>0,25
Женщины	132	62,6	98	57,0	>0,25
р		<0,001		<0,05	
Количество обследуемых лиц	211	100,0	173	100,0	

Основная и контрольная группа по возрастному составу между собой различались (таблица 3). В контрольной группе все лица были моложе 60 лет. В основной группе на этот возраст приходилось 44,1% больных, удельный вес пациентов в возрасте от 60-69 лет составил 32,7%, а от 70 лет и старше 23,2%.

Таблица 3. Распределение пациентов и доноров по возрасту

Возрастной период (лет)	Группы обследованных лиц				р
	основная		контрольная		
	абс. число	%	абс. число	%	
до 50	31	14,7	101	58,4	<0,001
50-59	62	29,4	72	41,6	<0,02
60-69	69	32,7	-	-	<0,001
70 и старше	49	23,2	-	-	<0,001
Количество обследуемых лиц	211	100,0	173	100,0	

Национальный состав основной и контрольной группы не был одинаковым

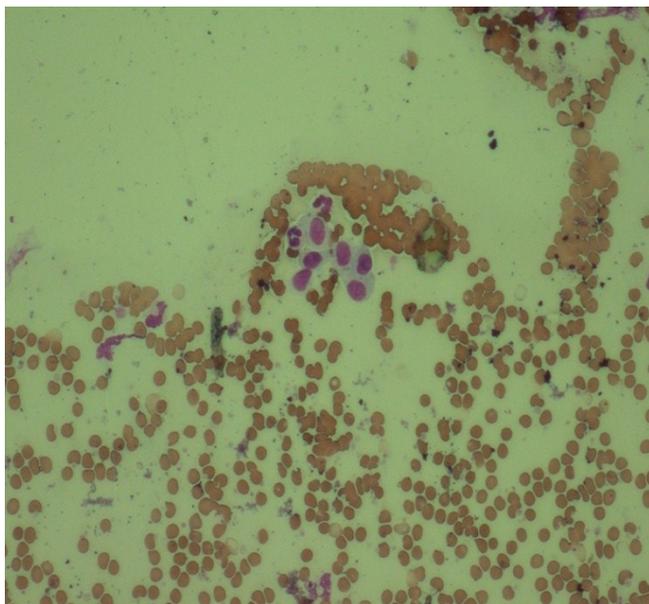
(таблица 4). Количество русских в основной группе было больше, чем в контрольной группе, в последней же напротив преобладали буряты.

Таблица 4. Распределение пациентов и доноров по национальности

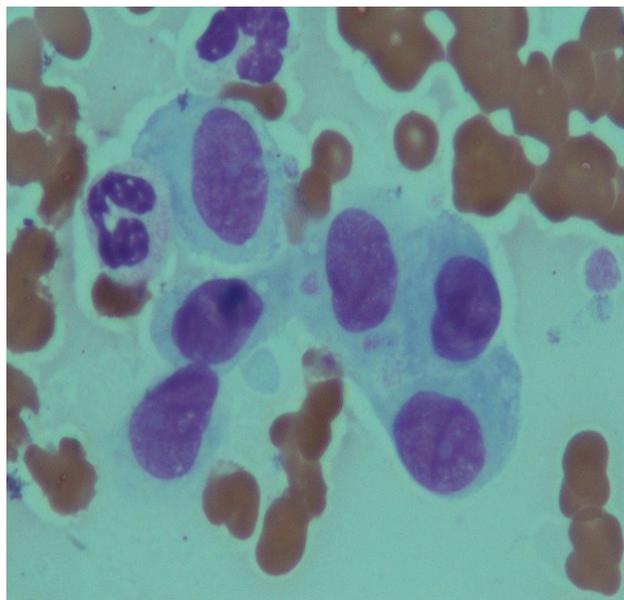
Пол	Группы обследованных лиц				P
	основная		контрольная		
	абс. число	%	абс. число	%	
Русские	160	75,8	65	37,6	<0,001
Буряты	51	24,2	108	62,4	<0,001
p		<0,001		<0,001	
Количество обследуемых лиц	211	100,0	173	100,0	

У 198 (93,8%) больных из 211 пациентов с подозрением на ЗНО при проведении гемофилтроцитологического исследования в периферической крови были обнаружены циркулирующие раковые клетки (рисунки 3-14).

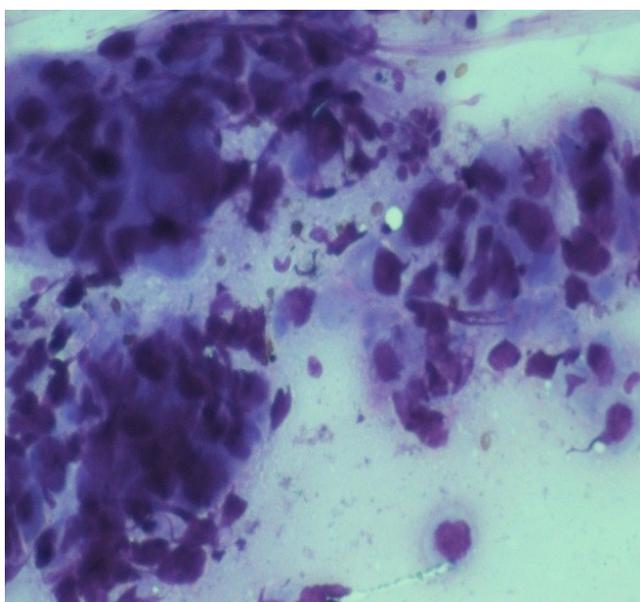
Следующим этапом диагностического процесса являлось определение локализации опухоли, степень её распространенности в органе, морфологическое подтверждение диагноза. Проведенное в дальнейшем у этих больных целенаправленное инструментальное дообследования с патогистологическим исследованием биопсийного и операционного материала, подтвердило у них наличие злокачественной опухоли. Таким образом процент больных, у которых удалось обнаружить ЦРК в венозной крови и диагноз злокачественного новообразования в последствии у них подтвердился составил 93,8%.



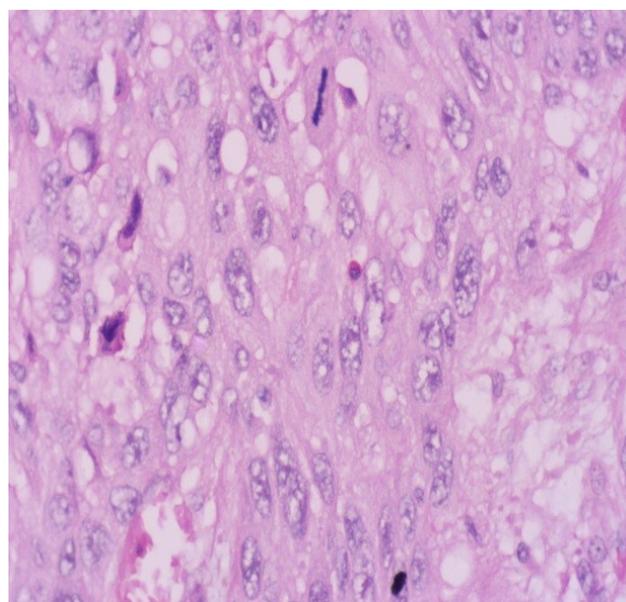
А. Ув. X 200



А. Ув. X 1000



Б. Ув. X 200



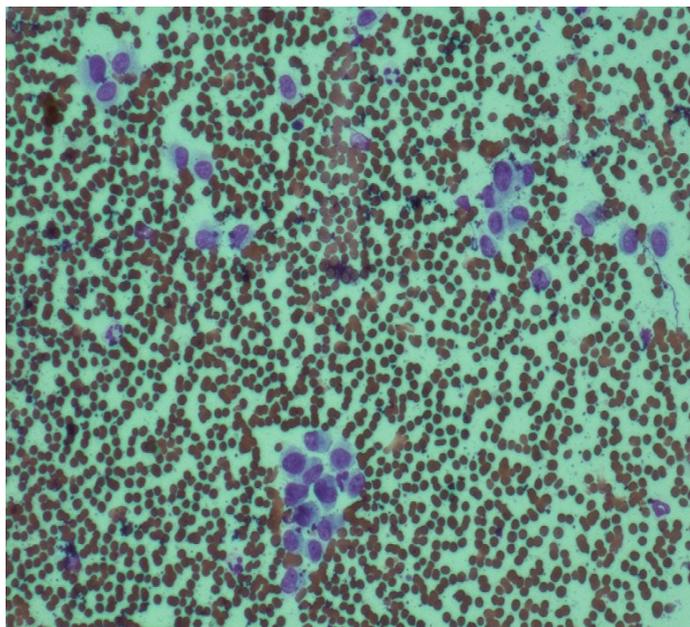
В. Ув. X 400

Рисунок 3. Больной, 63 лет. Диагноз: «Рак верхней доли правого легкого. IIIc стадия».

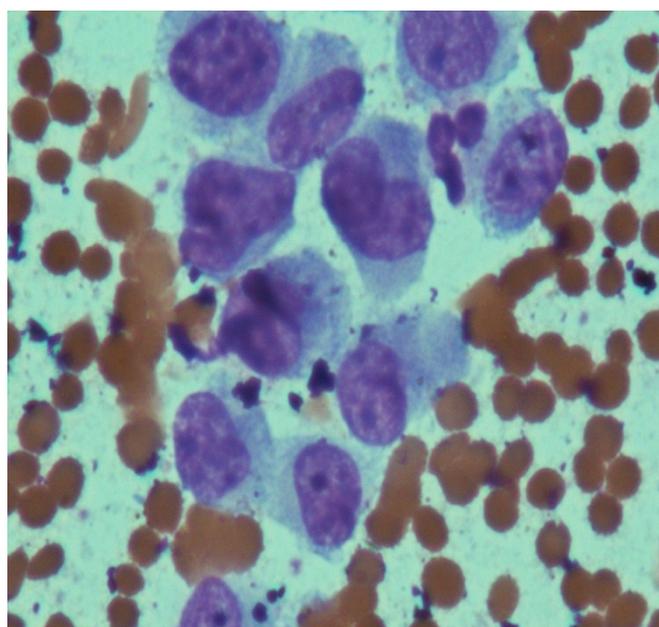
А. Гемофилтроцитологическое исследование: ЦРК в периферической венозной крови. Окраска азур-эозином.

Б. Цитологическое исследование: комплекс опухолевых клеток. Окраска азур-эозином.

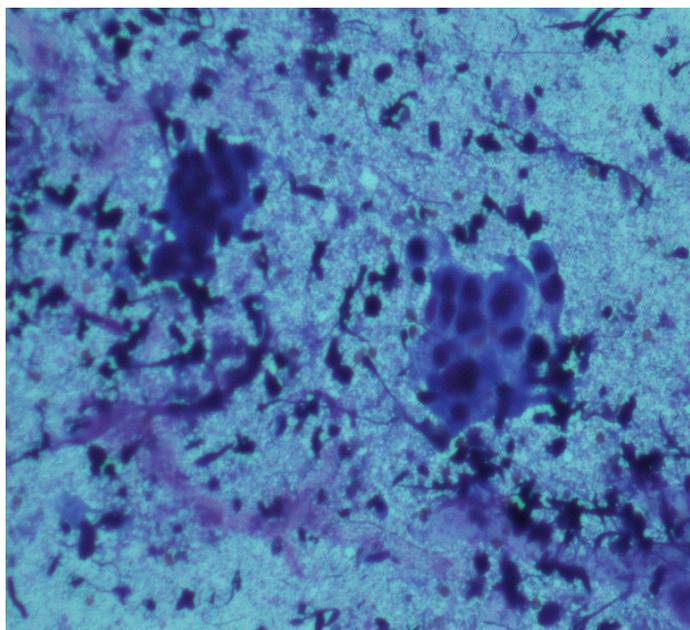
В. Патогистологическое исследование: «Плоскоклеточный рак легкого» Окрасивание гематоксилин-эозином.



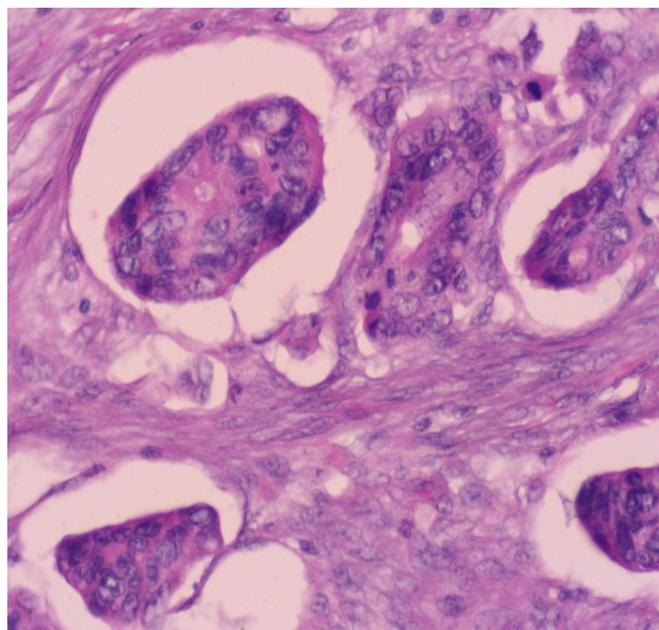
А. Ув. X 200



А. Ув. X 1000



Б. Ув. X 200



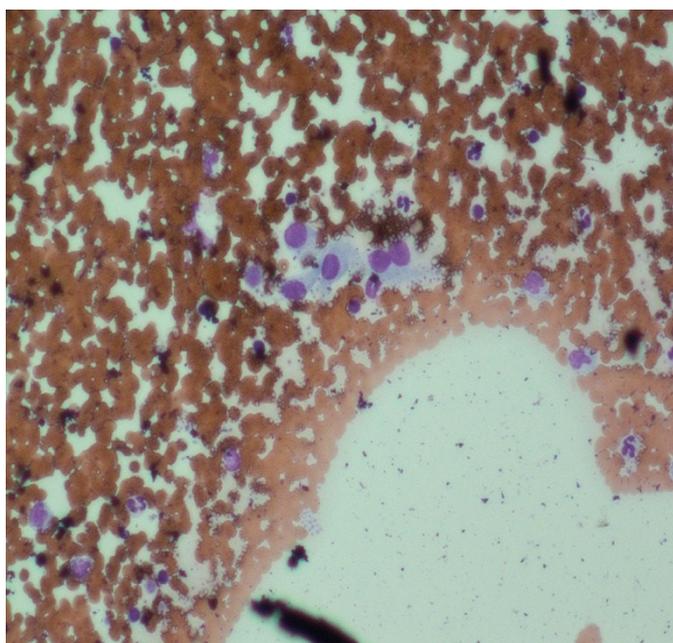
В. Ув. X 400

Рисунок 4. Больная, 68 лет. Диагноз: «Рак нисходящего отдела ободочной кишки. Па стадии».

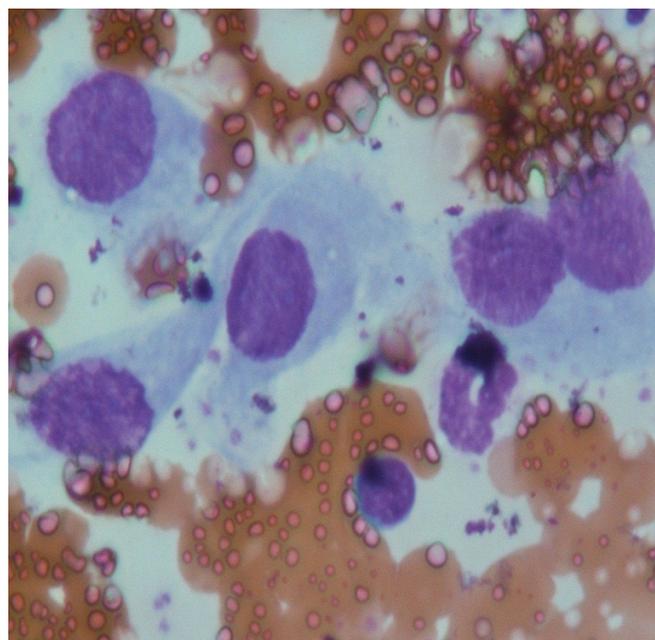
А. Гемофилтроцитологическое исследование: ЦРК в периферической венозной крови. Окраска азур-эозином.

Б. Цитологическое исследование: комплекс опухолевых клеток. Окраска азур-эозином.

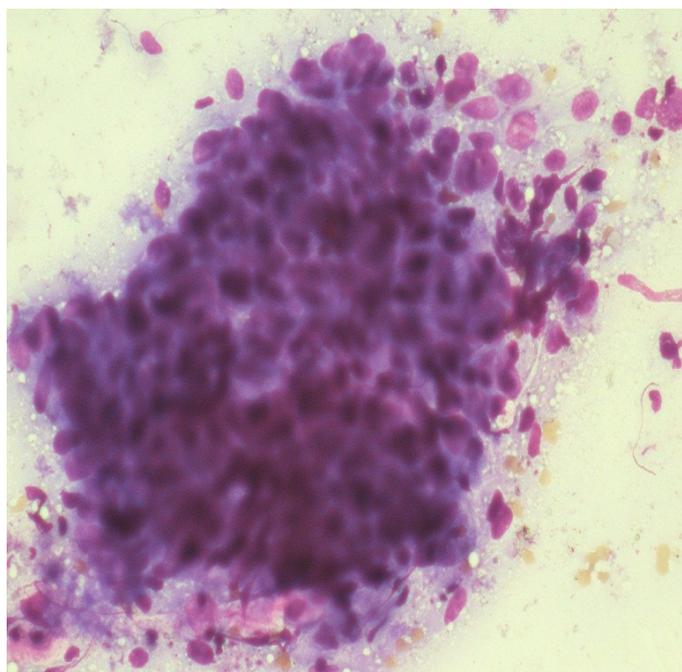
В. Патогистологическое исследование: «Умеренно дифференцированная аденокарцинома. Окрашивание гематоксилин-эозином.



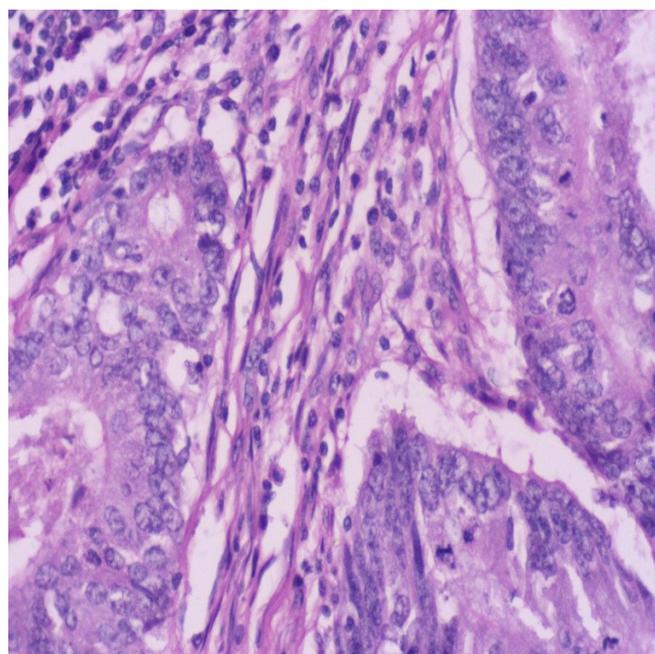
А. Ув. X 200



А. Ув. X 1000



Б. Ув. X 200



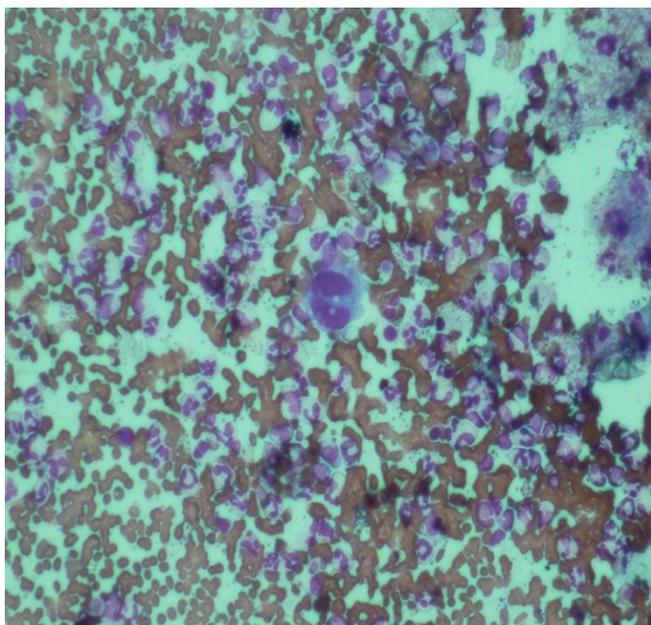
В. Ув. X 400

Рисунок 5. Больная, 66 лет. Диагноз «Рак нисходящего отдела ободочной кишки. Пя стадия».

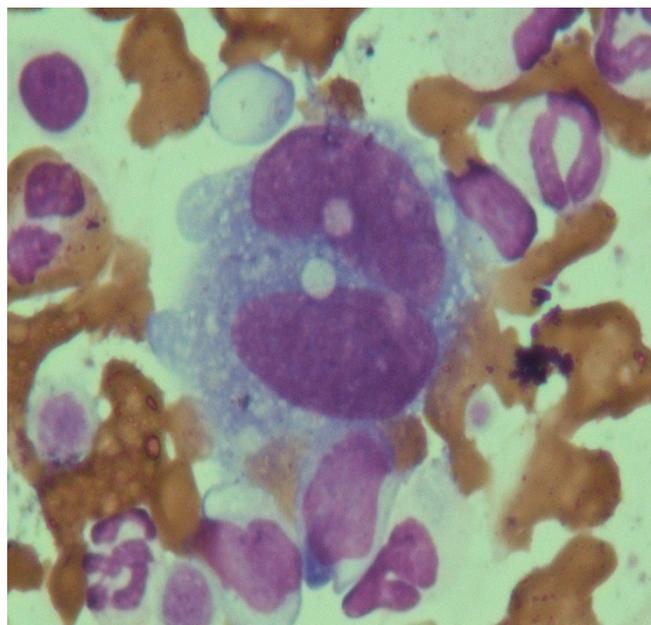
А. Гемофильтроцитологическое исследование: ЦРК в периферической венозной крови. Окраска азур-эозином.

Б. Цитологическое исследование: комплекс опухолевых клеток. Окраска азур-эозином.

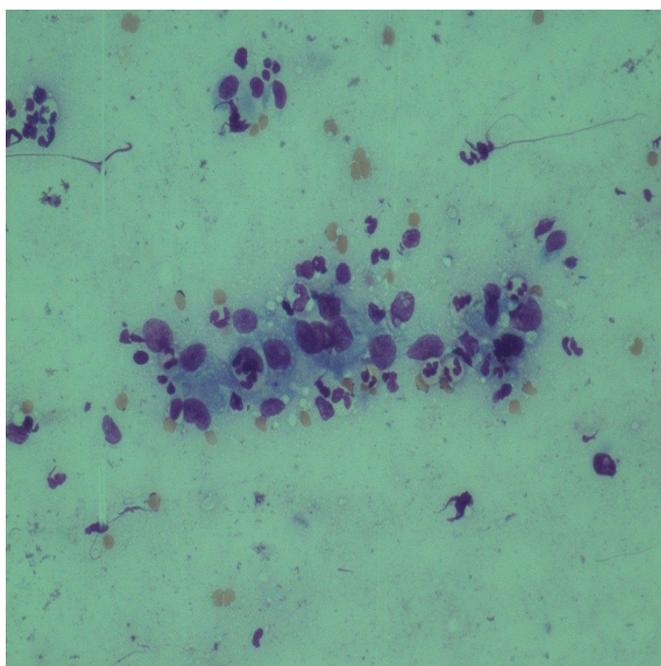
В. Патологическое исследование: Умеренно дифференцированная аденокарцинома. Окрашивание гематоксилин-эозином.



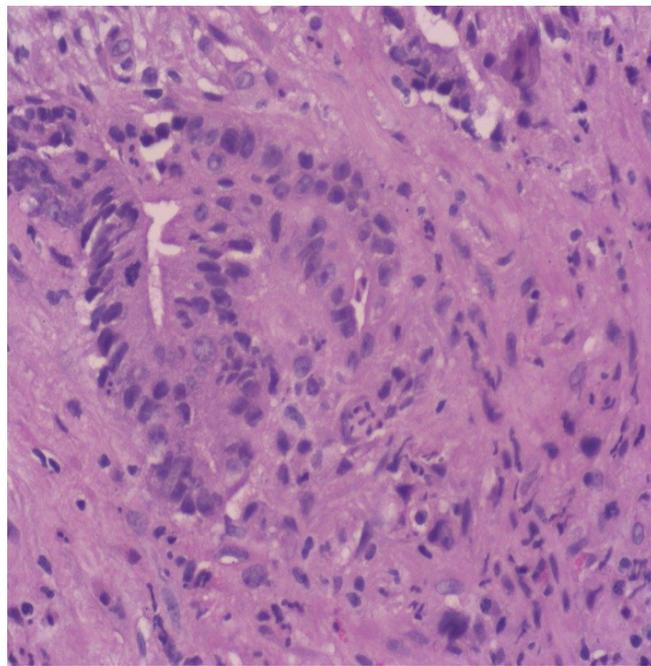
А. Ув. X 200



А. Ув. X 1000



Б. Ув. X 200



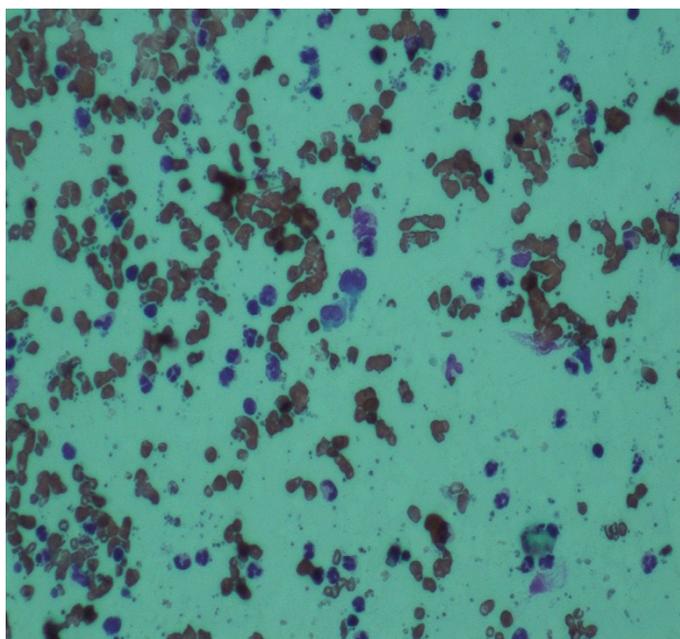
В. Ув. X 400

Рисунок 6. Больной, 71 год. Диагноз: «Рак верхнеампулярного отдела прямой кишки. IV стадия».

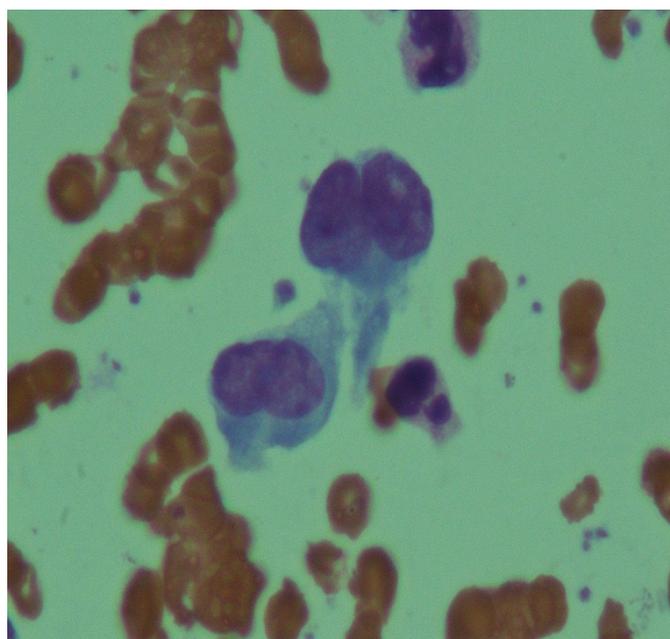
А. Гемофильтрацитологическое исследование: ЦРК в периферической венозной крови. Окраска азур-эозином.

Б. Цитологическое исследование: комплекс опухолевых клеток. Окраска азур-эозином.

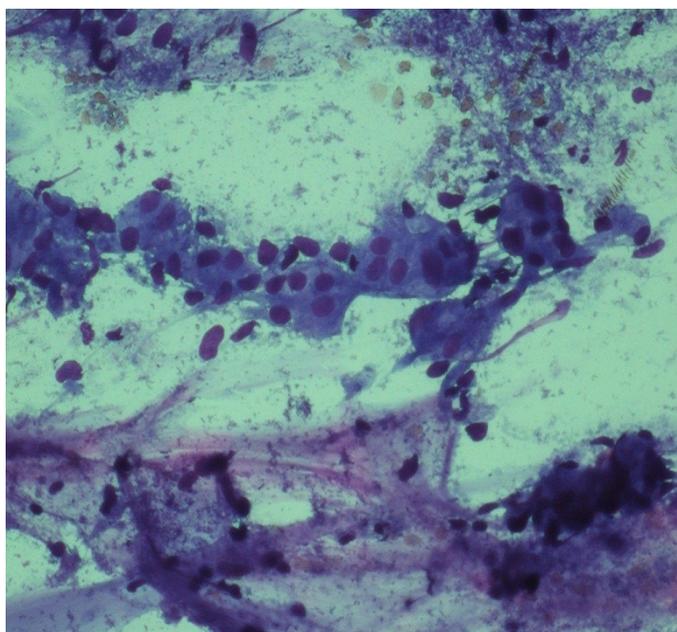
В. Патогистологическое исследование: «Аденокарцинома прямой кишки». Окрашивание гематоксилин-эозином.



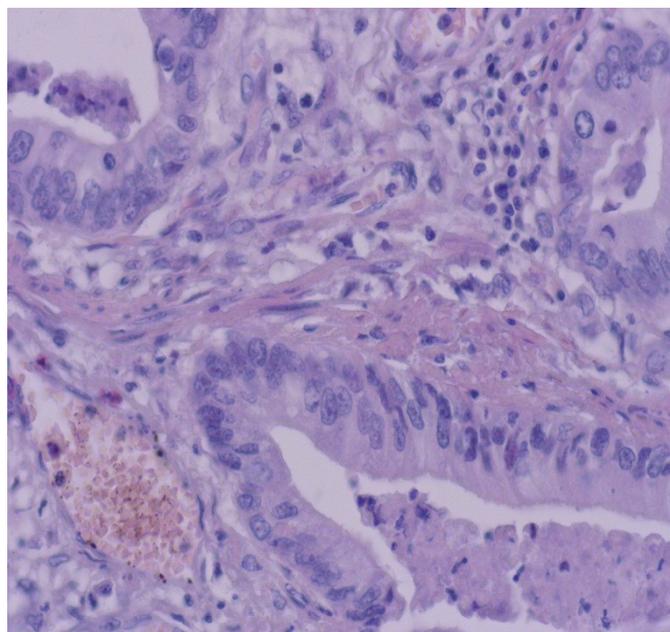
А. Ув. X 200



А. Ув. X 1000



Б. Ув. X 200 В.



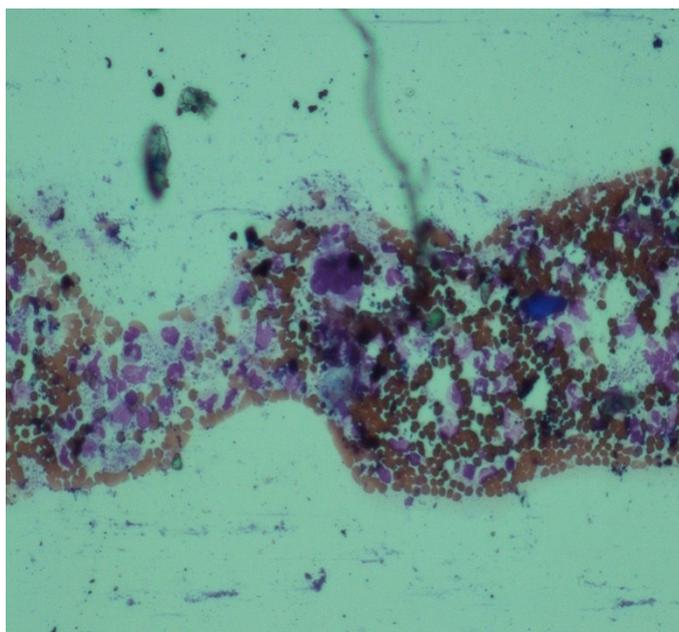
В. Ув. X 400

Рисунок 7. Больной, 40 лет. Диагноз: «Рак антрального отдела желудка. Iб стадия».

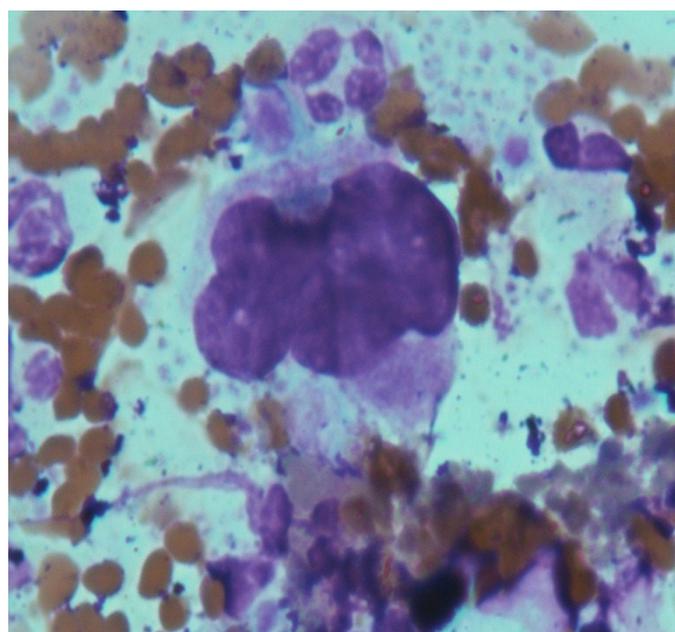
А. Гемофильтрацитологическое исследование: ЦРК в периферической венозной крови. Окраска азур-эозином.

Б. Цитологическое исследование: комплекс опухолевых клеток. Окраска азур-эозином.

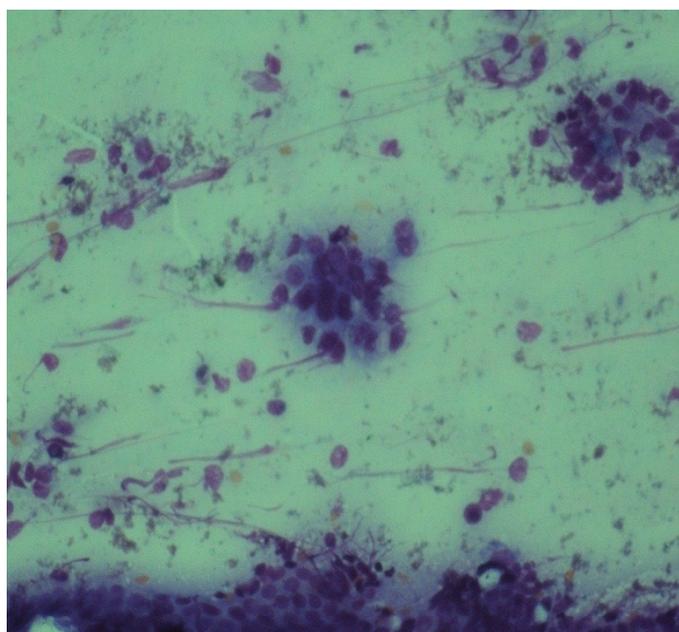
В. Патогистологическое исследование: Умеренно дифференцированная аденокарцинома желудка. Окрасивание гематоксилин-эозином.



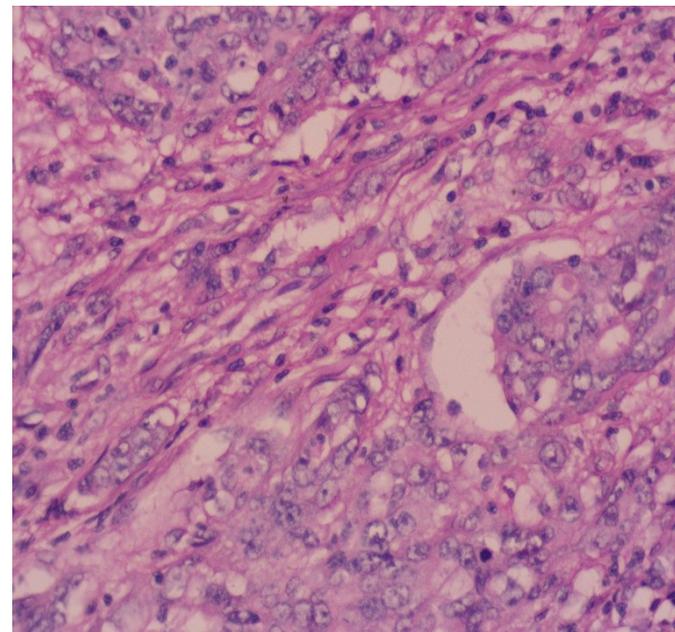
А. Ув. X 200



А. Ув. X 1000



Б. Ув. X 200



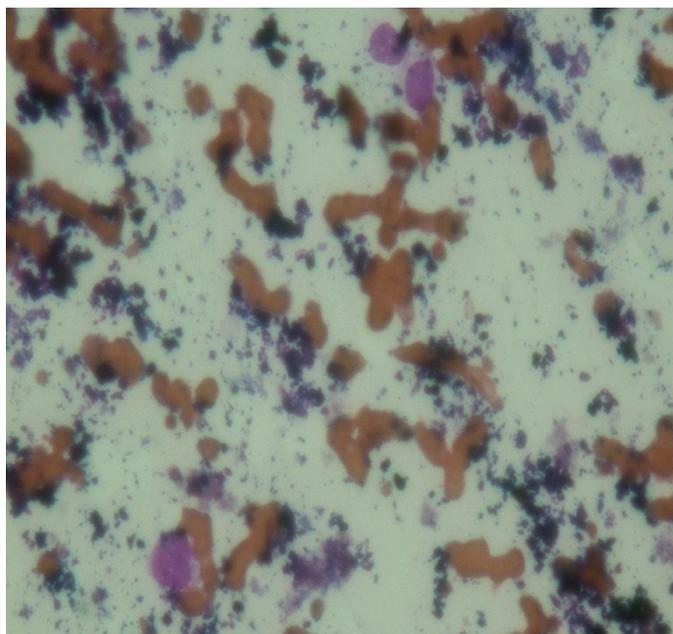
В. Ув. X 400

Рисунок 8. Больная, 53 лет. Диагноз: «Рак тела желудка. IIIб стадия».

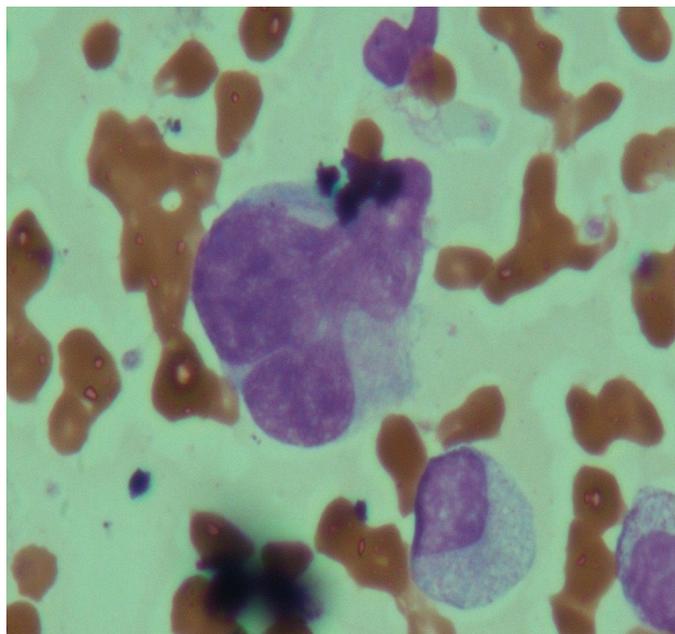
А. Гемофильтроцитологическое исследование: ЦРК в периферической венозной крови. Окраска азур-эозином.

Б. Цитологическое исследование: комплекс опухолевых клеток. Окраска азур-эозином.

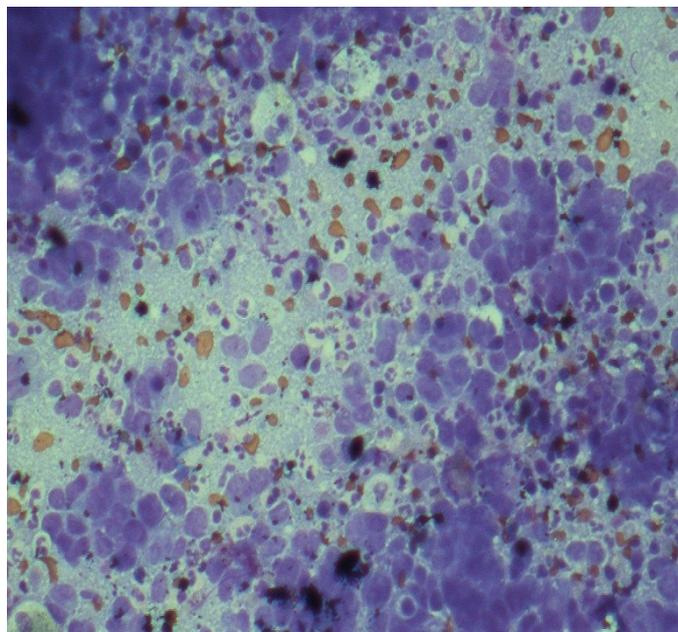
В. Патогистологическое исследование: «Низкодифференцированная аденокарцинома желудка». Окрашивание гематоксилин-эозином.



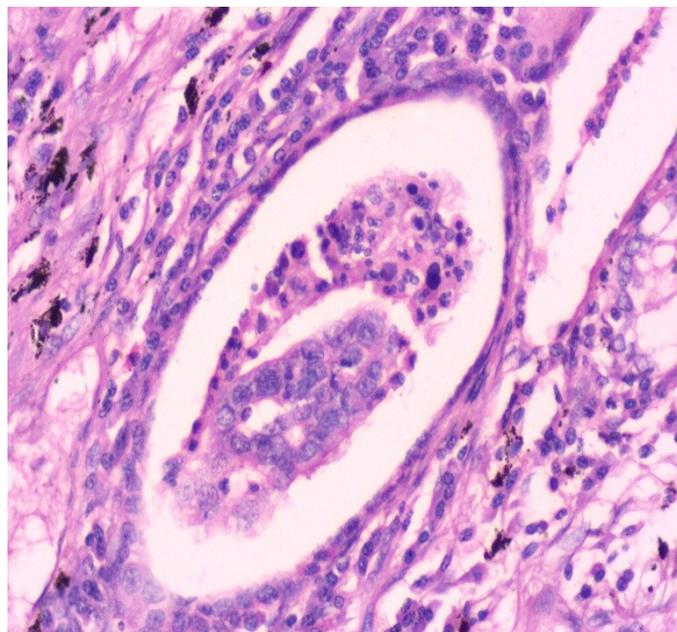
А. Ув. X 200



А. Ув. X 1000



Б. Ув. X 200



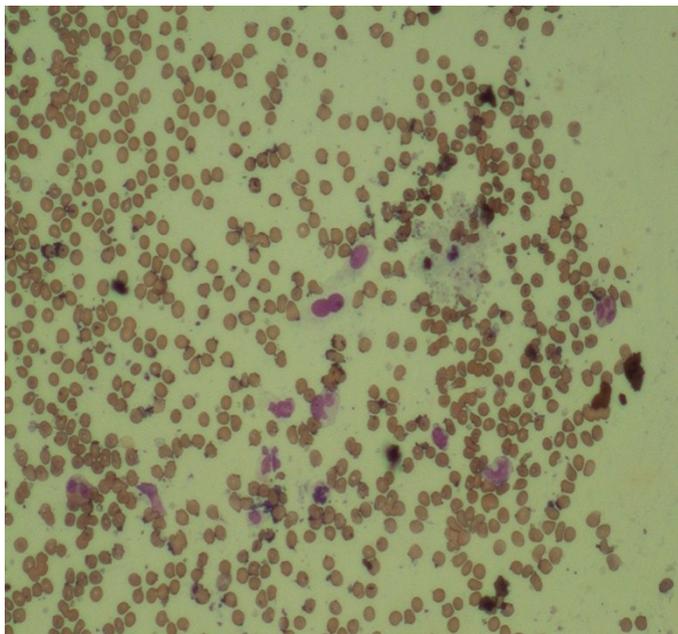
В. Ув. X 400

Рисунок 9. Больной, 74 года. Диагноз: «Рак верхней доли левого легкого. IIa стадия».

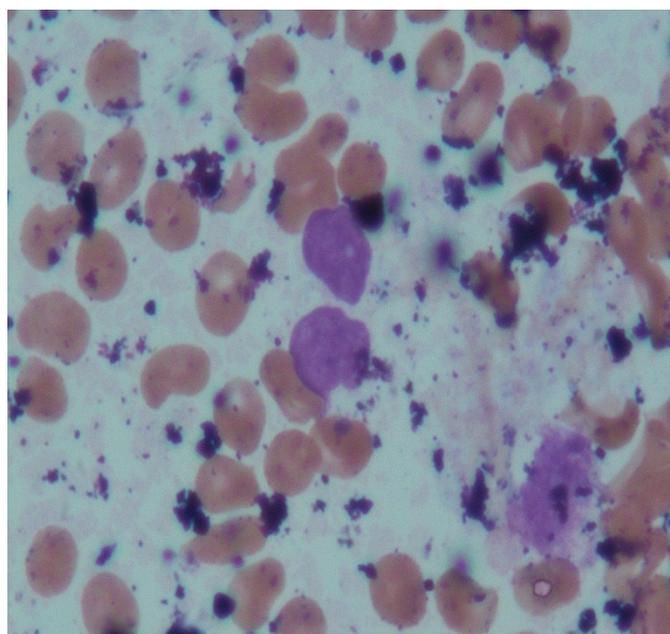
А. Гемофильтрацитологическое исследование: ЦРК в периферической венозной крови. Окраска азур-эозином.

Б. Цитологическое исследование: комплекс опухолевых клеток. Окраска азур-эозином.

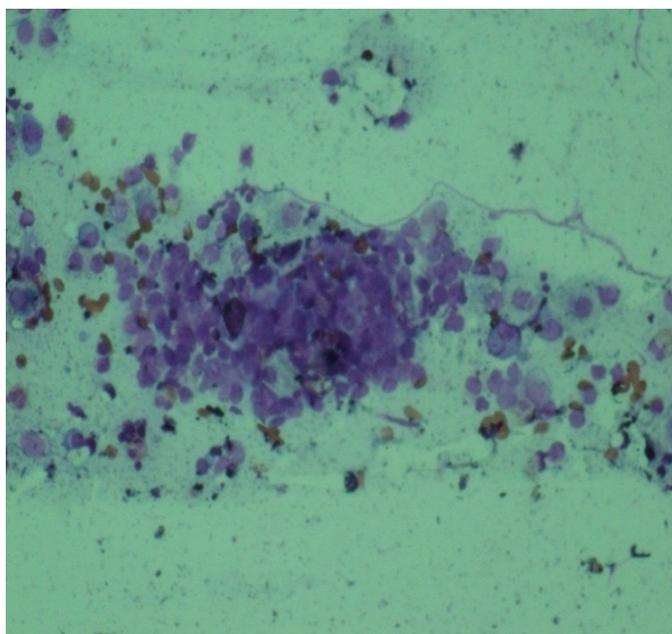
В. Патогистологическое исследование: «Умеренно дифференцированный плоскоклеточный рак легкого». Окрашивание гематоксилин-эозином.



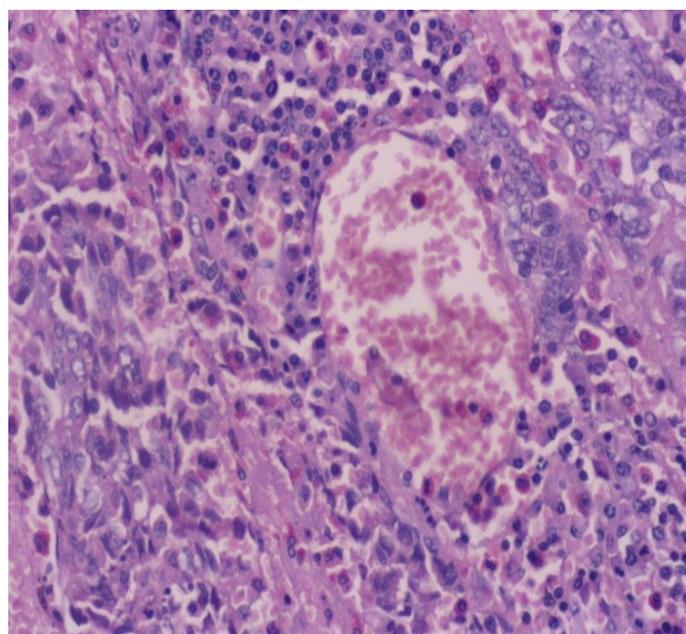
А. Ув. X 200



А. Ув. X 1000



Б. Ув. X 200



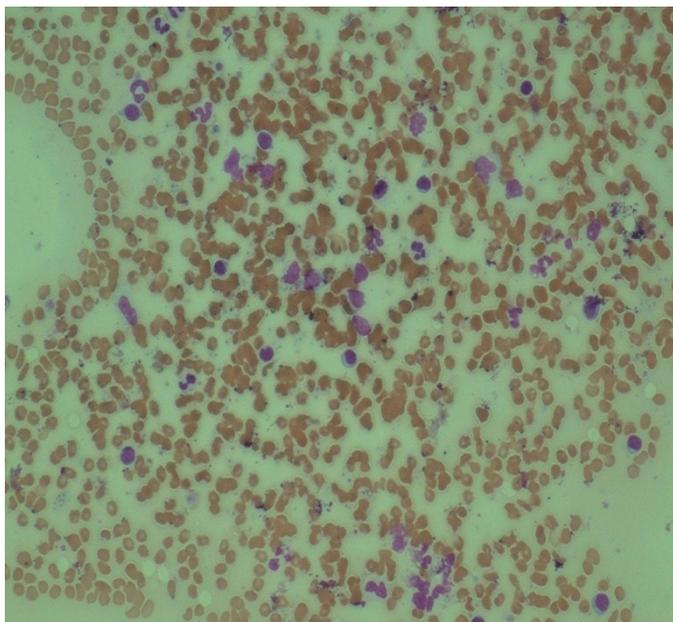
В. Ув. X 400

Рисунок 10. Больной, 43 года. Диагноз: «Злокачественный карциноид левого легкого. III стадии».

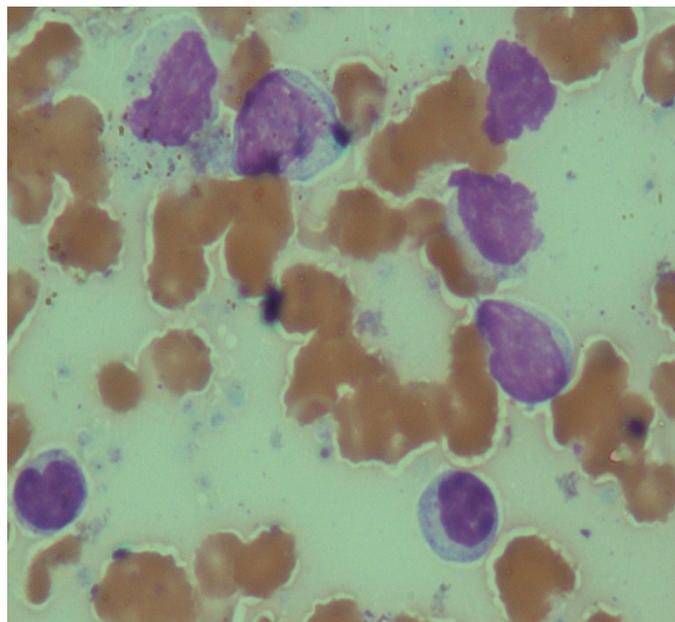
А. Гемофилтроцитологическое исследование: ЦРК в периферической венозной крови. Окраска азур-эозином.

Б. Цитологическое исследование: комплекс опухолевых клеток. Окраска азур-эозином.

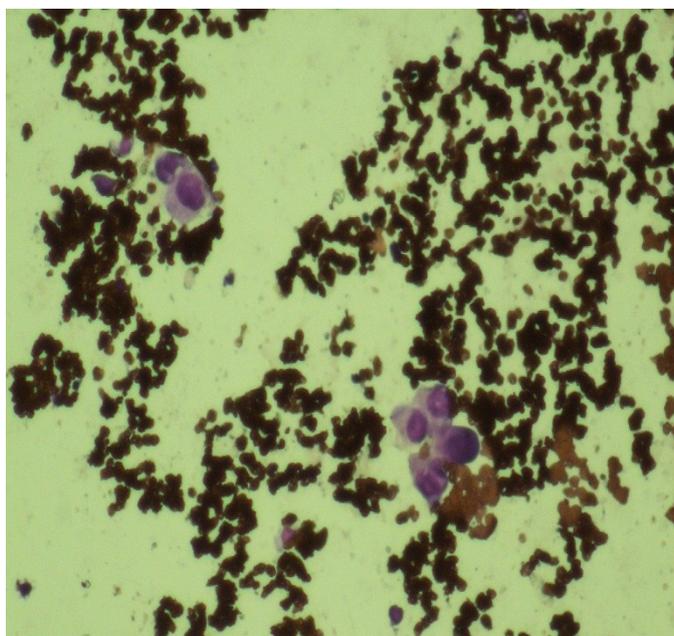
В. Патогистологическое исследование: «Злокачественный карциноид легкого». Окрашивание гематоксилин-эозином.



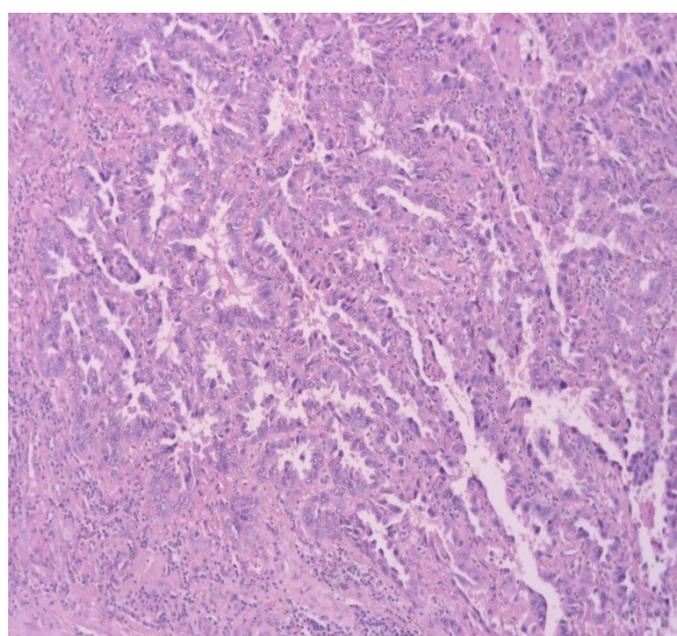
А. Ув. X 200



А. Ув. X 1000



Б. Ув. X 200



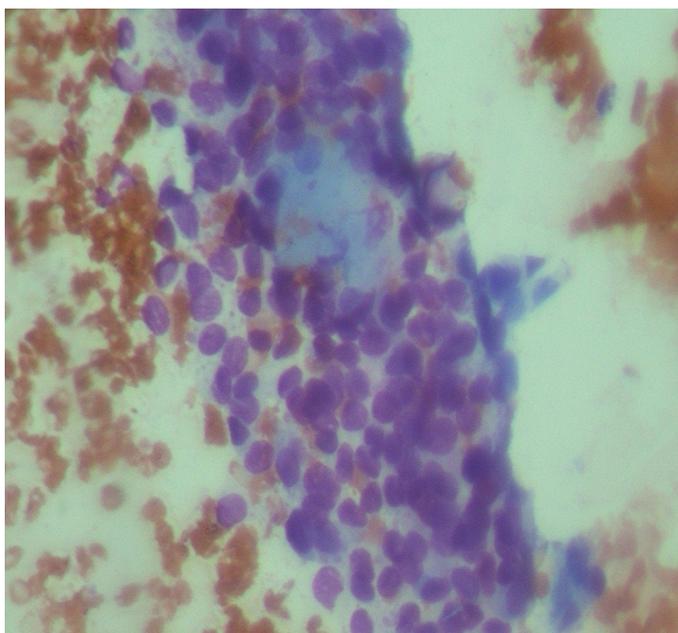
В. Ув. X 400

Рисунок 11. Больная, 80 лет. Диагноз: «Рак верхней доли правого легкого. I стадия».

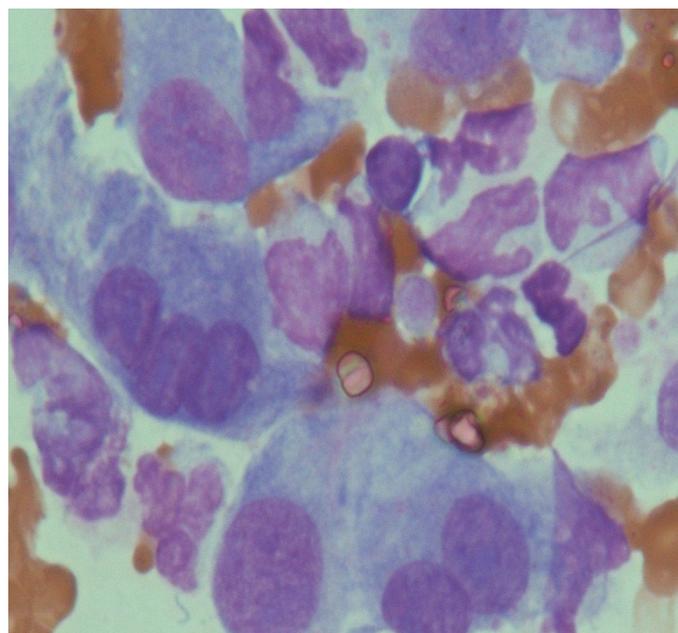
А. Гемофилтритологическое исследование: ЦРК в периферической венозной крови. Окраска азур-эозином.

Б. Цитологическое исследование: комплекс опухолевых клеток. Окраска азур-эозином.

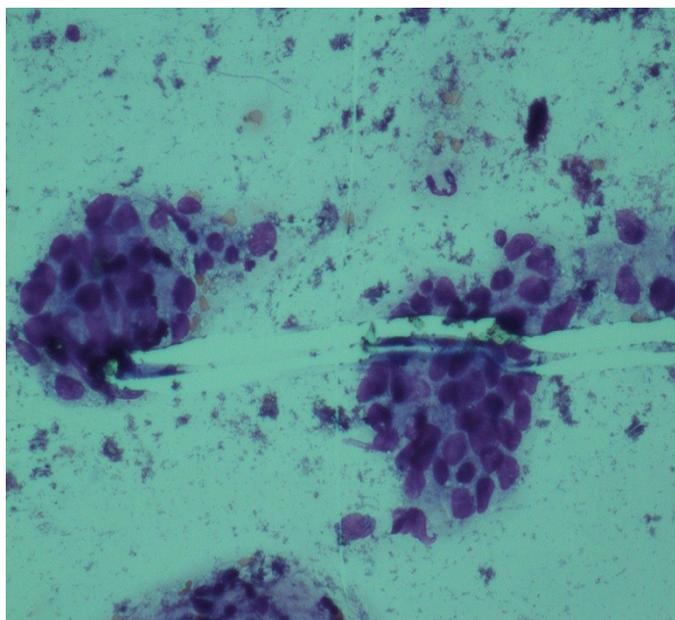
В. Патогистологическое исследование: «Бронхиолоальвеолярный слизеобразующий рак легкого». Окрашивание гемтоксилин-эозином.



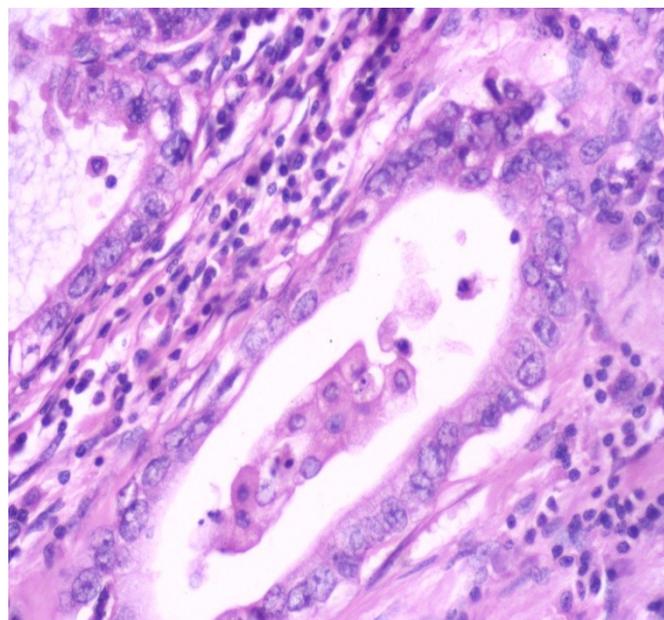
А. Ув. X 200



А. Ув. X 1000



Б. Ув. X 200



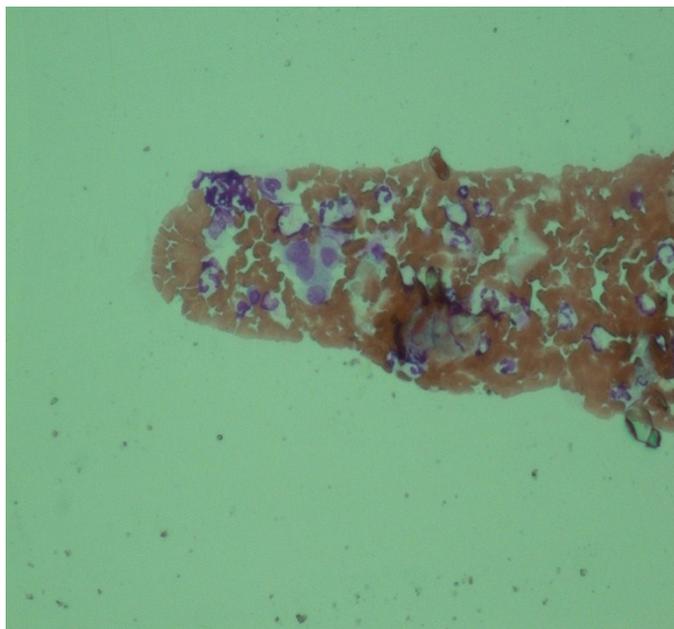
В. Ув. X 400

Рисунок 12. Больной, 66 лет. Диагноз: «Рак желудка. IIIc стадия».

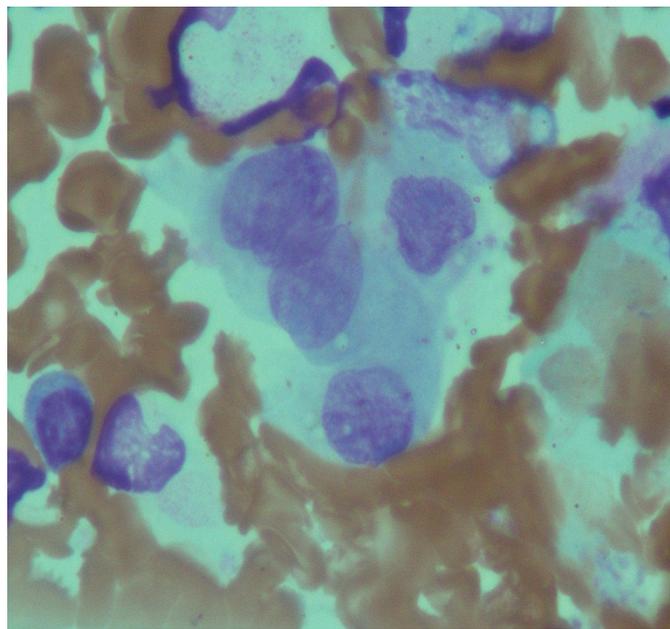
А. Гемофилтритроцитологическое исследование: ЦРК в периферической венозной крови. Окраска азур-эозином.

Б. Цитологическое исследование: комплекс опухолевых клеток. Окраска азур-эозином.

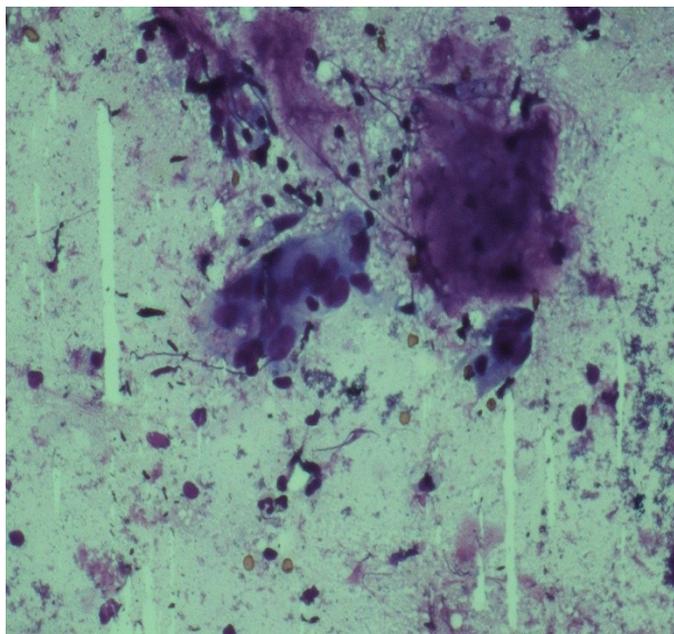
В. Патогистологическое исследование: «Умеренно дифференцированная аденокарцинома желудка». Окрашивание гематоксилин-эозином.



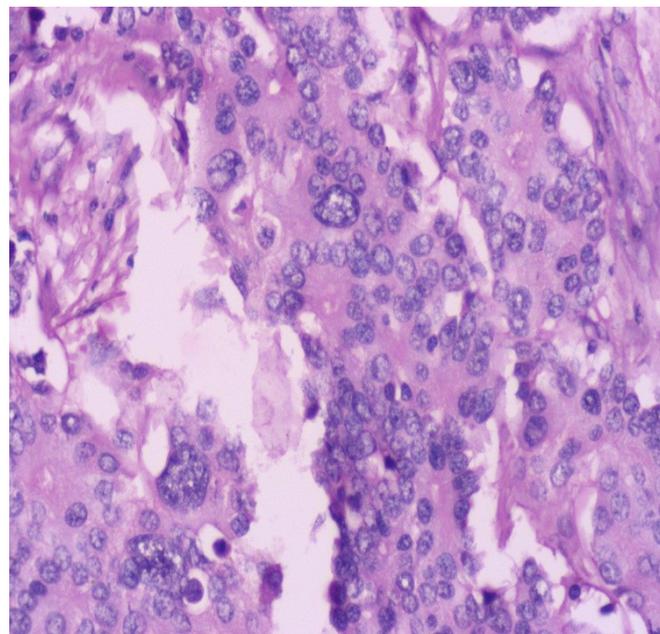
А. Ув. X 200



А. Ув. X 1000



Б. Ув. X 200



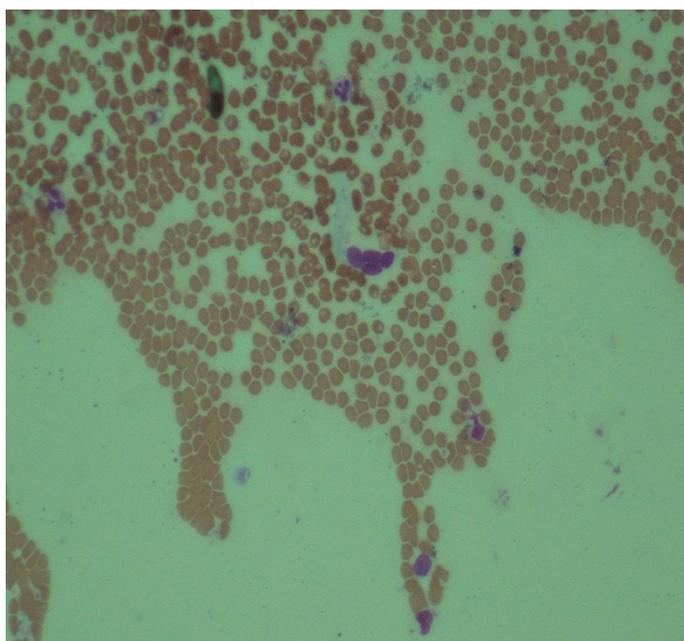
В. Ув. X 400

Рисунок 13. Больная, 65 лет. Диагноз: «Рак слепой кишки. III стадия».

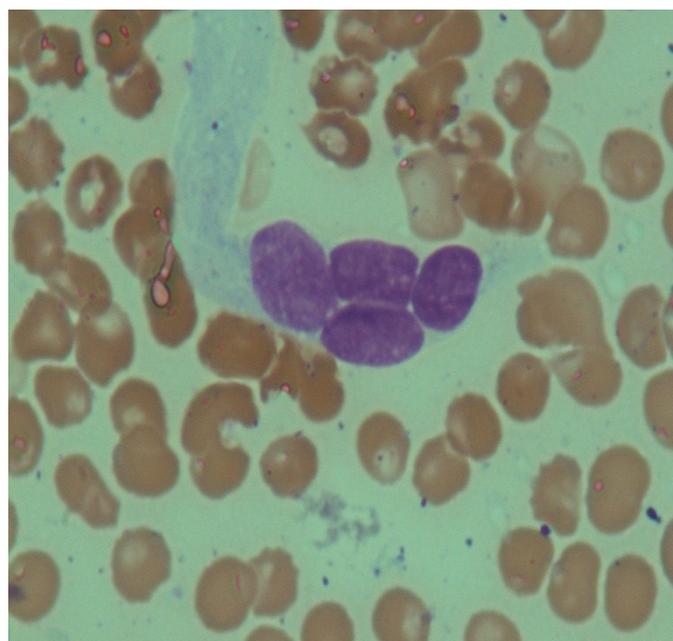
А. Гемофильтрацитологическое исследование: ЦРК в периферической венозной крови. Окраска азур-эозином.

Б. Цитологическое исследование: комплекс опухолевых клеток. Окраска азур-эозином.

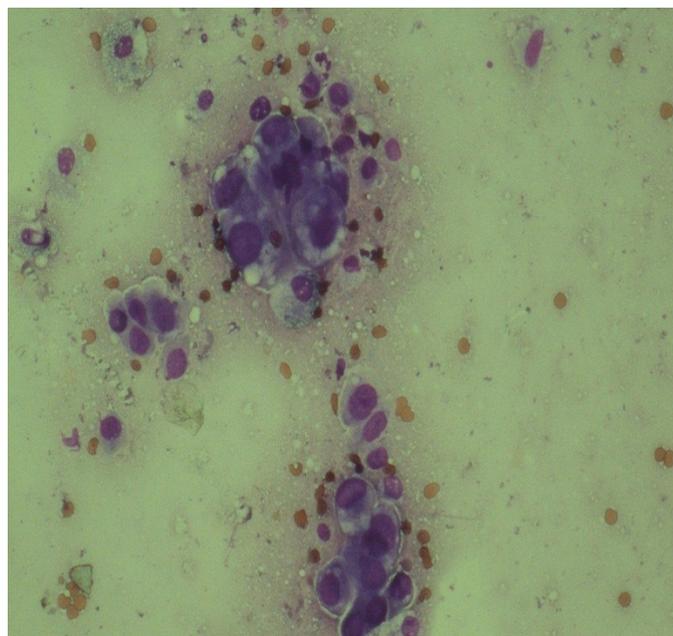
В. Патогистологическое исследование: «Умеренно дифференцированная аденокарцинома толстой кишки». Окрашивание гематоксилин-эозином.



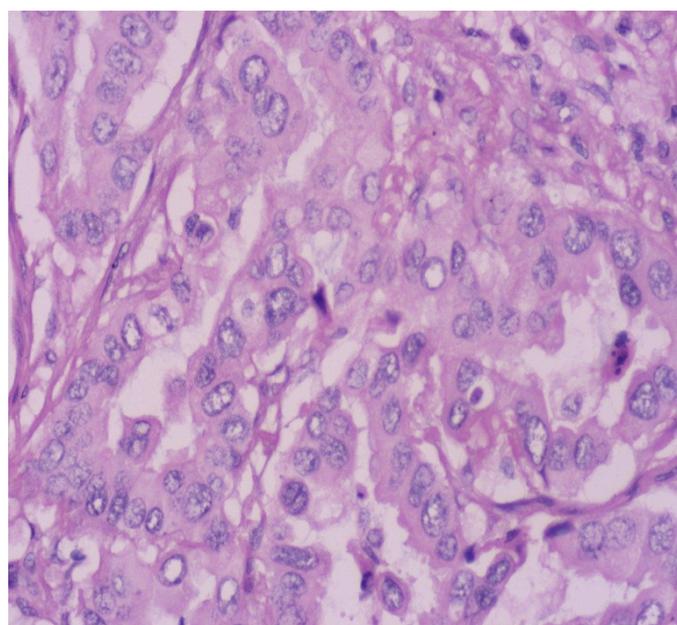
А. Ув. X 200



А. Ув. X 1000



Б. Ув. X 200



В. Ув. X 400

Рисунок 14. Больная, 57 лет. Диагноз: «Рак верхней доли правого легкого. III стадия».

А. Гемофилтритологическое исследование: ЦРК в периферической венозной крови. Окраска азур-эозином.

Б. Цитологическое исследование: комплекс опухолевых клеток. Окраска азур-эозином.

В. Патогистологическое исследование: «Умеренно дифференцированная аденокарцинома легкого». Окрашивание гематоксилин-эозином.

У 13 (6,2%) больных соЗНО I-II стадии гистологически верифицированными ЦРК в периферической крови не были выявлены, хотя у достаточно большого количества больных с I-II стадии заболевания удалось выявить ЦРК с помощью гемофилтритроцитологического исследования.

Среди 198 больных, у которых при гемофилтритроцитологическом исследовании были установлены ЦРК, у 28(14,1%) пациентов имелись I-II стадии злокачественного процесса. (таблица 5).

Таблица 5. Распределение злокачественных новообразований по стадиям

Стадия новообразования	Количество больных	
	абс. число	%
I стадия	2	1,0
II стадия	26	13,1
III стадия	123	62,1
IV стадия	47	23,7
Всего	198	100,0

Гемофилтритроцитологическим методом также исследована венозная кровь у 173 доноров на предмет наличия или отсутствия у них ЦРК. Проведенное гемофилтритроцитологическое исследование у доноров не выявило ни в одном случае циркулирующие раковые клетки. Соответственно специфичность гемофилтритроцитологического исследования венозной крови обследованных лиц составила 100%.

Частота выявления циркулирующих раковых клеток в крови при различных нозологических формах ЗНО колебалась от 75,0% до 97,6% (таблица 6).

При пяти степенях свободы и уровня статистической значимости $p=0,005$ табличное значение критических точек распределения хи-квадрата 16,750 к расчетным значениям $\chi^2=29,10$ установленные на основании результатов гистологических исследований и $\chi^2=34,6$ установленные по результатам гемофилтритроцитологических исследований (таблица 7).

Таблица 6. Впервые установленные злокачественные новообразования

Локализация злокачественного новообразования	Выявление ЗНО по результатам			
	патогистологии		гемофильтроцитодиагностики	
	абс. число	%	абс.число	%
Легкие	47	100,0	45	95,8
Желудок	50	100,0	48	96,0
Поджелудочная железа	12	100,0	9	75,0
Ободочная и прямая кишка	41	100,0	40	97,6
Молочные железы	24	100,0	21	87,5
Яичники	37	100,0	35	94,6
Всего:	211	100,0	198	93,8

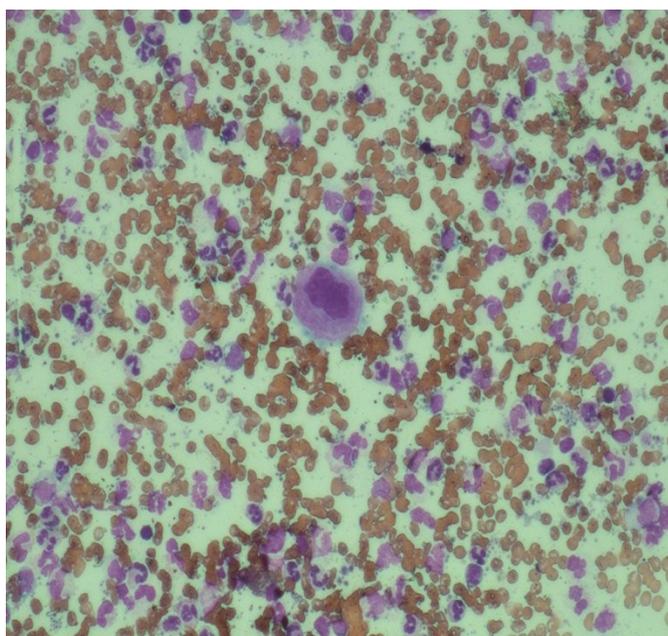
Таблица 7. Значение хи-квадрата для методики с применением гистологических исследований и гемофильтроцитологического метода

Локализация злокачественного новообразования	Установленные диагнозы на основании результатов гистологических исследований	Теоретические значения $(Y-Y^{\wedge})^2/Y^{\wedge}$		Установленные диагнозы по результатам гемофильтроцитологических исследований	Теоретические значения $(Y-Y^{\wedge})^2/Y^{\wedge}$	
Легкие	47	35,16	2,97	45	33	4,36
Желудок	50	35,16	6,25	48	33	6,81
Поджелудочная железа	12	35,16	15,26	9	33	17,45
Толстая кишка	41	35,16	0,96	40	33	1,48
Молочные железы	24	35,16	3,54	21	33	4,36
Яичники	37	35,16	0,096	35	33	0,12
Всего:	211	Σ	29,10	198	Σ	34,60

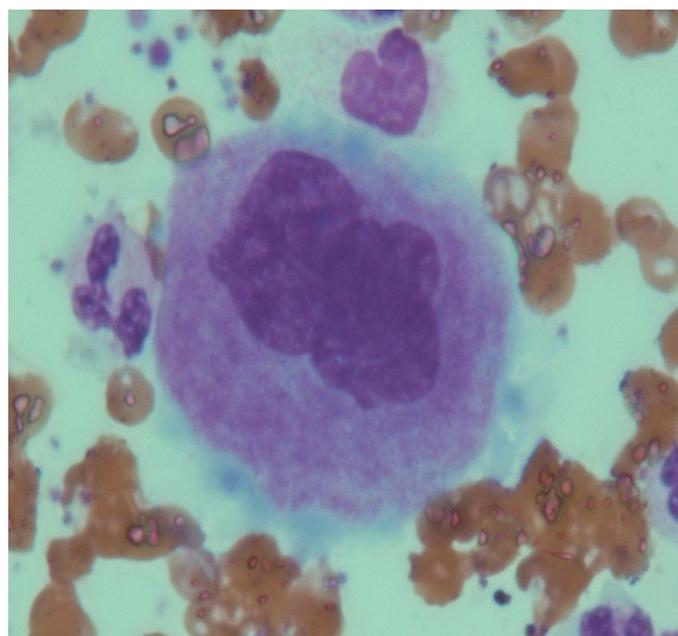
Полученные показатели больше критического и оба расчетных значения статистически значимы с вероятностью более 99,0% (таблица 8). Сравниваем с распределением хи-квадрата с $6-1=5$ степенями свободы, где 6 - число групп. Реально достигнутый уровень значимости безмерно мал: 0,000017. Различия можно считать статистически значимыми при распределении выборки на 4,26% при $n=211$ и уровне значимости $p=0,005$. Возможность определения с помощью гемофильтоцитологического исследования наличия у больных злокачественных новообразований подтверждается рядом наблюдений (рисунок 15-25).

Таблица 8. Статистика критерия хи-квадрат, проверяющего статистическую значимость различий в анализируемых группах

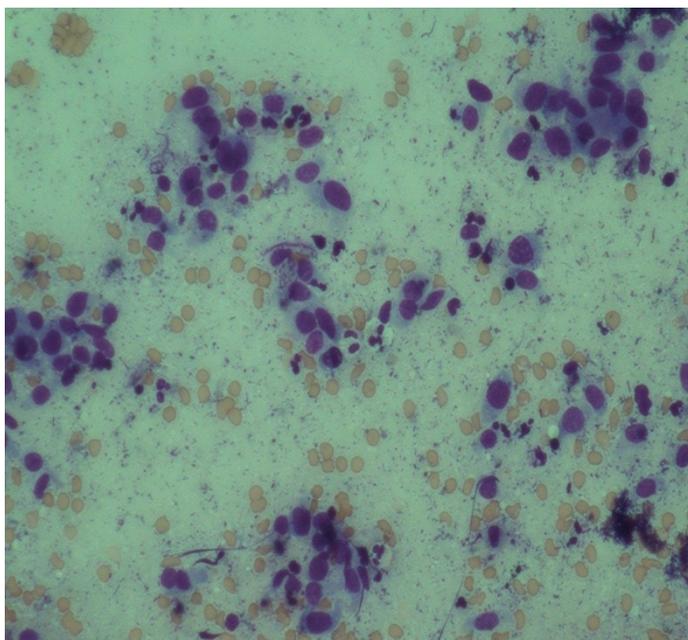
Локализация злокачественного новообразования	Установленные диагнозы на основании результатов гистологических исследований	Установленные диагнозы по результатам гемофильтоцитологических исследований	Статистическая значимость различий между группами
Легкие	47	45	0,000000222454
Желудок	50	48	0,000000303912
Поджелудочная железа	12	9	0,000006207578
Толстая кишка	41	40	0,000000733384
Молочные железы	24	21	0,000001311905
Яичники	37	35	0,000000027700
Всего:	211	198	0,000008806933



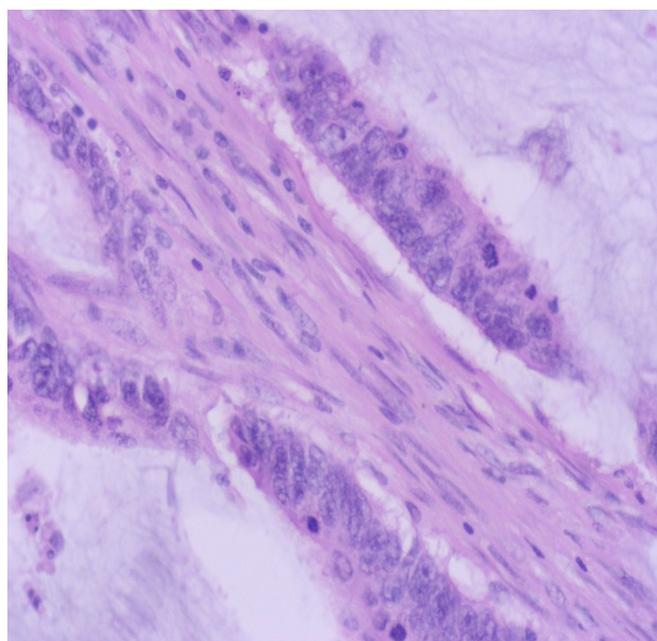
А. Ув. х 200



А. Ув. х 1000



Б. Ув. X 200



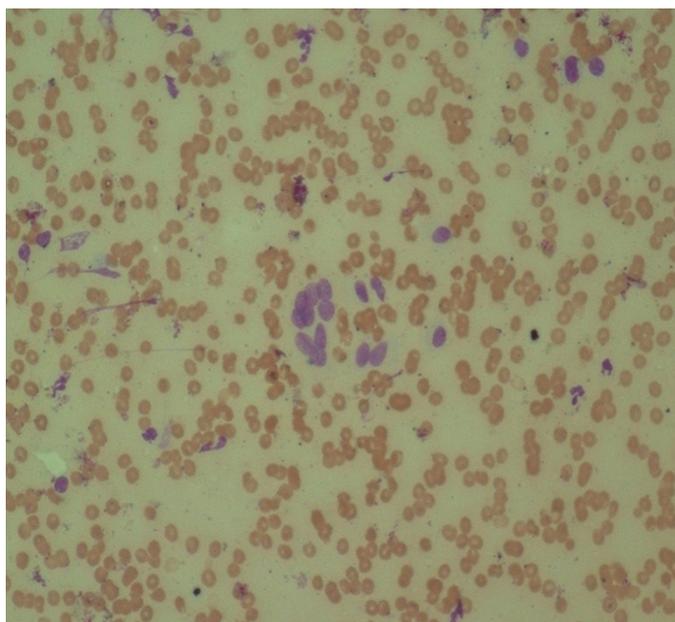
В. Ув. X 400

Рисунок 15. Больная, 68 лет. Диагноз: «Рак сигмовидной кишки. III стадия».

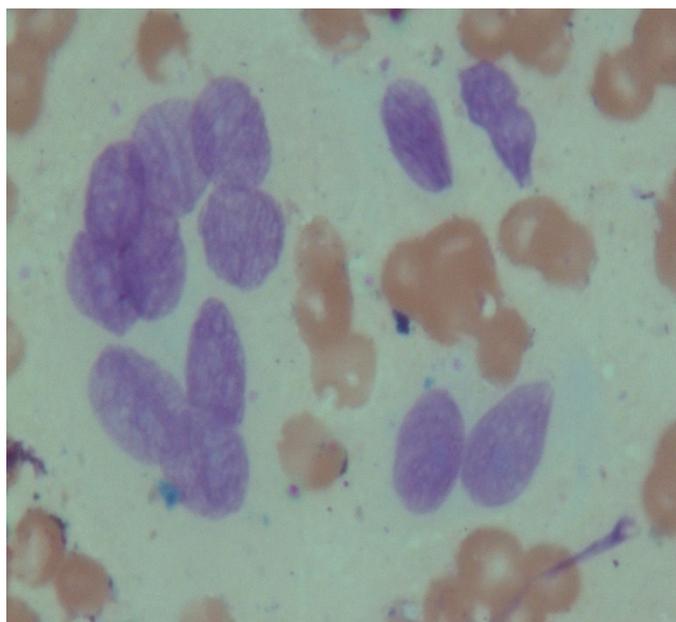
А. Гемофильтрацитологическое исследование: ЦРК в периферической венозной крови. Окраска азур-эозином.

Б. Цитологическое исследование: комплекс опухолевых клеток. Окраска азур-эозином.

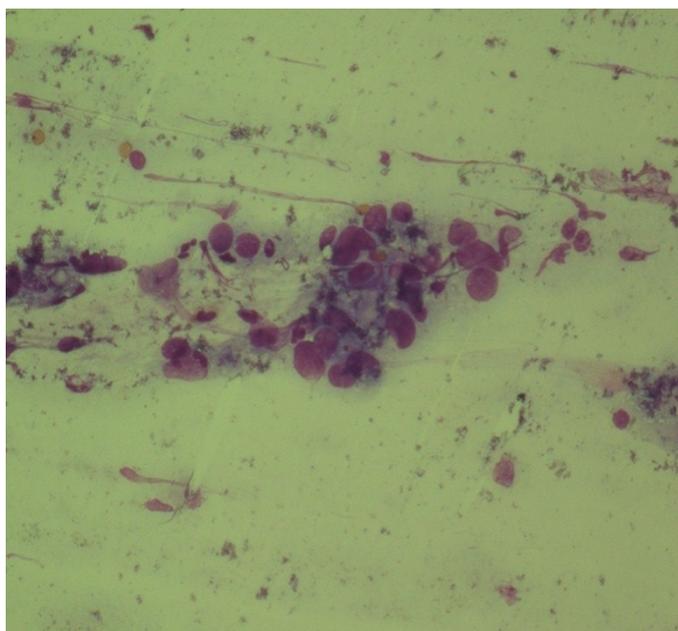
В. Патогистологическое исследование: «Коллоидная аденокарцинома толстой кишки». Окрашивание гематоксилин-эозином.



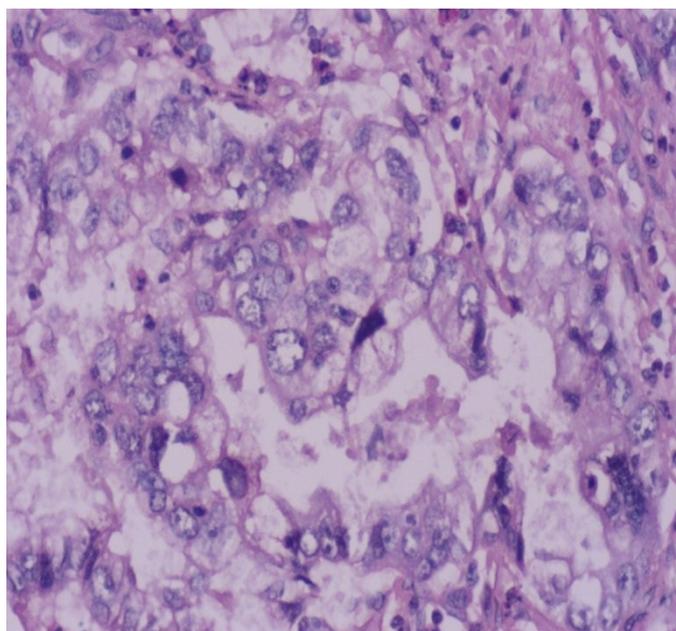
А. Ув. x 200



А. Ув. x 1000



Б. Ув. X 200



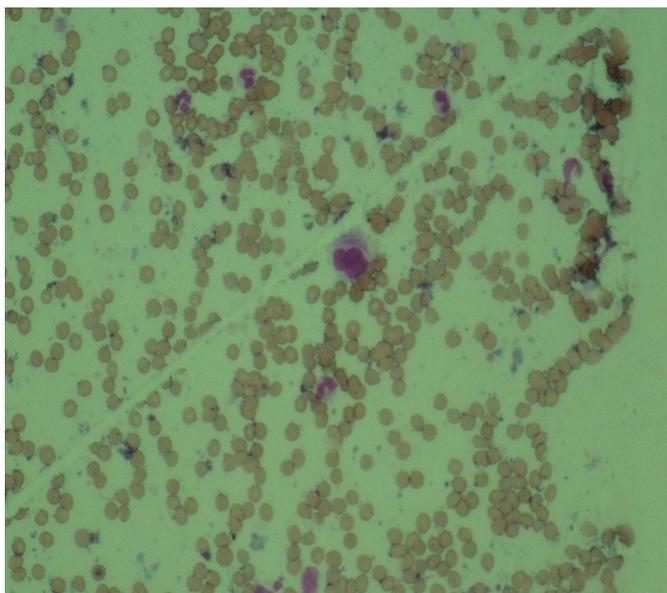
В. Ув. X 400

Рисунок 16. Больной, 84 года. Диагноз: «Рак антрального отдела желудка. III стадия».

А. Гемофилтроцитологическое исследование: ЦРК в периферической венозной крови. Окраска азур-эозином.

Б. Цитологическое исследование: комплекс опухолевых клеток. Окраска азур-эозином.

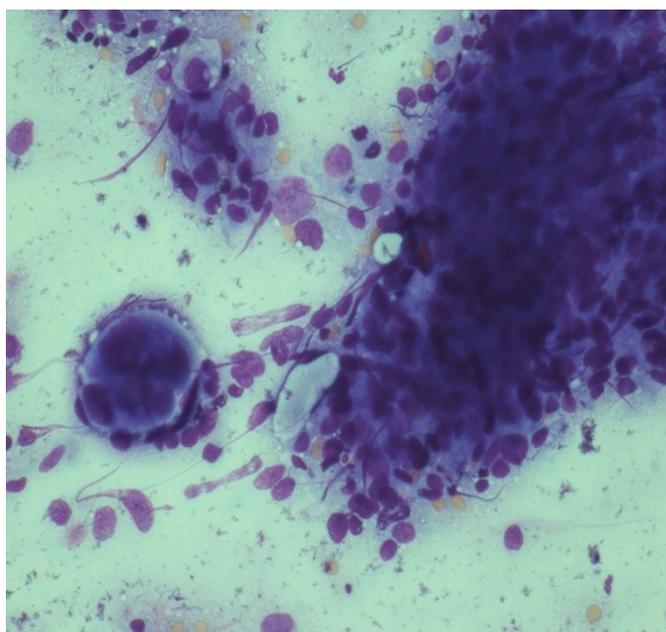
В. Патогистологическое исследование: «Умеренно дифференцированная аденокарцинома желудка». Окрашивание гематоксилин-эозином.



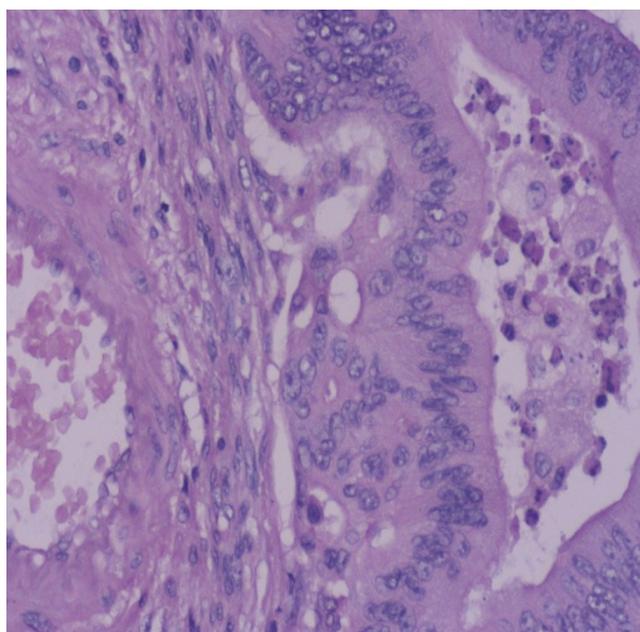
А. Ув. x 200



А. Ув. x 1000



Б.Ув. X 200



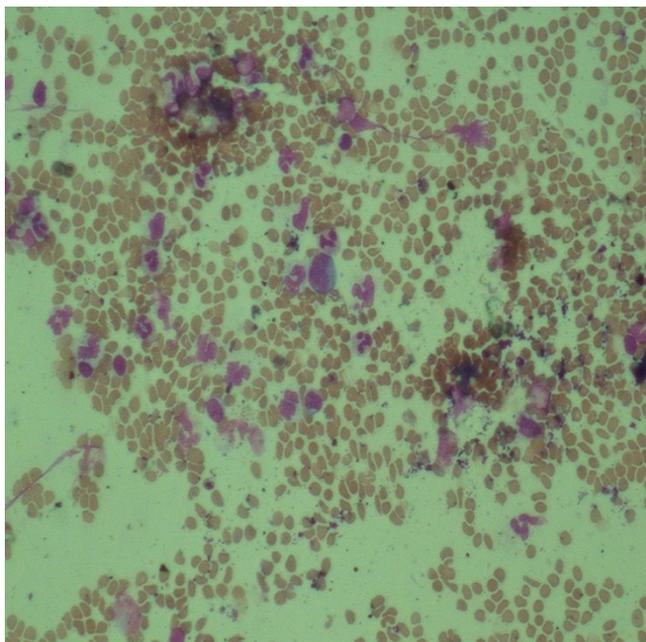
В. Ув. X 400

Рисунок 17. Больной, 54 года. Диагноз: «Рак сигмовидной кишки. IV стадия».

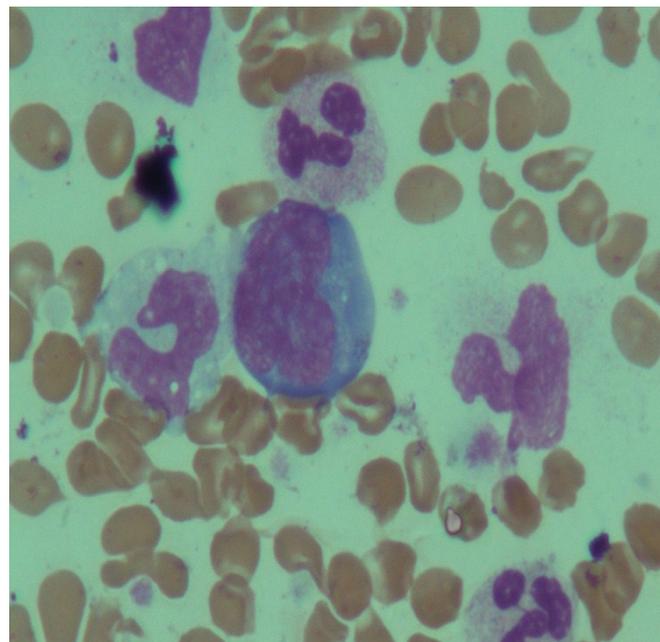
А. Гемофильтрацитологическое исследование: ЦРК в периферической венозной крови. Окраска азур-эозином.

Б. Цитологическое исследование: комплекс опухолевых клеток. Окраска азур-эозином.

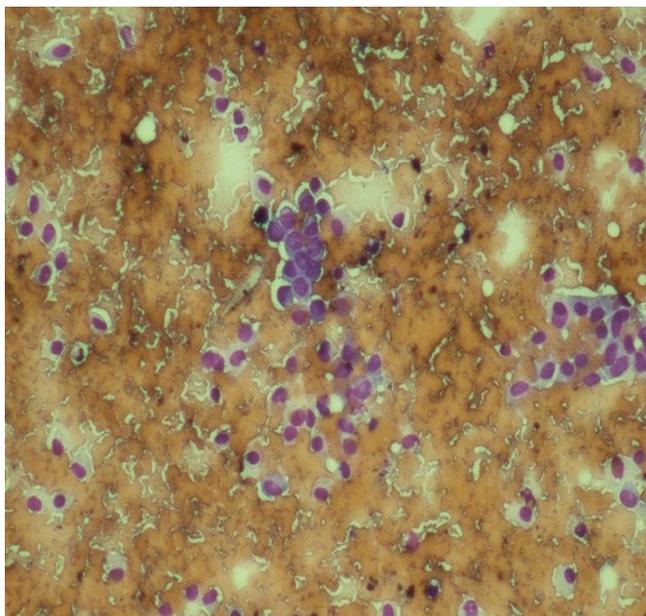
В. Патогистологическое исследование: «Умеренно дифференцированная аденокарцинома толстой кишки». Окрашивание гематоксилин-эозином.



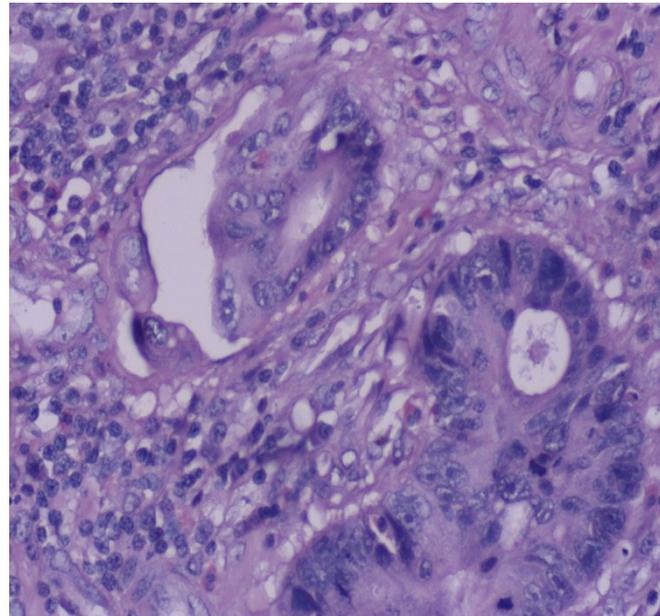
А. Ув. x 200



А. Ув. x 1000



Б. Ув. X 200



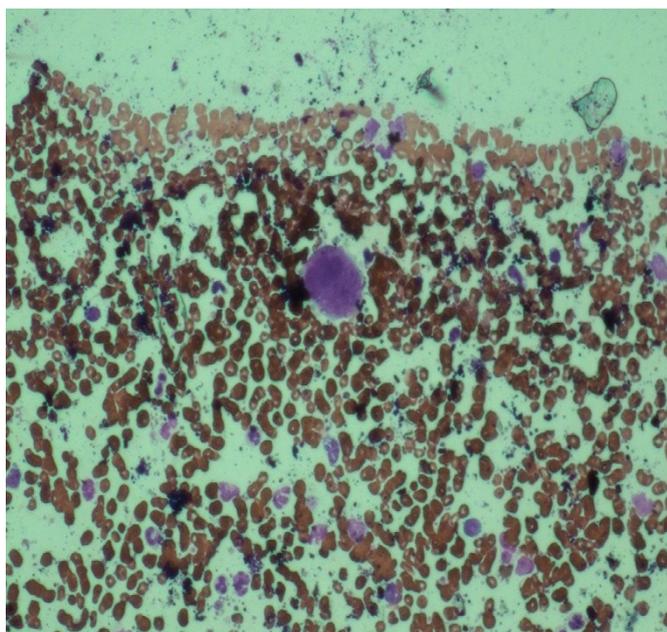
В. Ув. X 400

Рисунок 18. Больной, 75 лет. Диагноз: «Рак тела желудка. IIIa стадия».

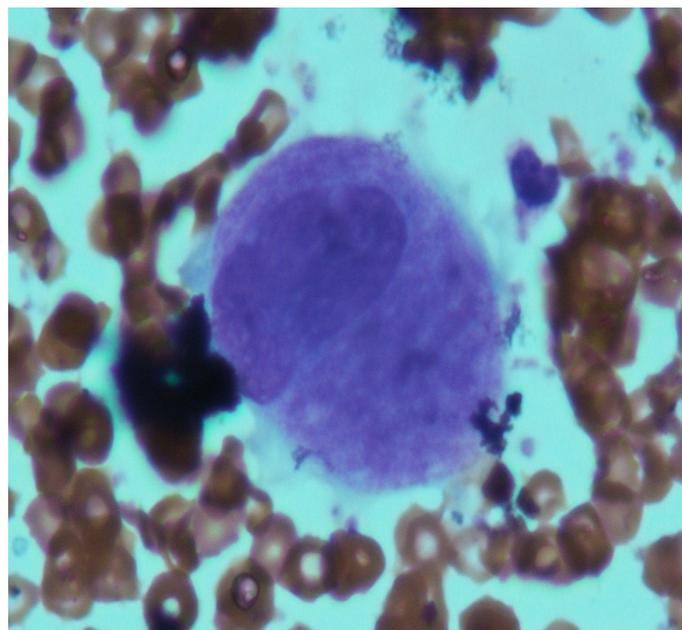
А. Гемофильтроцитологическое исследование: ЦРК в периферической венозной крови. Окраска азур-эозином.

Б. Цитологическое исследование: комплекс опухолевых клеток. Окраска азур-эозином.

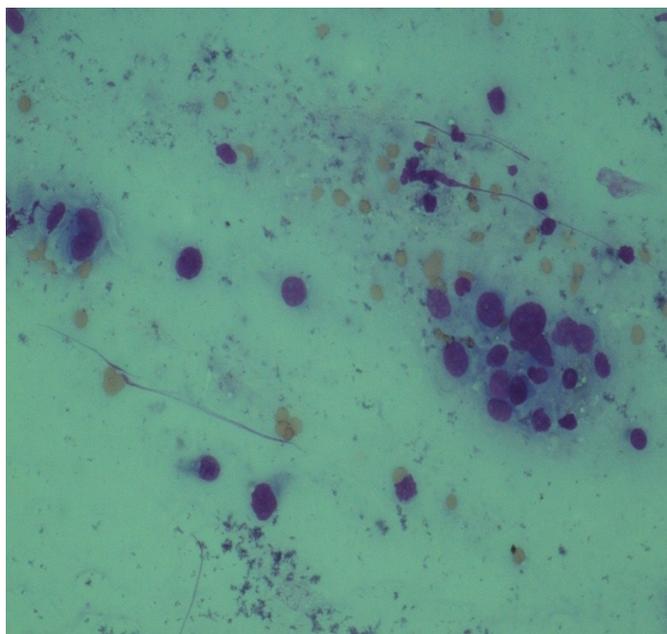
В. Патогистологическое исследование: «Умеренно дифференцированная аденокарцинома желудка». Окрашивание гематоксилин-эозином.



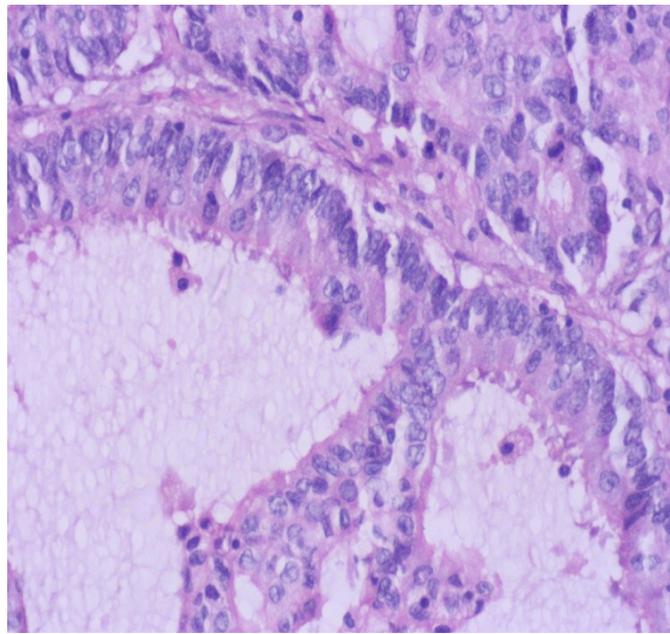
А. Ув. x 200



А. Ув. x 1000



Б. Ув. X 200



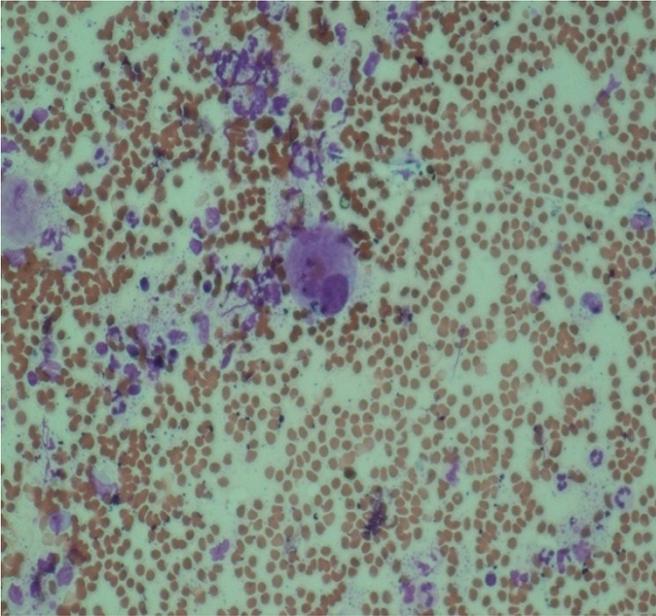
В. Ув. X 400

Рисунок 19. Больная, 80 лет. Диагноз: «Рак кардиального отдела желудка. III стадия».

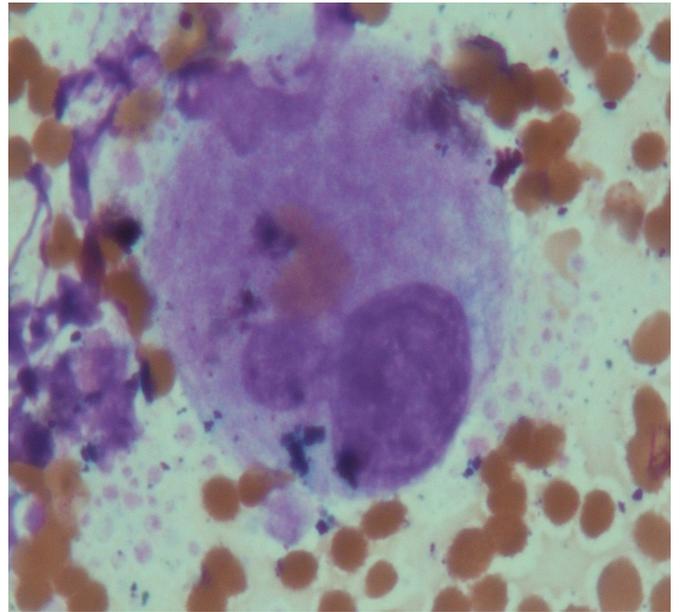
А. Гемофилтритологическое исследование: ЦРК в периферической венозной крови. Окраска азур-эозином.

Б. Цитологическое исследование: комплекс опухолевых клеток. Окраска азур-эозином.

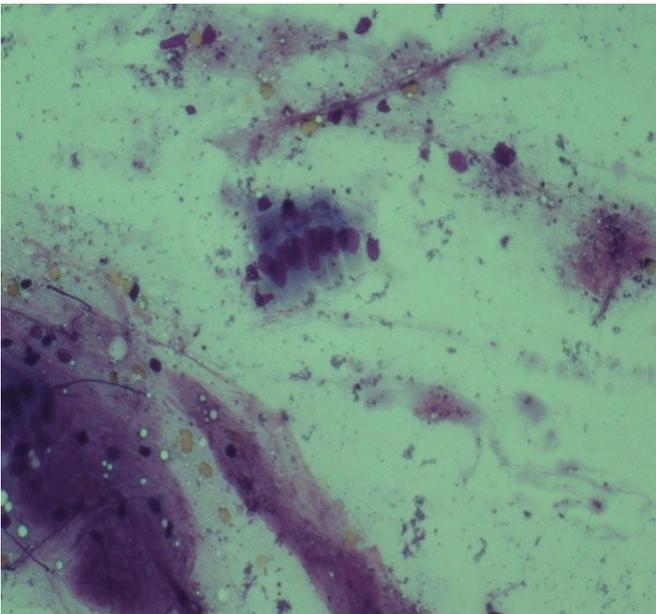
В. Патогистологическое исследование: «Умеренно дифференцированная аденокарцинома желудка». Окрашивание гемтоксилин-эозином.



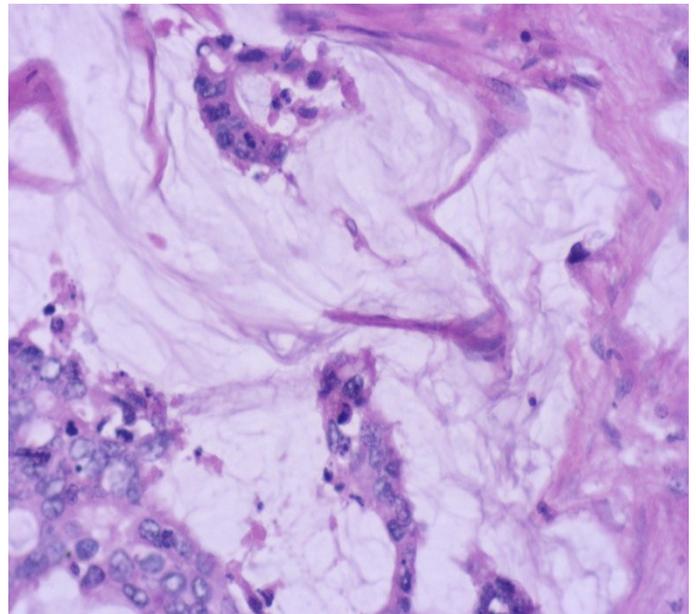
А. Ув. x 200



А. Ув. x 1000



Б. Ув. X 200



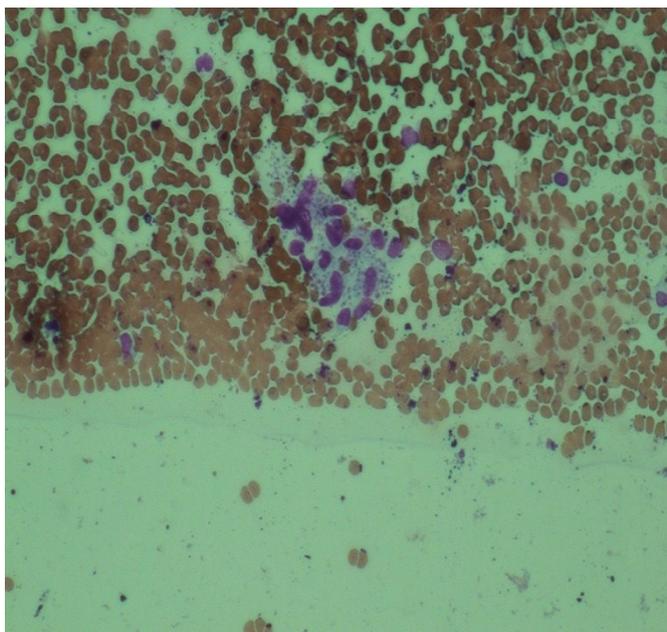
В. Ув. X 400

Рисунок 20. Больной, 65 лет. Диагноз: «Рак сигмовидной кишки. III стадия».

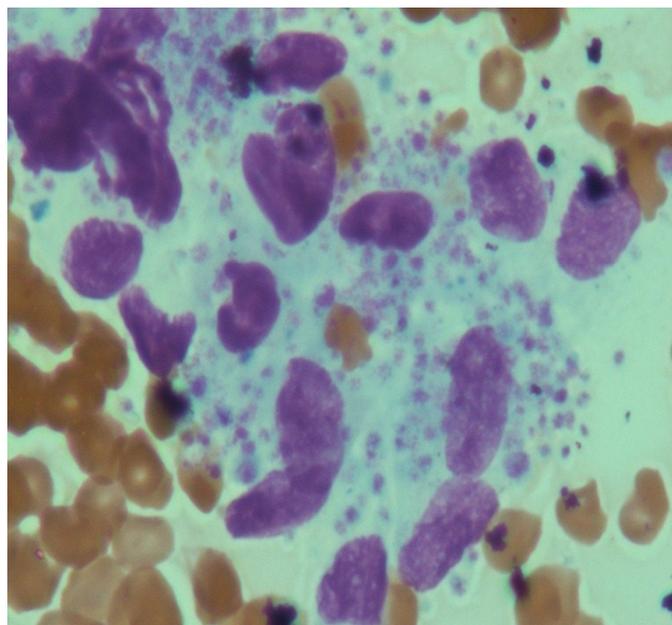
А. Гемофилтроцитологическое исследование: ЦРК в периферической венозной крови. Окраска азур-эозином.

Б. Цитологическое исследование: комплекс опухолевых клеток. Окраска азур-эозином.

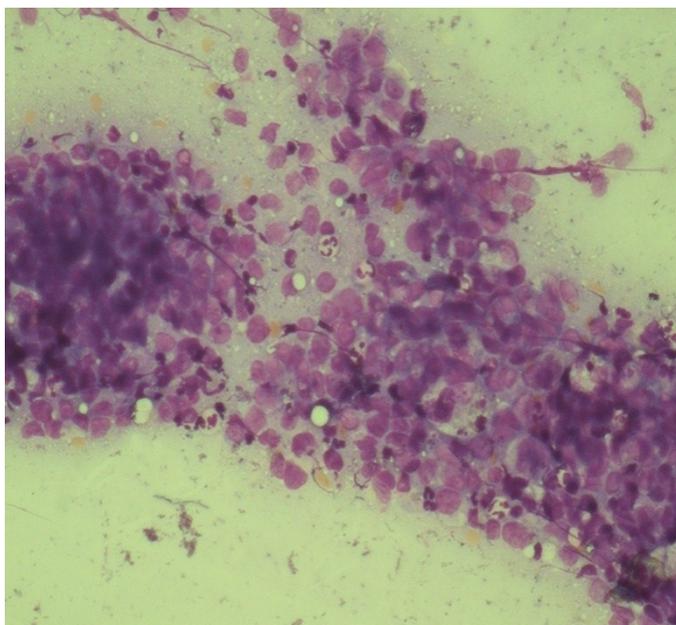
В. Патогистологическое исследование: «Коллоидный рак кишки с инфильтративным ростом». Окрашивание гематоксилин-эозином.



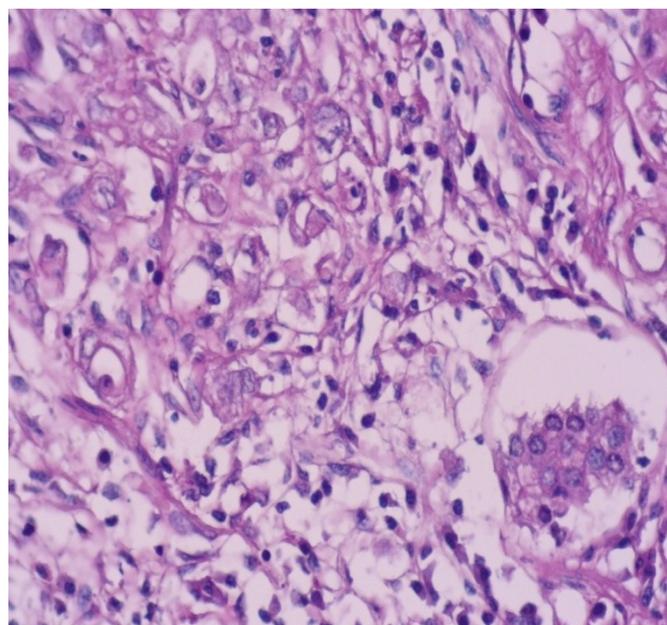
А. Ув. x 200



А. Ув. x 1000



Б. Ув. X 200



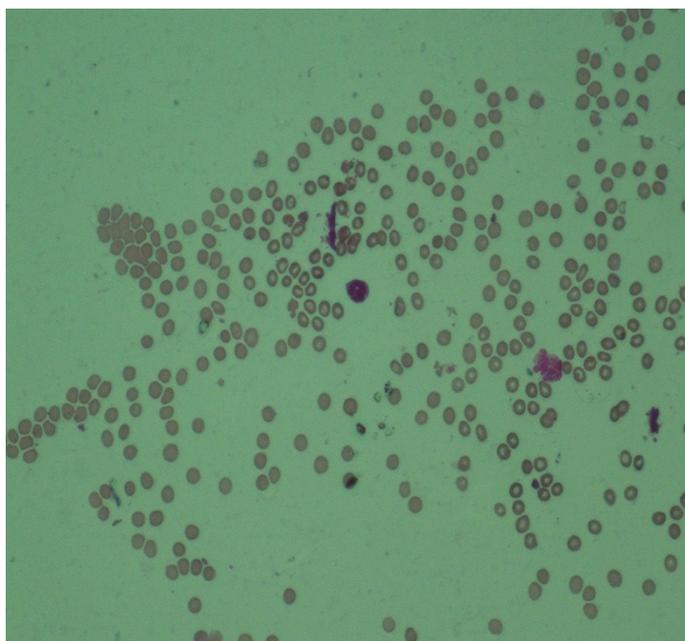
В. Ув. X 400

Рисунок 21. Больная, 67 лет. Диагноз: «Рак антрального отдела желудка. IIa стадия».

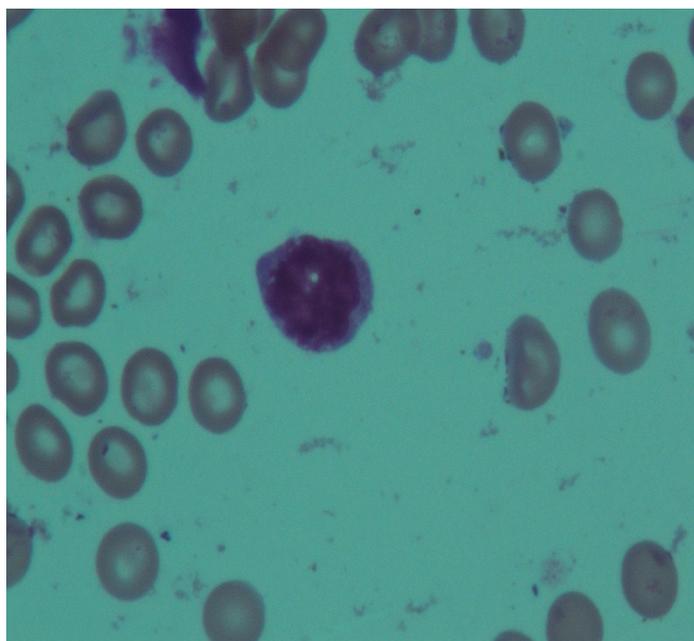
А. Гемофилтроцитологическое исследование: ЦРК в периферической венозной крови. Окраска аzur-эозином.

Б. Цитологическое исследование: комплекс опухолевых клеток. Окраска аzur-эозином.

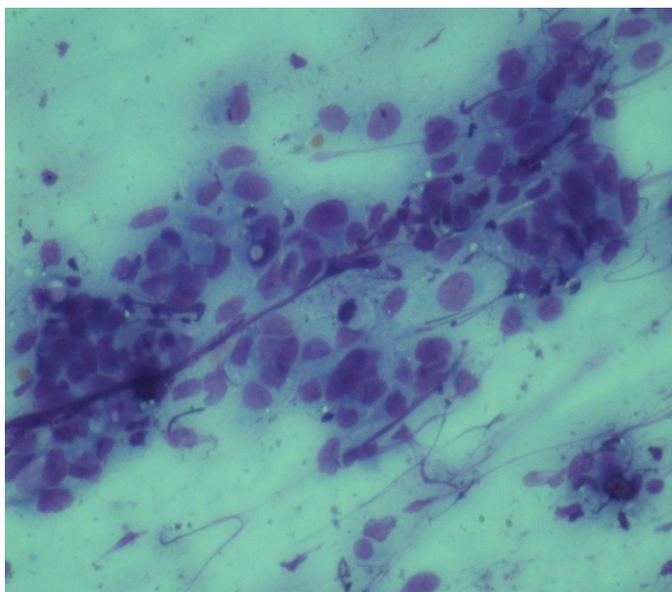
В. Патогистологическое исследование: «Низкодифференцированная аденокарцинома желудка». Окрашивание гемоксилин-эозином.



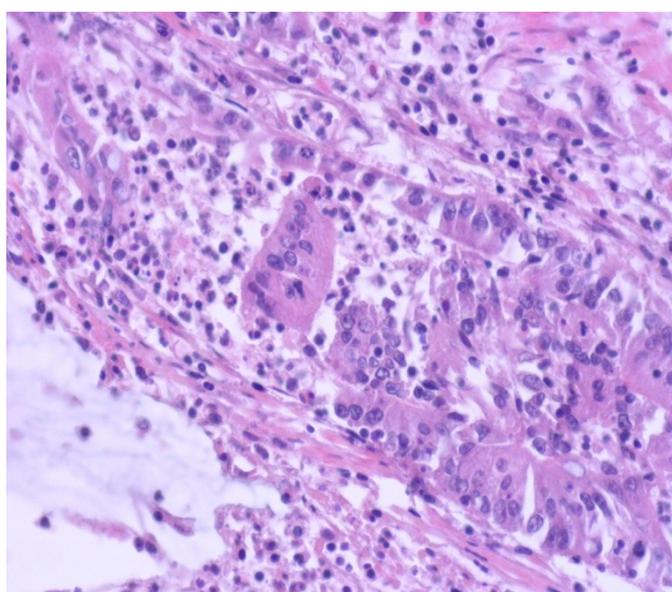
А.Ув. x 200



А. Ув. x 1000



Б.Ув. X 200



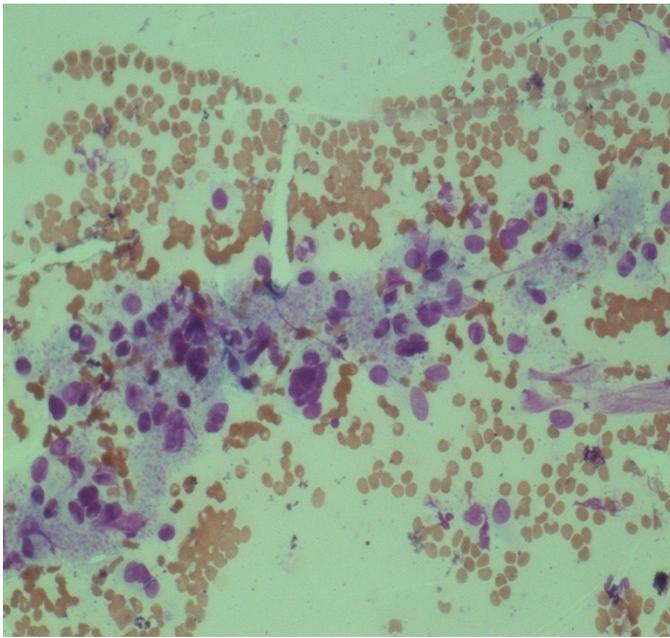
В. Ув. X 400

Рисунок 22. Больной, 73 года. Диагноз: «Рак верхнеампулярного отдела прямой кишки. III стадия».

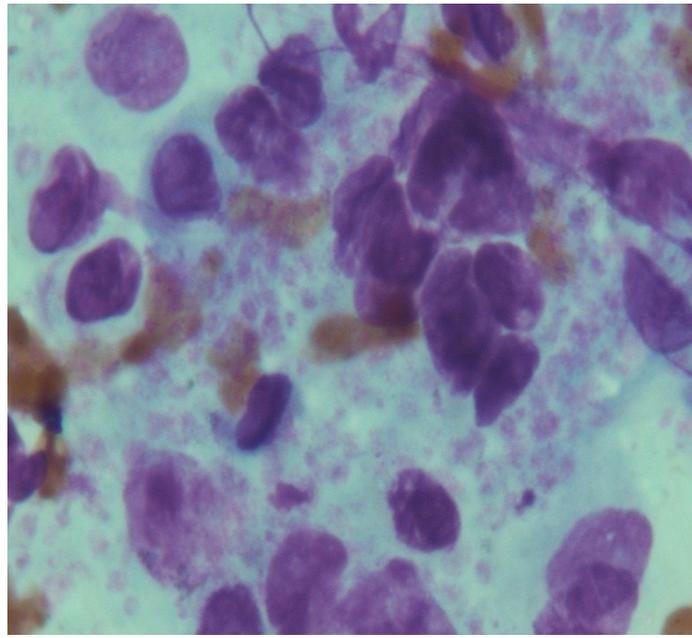
А. Гемофилтритологическое исследование: ЦРК в периферической венозной крови. Окраска азур-эозином.

Б. Цитологическое исследование: комплекс опухолевых клеток. Окраска азур-эозином.

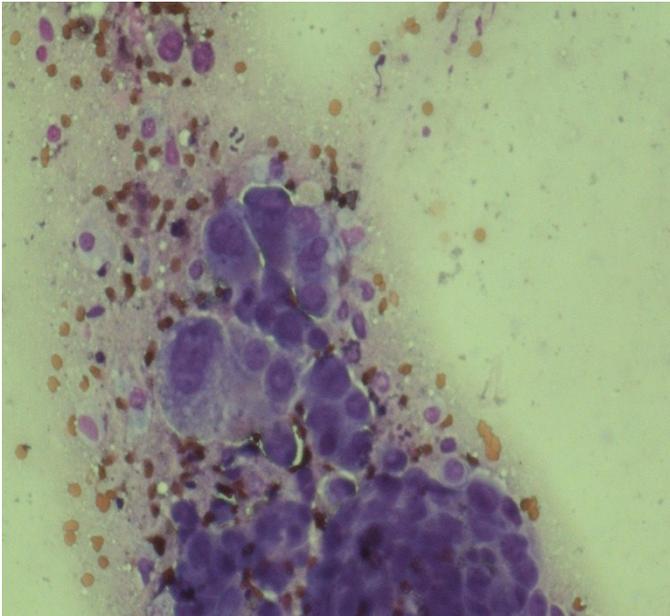
В. Патогистологическое исследование: «Дифференцированная аденокарцинома прямой кишки». Окрашивание гематоксилин-эозином.



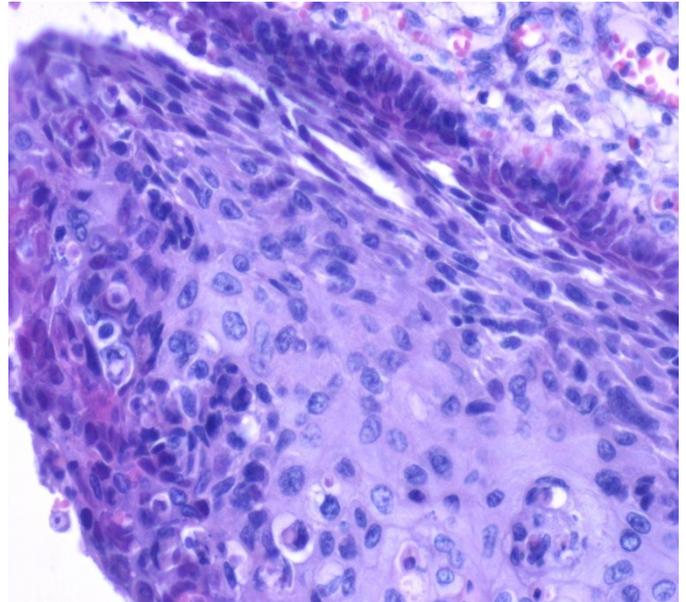
А. Ув. x 200



А. Ув. x 1000



Б. Ув. X 200



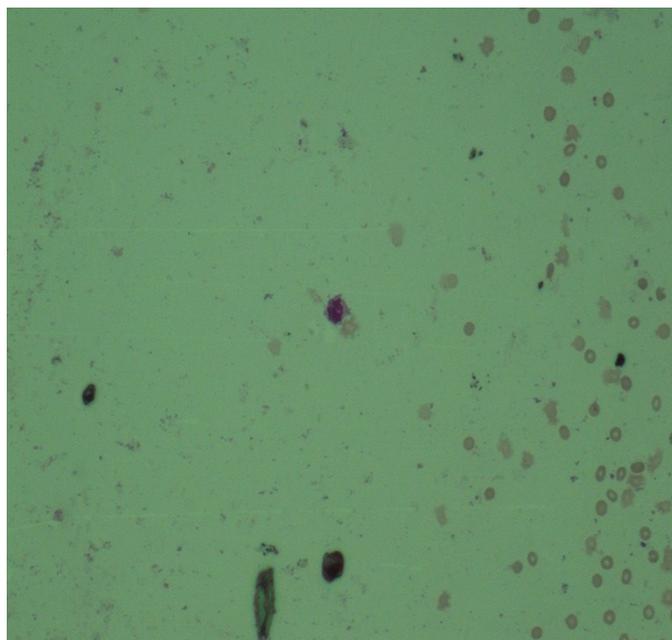
В. Ув. X 400

Рисунок 23. Больной, 54 года. Диагноз: «Рак верхней доли левого легкого. III стадия».

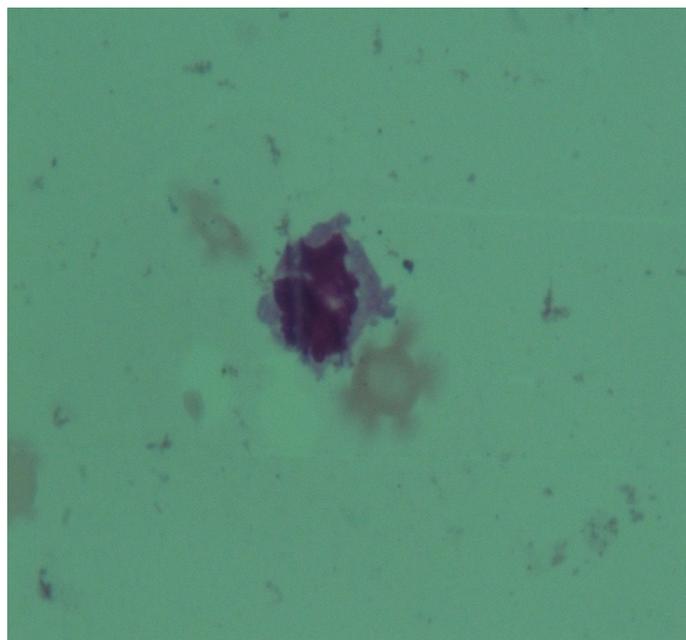
А. Гемофильтроцитологическое исследование: ЦРК в периферической венозной крови. Окраска азур-эозином.

Б. Цитологическое исследование: комплекс опухолевых клеток. Окраска азур-эозином.

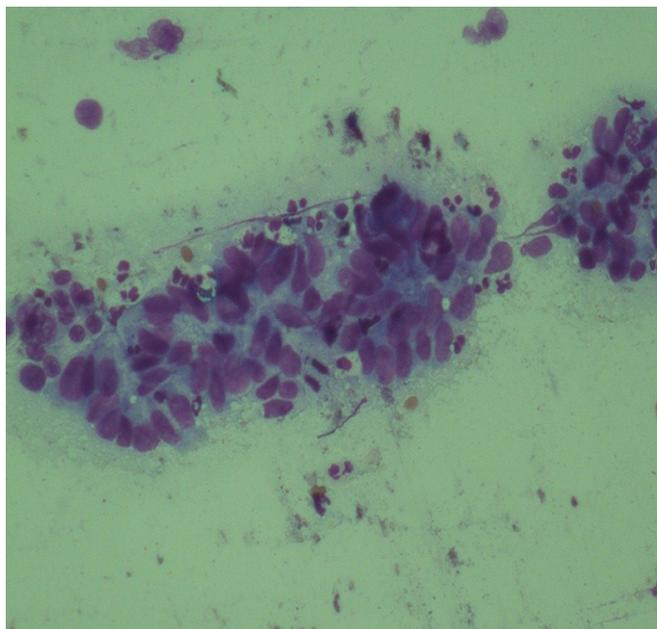
В. Патогистологическое исследование: «Умеренно дифференцированный плоскоклеточный рак легкого». Окрашивание гематоксилин-эозином.



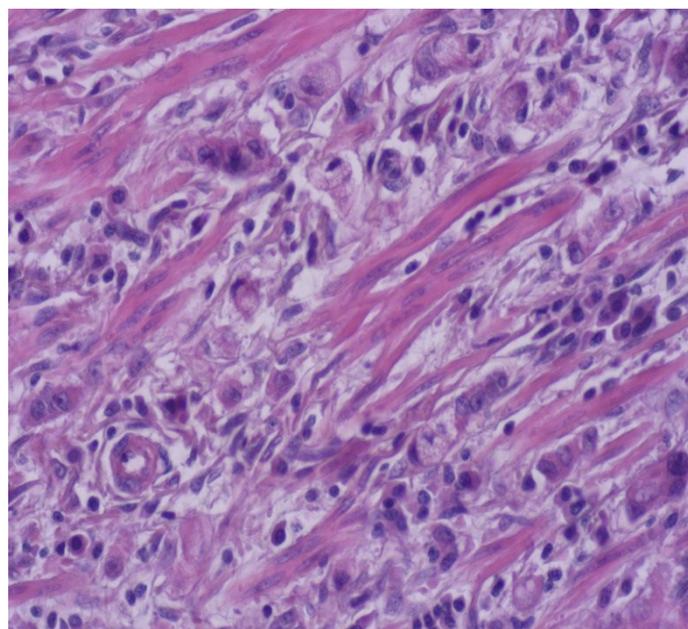
А. Ув. х 200



А. Ув. х 1000



Б. Ув. X 200



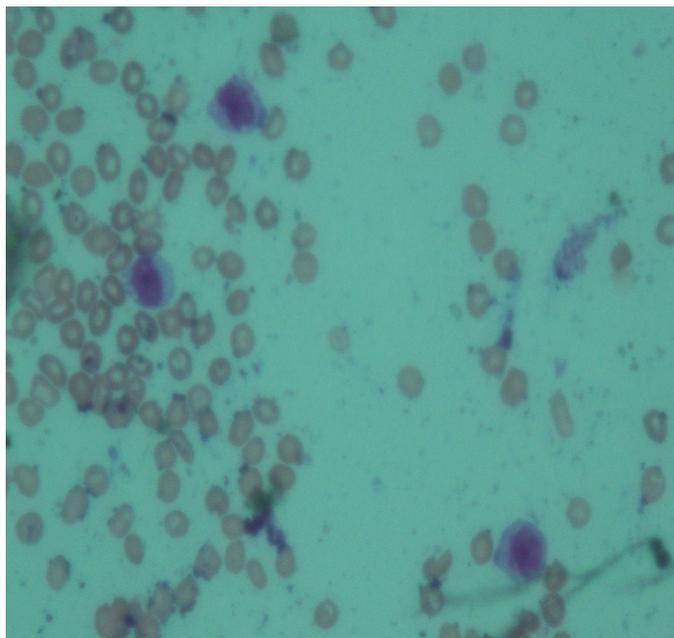
В. Ув. X 400

Рисунок 24. Больной, 48 лет. Диагноз: «Рак желудка. III стадия»

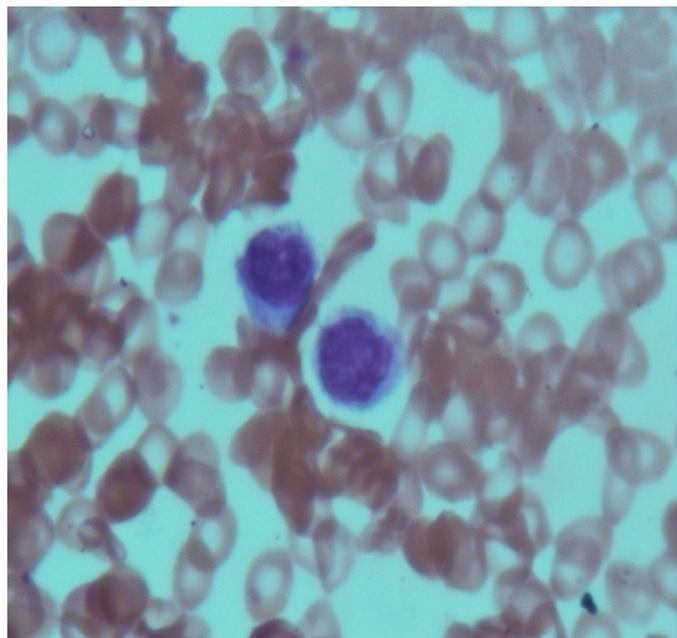
А. Гемофилтроцитологическое исследование: ЦРК в периферической венозной крови. Окраска азур-эозином.

Б. Цитологическое исследование: комплекс опухолевых клеток. Окраска азур-эозином.

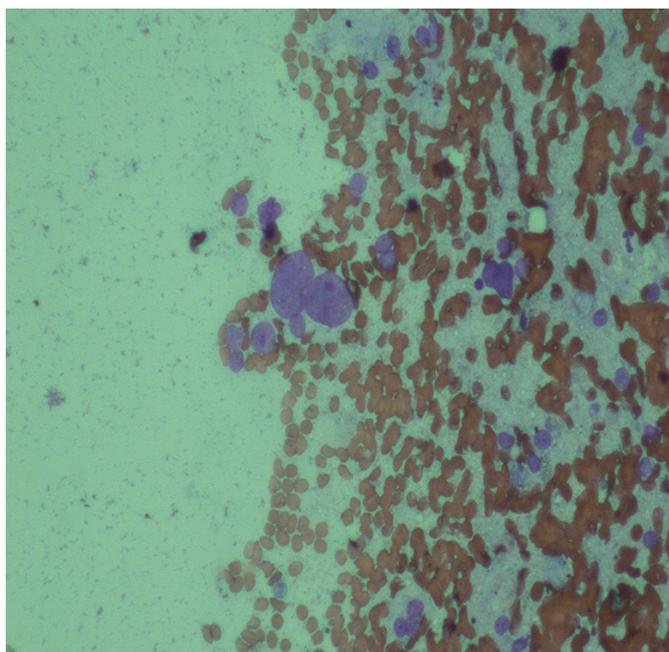
В. Патогистологическое исследование: «Низкодифференцированный рак желудка». Окрашивание гематоксилин-эозином.



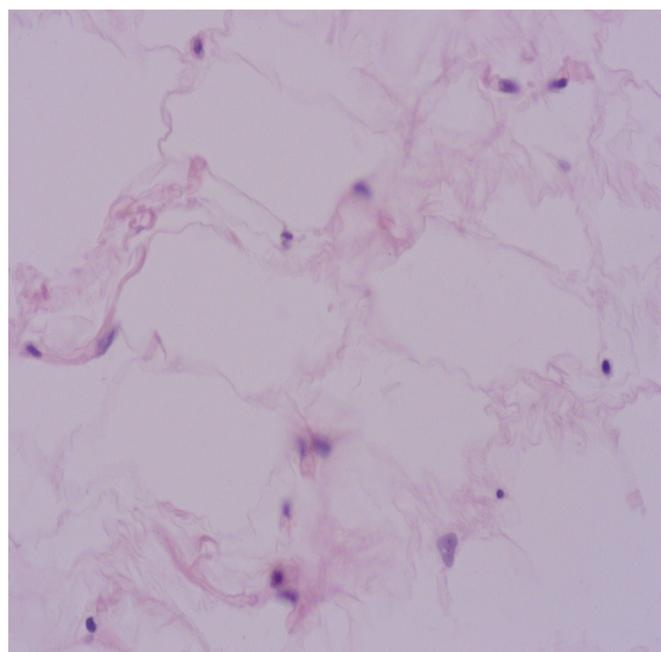
А. Ув. x 200



А. Ув. x 1000



Б. Ув. X 200



В. Ув. X 400

Рисунок 25. Больной, 56 лет. Диагноз: «Рак поперечноободочной кишки. IIIб стадия».

А. Гемофильтрацитологическое исследование: ЦРК в периферической венозной крови. Окраска азур-эозином.

Б. Цитологическое исследование: комплекс опухолевых клеток. Окраска азур-эозином.

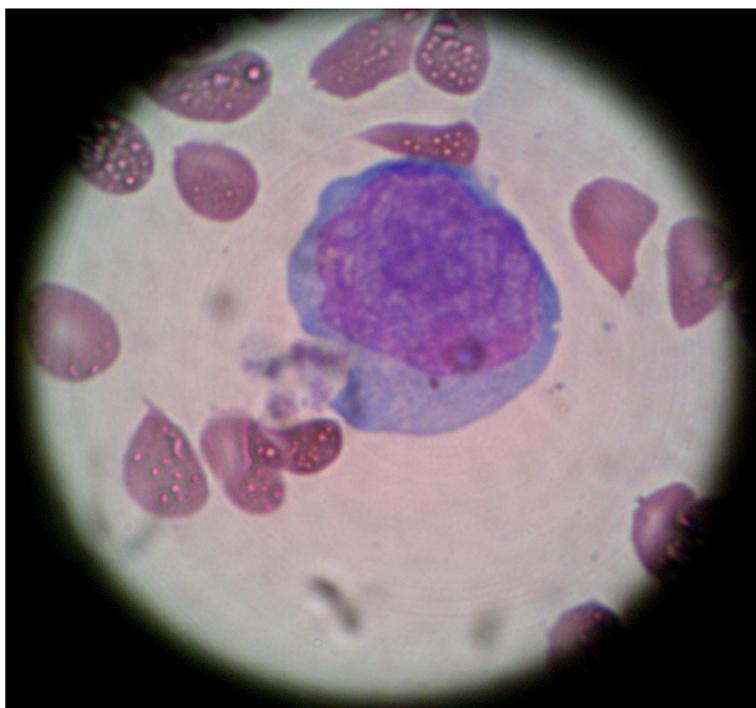
В. Патогистологическое исследование: «Умеренно дифференцированная аденокарцинома толстой кишки». Окрашивание гемоксилин-эозином.

Определение циркулирующих опухолевых клеток в крови может стать новым перспективным подходом в практической онкологии. Клиническая значимость обнаружения циркулирующих опухолевых клеток может варьировать от ранней диагностики инвазивных форм рака до оценки риска развития рецидивов, а также выявления ответа или резистентности к противоопухолевым методам лечения. Однако результат обнаружения циркулирующих опухолевых клеток в крови пациентов сильно зависит от технических характеристик метода используемого для их выделения, его чувствительности и точности. Кроме того, важнейшей проблемой в области обнаружения циркулирующих опухолевых клеток является то, что большая часть злокачественных циркулирующих опухолевых клеток теряет свои "эпителиальные антигены" и начинает экспрессировать мезенхимальные антигены. Этот процесс известен как эпителиально - мезенхимальный переход, в связи с чем возникает необходимость дальнейших исследований в этой области [310].

Для иллюстрации приводим следующие клинические наблюдения.

1. Больная, 52 лет, поступила во 2-ое хирургическое отделение Бурятского республиканского клинического онкологического диспансера 17 декабря 2007 года. В сентябре 2007 года стала отмечать повышенную утомляемость, тяжесть в эпигастрии после приема пищи, тошноту. Постепенно нарастала общая слабость, ухудшился аппетит. Из-за возникших болей ноющего характера в эпигастриальной области, обратилась 16 ноября 2007 г. к участковому терапевту поликлиники по месту жительства. Назначенная лекарственная терапия по поводу хронического гастродуоденита была неэффективной. При фиброгастроскопии, выполненной 14 декабря 2007 г., по большой кривизне тела желудка выявлена инфильтративно-язвенная опухоль до 6,5 сантиметра в диаметре. Взята биопсия. Заключение по данным исследования биоптата: «Хроническая язва». 13 декабря 2007 г. направлена на оперативное лечение в республиканский клинический онкологический диспансер". При поступлении общее состояние пациентки было относительно удовлетворительное. Жалобы на постоянные боли в эпигастриальной области, усиливающиеся при приеме пищи, похудание на 10 кг за последние 1,5 -

2 месяца. Кожные покровы и видимые слизистые нормальной окраски и влажности, тургор понижен. Периферические лимфатические узлы не увеличены. Дыхательных и гемодинамических нарушений нет. Живот мягкий, умеренно болезненный в эпигастральной области, где пальпируется образование тугоэластической консистенции, мало смещаемое. Печень по краю реберной дуги. В общем анализе крови снижение гемоглобина до 106 г/л, ускоренное СОЭ до 21 мм в час. В общем анализе мочи значимых отклонений не выявлено. В биохимическом анализе крови снижение общего белка до 63,7 г/л. По данным серологического исследования получены отрицательные результаты на HbsAg и a-HCV. Раково-эмбриональный антиген (онкомаркер) оказался в норме. РЭА от 01.12.07г. - 2 нг/мл. 01.12.07. было проведено гемофилтрацитологическое исследование венозной крови, которое выявило у больной ЦРК (рисунок 26).



(Ув. x 1000).

Рисунок 26. Больная, 52 лет. Диагноз: «Рак желудка. Стадия IIIA». Гемофилтрацитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. Среди эритроцитов опухолевая клетка крупного размера с эксцентрично расположенным крупным ядром. Контуры ядра неровные, хроматин мелкозернистый, глыбчатый, неравномерно распределенный. В ядре определяются два полиморфных ядрышка.

После предварительной предоперационной подготовки 21.12.07 г. выполне-

но оперативное вмешательство в объеме чрезбрюшиннойгастрэктомии с расширенной лимфаденэктомией D₂, спленэктомией. Патогистологическое заключение операционного материала: Б-3971-80 «Тубулярная аденокарцинома желудка». Заживление послеоперационной раны первичным натяжением. Выписана в удовлетворительном состоянии.

На контрольный осмотр пациентка пришла 03.03.08г. Жалоб не предъявляла, общее состояние удовлетворительное. Проведенное рентгенологическое исследование - признаков рецидива не выявило. Выполненное гемофилтритроцитологическое исследование крови обнаружило 5 ЦРК. Со второй половины апреля 2008 года у больной появились симптомы дисфагии. Проведенная фиброгастроскопия выявила рецидив рака в области пищеводно-кишечного соустья. С 23.04.08 по 23.05.08 повторно находилась на стационарном лечении во II хирургическом отделении республиканского клинического онкологического диспансера. 05.05.08г. была выполнена операция: еюностомия по Майдлю. На операции после разделения спаек обнаружен канцероматоз по висцеральной и париетальной брюшине, множественные метастазы в обеих долях печени, а также опухолевое образование размером 5х6 см в области пищеводно-кишечного соустья. Случай расценен как нерезектабельный. Больная выписана на симптоматическое лечение по месту жительства.

2. Больной, 63 лет, находился на стационарном лечении во II хирургическом отделении Бурятского республиканского клинического онкологического диспансера с 06августа 2009г. по 24 августа 2009г. с диагнозом: «Рак слепой кишки. Стадия III, T₃N₁M₀». При поступлении предъявлял жалобы на периодические боли в правой половине живота, вздутие, запоры. Из анамнеза известно, что заболел в феврале 2009 года, когда впервые стал отмечать боли в животе, постепенно нарастала общая слабость, появилось периодическое вздутие, возникли запоры. В июле 2009 г. самостоятельно при пальпации обнаружил у себя опухолевидное образование в брюшной полости, что послужило поводом обращения к участковому терапевту поликлиники по месту жительства. При ирригоскопии 23 июля 2009г. в восходящем отделе ободочной кишки определялся на протяжении 14 см дефект

наполнения. 29 июля 2009 года проведена фиброколоноскопия со взятием биопсийного материала. Получено патогистологическое заключение Б-37662-63 «Хронический колит». Злокачественного роста в присланном материале нет.

Общее состояние относительно удовлетворительное. Кожные покровы и видимые слизистые нормальной окраски и влажности. Периферические лимфоузлы не увеличены. Со стороны обеих легочных полей выслушивается везикулярное дыхание, хрипов нет. Тоны сердца ритмичные, ясные. АД-120/80мм.рт.столба, пульс 74 ударов в 1 минуту. Живот при пальпации мягкий, в правой половине ближе к подвздошной области определяется опухолевидное образование 16x14 см тугоэластической консистенции, несмещаемое.

В общем анализе крови, общем анализе мочи и биохимическом анализе крови значимых отклонений не выявлено. Выполненное 12 августа 2009 года гемофилтроцитологическое исследование обнаружило в венозной крови больного ЦРК (рисунок 27).

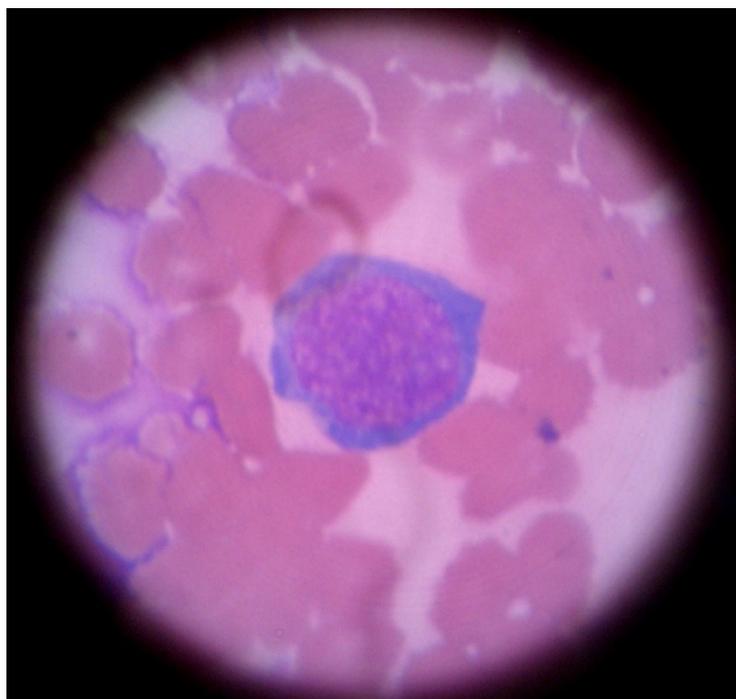


Рисунок 27. Больной, 63 лет. Диагноз: «Рак слепой кишки. Стадия IIIВ». Гемофилтроцитологическое исследование венозной крови. Окраска аzur-эозином. Опухолевая клетка округлой формы с крупным ядром. Контуры ядра неровные, хроматин глыбчатый. Цитоплазма базофильная. (Ув. x 1000).

13.08.09 г. под эндотрахеальным наркозом выполнена операция в объеме правосторонней гемиколэктомии с лимфаденэктомией. При ревизии брюшной полости определяется опухоль, которая занимает всю слепую кишку, практически полностью обтурирует ее просвет и прорастает в забрюшинную клетчатку. В брыжейке ободочной кишки имеются единичные увеличенные плотной консистенции лимфоузлы. Патогистологическое заключение операционного материала: «Темноклеточная аденокарцинома».

В послеоперационном периоде, учитывая наличие у больного постгеморрагической анемии (Hb-78г/л), проведена гемотрансфузия одногруппной эритроцитарной массы в количестве 250 мл. Переливание препарата крови совместимого по групповой и резус принадлежности с кровью больного прошло без осложнений. Послеоперационное течение в дальнейшем протекало гладко, заживление послеоперационной раны первичным натяжением. Выполненное на пятнадцатые и двадцатые сутки после проведенного оперативного вмешательства гемофильтроцитологическое исследование больному, не обнаружило в его венозной крови циркулирующих раковых клеток.

Больной выписан в удовлетворительном состоянии с рекомендацией: динамическое наблюдение в поликлинике онкологического диспансера. В настоящее время находится под динамическим наблюдением. Проводятся необходимые инструментальные и лабораторные методы исследования, в том числе и гемофильтроцитологическое исследование крови, циркулирующих раковых клеток в венозной крови, равно как и признаков рецидива и прогрессирования основного заболевания у больного до настоящего времени не выявлено.

Сложность гистологической верификации ЗНО поджелудочной железы предполагает поиск новых технологий. Этому соответствует метод гемофильтроцитологического исследования. Для иллюстрации приводим следующие наблюдения.

3. Больной, 70 лет, поступил во II хирургическое отделение Бурятского республиканского клинического онкологического диспансера 27 июля 2009г. Появление иктеричности склер впервые заметил в конце мая 2009г. после длительного

приема алкоголя. В начале июня появилась желтушность кожных покровов, которая в дальнейшем нарастала, изменился цвет стула и мочи, стал беспокоить кожный зуд. К участковому терапевту поликлиники по месту жительства обратился с вышеуказанными симптомами заболевания 06.06.09г. С подозрением на вирусный гепатит был направлен в городскую инфекционную больницу, где после обследования диагноз инфекционного гепатита не подтвердился 20.07.09г. хирург приемного покоя больницы скорой медицинской помощи, куда обратился больной, назначил ультразвуковое исследование органов брюшной полости. При проведении УЗИ брюшной полости патологических включений (конкрементов) в желчевыводящих путях и желчном пузыре не обнаружено. Последний увеличен в размерах, содержимое его однородное. Печень не увеличена, имеются умеренные диффузные структурные изменения. Отмечается повышенная плотность и гетерогенность поджелудочной железы.

С диагнозом: «Механическая желтуха опухолевого генеза?» госпитализирован 27.07.09г. в стационар онкологического диспансера. Учитывая анамнестические данные (начала заболевания связывает с приемом алкоголя) и полученные результаты УЗИ и КТ брюшной полости (где нет убедительных признаков наличия онкопатологии со стороны поджелудочной железы) у больного не исключался псевдотуморозный панкреатит. Онкомаркеры: основной СА-19-9 (36ЕД/мл) оказался в пределах нормы, а дополнительный РЭА (19 нг/мл) несколько повышен. Проведенное гемофилтроцитологическое исследование больному обнаружило в его венозной крови 2 циркулирующие раковые клетки (рисунок 28).



Рисунок 28. Больной, 70 лет. Заключительный диагноз: «Рак головки поджелудочной железы. IV стадия». Гемофильтроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. Среди эритроцитов две опухолевые клетки небольших размеров с полиморфными неровными контурами ядер. Хроматин комковатый, ядра занимают почти всю цитоплазму. (Ув. х 1000).

При объективном осмотре кожные покровы и видимые слизистые (склеры глазных белков) шафраново-желтой окраски, тургор понижен. Периферические лимфатические узлы не увеличены. Дыхательных и гемодинамических нарушений нет. Живот обычной формы, участвует в акте дыхания, при пальпации мягкий, болезненный в правом подреберье, где определяется увеличенный желчный пузырь (симптом Курвуазье).

В общем анализе крови от 28.07.09 г. снижение Hb до 110 г/л и ускоренная СОЭ до 49 мм/ч. В общем анализе мочи от 28.07.09 г. цвет насыщенно-желтый, реакция на желчные пигменты положительная. В биохимическом анализе крови от 28.07.09 г. общий билирубин 409,0 мкм/л, прямой билирубин 285 мкм/л, непрямой билирубин 224 мкм/л.

27.07.09 г. выполнена паллиативная операция в объеме обходной холецистостомии с межкишечным анастомозом по Брауну. На операции при ревизии органов брюшной полости обнаружена опухоль головки поджелудочной железы с переходом на тело до 4 см в диаметре. Парапанкреатическая клетчатка ин-

фильтрирована. Желчный пузырь увеличен, напряжен. Общий желчный проток увеличен до 1,5 см. Определяется в брюшной полости асцит. Другой органической патологии не обнаружено. Взят материал на гистологическое исследование из головки поджелудочной железы. Получено патогистологическое заключение операционного материала «Протоковая аденокарцинома». Послеоперационный период протекал гладко, без осложнений. Желтушность кожных покровов значительно уменьшилась. В биохимическом анализе крови от 07.08.09 г. общий билирубин - 79,8 мкм/л., прямой билирубин 70,3 мкм/л и непрямой билирубин - 9,5 мкм/л. Заживление послеоперационной раны первичным натяжением, швы сняты на тринадцатые сутки после операции. Выписан в относительно удовлетворительном состоянии с рекомендацией: симптоматическая терапия по месту жительства.

4. Больная, 55 лет, находилась на стационарном обследовании и лечении во II хирургическом отделении Бурятского республиканского клинического онкологического диспансера с 22 марта 2010 года по 16 апреля 2010 года с диагнозом: «Рак головки поджелудочной железы. III стадия; T₃N₂ M₀. Механическая желтуха».

Из анамнеза известно, что больна с 7 февраля 2010 г., когда появилась желтушность кожных покровов, интенсивность которой со временем стала нарастать, возник сильный кожный зуд. С 25 февраля 2010 г. по 16 марта 2010 г. проходила амбулаторное обследование в поликлинике по месту жительства, где были последовательно исключены вирусный гепатит и механическая желтуха желчнокаменного генеза. С диагнозом: «Механическая желтуха опухолевого происхождения? Хронический бескамневой холецистит. Липоматоз поджелудочной железы» поступила 22.03.10 г. в стационар республиканского онкологического диспансера. Общее состояние относительно удовлетворительное. Правильного телосложения, удовлетворительного питания. Кожные покровы желтушной окраски, тургор сохранен. На коже имеются многочисленные следы от расчесов. Со стороны обеих легочных полей выслушивается везикулярное дыхание, хрипов нет. Тоны сердца

ясные, ритмичные, артериальное давление-120/80 ммрт. столба, пульс-73 удара в 1 минуту. Живот обычной формы, при пальпации мягкий, умеренно болезненный в правых верхних отделах и в мезогастральной области. Патологических образований в брюшной полости при пальпации не определяется. При ультразвуковом исследовании органов брюшной полости от 25.02.10 г. выявлены эхографические признаки хронического бескаменного холецистита, выраженного липоматоза поджелудочной железы. Другой органической патологии не обнаружено. Выполненное 31.03.10 г. больной гемофилтритроцитологическое исследование обнаружило в ее венозной крови циркулирующие раковые клетки (рисунок 29).

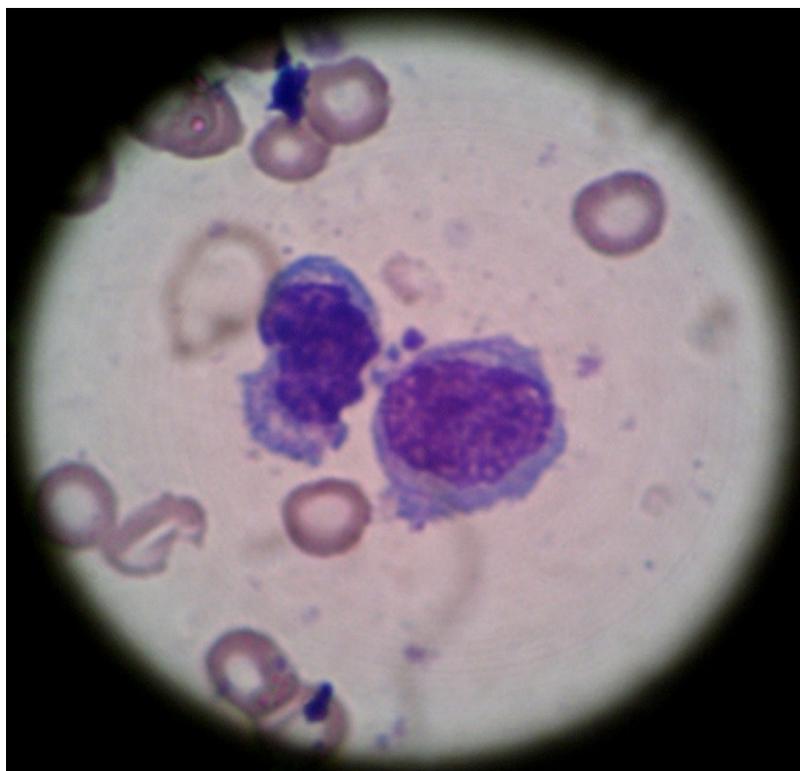


Рисунок 29. Больная, 55 лет. Заключительный диагноз: «Рак головки поджелудочной железы. III стадия». Гемофилтритроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. Две опухолевые клетки с крупными полиморфными ядрами. Контуры ядер неровные. Хроматин крупнозернистый, комковатый. Определяется эксцентричность расположения ядер. (Ув. x 1000)

31.03.10 г. выполнена операция в объеме панкреатодуоденальной резекции поджелудочной железы. В раннем послеоперационном периоде находилась на лечении в отделении интенсивной терапии, в дальнейшем по улучшению состояния переведена во II хирургическое отделение. Патогистологическое заключение операционного материала "Недифференцированный анапластический рак поджелудочной железы с инфильтрирующим ростом и массивными некрозами". Послеоперационное течение протекало без осложнений и 16.04.10 г. больная выписана в удовлетворительном состоянии под динамическое наблюдение.

На примере двух последних собственных клинических наблюдений видно, что гемофилтритроцитологическое исследование крови больных действительно помогает в постановке диагноза при такой трудной в плане дифференциальной диагностики патологии, как рак поджелудочной железы.

Необходимо отметить, что биофилтритроцитологическое исследование серозных жидкостей из плевральной и брюшной полости (Патент на изобретение № 2495436 Федеральной службы по интеллектуальной собственности, зарегистрировано в Государственном реестре изобретений РФ) у больных со специфическим плевритом, асцитом позволяет увеличить выделение раковых клеток, чем обычный торакоцентез или лапароцентез. Соответственно последующее цитологическое исследование выделенных раковых клеток повышает результаты по поиску первичного очага. Кроме того, все случаи мезотелиомы плевры, диагностированные современными лучевыми методами исследования, требуют морфологического подтверждения диагноза. Цитологическое исследование плевральной жидкости в большинстве случаев является первым этапом морфологической верификации диагноза, так как у подавляющего числа пациентов имеется выпот в плевральной полости. Однако, чувствительность этого метода составляет 26-50% [142].

При цитологическом исследовании мазков плеврального выпота у 7 больных с мезотелиомой плевры, полученного посредством плевральной пункции с центрифугированием, подтвердило мезотелиому только у 3 больных. Процент выявления мезотелиомы плевры данным методом составил 43%. Выполненное затем биофилтритроцитологическое исследование внутривисцерального экссудата у этих

же больных в 6 случаях выявило мезотелиому плевры. Чувствительность данного метода составила 86%.

3.3. Сравнительная оценка результатов исследования на наличие ЦРК в венозной крови гемофилтритроцитологическим и иммунофлуоресцентным методами.

С целью определения реальных возможностей гемофилтритроцитологического исследования в выделении ЦРК на базе научно-образовательного центра молекулярной медицины ГОУ ВПО СибГМУРоздрава в 2011г. была проведена методом иммунофлуоресценции оценка наличия циркулирующих раковых клеток в мазках-отпечатках фильтрата венозной крови больных с онкологической патологией. Определение ЦРК в крови больных наиболее воспроизводимо при проведении таких перспективных в технологическом плане методов исследования как иммунофлуоресценция. Иммунофлуоресценция является одним из самых эффективных методов иммуногистохимического исследования. Иммуногистохимические методики исследования на сегодняшний день являются обязательной частью любых исследований, так как только они обеспечивают специфическую визуализацию тех или иных веществ.

В таблице 9 представлены данные онкологических больных и нумерация мазков-отпечатков с результатами гемофилтритроцитологического исследования их венозной крови. Результат исследования считался положительным (+), если в мазке-отпечатке определялись ЦРК, и соответственно отрицательным (-), если ЦРК в нем не было. При проведении гемофилтритроцитологического метода исследования во всех мазках-отпечатках за исключением шести, а именно: №1-б, 2-а, 2-в, 6-б, 7-б и 8-в не выявлены ЦРК.

Таблица 9. Сравнительная оценка результатов обследования больных методами гемофильтроцитологического исследования и иммунофлуоресценции.

Больные	Возраст	№ мазков – отпечатков	Результаты исследования на наличие	
			ЦРК	ЕрСАМ клеток
1	64	1-а	+	+
		1-б	-	-
		1-в	+	+
2	40	2-а	-	-
		2-б	+	-
		2-в	-	-
3	75	3-а	+	+
		3-б	+	+
		3-в	+	+
4	40	4-а	+	+
		4-б	+	+
		4-в	+	+
5	53	5-а	+	+
		5-б	+	+
		5-в	+	+
6	46	6-а	+	+
		6-б	-	-
		6-в	+	+
7	43	7-а	+	+
		7-б	-	-
		7-в	+	+
8	76	8-а	+	+
		8-б	+	-
		8-в	-	-

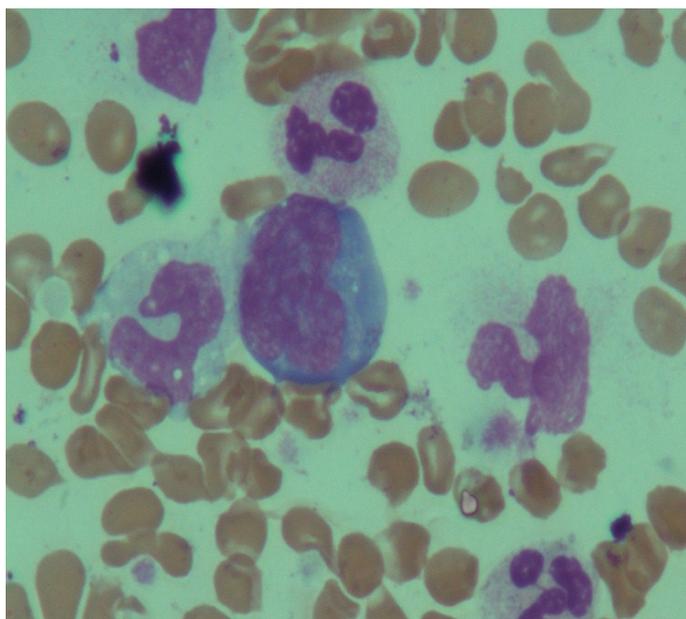
Для подтверждения или опровержения полученных гемофильтроцитологическим исследованием результатов, вышеуказанные мазки-отпечатки фильтрата венозной крови исследованы иммунофлуоресцентным методом. С этой целью проведена оценка наличия ЕрСАМ (CD 326) – положительных клеток в 24 цито-

логических мазках-отпечатках, полученных с помощью устройства для гемофилтритологического исследования венозной крови с нанофилтритом диаметр пор которого 6000 нм. В основе действия данного устройства лежит принцип, направленный на выделение из периферической венозной крови циркулирующих раковых клеток. Преимуществом этого прибора является имитация искусственной сосудистой модели, воссоздающей условия кровотока максимально приближенные к естественным, для того чтобы не допустить повреждения циркулирующих раковых клеток. Кроме того, данное устройство делает процесс выделения циркулирующих раковых клеток проще, качественнее и быстрее.

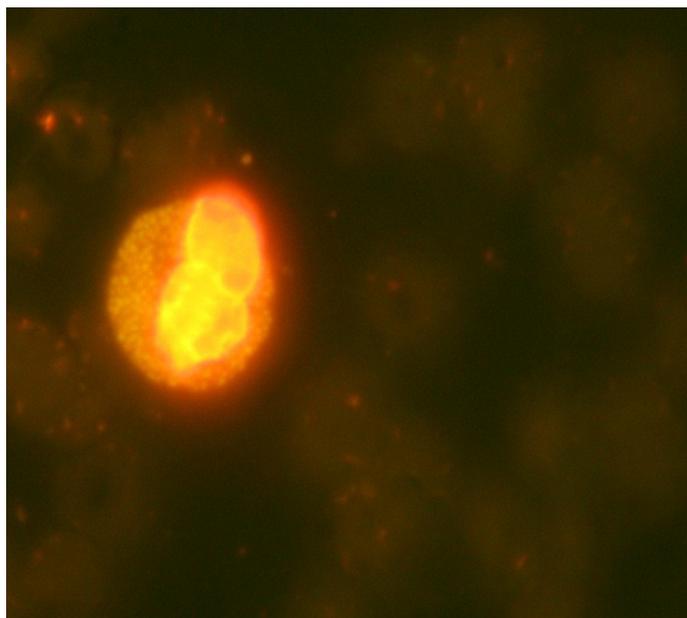
Оценку наличия ЕpСAМ (CD326)-положительных клеток проводили прямым методом иммунофлуоресценции на флуоресцентном микроскопе Axiostarplus («CarlZeiss», Германия). Для этого фиксированные мазки-отпечатки обрабатывали протеиназой К («Dako», Дания) 15 мин при 37°C, отмывали PBS, затем проводили инкубацию с флуоресцентным ядерным красителем PI (Invitrogen, США) и моноклональными антителами против человеческого ЕpСAМ (CD326) (клон В29.1 (VU-ID9)), меченных FITC («Abcam», Великобритания) в концентрации 5мкг/мл. ФИТЦ (изотиоцианат флуоресцеин) является самым лучшим из существующих флюорохромов.

Результат считался положительным при наличии клеток, имеющих ядерное красное окрашивание (PI) совместно с зеленой меткой (ЕpСAМ-FITC), то есть в положительных случаях при образовании комплекса антиген - антитело по его периферии появляется светящийся сигнал (рисунок 30 - 33). Во всех мазках-отпечатках (за исключением 2 проб: № 2-б и 8-б) проведенным контрольным исследованием, а именно методом иммунофлуоресценции обнаружены ЕpСAМ положительные клетки, следовательно, подтверждено наличие ЦРК (таблица 9).

ЕpСAМ (CD326) - молекула адгезии эпителиальных клеток. ЕpСAМ является ранним маркером злокачественных опухолей. Это один из самых стабильных и максимально «проявленных» маркеров раковых клеток опухолей самых разных органов, из метастазов, а также стволовых раковых клеток. ЕpСAМ является трансмембранным гликопротеином 1 типа.



А.

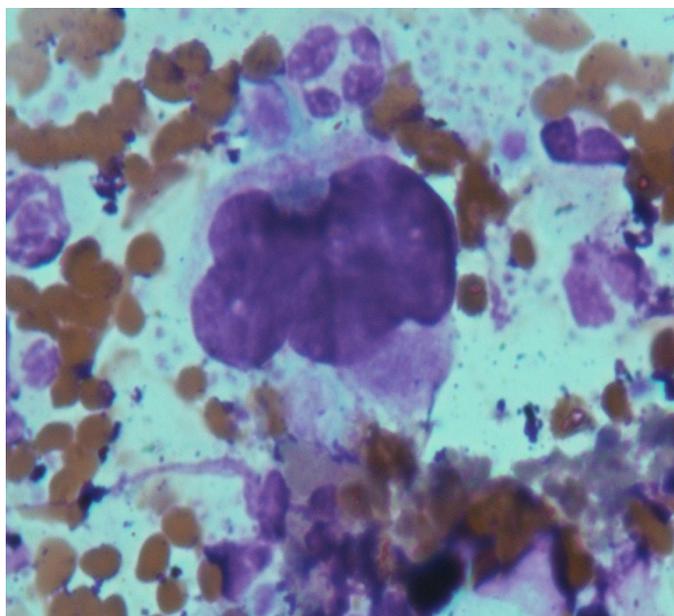


Б.

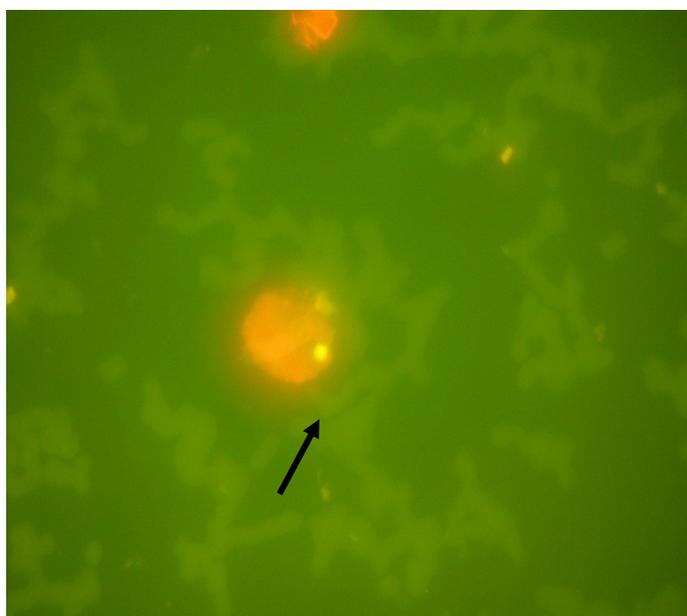
Рисунок 30. Больной 75 лет. Диагноз: «Рак тела желудка. IIIa стадия».

А. Гемофилтритологическое исследование: ЦРК выявленные в периферической крови. (ув. 1000).

Б. Иммунофлуоресценция Her2/neu-положительной клетки в мазке-отпечатке (ув. 200).



А.



Б.

Рисунок 31. Больная 53 лет. Диагноз: «Рак тела желудка. IIIb стадия».

А. Гемофилтритологическое исследование: ЦРК выявленные в периферической крови. ув. 1000).

Б. Иммунофлуоресценция Her2/neu-положительной клетки в мазке-отпечатке показана стрелкой (ув. 200).

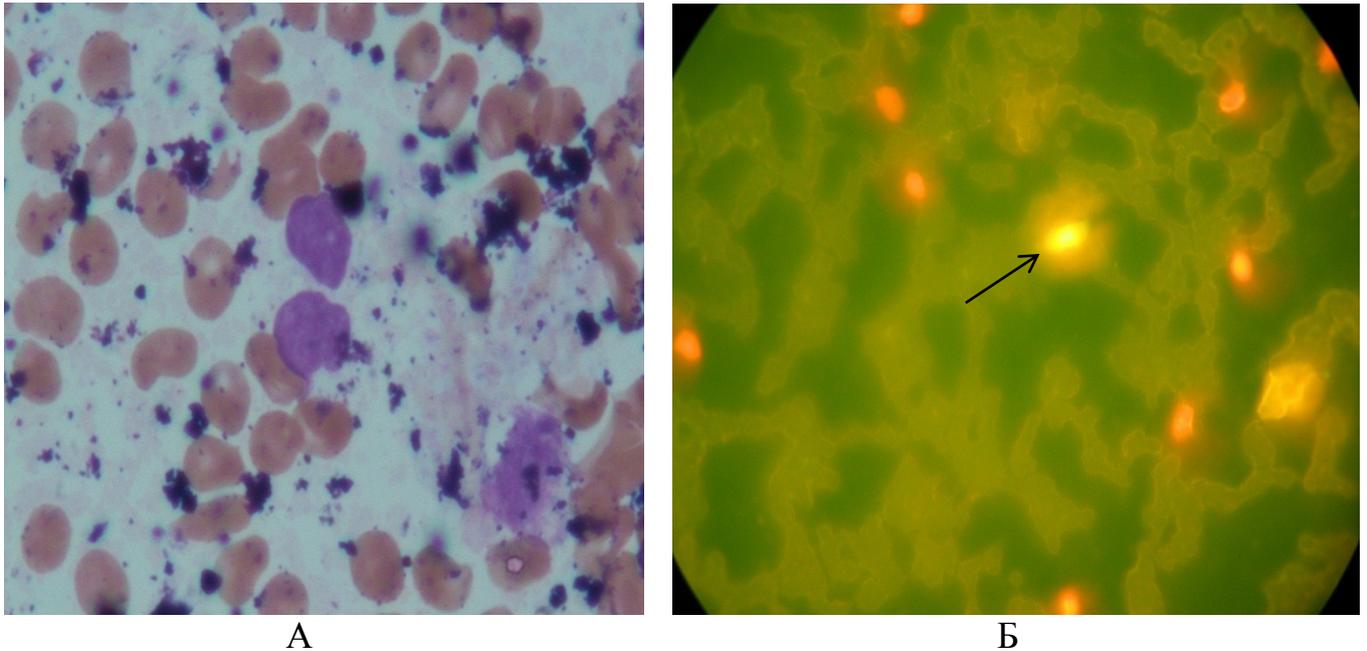


Рисунок 32. Больной 43 лет. Диагноз: «Злокачественный карциноид левого легкого. III стадия».

А. Гемофилтритологическое исследование: ЦРК выявленные в периферической крови. (ув. 1000).

Б. Иммунофлуоресценция ЕрСам-положительной клетки в мазке-отпечатке показана стрелкой (ув. 200).

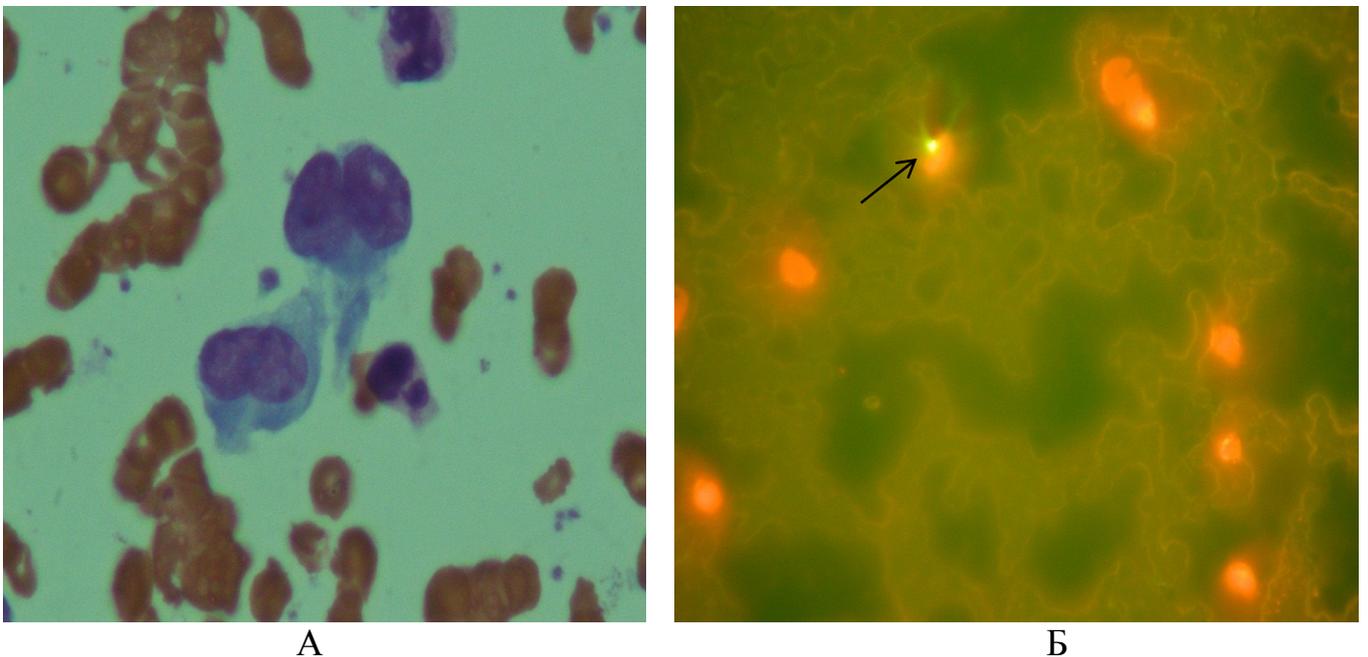


Рисунок 33. Больной 40 лет. Диагноз: «Рак антрального отдела желудка, Ib стадия».

А. Гемофилтритологическое исследование: ЦРК выявленные в периферической крови. (ув. 1000).

Б. Иммунофлуоресценция ЕрСам-положительной клетки в мазке-отпечатке показана стрелкой (ув. 200).

Ядерное окрашивание достигается применением ядерного красителя PI, флуоресцирующего в красном диапазоне и пропидия йодид - интеркалирующего непроникающего красителя. Поскольку область связывания PI с молекулой нуклеиновой кислоты лежит в области нуклеотидной пары гуанин и цитозин, то краситель также способен взаимодействовать с двухцепочечными участками РНК.

Иммунофлуоресцентный метод является универсальным иммуногистохимическим методом, сочетающим в себе точный морфологический анализ со специфичностью и высокой разрешающей способностью иммунологических методов. Большое преимущество данного метода заключается в его простоте, высокой чувствительности, а также в быстроте получения результатов. В настоящее время высокая степень очистки антител позволяет при прямом методе исследования свести на нет неспецифические реакции и исключить ложноположительные результаты. Метод иммунофлуоресценции имеет решающее значение в ранней диагностике онкологических заболеваний.

В двух пробах с мазками-отпечатками (№ 2-б и 8-б с (+) результатами на присутствие ЦРК) наличие ЕрСАМ положительных клеток при проведении исследования методом иммунофлуоресценции не установлено. Следовательно, степень достоверности выделения ЦРК гемофилтритроцитологическим методом исследования по результатам иммунофлуоресценции, составляет 91,6%.

Таким образом, результаты исследования методом иммунофлуоресценции подтверждают высокую эффективность выделения циркулирующих раковых клеток из венозной крови с помощью гемофилтритроцитологического метода исследования.

Резюме.

Применение гемофилтритроцитологического метода исследования венозной крови у больных с подозрением на наличие злокачественной опухоли, содействует в установлении диагноза злокачественного новообразования. Такой вывод основывается на следующих результатах:

— во-первых, проведение гемофилтритроцитологического исследования позволило обнаружить ЦРК в крови у 198 больных (93,8%) из 211 пациентов,

что дало основание для целенаправленного инструментального обследования и установления диагноза ЗНО подтвержденного патогистологическим исследованием;

— во-вторых, и это главное: результат экспертизы цитологических препаратов мазков отпечатков фильтрата крови методом иммунофлуоресценции подтверждает эффективность выделения ЦРК гемофильтроцитологическим методом;

— в-третьих, чувствительность гемофильтроцитологического исследования, учитывая результаты обнаружения ЦРК у онкологических больных составила 93,8%, а применение гемофильтроцитологического исследования у доноров свидетельствует о 100% специфичности метода.

Для гемофильтроцитологического исследования используются доступные биологические объекты (периферическая венозная кровь), обычный способ забора венозной крови, стандартная методика окраски препарата и небольшой период времени для проведения исследования, что является достоинством этого метода.

Гемофильтроцитологический метод простой в исполнении, даёт быстрый результат (в 2,5 раза быстрее). И наконец, он тоже эффективный метод, мало уступающий иммунофлуоресцентному методу в точности определения циркулирующих раковых клеток, а именно, на 8,3%. Применение гемофильтроцитологического метода исследования, вместо метода иммунофлуоресценции с расходным материалом зарубежного производства, способствует импортозамещению.

Глава 4

Роль гемофилтритроцитологического исследования периферической венозной крови у радикально оперированных больных раком легкого, желудка и толстой кишки в раннем послеоперационном периоде

Основным методом лечения немелкоклеточного рака легкого, желудка и толстой кишки до настоящего времени остается хирургический метод. Тем не менее, для обеспечения удовлетворительных отдаленных результатов лечения возможностей одного хирургического лечения недостаточно, поскольку этому мешают возникающие в последующем периоде времени локорегионарные рецидивы и отдаленные метастазы.

Для улучшения выживаемости онкологических больных после радикального хирургического лечения требуется проведение в необходимых случаях адъювантной полихимиотерапии (АХТ). Традиционно показаниями к проведению АХТ служили местно распространенные формы опухолей, а также вторая стадия заболевания у молодых лиц при наличии неблагоприятных факторов прогноза (низкая дифференцировка, инвазия сосудов). Однако, безрецидивная и общая выживаемость оперированных больных, которым АХТ проводилась согласно вышеуказанным показаниям оставляет желать лучшего. В связи с этим не прекращается поиск новых подходов к назначению АХТ.

До настоящего времени отсутствует объективный метод контроля качества проведенной адъювантной полихимиотерапии, следовательно, в случае лекарственной устойчивости своевременно распознать это также не представляется возможным. Не исключено, что все это служит причиной неудовлетворительных результатов комбинированного лечения онкологических больных. Соответственно нужен метод контроля АХТ, позволяющий на любом этапе ее проведения, провести данный контроль.

Для определения показаний АХТ нами использован гемофилтритроцитологический метод исследования периферической венозной крови радикально оперированных больных по поводу рака легких, желудка и ободочной кишки.

С этой целью проведены исследования у 511 лиц. Среди них было 338 больных злокачественными новообразованиями и 173 здоровых донора. Гемофильтроцитологическое исследование проведено у всех 338 больных, в том числе у 138 пациентов дважды, до и после операции, и у 200 только после операции.

Выделены две группы лиц: основная и контрольная. В основную группу вошли 338 (66,1%) пациентов, прошедших радикальное оперативное вмешательство по поводу ЗНО. Контрольную группу составили 173 (33,9%) здоровых донора, исследованных на предмет отсутствия или наличия у них в венозной крови ЦРК (таблица 10).

Таблица 10. Применение гемофильтроцитологического исследования у больных и доноров.

Группа обследованных лиц						
всего		в том числе				р
		основная (больные)		контрольная (доноры)		
абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%	
511	100,0	338	66,1	173	33,9	<0,001

С целью оценки прогноза и эффективности проведения адъювантной полихимиотерапии (АХТ) обследовано 338 радикально оперированных больных по поводу злокачественных новообразований (ЗНО) легких, желудка и толстого кишечника. Из них 112 пациентов были с ЗНО легких, 81 - желудка и 145 - толстой кишки (таблица 11).

Таблица 11. Характер заболеваний у больных с установленной локализацией злокачественных новообразований, у которых проводилось исследование ЦРК в венозной крови

Нозология	Абс. число	%
Рак легкого	112	33,1
Рак желудка	81	24,0
Рак толстой кишки	145	42,9
Всего:	338	100,0

В соответствии с поставленной задачей у этих больных на 15 и 21 дни раннего послеоперационного периода было проведено гемофильтроцитологическое исследование периферической венозной крови.

Цитологическое исследование мазков-отпечатков, полученных из фильтрата крови у 259 (76,6%) больных, оперированных по поводу рака легких, желудка и толстой кишки, выявило наличие в них ЦРК (рисунок 34-41).

Отрицательный результат (отсутствие ЦРК) отмечен у 79 (23,4%) послеоперационных больных (таблица 12).

Таблица 12. Частота выявления ЦРК в периферической венозной крови у радикально оперированных онкологических больных

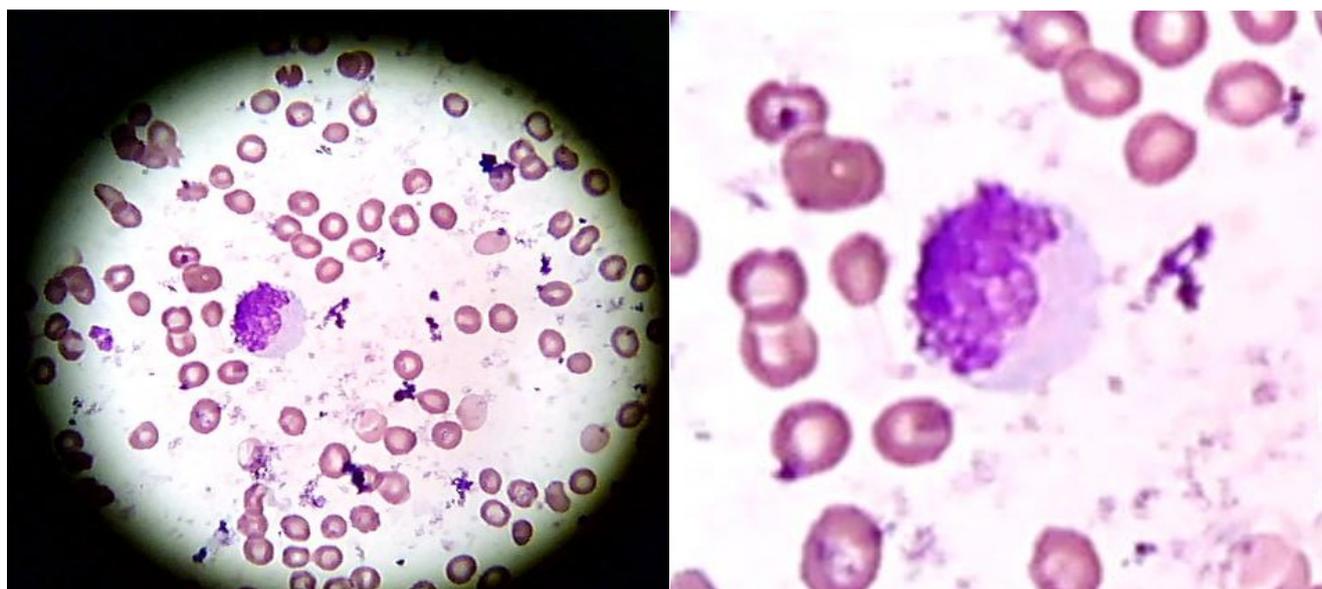
Всего больных		ЦРК (+)		ЦРК (-)	
абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%
338	100,0	259	76,6	79	23,4

Кроме того, динамическое наблюдение больных осуществлялось в течение 1-3 лет после операции. Одновременно проводилось гемофильтроцитологическое исследование: в 1 год – 4 раза, на 2 год – 2 раза, на 3 год – 1 раз.

Всем 259 онкологическим больным в ходе собеседования, учитывая обнаруженные у них ЦРК, было предложено проведение адъювантной химиотерапии.

Из них у 185 пациентов, согласным на нее, проведена адъювантная химиотерапия по общепринятым схемам (таблица 13). У 74 больных АХТ не проводилась. В основную группу вошли 185 радикально оперированных больных. Критерием включения в данную группу пациентов с ЗНО являлось их письменное согласие и проведение АХТ. Критерием исключения из этой группы пациентов служил их дальнейший отказ и соответственно незавершенность адъювантной химиотерапии (таблица 13).

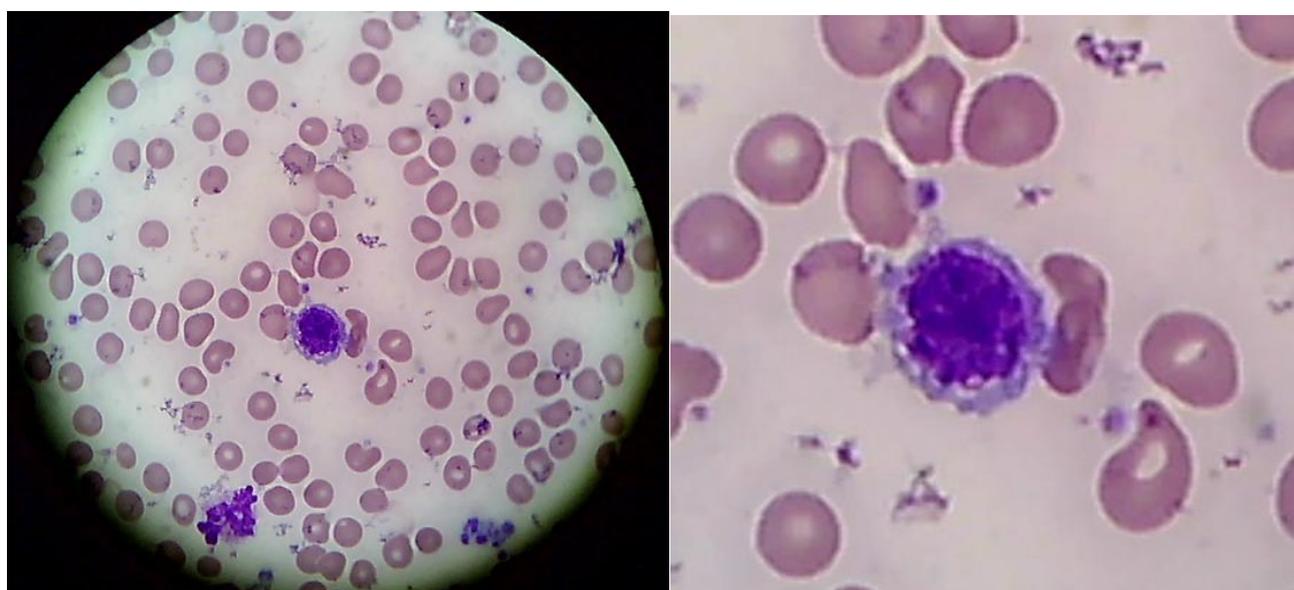
Группу сравнения составили 74 радикально оперированных онкологических больных. Критерием включения в эту группу пациентов являлся их отказ от проведения АХТ. Критерием исключения больных из данной группы служило их в последствии принятое решение получать АХТ и начало проведения химиотерапии.



Ув. х 200

Ув. х 1000

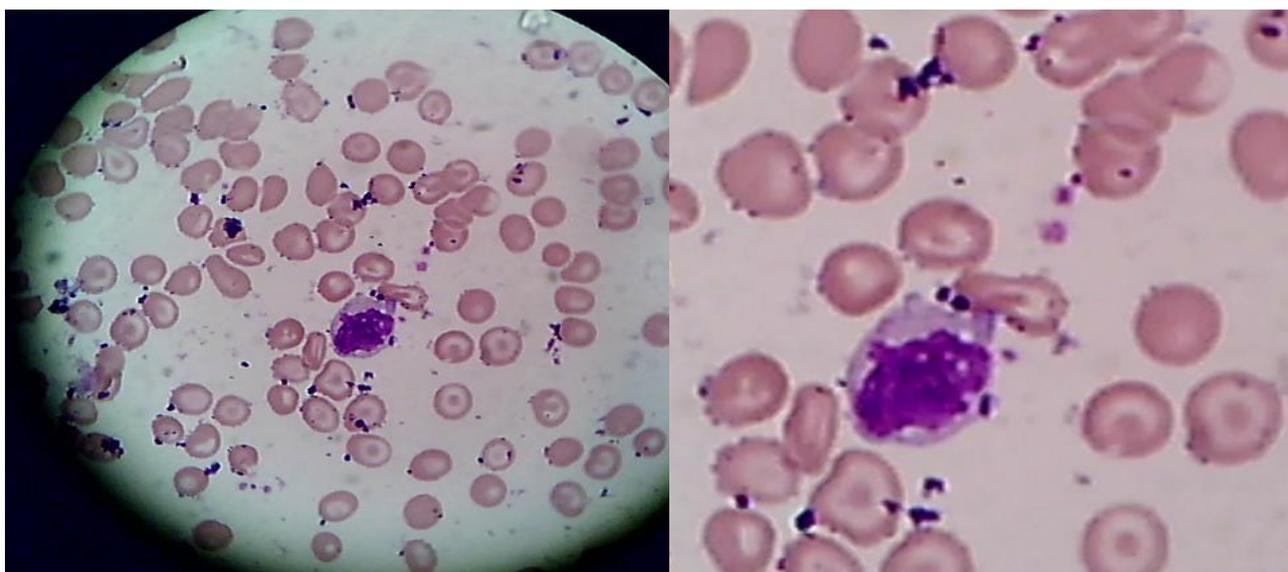
Рисунок 34. Больной, 58 лет. Диагноз: «Рак желудка. Стадия IIIA». Гемофильтроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азури-эозином. Опухолевая клетка с крупным уродливым ядром. Структура хроматина глыбчатая. Ядро расположено эксцентрически.



Ув. х 200

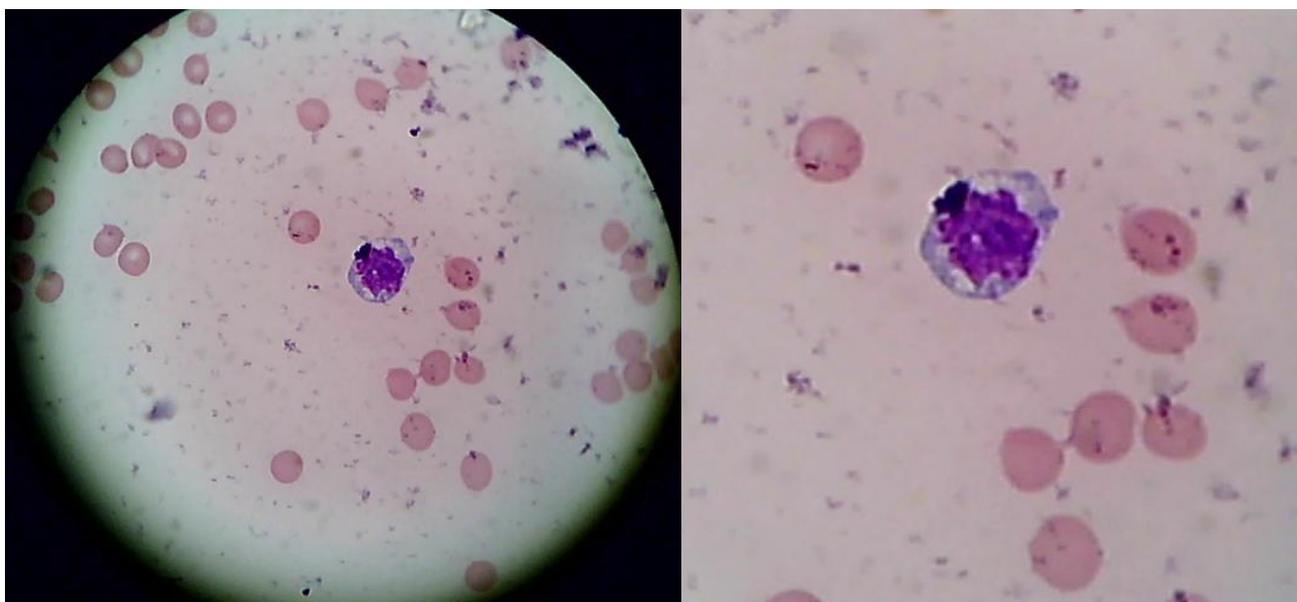
Ув. х 1000

Рисунок 35. Больной, 59 лет. Диагноз: «Рак толстой кишки. Стадия IIIA». Гемофильтроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азури-эозином. Опухолевая клетка с крупным полиморфным и неровными контурами ядром.



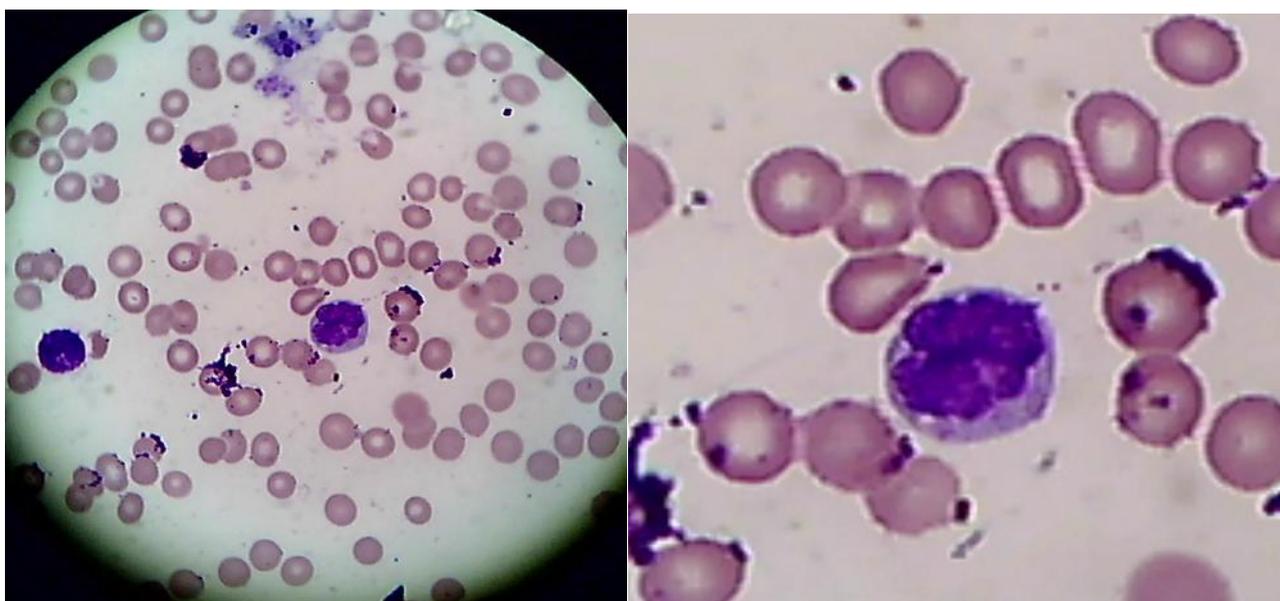
Ув. х 200 Ув. х 1000

Рисунок 36. Больной, 62 лет. Диагноз: «Рак желудка. Стадия IIВ.» Гемофильтроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. Опухолевая клетка с крупным уродливым ядром. Хроматин крупнозернистый.



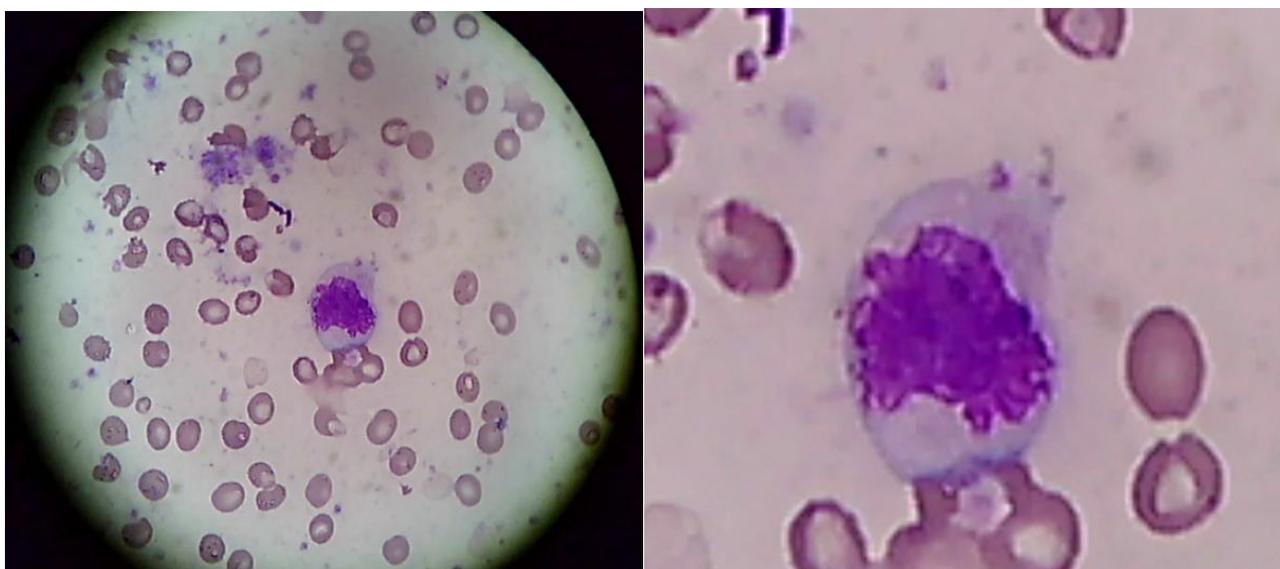
Ув. х 200 Ув. х 1000

Рисунок 37. Больной, 85 лет. Диагноз: «Рак толстой кишки. Стадия IIIВ.» Гемофильтроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. Опухолевая клетка с инвагинированным крупным ядром. Структура хроматина глыбчатая (впечатление многоядерности). Цитоплазма скудная.



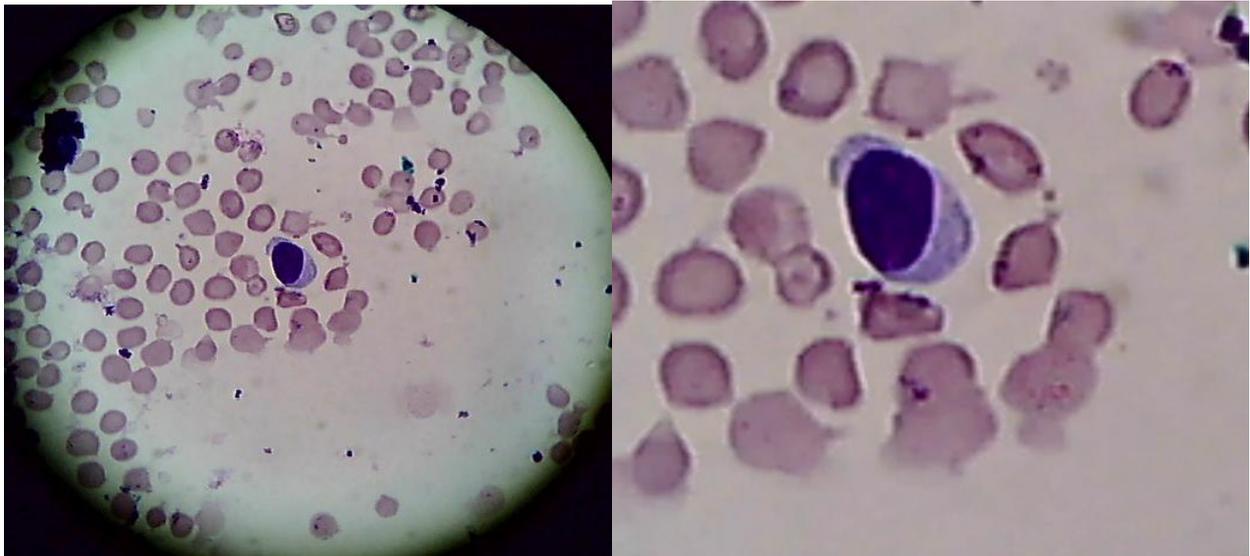
Ув. х 200 Ув. х 1000

Рисунок 38. Больной, 57 лет. Диагноз: «Рак толстой кишки. Стадия IIIA». Гемофильтроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. Опухолевая клетка небольшого размера. Контуры ядра неровные, хроматин комковатый. Нарушено ядерно-цитоплазматическое соотношение.



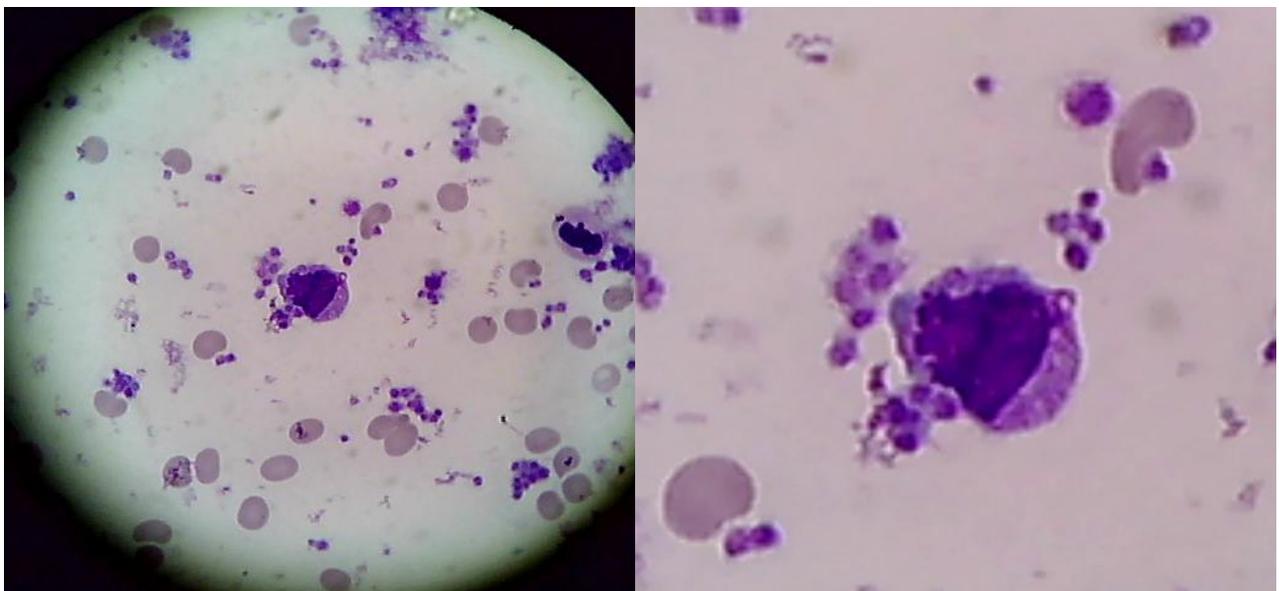
Ув. х 200 Ув. х 1000

Рисунок 39. Больной, 48 лет. Диагноз: «Рак правого легкого. Стадия IIIA.» Гемофильтроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. Опухолевая клетка с крупным уродливым ядром. Контуры ядра неровные. Хроматин нежной структуры.



Ув. х 200 Ув. х 1000

Рисунок 40. Больная, 51 года. Диагноз: «Рак левого легкого. Стадия IIIA.» Гемофильтроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. Опухолевая клетка небольших размеров с эксцентрически расположенным ядром. Ядро гиперхромное.



Ув. х 200 Ув. х 1000

Рисунок 41. Больная, 59 лет. Диагноз: «Рак толстой кишки. Стадия IIIВ.» Гемофильтроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. Опухолевая клетка с полиморфным уродливым ядром. Контуры ядра неровные. Ядро занимает большую часть клетки.

Таблица 13. Локализация злокачественных новообразований у больных, у которых проводилась АХТ (основная группа) и пациентов, отказавшихся от проведения АХТ (группа сравнения).

Локализация злокачественного новообразования	Группы больных						
	всего		в том числе				Р
			основная		сравнения		
	абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%	
Рак легких	87	33,6	62	71,3	25	28,7	<0,001
Рак желудка	64	24,7	43	67,2	21	32,8	<0,001
Рак толстой кишки	108	41,7	80	74,0	28	26,0	<0,001
Всего больных	259	100,0	185	71,4	74	28,6	<0,001

В данное сравнительное проспективное клиническое исследование вошли 87 больных с раком лёгкого, 64 больных с раком желудка и 108 больных с раком толстой кишки. Необходимо отметить, что у этих больных после радикальной операции были обнаружены ЦРК. Сопоставление групп онкологических больных было проведено по полу, возрасту, морфологической форме, локализации и распространенности процесса по стадиям, объемам выполненных оперативных вмешательств.

Из радикально оперированных больных с раком легкого, у которых были обнаружены в венозной крови ЦРК, 62 пациента, прошедших адьювантную ПХТ, вошли в основную, а 25, не получивших химиотерапию – в группу сравнения. Всего же в двух исследуемых группах больных раком легкого были 53 мужчины и 34 женщины (таблица 14). Половой состав в группах больных был статистически одинаковым.

Большинство больных были в возрасте 60-69 лет (таблица 15). По возрастным группам больные раком легкого статистически не различались.

Таблица 14. Определение значимости различий по полу в исследуемых группах у радикально оперированных больных раком легкого

Пол	Группа больных				X ²	f	p>
	основная		сравнения				
	абс. число	%	абс. число	%			
Мужчины	37	60,0	16	64,0	0,14	1	0,05
Женщины	25	40,0	9	36,0			
Всего	62	100,0	25	100,0			

Таблица 15. Определение значимости различий по возрасту в исследуемых группах радикально оперированных больных раком легкого

Возрастной период, лет	Группы больных				X ²	f	p>
	основная		сравнения				
	абс. число	%	абс. число	%			
До 40	1	1,6	0	0	0,99	4	0,05
40-49	5	8,0	1	4,0			
50-59	22	35,4	9	36,0			
60-69	24	39,0	10	40,0			
70 и старше	10	16,0	5	20,0			
Всего	62	100,0	25	100,0			

При изучении патоморфологического строения опухолей легких было выявлено превалирование плоскоклеточного рака (таблица 16).

Таблица 16. Определение значимости различий по морфологическому типу опухоли в исследуемых группах радикально оперированных больных раком легкого

Морфологический тип опухоли	Группа больных				X ²	f	p>
	основная		сравнения				
	абс. число	%	абс. число	%			
Плоскоклеточный рак	33	53,2	13	52,0	0,16	2	0,05
Мелкоклеточный рак	9	14,5	3	12,0			
Аденокарцинома	20	32,3	9	36,0			
Всего	62	100,0	25	100,0			

Частота отдельных морфологических типов была одинаковой.

Периферическая форма рака легких преобладает над центральной локализацией в обеих исследуемых группах больных (таблица 17). По формам локализации обе группы были сопоставимы.

Таблица 17. Определение значимости различий по локализации опухоли в исследуемых группах больных раком легкого

Форма опухоли	Группа больных				X ²	f	p>
	основная		сравнения				
	абс. число	%	абс. число	%			
Центральная	24	38,7	9	36,0	0,05	1	0,05
Периферическая	38	61,3	16	64,0			
Всего	62	100,0	25	100,0			

Для оценки распространенности рака легкого и других локализаций ЗНО нами использовано 7-е издание Классификации TNM, которое содержит правила руководства по стадированию ЗНО AJCC, выпущенном в 2009 г. Данная классификация позволяет систематизировать различные клинические ситуации, выработать общую тактику лечения, прогнозировать его результаты на основе анатомических параметров опухоли.

Среди больных раком легкого, лица с IIА стадией болезни отмечались только в основной группе, а пациентов с IIВ как и с IIIА стадиями было меньше в группе сравнения (таблица 18).

По стадиям, распространенности процесса обе группы были статистически сопоставимы.

Наиболее частым видом операций, выполненных как в основной группе радикально оперированных больных раком легкого, так и в группе сравнения была лобэктомия (таблица 19). По объему выполненных операций исследуемые группы были сопоставимы.

Таблица 18. Определение достоверности различий по распространенности опухоли в исследуемых группах больных раком легкого

Стадия заболевания		Группа больных				X ²	f	p>
		основная		сравнения				
		абс. число	%	абс. число	%			
IIA	T1aN1M0	1	1,6	0	0	0,56	5	0,05
IIB	T2bN1M0	8	13,0	3	12,0			
	T3N0M0	14	22,6	6	24,0			
IIIA	T2aN2M0	12	19,3	5	20,0			
	T3N1M0	18	29,0	8	32,0			
	T3N2M0	9	14,5	3	12,0			
Всего		62	100,0	25	100,0			

Таблица 19. Определение значимости различий по видам выполненных оперативных вмешательств в исследуемых группах больных раком легкого

Объем операции		Группа больных				X ²	f	p>
		основная		сравнения				
		абс. число	%	абс. число	%			
Лобэктомия		30	48,3	13	52,0	0,10	2	0,05
Билобэктомия		3	5,0	1	4,0			
Пневмонэктомия		29	46,7	11	44,0			
Всего		62	100,0	25	100,0			

Проведенный анализ статистически значимой разницы по полу, возрасту, морфологии, локализации, стадиям и операциям между основной группой и группой сравнения, оперированных по поводу рака легкого, не выявил.

В следующую серию исследований вошли 64 пациента, радикально оперированные по поводу рака желудка (таблица 20). Из них у 43 больных (24 мужчины и 19 женщин), составивших основную группу, в послеоперационном периоде помимо хирургического лечения применялась адъювантная химиотерапия. Остальным 21 пациенту (12 мужчин и 9 женщин), составивших группу сравнения, было выполнено только радикальное оперативное вмешательство, а от адъювантной полихимиотерапии они отказались. Половой состав основной группы и группы сравнения были сопоставимы.

Таблица 20. Определение значимости различий по полу в исследуемых группах радикально оперированных больных раком желудка

Пол	Группа больных				X ²	f	p>
	основная		сравнения				
	абс. число	%	абс. число	%			
Мужчины	24	55,8	12	57,1	0,01	1	0,05
Женщины	19	44,2	9	42,8			
Всего	43	100,0	21	100,0			

Возраст больных раком желудка варьировал от 40 до 70 лет и старше (таблица 21).

Таблица 21. Определение значимости различий по возрасту в исследуемых группах радикально оперированных больных раком желудка

Возрастной период, лет	Группа больных				X ²	f	p>
	основная		сравнения				
	абс. число	%	абс. число	%			
40-49	5	11,6	2	9,5	0,11	3	0,05
50-59	12	28,0	6	28,6			
60-69	15	34,8	8	38,1			
70 и старше	11	25,6	5	23,8			
Всего	43	100,0	21	100,0			

Возрастная структура онкологических больных была в сравниваемых группах следующая: на возрастной период от 60 – 69 лет приходилось наибольшее количество больных раком желудка. В возрастном периоде 40 - 49 лет в обеих группах оказалось наименьшее число пациентов. Возрастной состав обеих групп был сопоставим.

У всех больных анализируемых групп гистологической формой опухоли, оказалась аденокарцинома.

По структуре степени зрелости опухоли у 20 пациентов из основной группы и у 10 пациентов из группы сравнения аденокарцинома оказалась низкодифференцированной, у 16 из основной и у 9 из группы сравнения – умереннодифференцированной, наконец, у 7 из основной и у 2 из группы сравнения – высокодифференцированной. Таким образом, в исследуемых группах отмечено преобладание низкодифференцированной аденокарциномы (таблица 22).

Таблица 22. Определение значимости различий по морфологическому типу опухоли в исследуемых группах радикально оперированных больных раком желудка

Морфологический тип аденокарциномы (АДК)	Группа больных				X ²	f	p>
	основная		сравнения				
	абс. число	%	абс. число	%			
высокодифференцированная	7	16,3	2	9,5	0,57	2	0,05
умереннодифференцированная	16	37,2	9	42,8			
низкодифференцированная	20	46,5	10	47,6			
Всего	43	100,0	21	100,0			

По морфологическим типам рассматриваемые группы больных были сопоставимы.

В сравниваемых группах самой частой локализацией рака является тело желудка (таблица 23). По локализации новообразований анализируемые группы были сопоставимы.

Таблица 23. Определение значимости различий по локализации опухоли в исследуемых группах радикально оперированных больных раком желудка

Локализация опухоли	Группа больных				X ²	f	p>
	основная		сравнения				
	абс.число	%	абс.число	%			
Кардиальныйотдел	11	25,5	5	0,05	0,06	2	0,05
Тело желудка	17	39,5	9	42,8			
Антральныйотдел	15	35,0	7	33,3			
Всего	43	100,0	21	100,0			

При сопоставлении обеих групп установлено, что больные раком желудка с T1N2M0 и T4aN0M0 были только в основной группе, а наибольшее количество составили больные раком желудка с T3N2M0 как в основной, так и в группе сравнения (таблица 24). Второе место по частоте в обеих сравниваемых группах приходилось на больных раком желудка с T3N1M0. По стадиям и распространенности рассматриваемые группы были сопоставимы.

Таблица 24. Определение значимости различий по распространенности опухоли в исследуемых группах радикально оперированных больных раком желудка

Стадия заболевания		Группа больных				X ²	f	p>
		основная		сравнения				
		абс. число	%	абс. число	%			
II A	T1 N2M0	1	2,3	0,05	0	1,36	6	0,05
	T2 N1M0	5	11,6		14,3			
	T3 N0M0	2	4,6		4,7			
II B	T2 N2M0	6	14,0	2	9,5			
	T3 N1M0	13	30,2	7	33,3			
	T4a N0M0	1	2,3	0	0			
III A	T3 N2M0	15	35,0	8	38,1			
Всего		43	100,0	21	100,0			

У всех 64 больных со злокачественным новообразованием желудка, вошедшим в основную и группу сравнения, проведена в плановом порядке радикальная операция по удалению опухоли. Дистальная субтотальная резекция желудка по количеству выполненных оперативных вмешательств находится на первом месте, на втором – гастрэктомия и на третьем месте – проксимальная субтотальная резекция желудка (таблица 25). По объемам операции группы больных были сопоставимы.

Полученные результаты анализа доказывают, что различия в сравниваемых группах по полу, возрасту, морфологии опухолей, локализации и стадиям заболевания, а также выполненным оперативным вмешательствам статистически не значимы.

Таблица 25. Определение значимости различий по видам выполненных оперативных вмешательств в исследуемых группах радикально оперированных больных раком желудка

Объем операции	Группа больных				X ²	f	p>
	основная		сравнения				
	абс. число	%	абс. число	%			
Проксимальная субтотальная резекция желудка	5	11,6	2	9,5	0,21	2	0,05
Дистальная субтотальная резекция желудка	22	51,1	12	57,1			
Гастрэктомия	16	37,2	7	33,3			
Всего	43	100,0	21	100,0			

Среди больных раком толстой кишки отмечено преобладание женской части больных над мужской в основной группе и, наоборот, в группе сравнения (таблица 26). Различия показателей по полу между группами были статистически не значимыми.

Таблица 26. Определение значимости различий по полу в исследуемых группах радикально оперированных больных раком толстой кишки

Пол	Группа больных				X ²	f	p>
	основная		сравнения				
	абс. число	%	абс. число	%			
Мужчины	38	47,5	15	53,6	0,30	1	0,05
Женщины	42	52,5	13	46,4			
Всего	80	100,0	28	100,0			

Возрастной период, на который приходится наибольшее количество заболевших раком толстой кишки, составляет 60-69 лет (таблица 27). По возрастному составу группы были сопоставимы.

Таблица 27. Определение достоверности различий по возрасту в исследуемых группах радикально оперированных больных раком толстой кишки

Возрастные группы, лет	Группа больных				X ²	f	p>
	основная		сравнения				
	абс. число	%	абс. число	%			
до 40	2	2,5	0	0	0,88	4	0,05
40-49	7	8,7	2	7,1			
50-59	23	28,8	9	32,1			
60-69	27	33,8	10	35,7			
70 и старше	21	26,2	7	25,0			
Всего	80	100,0	28	100,0			

У всех 108 оперированных больных с раком толстой кишки из обеих групп удаленная опухоль после гистологического исследования по морфологическому строению оказалась аденокарциномой. При сравнении аденокарцинома по структуре зрелости в количественном соотношении в анализируемых группах не различалась. Общеизвестны следующие градации степени дифференцировки: высокодифференцированные опухоли имеют приблизительно строение аденомы, умереннодифференцированные представляли опухоли с нарушенной железистой

структурой, низкодифференцированные характеризовались малым количеством формирования желез. Больные с данной степенью дифференцировки опухоли в нашем случае оказались наиболее многочисленны (таблица 28).

Таблица 28. Определение значимости различий по гистологическому строению опухоли в исследуемых группах радикально оперированных больных раком толстой кишки

Морфологический тип аденокарциномы (АДК)	Группа больных				X ²	f	p>
	основная		сравнения				
	абс. число	%	абс. число	%			
Высокодифференцированная	16	20,0	5	17,9	0,08	2	0,05
Умереннодифференцированная	29	36,2	10	35,7			
Низкодифференцированная	35	43,8	13	46,4			
Всего	80	100,0	28	100,0			

В исследуемых группах рак ободочной кишки в 1,5 раза и более превышает рак сигмовидной кишки (таблица 29). По локализации новообразования анализируемые группы больных были сопоставимы.

Таблица 29. Определение значимости различий по локализации опухоли в исследуемых группах радикально оперированных больных раком толстой кишки

Локализация опухоли	Группа больных				X ²	f	p>
	основная		сравнения				
	абс. число	%	абс. число	%			
Ободочная кишка	49	61,2	18	64,2	0,08	1	0,05
Сигмовидная кишка	31	38,8	10	35,7			
Всего	80	100,0	28	100,0			

В сравниваемых группах больные раком толстой кишки в стадии T4aN0M0 были только в основной группе, а наибольшее количество онкологических больных в обеих группах оказались со стадией T3N2bM0 (таблица 30). По стадиям, распространенности процесса обе группы были сопоставимы.

Таблица 30. Определение значимости различий по распространенности опухоли в исследуемых группах радикально оперированных больных раком толстой кишки

Стадия заболевания		Группа больных				X ²	f	p>
		основная		сравнения				
		абс число	%	абс число	%			
IIA	T3 N0M0	9	11,2	3	10,7	2,73	2	0,05
IIВ	T4a N0M0	6	7,5	0	0			
IIIA	T2 N1M0	12	15,0	5	17,9			
IIВ	T3 N1M0	10	12,5	3	10,7			
	T4a N1M0	11	13,8	4	14,3			
	T2 N2aM0	7	8,8	2	7,1			
IIС	T3 N2bM0	16	20,0	7	25,0			
	T4aN2aM0	9	11,2	4	14,3			
Всего		80	100,0	28	100,0			

Самым распространенным оперативным вмешательством, выполненным по поводу рака толстой кишки, была гемиколэктомия (таблица 31). По объемам операции рассматриваемые группы были сопоставимы.

Статистический анализ достоверных различий в обеих группах больных по полу, возрасту, гистологической форме опухолей, локализации процесса, стадиям заболевания и видам операций не обнаружил.

Таблица 31. Определение значимости различий по видам оперативных вмешательств в исследуемых группах радикально оперированных больных раком толстой кишки

Объем операции	Группа больных				X ²	f	p>
	основная		сравнения				
	абс. число	%	абс. число	%			
Гемиколэктомия	53	66,2	17	60,7	0,30	2	0,05
Резекция поперечного отдела ободочной кишки	8	10,0	3	10,7			
Резекция сигмовидной кишки	19	23,8	8	28,6			
Всего	80	100,0	28	100,0			

Таким образом, в результате проведенной статистической обработки данных, полученных в ходе сравнения основной группы и группы сравнения у больных со злокачественными опухолями легких, желудка и толстой кишки, статистически значимой разницы не выявлено.

Перед началом адъювантной полихимиотерапии при проведении гемофильтроцитологического исследования венозной крови радикально оперированных больных концентрация ЦРК в 8,0 мл периферической крови была в основной группе следующей: 5 и более ЦРК у 109; 4 и менее у 76 пациентов (таблица 32).

Таблица 32. Концентрация ЦРК в венозной крови радикально оперированных больных перед началом АХТ

Локализация злокачественного новообразования	Всего		ЦРК 5 и более				ЦРК 4 и меньше			
			основная группа		группа сравнения		основная группа		группа сравнения	
	абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%
Рак легких	87	33,6	37	59,7	9	36,0	25	40,3	16	64,0
Рак желудка	64	24,7	26	60,5	7	33,3	17	39,5	14	66,7
Рак толстой кишки	108	41,7	46	57,5	11	39,3	34	42,5	17	60,7
Всего больных	259	100,0	109	59,0	27	36,5	76	41,0	47	63,5

Наибольшее количество радикально оперированных больных с концентрацией 5 и более ЦРК представляли пациенты, оперированные по поводу рака толстой кишки, соответственно, наименьшее количество – больные раком желудка.

В группе пациентов с концентрацией ЦРК 4 и менее также преобладали больные с раком толстой кишки, а меньше всего было больных оперированных по поводу рака желудка. Больные оперированные по поводу рака легких занимали промежуточное положение.

Принимая во внимание наличие ЦРК в периферической венозной крови онкологических больных на 15 и 21 дни после радикального оперативного вмешательства, заключавшегося в полном удалении опухоли вместе с регионарными лимфатическими узлами, представилось важным проведение у них адъювантной полихимиотерапии.

Растет признание решающей роли циркулирующих раковых клеток в развитии метастазов. Эти идеи заложили биологические основы лечебного таргетирования циркулирующих опухолевых клеток – перспективного направления исследования, целью которого является снижение онкологической заболеваемости и смертности населения за счет профилактики развития метастазов на очень ранней стадии. Стадия гематогенной транспортировки метастатического каскада обеспечивает необходимый доступ к циркулирующим опухолевым клеткам для прицельного лечебного таргетирования, чтобы получить возможность прервать процесс метастазирования [309]. По данным В. Smith и соавторов ЦРК в периферической крови определялись более чем у половины больных распространенным раком молочной железы, а их количество изменялось в зависимости от эффективности, проводимой химио- или гормонотерапии [311]. Снижение концентрации ЦРК после начала системной противоопухолевой терапии (химиотерапии) коррелировало с улучшением выживаемости и отсутствием прогрессирования заболевания [212, 214].

Показанием к назначению адъювантной полихимиотерапии у оперированных больных была карцинемия, т.е. обнаружение в венозной крови ЦРК после двукратного гемофилтритроцитологического исследования.

По результатам исследования со всеми 259 больными с выявленными ЦРК состоялось собеседование, на котором им было предложено проведение адъювантной полихимиотерапии. Из них 185 пациентов дали письменное согласие на проведение им АХТ, а 74 больных отказались от адъювантной полихимиотерапии. Для определения возможных различий в выживаемости данных пациентов были образованы две группы. В основную группу вошли 185 (71,4%) больных, а 74 (28,6%) пациента составили группу сравнения (таблица 33). По нозологическому составу больных обе анализируемые группы были сопоставимы.

Таблица 33. Характер заболевания у радикально оперированных онкологических больных с выявленными в венозной крови ЦРК

Характер заболевания	Все больные		В том числе группы больных				p>
			основная		сравнения		
	абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%	
Рак легкого	87	33,6	62	33,5	25	33,8	0,5
Рак желудка	64	24,7	43	23,3	21	28,4	0,1
Рак толстой кишки	108	41,7	80	43,2	28	37,8	0,1
Всего	259	100,0	185	100,0	74	100,0	

При немелкоклеточном раке легкого применялись следующие двухкомпонентные платиносодержащие режимы адъювантной химиотерапии (АХТ):

1. EP

Цисплатин 80 мг/м² в/в 1 день

Этопозид 120 мг/м² в/в в 1-3 дни

4 курса, интервал между курсами 1раз в 3 недели

2. GP

Гемцитабин 1000 мг/м² в/в в 1 и 8 дни

Цисплатин 80 мг/м² в/в в 1 день

4 курса, интервал между курсами 21 день

При мелкоклеточном раке легкого использовались следующие схемы АХТ:

3. ЕС

Карбоплатин 300 мг/м² в/в 1 день

Этопозид 120 мг/м² в/в в 1-3 дни

Интервал между курсами 1 раз в 3 недели

4. РС

Паклитаксел 175 мг/м² в 1 день

Цисплатин 75 мг/м² в 1 день

Интервал между курсами 3 недели

При раке желудка применялась стандартная схема АХТ:

5. 5-ФУ/ЛВ (режим Мейо)

Лейковорин 20 мг/м² в/в струйно в 1-5 дни

5-ФУ-425 мг/м² в/в струйно после введения лейковорина в 1-5 дни

Повторение через 3 недели

При раке толстой кишки использовались следующие схемы АХТ:

6. FOLFOX-4

Оксалиплатин 85 мг/м² в/в в 250 - 500 мл. 5% раствора глюкозы, 2 часовая инфузия в 1 день

Лейковорин 200 мг/м² в/в 2 часовая инфузия в 1 и 2-й дни

5-ФУ-400 мг/м² в/в струйно в 1 и 2-й дни

5-ФУ-600 мг/м² в/в 22 часовая инфузия в 1 и 2-й дни, 6 курсов каждые 2 недели

7. 5-ФУ/ЛВ (режим Мейо)

(компоненты и их дозировку см. выше)

Необходимо отметить, что адъювантную полихимиотерапию начинали про-

водить онкологическим больным на 30-40 день после выполненного у них радикального оперативного вмешательства.

С целью изучения результата на проводимую лекарственную противоопухолевую терапию помимо двукратного определения ЦРК перед началом АХТ, гемофилтроцитологическое исследование выполняли больным еще перед каждым очередным курсом химиотерапии и по его завершению. Результат гемофилтроцитологического исследования после 2 курса химиотерапии использовался для оценки раннего ответа. Такое многократное гемофилтроцитологическое исследование служит одной важной цели. Это выявлению ЦРК, определению степени полученных ими повреждений в результате воздействия химиопрепаратов и оценке их жизнеспособности. По выявленному лечебному патоморфозу, выделенных из крови ЦРК, оценивалось качество и завершенность АХТ. Отсутствие повреждений ЦРК в процессе химиотерапии дает предположение о резистентности опухоли к проводимому лечению и о необходимости поменять схему ПХТ, что и было сделано в отдельных случаях.

Полученные в результате АХТ повреждения ЦРК по своей выраженности разделены на I-IV уровни, соответственно I-IV степеням лечебного патоморфоза (ЛП).

Путем сравнительного изучения данных цитогамм уровни полученных повреждений ЦРК по своей выраженности были сопоставлены с общепринятыми степенями ЛП по следующим признакам:

- при I уровне повреждений ЦРК (I степень ЛП) цитоморфологические изменения раковых клеток выражены слабо. Раковые клетки в незначительной степени полиморфные, с очаговыми дистрофическими и некробиотическими изменениями. Отмечается наличие митозов (рисунок 42):

- при II уровне повреждений ЦРК (II степень ЛП) цитоморфологические изменения были выражены умеренно. Отмечалось усиление полиморфизма раковых клеток, нарастание дистрофических изменений в виде вакуолизации ядер и цитоплазмы. Митозов нет (рисунок 43-46);

- при III уровне повреждений ЦРК (III степень ЛП) цитоморфологические

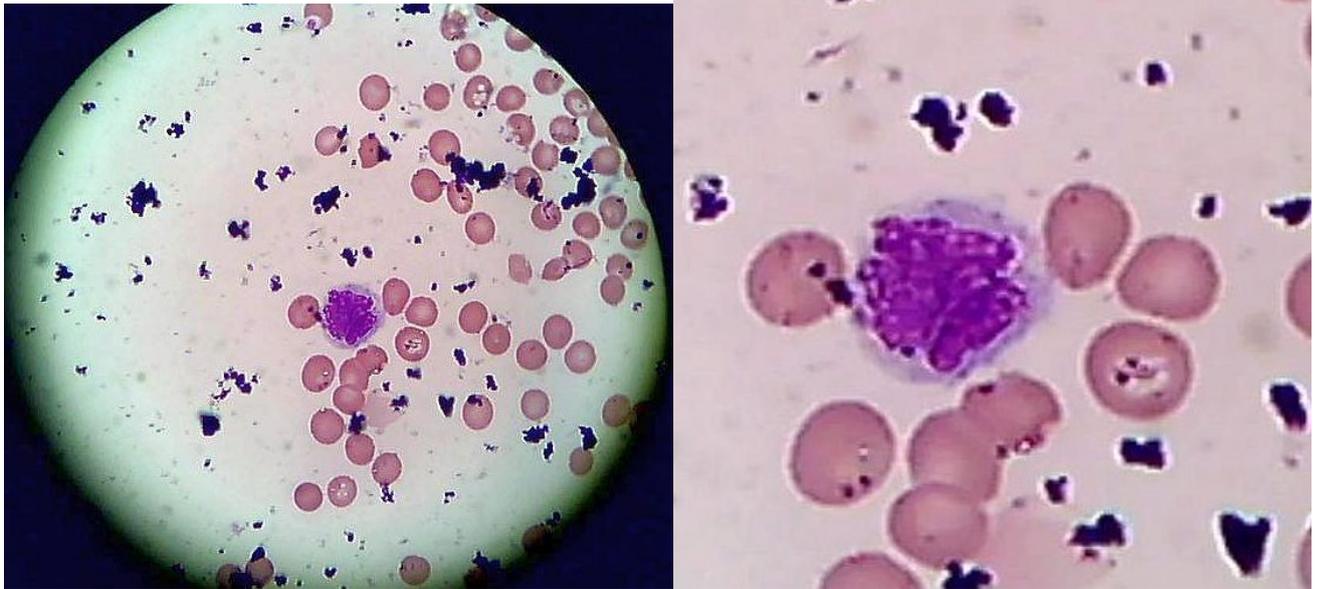
изменения значительно выраженные (рисунок 47-49). Раковые клетки характеризовались резким полиморфизмом с преобладанием «голых» ядер с выраженными признаками дистрофии, лизиса, некроза и наличием цитоплазматического детрита;

- при IV уровне повреждений ЦРК (IV степень ЛП) элементы злокачественного роста, т.е. циркулирующие раковые клетки не были выявлены.

По уровню повреждений ЦРК сравнимом с определенной степенью лекарственного патоморфоза оценивалось качество и полнота проведенной АХТ, а также наличие лекарственной устойчивости к тому или иному химиопрепарату.

Представилось важным определить, насколько влияет локализация опухолевого процесса на уровень повреждений ЦРК, говоря иначе какова чувствительность того или иного ЗНО к проводимой химиотерапии.

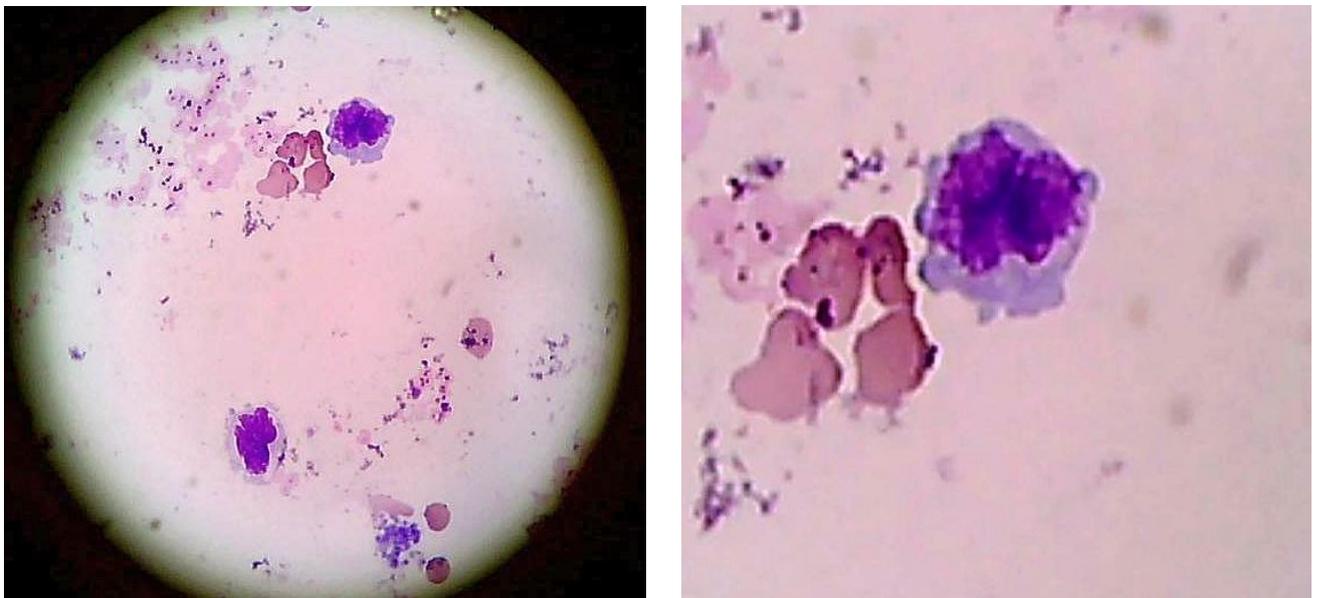
По результатам исследования наиболее чувствительны к химиотерапии были злокачественные новообразования толстой кишки, самая резистентная была опухоль желудка (таблица 34).



Ув. х 200

Ув. х 1000

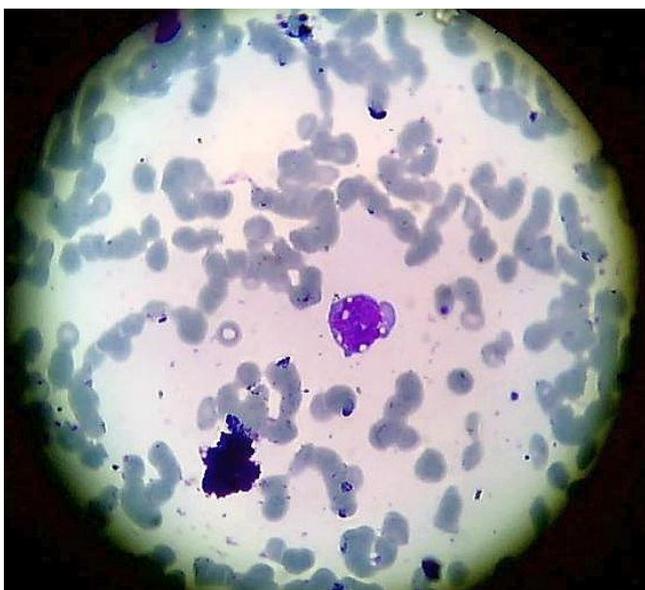
Рисунок 42. Больной, 67 лет. Диагноз: «Рак правого легкого. Стадия IIIА.» Гемофилтритроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. Уровень повреждений ЦРК. Опухолевая клетка с очаговыми дистрофическими и некробиотическими изменениями.



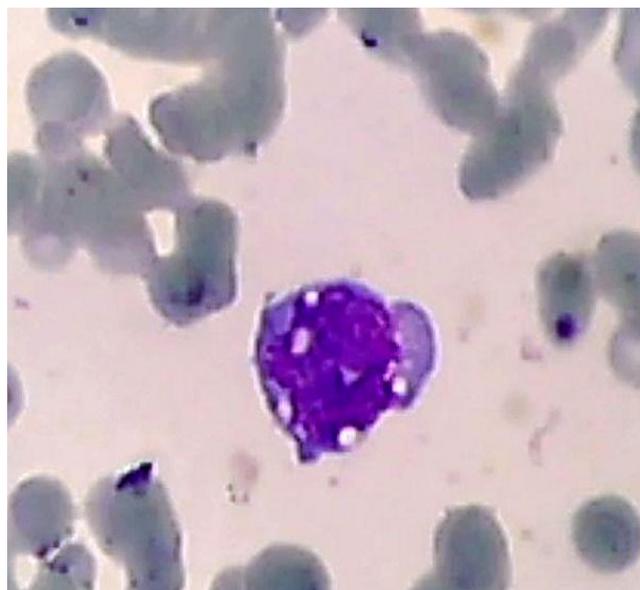
Ув. х 200

Ув. х 1000

Рисунок 43. Больная, 51 года. Диагноз: «Рак желудка. Стадия IIВ.» Гемофилтритроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. Уровень повреждений ЦРК. Опухолевые клетки с признаками выраженного полиморфизма и дистрофическими изменениями в виде вакуолизации ядра и цитоплазмы клеток.



Ув. х 200



Ув. х 1000

Рисунок 44. Больная, 51 года. Диагноз: «Рак толстой кишки. Стадия IIIВ.» Гемофильтроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. II уровень повреждений ЦРК. Опухолевая клетка с признаками выраженного полиморфизма и дистрофическими изменениями в виде вакуолизации ядра и цитоплазмы клетки.

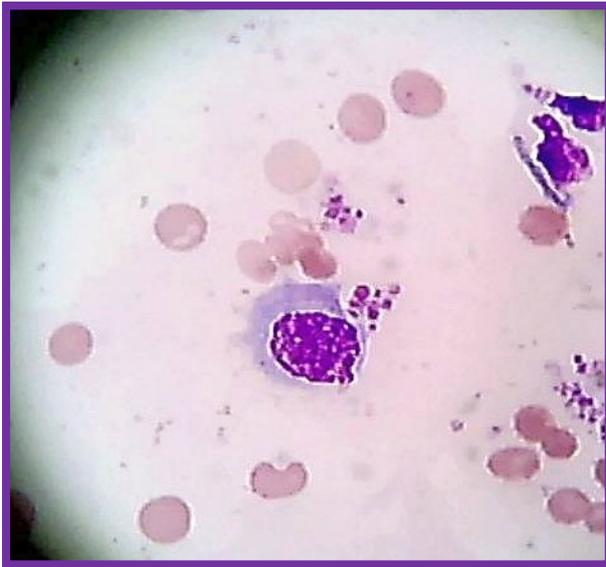


Ув. х 200

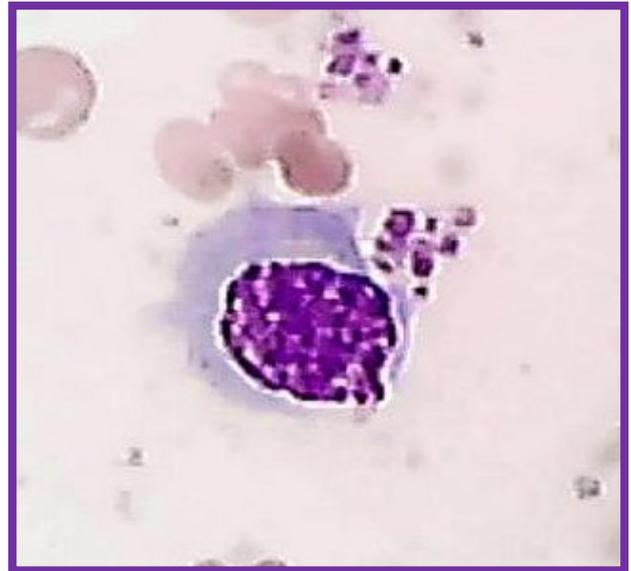


Ув. х 1000

Рисунок 45. Больная, 53 лет. Диагноз: «Рак толстой кишки. Стадия IIIА.» Гемофильтроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. I уровень повреждений ЦРК. Опухолевая клетка с выраженным полиморфизмом и с дистрофическими изменениями в виде вакуолизации ядра и цитоплазмы.

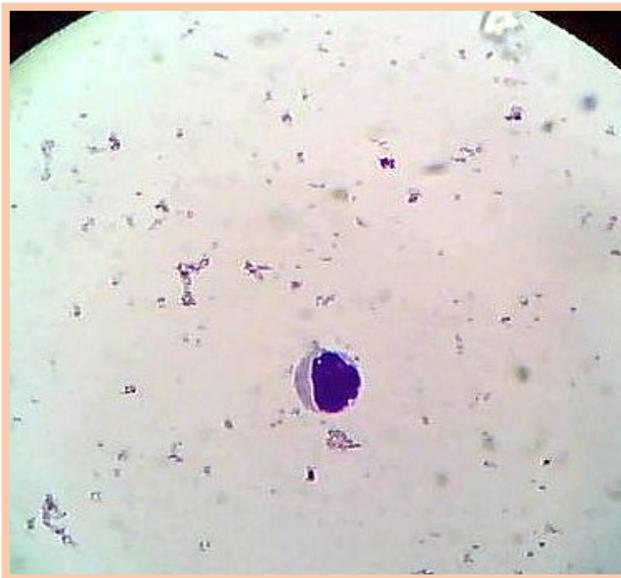


Ув. x 200

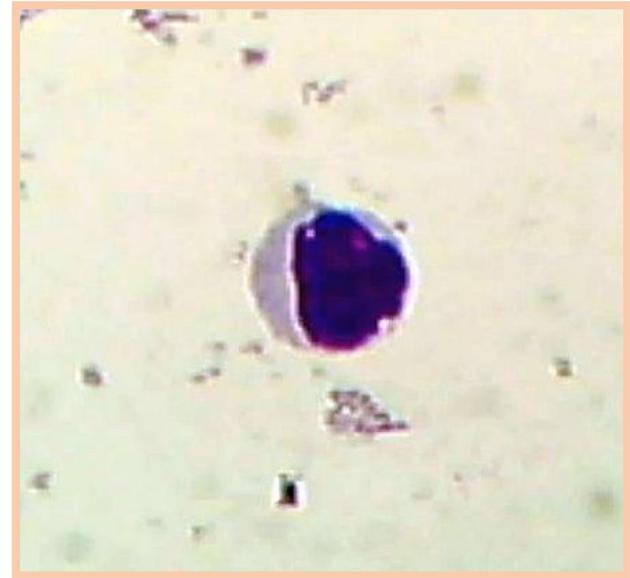


Ув. x 1000

Рисунок 46. Больная, 50 лет. Диагноз: «Рак желудка. Стадия ПА.» Гемофильтроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. Пуровень повреждений ЦРК. Выражен клеточный и ядерный полиморфизм. Ядра разных размеров и форм. Структура хроматина грубая.



Ув. x 200



Ув. x 1000

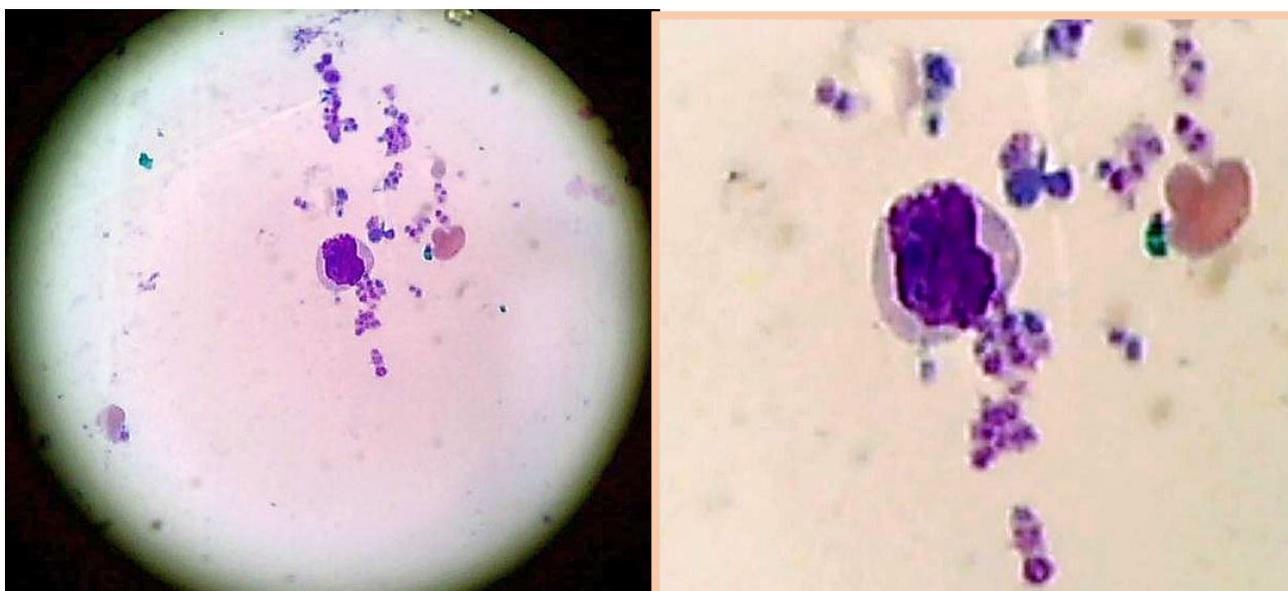
Рисунок 47. Больной, 54 лет. Диагноз: «Рак толстой кишки. Стадия ШВ.» Гемофильтроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. Шуровень повреждений ЦРК. Опухолевая клетка с резким полиморфизмом. Ядро расположено эксцентрически. В клетке отмечают дистрофические изменения.



Ув. х 200

Ув. 1000

Рисунок 48. Больная, 54 лет. Диагноз: Рак желудка. «Стадия IIIА.» Гемофильтроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. IIIуровень повреждений ЦРК. Опухолевая клетка с резким полиморфизмом и признаками дистрофии в ядре в виде вакуолизации.



Ув. х 200

Ув. х 1000

Рисунок 49. Больная, 53 лет. Диагноз: «Рак левого легкого. Стадия IIВ.» Гемофильтроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. IIIуровень повреждений ЦРК. Опухолевая клетка с резким полиморфизмом и признаками дистрофии в виде вакуолизации ядра в клетке.

Таблица 34. Уровни полученных повреждений ЦРК в венозной крови больных основной группы в ходе проведения химиотерапии в зависимости от их выраженности

Локализация новообразования	Количество больных		Уровни повреждений ЦРК (степениЛП)													
			I		II			III				IV				
	абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%	p 1-2	абс. число	%	p 1-3	p 2-3 >	абс. число	%	p 1-4	p 2-4 <	p 3-4 <
Легкие (1)	62	100,0	11	17,8	23	37,1	<0,02	20	32,3	>0,05	0,5	8	12,9	>0,25	0,01	0,02
Желудок (2)	43	100,0	18	41,9	16	37,2	>0,5	9	20,9	<0,05	0,05	-	-	<0,001	0,001	0,001
Толстая кишка (3)	80	100,0	-	-	28	35,0	<0,001	36	45,0	<0,001	0,1	16	20,0	<0,001	0,05	0,01
p 1-2				<0,02		>0,5			>0,05				<0,01			
p 1-3				<0,05		>0,5			>0,05				>0,05			
p 2-3				<0,001		>0,5			>0,05				<0,001			
Все больные:	185	100,0	29	15,7	67	36,2	<0,001	65	35,1	<0,001	0,5	24	13,0	>0,25	0,001	0,001

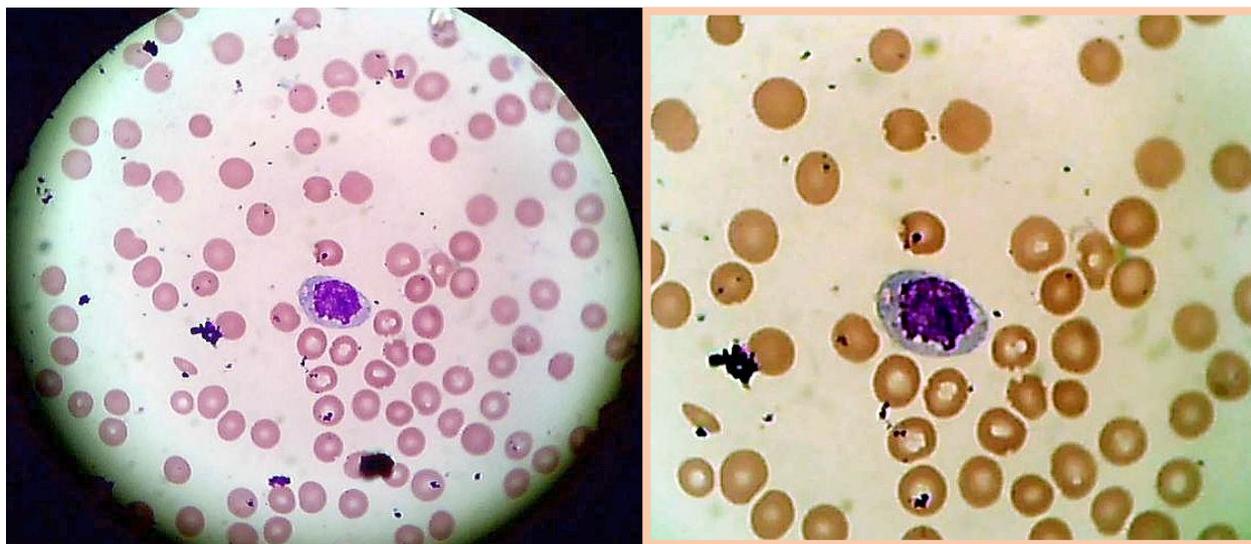
I уровень повреждений ЦРК (I степень ЛП) после 2 курса химиотерапии чаще наблюдался при раке желудка и был отмечен у 41,9% больных, что было больше, чем при раке легкого (рисунок 50) на 24,1% ($p < 0,02$). При раке толстой кишки больные с I уровнем повреждений ЦРК (I степень ЛП) после 2 курса химиотерапии не наблюдались.

II и III уровни повреждений циркулирующих раковых клеток (II-III степени ЛП) в ходе проведения адъювантной химиотерапии одинаково часто отмечены при всех трех видах злокачественных новообразований (рисунки 51-57).

IV уровень повреждений раковых клеток (IV степень ЛП) после 2 курса химиотерапии наблюдался только при раке легкого и толстой кишки, соответственно, в 12,9% и 20,0% случаев. При раке желудка этот уровень повреждений ЦРК не отмечен.

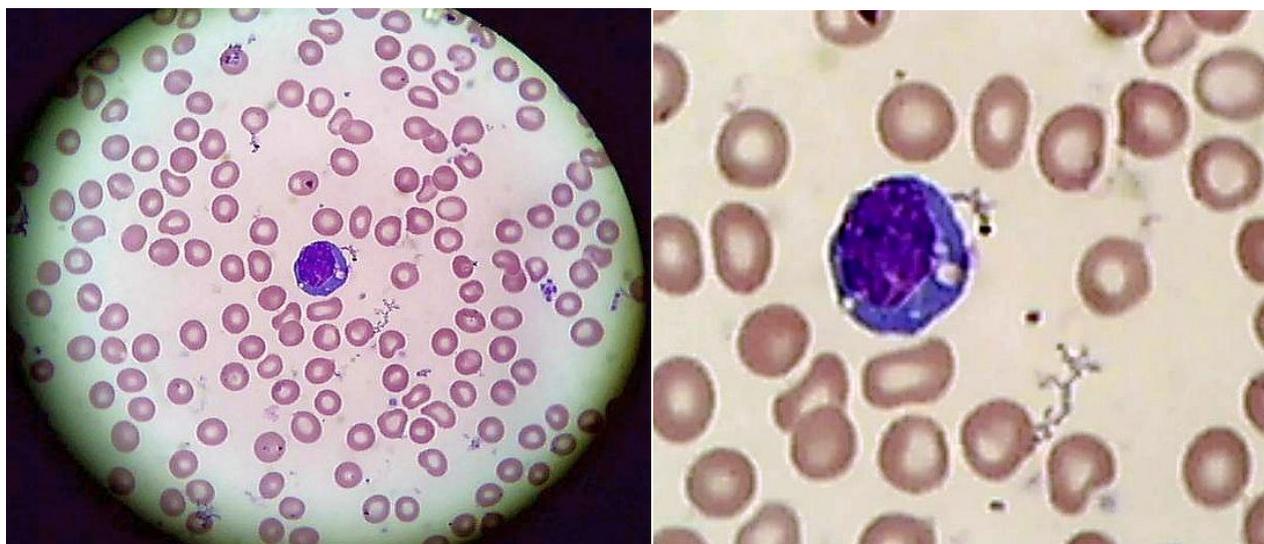
Статистически значимое преобладание наиболее выраженных III и IV уровней повреждений ЦРК (III-IV степени ЛП) над наименее выраженными I и II уровнями повреждений (I-II степени ЛП) отмечены при злокачественных новообразованиях толстой кишки – в среднем на 30,0% ($p < 0,001$). При раке желудка наименее выраженные I и II уровни повреждений ЦРК (I-II степени ЛП) преобладали над наиболее выраженными III и IV уровнями повреждений (III-IV степенями ЛП) на 58,2% ($p < 0,001$). При раке легкого в целом не отмечено статистически значимой разницы между наиболее и наименее выраженными уровнями повреждений ЦРК (степенями ЛП) (таблицы 35).

При проведении любого специального лечения, кроме определения клинического эффекта, целесообразно оценивать методом сравнения лекарственный патоморфоз. Поскольку, гемофилтроцитологическое исследование позволяет в полной мере провести морфологическую оценку выделенных из крови ЦРК с определением их уровней повреждений после адъювантной химиотерапии, оно подходит для этой цели. Тем более, что кровь больного является наиболее доступным объектом для исследования.



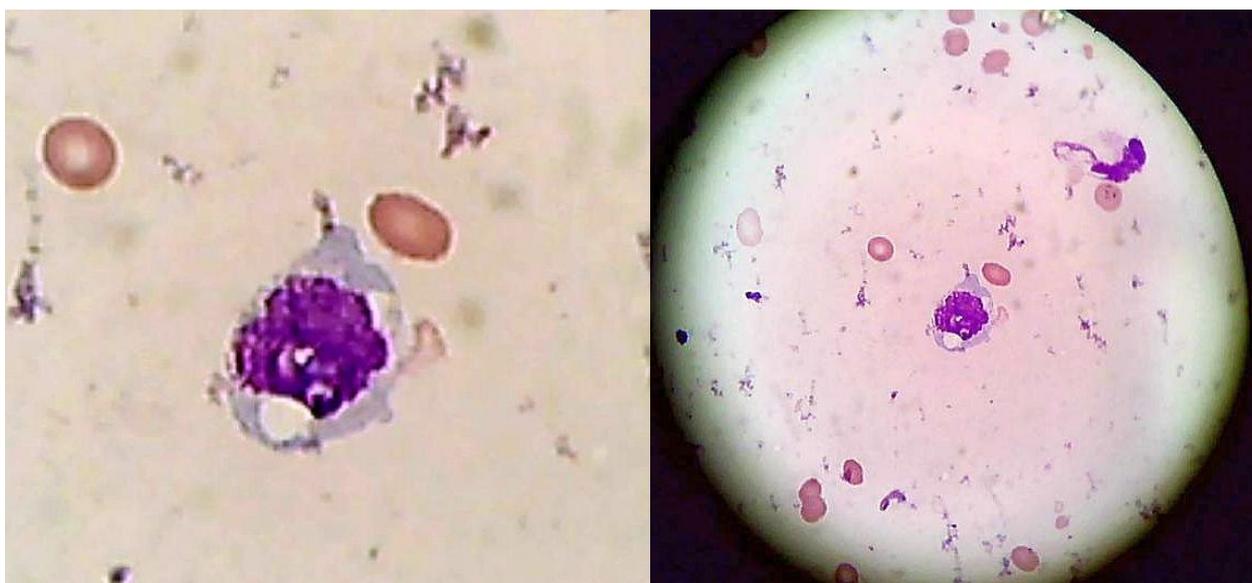
Ув. х 200 Ув. х 1000

Рисунок 50. Больной, 67 лет. Диагноз: «Рак левого легкого. Стадия IIIA.» Гемофилтритроцитологическое исследование венозной крови после 2 курса АХТ по схеме GP. Окраска азур-эозином. Уровень повреждений ЦРК. Опухолевые клетки с очаговыми дистрофическими и некробиотическими изменениями.



Ув. х 200 Ув. х 1000

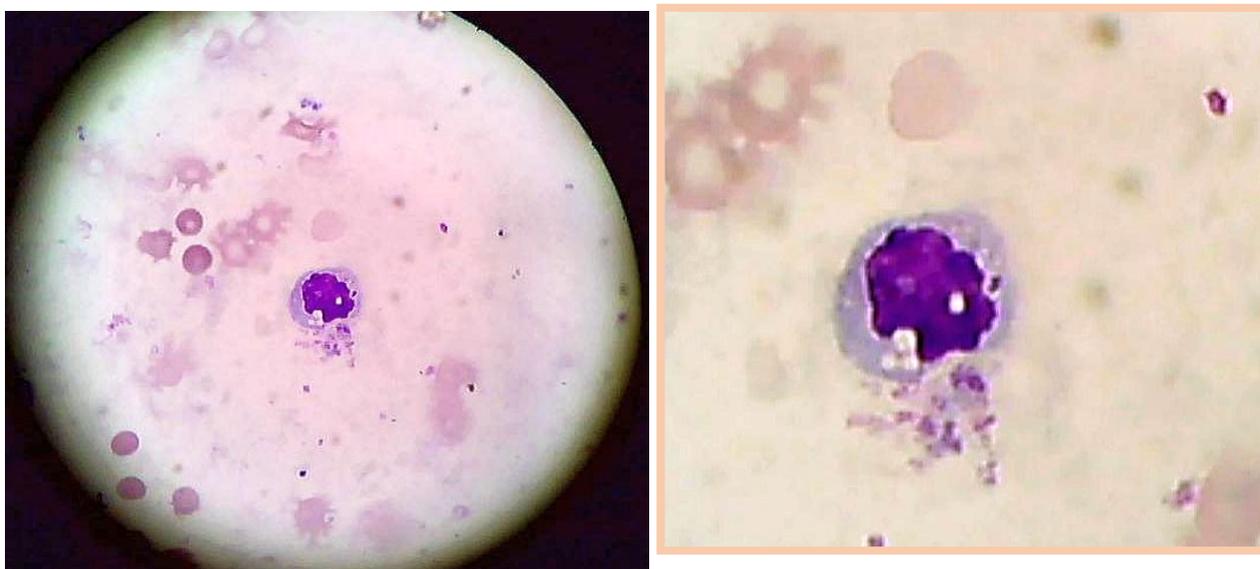
Рисунок 51. Больная, 53 лет. Диагноз: «Рак тела желудка. Стадия IIВ.» Гемофилтритроцитологическое исследование венозной крови после 2 курса АХТ по схеме 5-ФУ/ЛВ. Окраска азур-эозином. Уровень повреждений ЦРК. Опухолевая клетка с выраженным полиморфизмом и с дистрофическими изменениями в виде вакуолизации ядер и цитоплазмы.



Ув. х 200

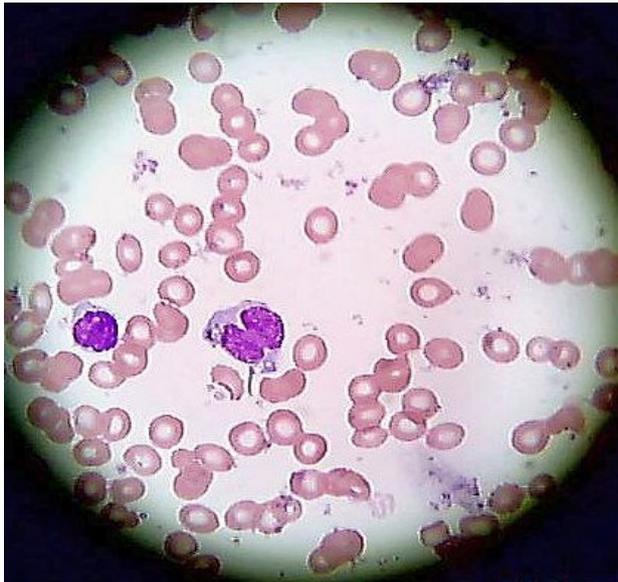
Ув. х 1000

Рисунок 52. Больная, 54 лет. Диагноз: «Рак правого легкого. Стадия ПА.» Гемофилтроцитологическое исследование венозной крови после 2 курса АХТ по схеме ЕР. Окраска азур-эозином. Пуровень повреждений ЦРК. Опухолевая клетка с выраженным полиморфизмом. В клетке отмечаются дистрофические изменения в виде вакуолизации ядра и цитоплазмы.

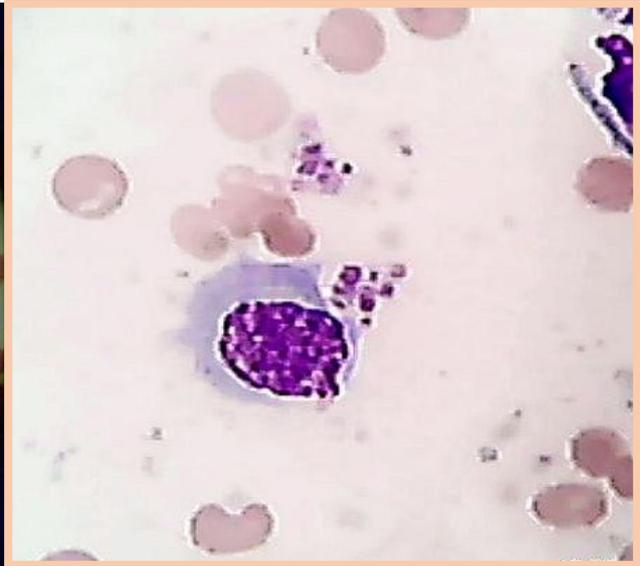


Ув. х 200 Ув. х 1000

Рисунок 53. Больная, 50 лет. Диагноз: «Рак левого легкого. Стадия ПВ.» Гемофилтроцитологическое исследование венозной крови после 2 курса АХТ по схеме GR. Окраска азур-эозином. Пуровень повреждений ЦРК. Опухолевая клетка с эксцентрически расположенным ядром, выраженным полиморфизмом и с дистрофическими явлениями в виде вакуолизации в ядре и цитоплазме.

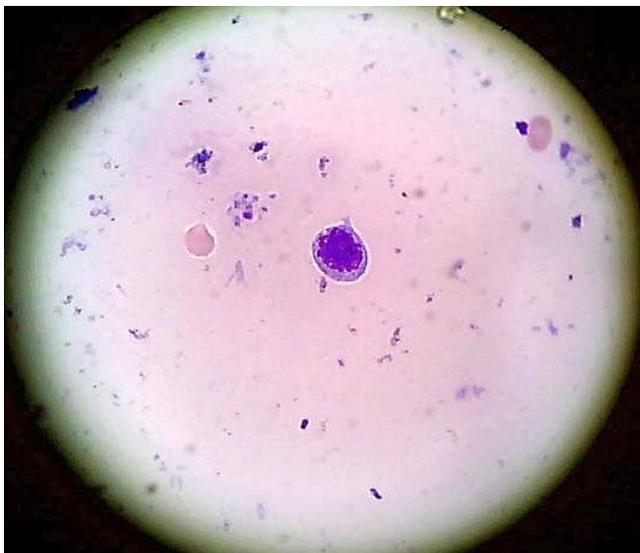


Ув. x 200

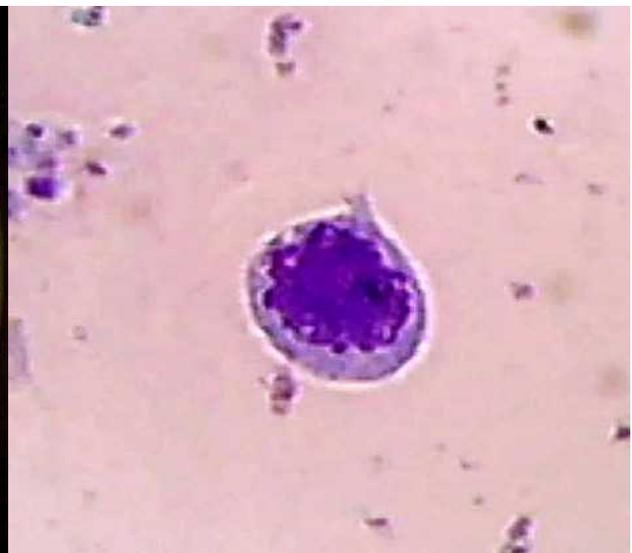


Ув. x 1000

Рисунок 54. Больная, 50 лет. Диагноз: «Рак тела желудка. Стадия IIВ.» Гемофилтроцитологическое исследование венозной крови после 2 курса АХТ по схеме 5-ФУ/ЛВ. Окраска азур-эозином. II уровень повреждений ЦРК. Выражен клеточный и ядерный полиморфизм. Ядра разных размеров и форм. Структура хроматина грубая.

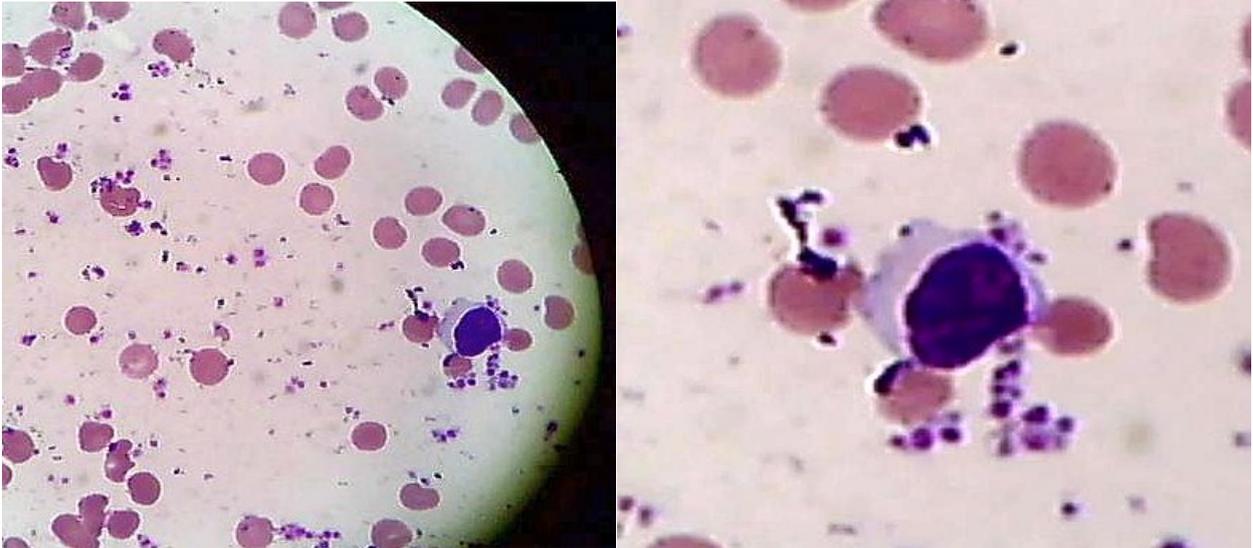


Ув. x 200



Ув. x 1000

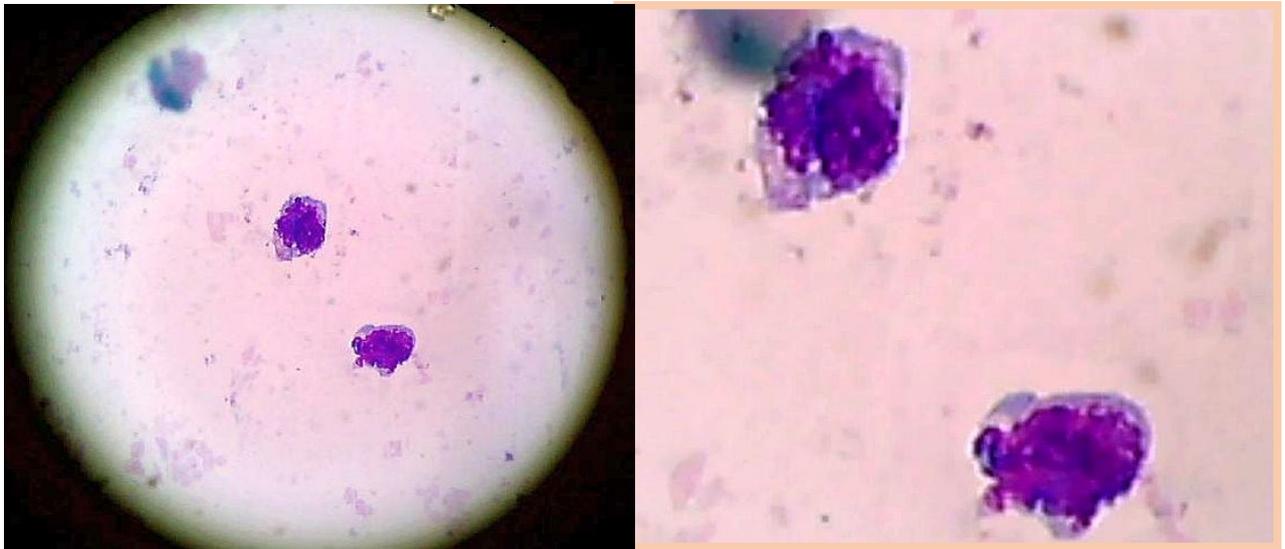
Рисунок 55. Больная, 60 лет. Диагноз: «Рак толстой кишки. Стадия IIIВ.» Гемофилтроцитологическое исследование венозной крови после 2 курса АХТ по схеме FOLFOX-4. Окраска азур-эозином. III уровень повреждений ЦРК. Опухолевая клетка с резким полиморфизмом и с признаками дистрофии в ядре в виде вакуолизации.



Ув. х 200

Ув. х 1000

Рисунок 56. Больной, 54 лет. Диагноз: «Рак толстой кишки. Стадия IIIА.» Гемофилтритроцитологическое исследование венозной крови после 2 курса АХТ по схеме FOLFOX-4. Окраска азур-эозином. IIIуровень повреждений ЦРК. Опухолевая клетка с резким полиморфизмом. Ядро расположено эксцентрически. В клетке отмечаются дистрофические изменения.



Ув. х 200

Ув. х 1000

Рисунок 57. Больная, 53 лет. Диагноз: «Рак правого легкого. Стадия IIВ.» Гемофилтритроцитологическое исследование венозной крови после 2 курса АХТ по схеме EP. Окраска азур-эозином. III уровень повреждений ЦРК. Опухолевые клетки с резким полиморфизмом и признаками дистрофии в виде вакуолизации ядра в одной клетке.

Лечебный патоморфоз - это патоморфологический эффект, который определяется изменениями опухоли на клеточном уровне и проявляется дистрофией и апоптозом клеток, формированием полей некроза, развитием очагов фиброза и склероза. В России основные положения классификации лечебного патоморфоза изложены в работах Г.А. Лавниковой (1972), Е.Ф. Лушниковой (1977) и Н.А. Краевского (1977).

Таблица 35. Уровни полученных повреждений ЦРК в венозной крови больных основной группы в ходе проведения химиотерапии

Локализация Новообразования	Количество больных		Уровни повреждений ЦРК (степени ЛП)				p
			I -II		III-IV		
	абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%	
Легкие (1)	62	100,0	34	54,8	28	45,2	>0,05
Желудок (2)	43	100,0	34	79,1	9	20,9	<0,001
Толстая кишка (3)	80	100,0	28	35,0	52	65,0	<0,001
p 1-2				<0,01		<0,01	
p 1-3				<0,05		<0,05	
p 2-3				<0,01		<0,01	
Все больные:	185	100,0	96	51,9	89	48,1	>0,05

После проведенного 2 курса АХТ у радикально оперированных больных по поводу рака легких число ЦРК в 8,0 мл. снизилось у 19 до 3 ЦРК и более, у 35 до 2 ЦРК и менее, а у 8 пациентов исчезли полностью (таблица 36).

У радикально оперированных больных по поводу рака желудка после 2 курса АХТ также отмечалось уменьшение концентрации ЦРК до 3 и более у 15, до 2 и менее у 28 пациентов (таблица 37).

В группе радикально оперированных больных по поводу рака толстой кишки после проведения 2 курса АХТ тоже отмечено снижение числа ЦРК до 3 и более у 7, до 2 и менее у 57, а у 16 пациентов они полностью отсутствовали (таблица 38).

Таблица 38. Соотношение количества ЦРК в венозной крови с уровнем их повреждений у больных раком толстой кишки после 2 курса АХТ

Число циркулирующих раковых клеток в крови	Количество больных		Уровни полученных повреждений ЦРК (степени ЛШ)							
			I		II		III		IV	
	абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%
3 ЦРК и более	7	8,8	-	-	5	71,4	2	28,6	-	-
2 ЦРК и менее	57	71,2	-	-	23	40,4	34	59,6	-	-
ЦРК отсутствуют	16	20,0	-	-	-	-	-	-	16	100,0

После завершения адьювантной полихимиотерапии у всех 185 радикально оперированных больных основной группы циркулирующих раковых клеток в венозной крови при гемофилтритроцитологическом исследовании не определялось.

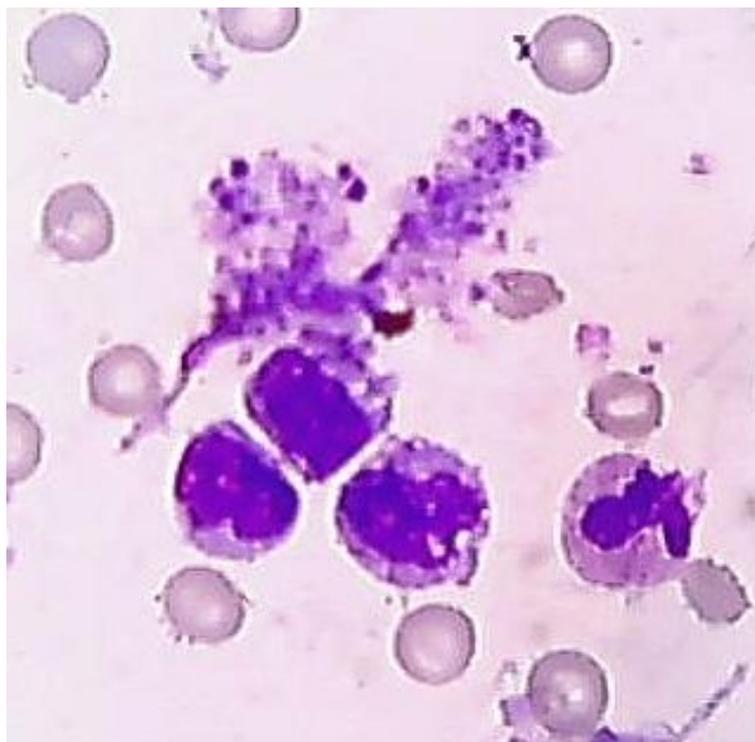
Для иллюстрации приводим следующие клинические наблюдения.

1. Больная, 54 лет, поступила во 2-ое хирургическое отделение Бурятского республиканского клинического онкологического диспансера 13.10.08г. с диагнозом: «Рак тела желудка, III стадия. II клиническая группа».

При поступлении жалоб не предъявляла. Из анамнеза настоящего заболевания следует, что в августе 2008 года появились боли в правом подреберье. В сентябре того же года усилились и переместились в эпигастральную область. Из-за болей больная вынуждена была обратиться к участковому терапевту поликлиники по месту жительства. 25.09.08г. при фиброгастродуоденоскопии в области тела желудка, по малой кривизне обнаружен глубокий язвенный дефект до 2 см в диа-

метре с неровными краями. Патологогистологическое заключение биопсийного материала "Тубулярная аденокарцинома желудка".

В общем анализе крови, общем анализе мочи и биохимическом анализе крови значимых отклонений не выявлено, уровень раково-эмбрионального антигена в пределах нормы (3 нг/мл). При гемофилтритроцитологическом исследовании обнаружены ЦРК в венозной крови больной (рисунок 58).



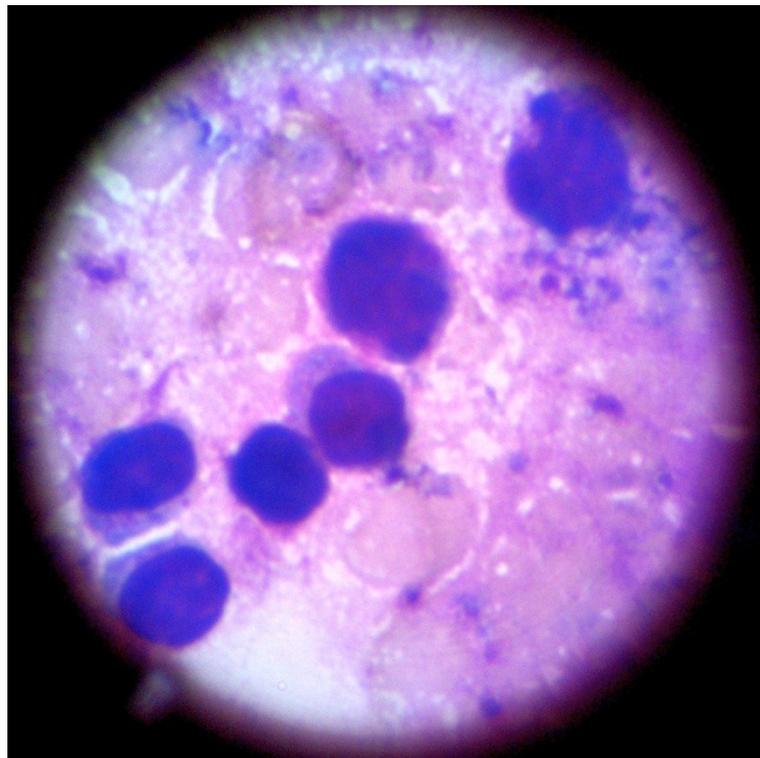
Ув. x 1000

Рисунок 58. Больная, 54 лет. Диагноз: «Рак желудка. Стадия IIIА.» Гемофилтритроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. Опухолевые клетки небольших размеров, контуры ядер неровные. Отмечается эксцентричность расположения ядер.

16.10.08г. больная была оперирована. На операции обнаружено злокачественное поражение опухолью угла желудка, инфильтрация на протяжении 6,5 см с язвенным дефектом на слизистой до 3 см. Опухоль прорастает все слои. Имеются увеличенные лимфоузлы по ходу левой желудочной артерии. Отдаленных метастазов не выявлено. Выполнена радикальная операция в объеме дистальной субтотальной резекции желудка по Бильрот-II в модификации Гофмейстера-Финстерера с лимфодиссекцией.

Послеоперационное течение без осложнений, дренажная трубка из брюшной полости удалена на четвертые сутки после операции. Заживление послеоперационной раны первичным натяжением, швы сняты полностью на двенадцатые сутки после операции.

На 15 и 21 дни после операции выполнено больной гемофилтритроцитологическое исследование венозной крови. Проведенное на 21 день гемофилтритроцитологическое исследование обнаружило в крови больной шесть циркулирующих раковых клеток (рисунок 59).



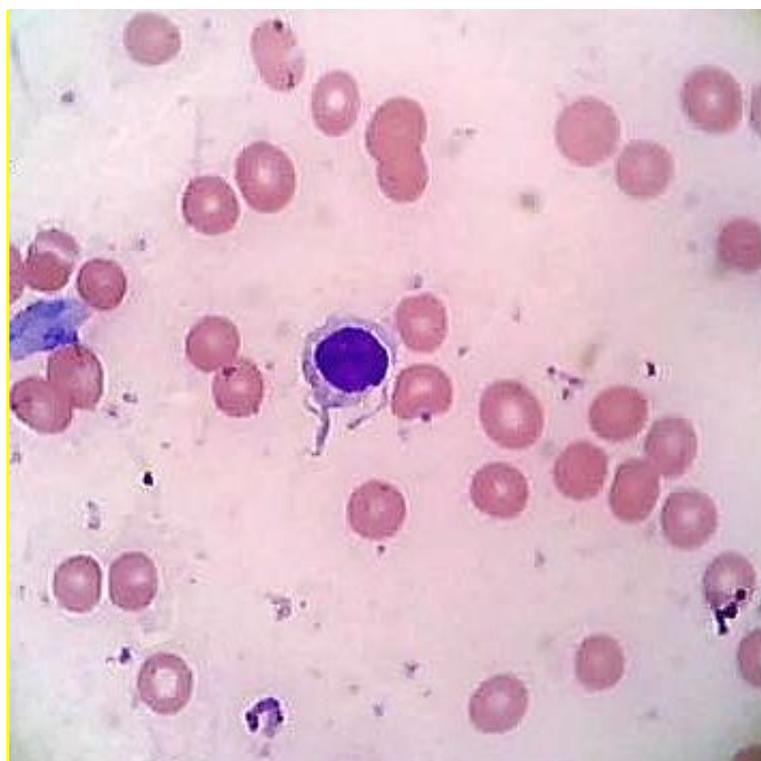
Ув. x 1000

Рисунок 59. Больная, 54 лет. Диагноз: «Рак желудка. Стадия IIIA». Гемофилтритроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. Шесть опухолевых клеток мелких размеров с крупными, вариабельными ядрами. Контуры ядер неровные. В трех клетках отмечается эксцентричность расположения ядер. Хроматин неравномерно распределенный, комковатый.

Больной было предложено в целях исключения рецидива заболевания проведение адьювантной полихимиотерапии по общепринятой схеме в режиме Мейо. После получения от пациентки письменного согласия ей было проведено 6 курсов адьювантной полихимиотерапии. Для контроля полноты и качества проводимой

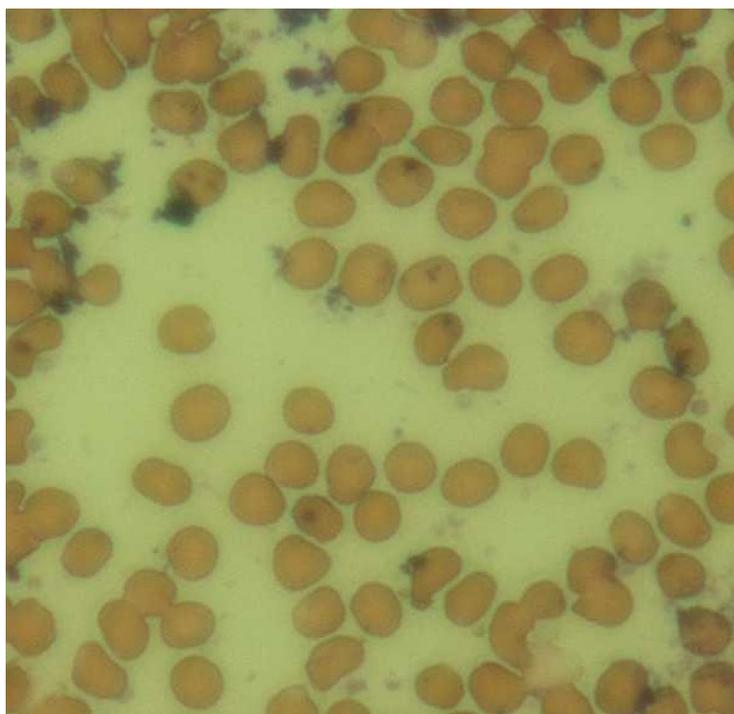
полихимиотерапии выполнялось гемофилтроцитологическое исследование венозной крови больной.

При гемофилтроцитологическом исследовании крови от 03.12.08 г., после 2 курсов полихимиотерапии, выявлены ЦРК сШуровнем повреждений (Шстепень ЛП) (рисунок 60). Повторно проведенное исследование по завершении 4 курсов химиотерапевтического лечения опухолевых клеток в крови больной не обнаружило (рисунок 61). В настоящее время больная находится под динамическим наблюдением без признаков рецидива и прогрессирования заболевания.



Ув. x 1000

Рисунок 60. Больная, 54 лет. Диагноз: «Рак желудка. Стадия IIIA.» Гемофилтроцитологическое исследование венозной крови после 2 курса АХТ.Шуровень повреждений ЦРК. Окраска азур-эозином. Опухолевая клетка с резким полиморфизмом и с признаками дистрофии в ядре клетки в виде вакуолизации.



Ув. $\times 1000$.

Рисунок 61. Больная, 54 лет. Диагноз: «Рак желудка. Стадия IIIA.» Гемофильтроцитологическое исследование венозной крови после 4 курса АХТ. IV уровень повреждений. Опухолевых клеток в крови не обнаружено. Окраска азур-эозином.

Гемофильтроцитологическое исследование венозной крови, больная согласно схемы проходит один раз в год. Последнее исследование проходила в ноябре 2012г., ЦРК не были обнаружены. Общие лабораторные показатели удовлетворительные.

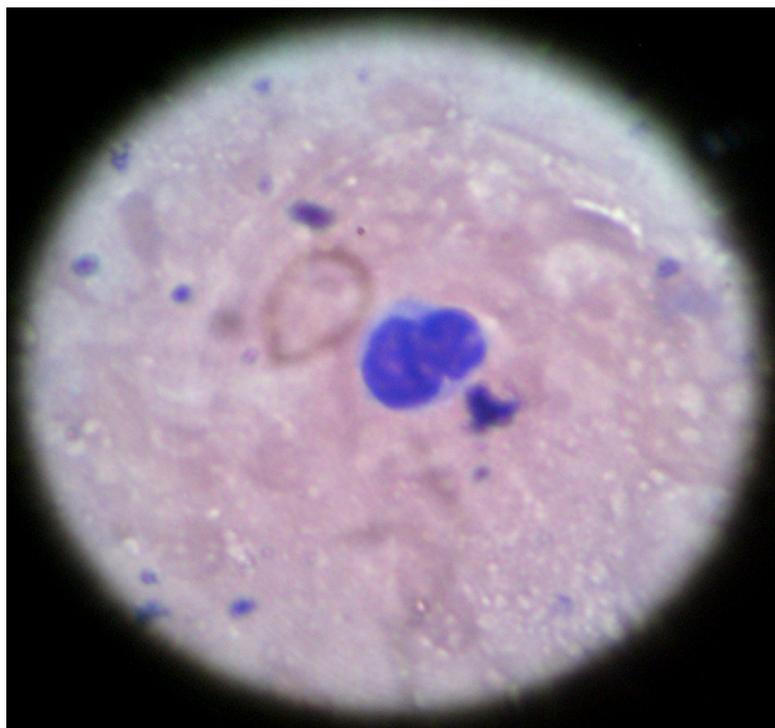
При рентгенологическом контроле 12 ноября 2012 года пищеводно-желудочный анастомоз проходим, эвакуация не нарушена.

2. Больной, 48 лет, поступил во 2-ое хирургическое отделение Бурятского республиканского клинического онкологического диспансера 15.06.09г. с диагнозом: «Малигнизированная язва желудка?».

Из истории настоящего заболевания известно, что считает себя больным с мая 2009 года, когда внезапно открылось желудочное кровотечение. Службой скорой медицинской помощи был доставлен в центральную районную больницу по месту жительства, где проводилось консервативное лечение с положительным клиническим эффектом.

При фиброгастродуоденоскопии выявлен по большой кривизне в верхней трети желудка обширный до 6,5 см язвенный дефект с плотными, подрытыми краями. При поступлении общее состояние относительно удовлетворительное. Кожные покровы бледноватой окраски, тургор сохранен. Периферические лимфатические узлы не увеличены. Со стороны обеих легочных полей выслушивается везикулярное дыхание, хрипов нет. Тоны сердца ясные, ритмичные. АД-110/70 мм.рт. ст., пульс-76 ударов в 1 мин. Живот при пальпации мягкий, болезненный в эпигастральной области. Печень по краю реберной дуги.

В общем анализе крови от 16.06.09г. отмечено снижение гемоглобина до 96 г/л. В общем анализе мочи также, как и в биохимическом анализе значимых отклонений не выявлено. При проведении гемофилтритроцитологического исследования венозной крови обнаружены ЦРК (рисунок 62).



Ув. х 1000

Рисунок 62. Больной, 48 лет. Диагноз: «Рак желудка. Стадия ПА». Гемофилтритроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. Двухъядерная опухолевая клетка мелкого размера. Контуры ядер неровные. Хроматин неравномерно распределенный. Цитоплазма скудная.

Показатели раково-эмбрионального антигена не изменены (РЭА-3 нг/мл). Учитывая предстоящее обширное оперативное вмешательство, а также исходный уровень гемоглобина после желудочного кровотечения (Hb-96 г/л) больному произведена гемотрансфузия одногруппной эритроцитарной массы в количестве 300 мл. Переливание препарата крови совместимого по групповой и резус принадлежности с кровью больного прошло без осложнений.

23.06.09г. выполнено в плановом порядке оперативное вмешательство в объеме чрезбрюшинной гастрэктомии с лимфодиссекцией. Патологогистологическое заключение операционного материала: «Умеренно дифференцированная аденокарцинома желудка». Послеоперационное течение протекало гладко, без осложнений. На пятнадцатый и двадцать первый дни после операции гемофильтроцитологическое исследование обнаружило в венозной крови больного ЦРК. Было предложено проведение адъюватной полихимиотерапии, на что больной дал согласие. В период времени с 6 августа 2009г. по 5 апреля 2010г. выполнено шесть курсов адъюватной полихимиотерапии с перерывом между курсами в среднем четыре недели.

За один курс химиотерапии больной получал лейковарина по 150 мг. и 5 – фторурацила по 2,5 гр. внутривенно по определенной схеме введения. После проведения пятого курса полихимиотерапии у больного отмечались проявления лейкопении первой степени, которые были купированы специальной медикаментозной терапией. Перед проведением очередного курса адъювантной полихимиотерапии у больного бралась венозная кровь для выполнения гемофильтроцитологического исследования (рисунок 63). На основе определения уровня полученных повреждений, выделенных из венозной крови циркулирующих раковых клеток, оценивались полнота и качество проведенного курса химиотерапии.



Ув. х 1000

Рисунок 63. Больной, 48 лет. Диагноз: «Рак желудка. Стадия IIА». Гемофилтроцитологическое исследование венозной крови после 2 курса АХТ. Уровень повреждений ЦРК. Окраска азур-эозином. Опухолевая клетка с признаками выраженного полиморфизма и дистрофическими изменениями в виде вакуолизации ядра.

Данный больной находится под динамическим наблюдением. Ему проводится ежегодное обследование, в т.ч. и гемофилтроцитологическое исследование венозной крови: ЦРК, признаков рецидива, прогрессирования основного заболевания у него до настоящего времени не выявлено.

Резюме

Проведение гемофилтроцитологического исследования периферической венозной крови у радикально оперированных больных раком легкого, желудка, толстой кишки на 15 и 21 день после операции позволяет выявить циркулирующие клетки у 76,6% больных.

Преобладание в ходе проведения АХТ III и IV уровней повреждений ЦРК (III-IV степеней ЛП) над I и II уровнями (I-II степенями ЛП) при раке толстой кишки составило 30,0% ($p < 0,001$), при раке легкого разница была не значимой, а при раке желудка она меньше на 58,2% ($p < 0,001$).

После проведенного 2 курса АХТ у радикально оперированных больных по поводу рака легких число ЦРК в 8,0 мл. снизилось у 19 до 3 ЦРК и более, у 35 до 2 ЦРК и менее, а у 8 пациентов исчезли полностью. У радикально оперированных больных по поводу рака желудка после 2 курса АХТ также отмечалось уменьшение концентрации ЦРК до 3 и более у 15, до 2 и менее у 28 пациентов.

В группе радикально оперированных больных по поводу рака толстой кишки после проведения 2 курса АХТ тоже отмечено снижение числа ЦРК до 3 и более у 7, до 2 и менее у 57, а у 16 пациентов они полностью отсутствовали.

После завершения адъювантной полихимиотерапии у всех 185 радикально оперированных больных основной группы циркулирующих раковых клеток в венозной крови при гемофилтритроцитологическом исследовании не определялось.

Таким образом, выявленные с помощью гемофилтритроцитологического исследования периферической венозной крови циркулирующие раковые клетки у послеоперационных больных являются показанием к назначению им АХТ. Кроме того по уровню полученных с помощью гемофилтритроцитологического исследования повреждений ЦРК оценивалось качество проведенной АХТ, а ее завершенность по их отсутствию в венозной крови больных.

Глава 5

Отдалённые результаты комбинированного лечения злокачественных новообразований легкого, желудка и толстой кишки с использованием данных гемофилтритроцитологического исследования периферической венозной крови

Эффективность комбинированного лечения радикально оперированных больных злокачественными новообразованиями с выявляемыми в периферической крови ЦРК проанализирована путём сравнительной оценки в течении 1-3 лет общей и безрецидивной выживаемости в зависимости от проведения после операции химиотерапии.

При гемофилтритроцитологическом исследовании периферической крови у больных со злокачественными новообразованиями легких, желудка и толстой кишки, состоящих на диспансерном учете, ЦРК были выявлены у 26 (10,0%) из 259 больных.

Динамическое наблюдение за радикально оперированными больными злокачественными новообразованиями позволило выявить следующую закономерность во взаимосвязи определения у больных ЦРК и появление рецидива опухолевого роста. Период времени между этими проявлениями составил 5,5- 6,5 месяцев. Случаев рецидива злокачественной опухоли у диспансерных больных при отсутствии данных в предшествующий период о наличии ЦРК на протяжении указанных сроков наблюдения не отмечено.

В целом, в основной группе больных, состоящих на диспансерном учете ЦРК были выявлены у 10 (5,4%) из 185 пациентов, а в группе сравнения у 16 (21,6%) из 74 больных (таблица 39). Различия в 16,2% случаев статистически значимы ($p < 0,01$). Темпы убывания наблюдаемых больных были одинаковыми и составили 0,18. Различия в распределении показателей по полным данным были статистически значимыми (по ЦРК – $p = 0,035$; по рецидивам – $p = 0,027$; по летальности – $p = 0,041$).

Таблица 39. Сравнительная оценка ЦРК в венозной крови, рецидива заболевания и летальности у радикально оперированных больных со злокачественными новообразованиями в зависимости от срока наблюдения

Сроки наблюдения	n (всего)	Группы больных													
		основная							сравнения						
		n	ЦРК		рецидив		умерли		n	ЦРК		рецидив		умерли	
			абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%		абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%
1 год в том числе	259	185	2	0,8	1	0,4	-	-	74	4	5,4	3	4,1	2	2,7
1 квартал	259	185	-	-	-	-	-	-	74	3	4,1	-	-	-	-
2 квартал	259	185	1	0,4	-	-	-	-	74	-	-	-	-	-	-
3 квартал	259	185	-	-	-	-	-	-	74	1	1,4	-	-	-	-
4 квартал	259	185	1	0,4	1	0,4	-	-	74	-	-	3	4,1	2	2,7
2 года в том числе	257	185	6	3,2	7	3,8	1	0,5	72	9	12,5	10	13,9	4	5,6
1 полугодие	257	185	6	3,2	1	0,5	-	-	72	9	12,5	1	1,4	-	-
2 полугодие	257	185	-	-	6	3,2	1	0,5	72	-	-	9	12,5	4	5,6
3 года	252	184	2	1,1	2	1,1	2	1,1	68	3	4,4	3	4,4	4	5,9

Различия в распределении всех показателей в группах в предположениях, что наблюдения связаны по годам (без учета квартальных данных) статистически незначимы ($p=0,109$).

Различия в распределении всех показателей в группах без учета их связи по полным данным статистически незначимы ($p=0,161$).

Различия в распределении всех показателей в группах без учета их связи по годам статистически незначимы ($p=0,1$).

Трехлетняя безрецидивная и трехлетняя общая выживаемость в основной группе больных превышала данные группы сравнения при p , соответственно, 0,0016 и 0,00046 (таблица 40; рисунок 64, 65).

Таблица 40. Сравнительный анализ трехлетней общей и безрецидивной выживаемости у онкологических больных

Показатель	n	Группы больных								p<
		основная				сравнения				
		абс. число	%	показатель выживаемости	$\pm \xi$	абс. число	%	показатель выживаемости	$\pm \xi$	
Трехлетняя безрецидивная выживаемость	259	185	71,4	0,94	0,03	74	28,6	0,80	0,09	0,0016
Общая трехлетняя выживаемость	259	185	71,4	0,98	0,02	74	28,6	0,86	0,07	0,0004

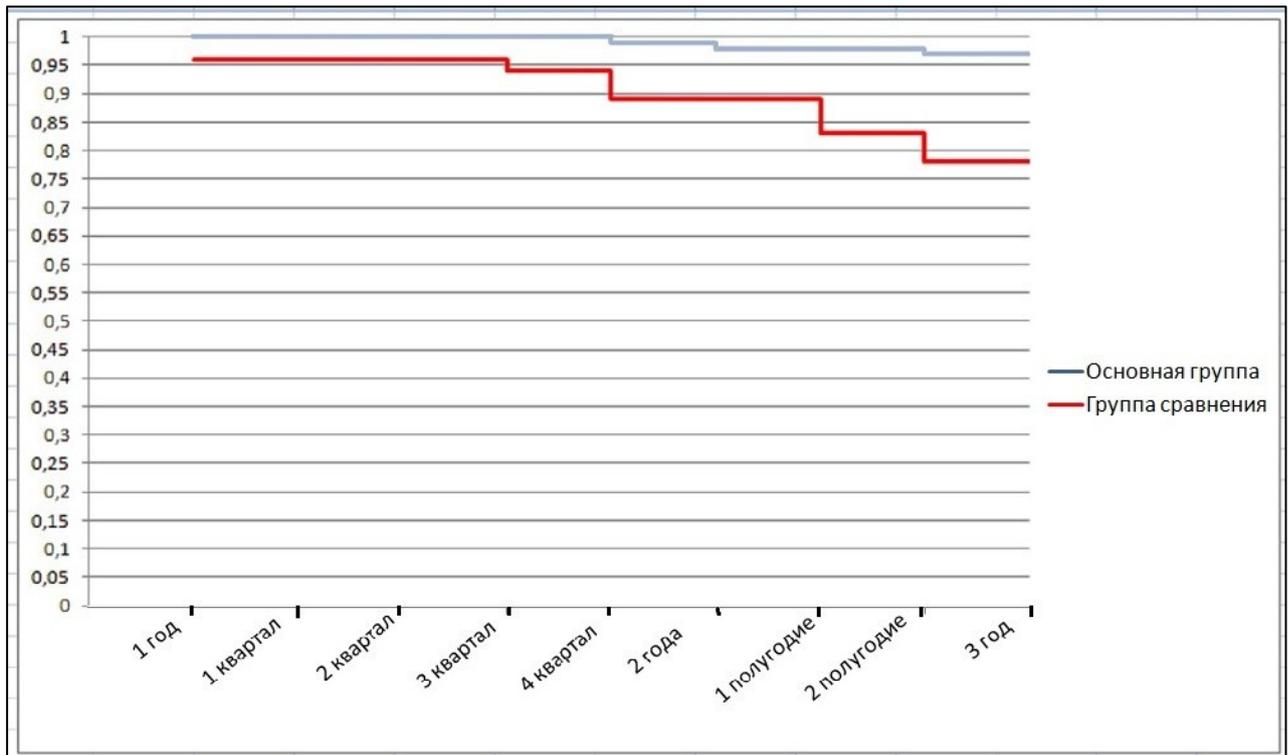


Рисунок 64. Сравнительный анализ трехлетней общей выживаемости у онкологических больных по методу Kaplan and Meier

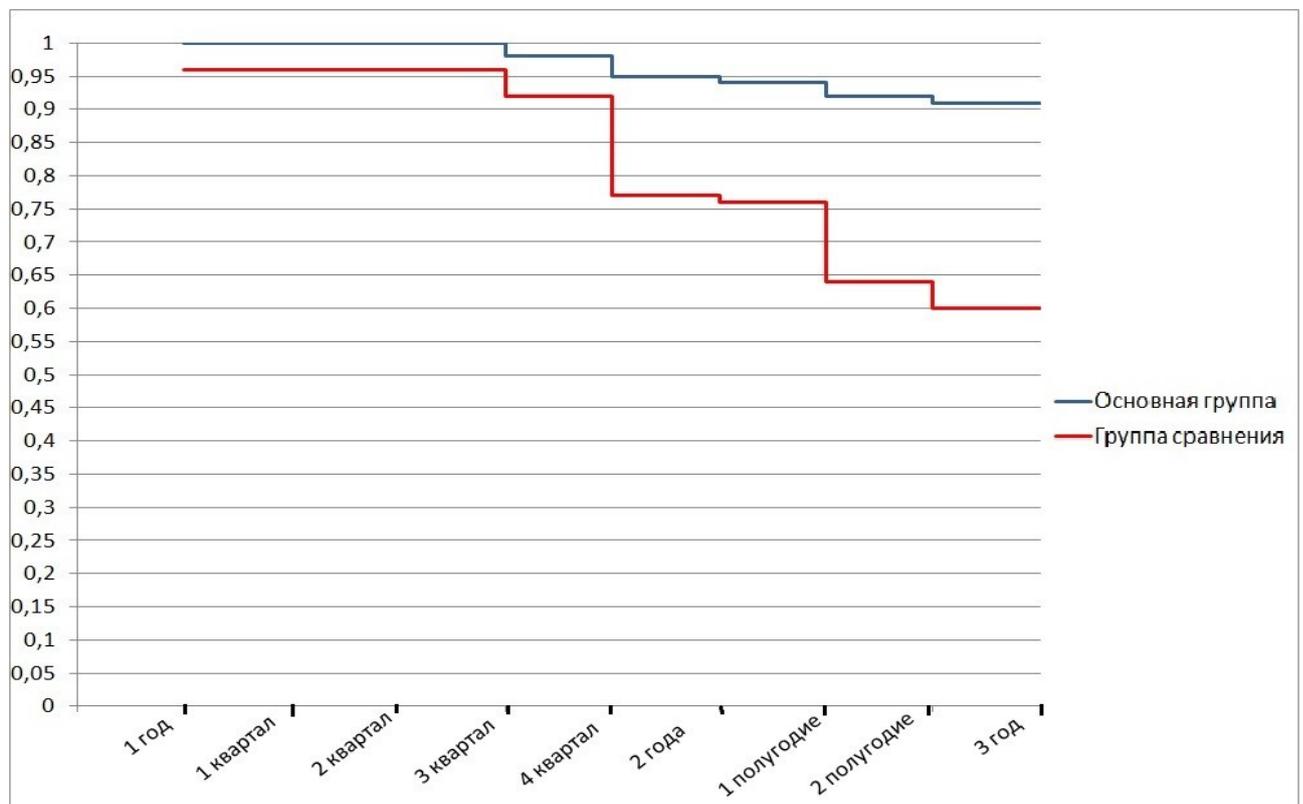


Рисунок 65. Сравнительный анализ трехлетней безрецидивной выживаемости у онкологических больных по методу Kaplan and Meier

Также проводилось трехлетнее динамическое наблюдение за группой радикально оперированных больных, у которых при проведении гемофилтритроцитологического исследования на 15 и 21 дни после операции ЦРК не были обнаружены. В результате трехлетнего наблюдения у всех 79 больных ЦРК, рецидивов и летальных исходов не отмечено.

Среди больных раком легкого в период их диспансерного наблюдения ЦРК были обнаружены у 15(17,2%) больных из 87.

Из 62 больных раком легкого основной группы при динамическом наблюдении ЦРК в периферической крови были выделены у 5 (8,1%) больных. В группе сравнения после операции они были выявлены у 10 (40,0%) больных из 25 (таблица 41). Разница между частотой встречаемости выявления ЦРК в основной группе и группе сравнения статистически значима.

Анализ данных показал, что темпы убывания наблюдаемых больных в анализируемых группах статистически различимы незначимо ($p=0,18$).

Различия распределения показателей в группах в предположениях, что наблюдения связаны по полным данным статистически значимые: по ЦРК – $p=0,046$, по рецидивам – $p=0,041$, по летальным исходам – $p=0,041$.

Различия распределения показателей в группах в предположениях что все наблюдения связаны по годам незначимы (по всем показателям $p=0,109$), без учета их связи по полным данным незначимы по частоте выявления ЦРК, рецидивов – $p=0,297$, по летальности – $p=0,161$. Без учета связи по годам различия всех показателей также статистически незначимы.

Сравнительный анализ трехлетней безрецидивной выживаемости и общей трехлетней выживаемости выявил значимые различия между основной группой и группой сравнения (таблица 42; рисунок 66, 67). В основной группе разница по трехлетней общей безрецидивной выживаемости превышала данные группы сравнения со статистической значимостью 0,007 и 0,001 соответственно.

Таблица 41. Сравнительная оценка ЦРК в венозной крови, рецидива и летальности у больных раком легкого в зависимости от срока наблюдения

Сроки наблюдения	п (всего)	Группы больных													
		основная								сравнения					
		п	ЦРК		рецидив		умерли		п	ЦРК		рецидив		умерли	
			абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%		абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%
1 год в том числе	87	62	1	1,6	1	1,6	-	-	25	2	8,0	2	8,0	1	4,0
1 квартал	87	62	-	-	-	-	-	-	25	2	8,0	-	-	-	-
2 квартал	87	62	1	1,6	-	-	-	-	25	-	-	-	-	-	-
3 квартал	87	62	-	-	-	-	-	-	25	-	-	-	-	-	-
4 квартал	87	62	-	-	1	1,6	-	-	25	-	-	2	8,0	1	4,0
2 года в том числе	85	61	3	4,9	3	4,9	1	1,6	24	5	20,8	5	20,8	3	12,5
1 полугодие	85	61	3	4,9	-	-	-	-	24	5	20,8	-	-	-	-
2 полугодие	85	61	-	-	3	4,9	1	1,6	24	-	-	5	20,8	3	12,5
3 года	81	60	1	1,7	1	1,7	1	1,7	21	3	14,3	3	14,3	2	9,5

Примечание: всех больных взятых на «Д» учет объединяем в графе 1 год, поскольку у них действительно был первый год наблюдения, также как второй и третий, независимо от календарного года взятия на "Д" наблюдение.

Таблица 42. Сравнительный анализ трехлетней общей и безрецидивной выживаемости у больных раком легкого

Показатель	n	Группы больных								
		основная				сравнения				
		абс. число	%	показатель выживаемости	$\pm \epsilon$	абс. число	%	показатель выживаемости	$\pm \epsilon$	p<
Трехлетняя безрецидивная выживаемость	87	62	71,3	0,92	0,06	25	28,7	0,60	0,19	0,001
Общая трехлетняя выживаемость	87	62	71,3	0,97	0,04	25	28,7	0,76	0,16	0,007

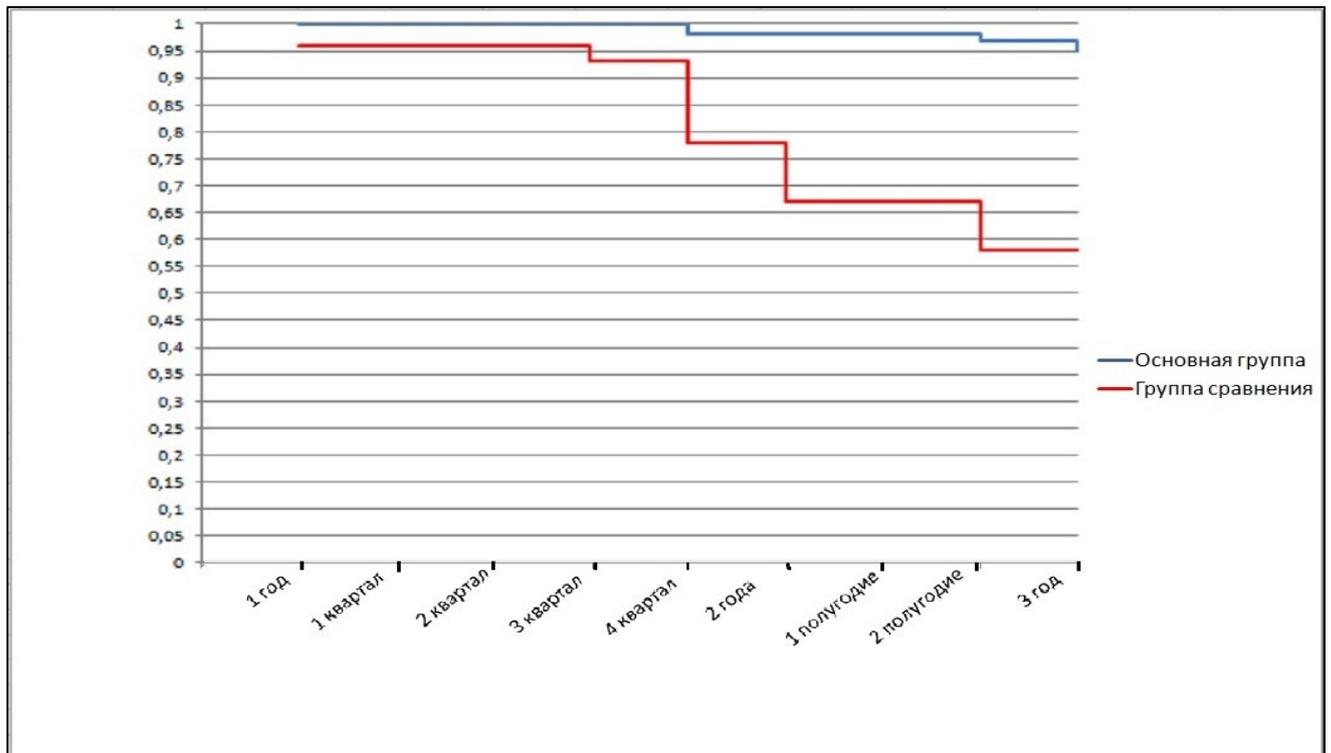


Рисунок 66. Сравнительный анализ трехлетней общей выживаемости у больных с раком легкого по методу KaplanandMeier

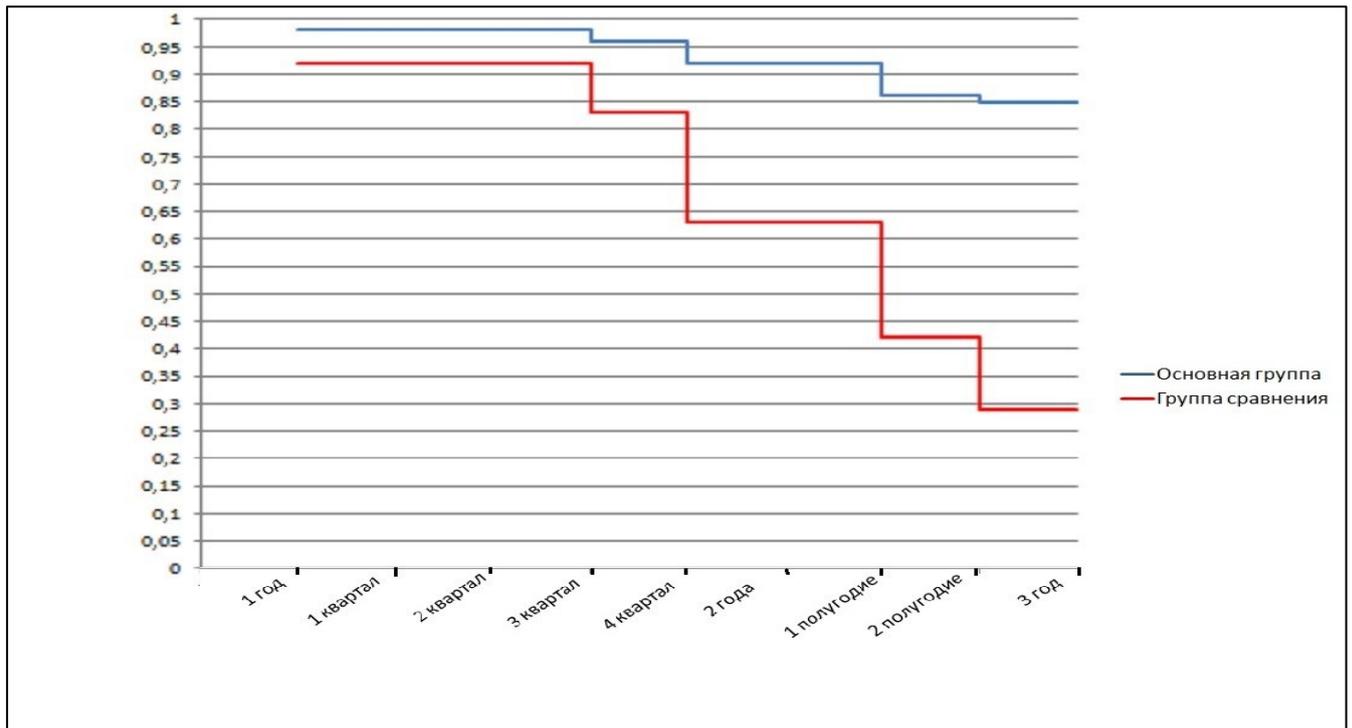
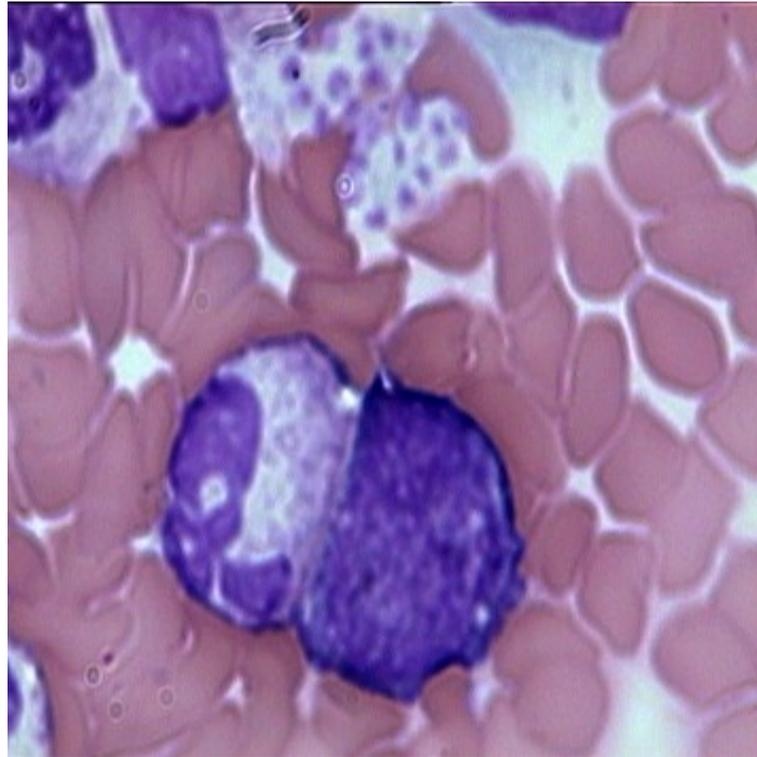


Рисунок 67. Сравнительный анализ трехлетней безрецидивной выживаемости у больных раком легкого по методу KaplanandMeier.

Для иллюстрации приводим следующее наблюдение.

Больной, 59 лет, поступил в хирургическоеотделение Бурятского республиканского клинического онкологического диспансера 14 мая 2009 г. с диагнозом «Рак верхней доли правого легкого. Стадия III».

При поступлении предъявлял жалобы на одышку при физической нагрузке, кашель со слизистой мокротой и общую слабость. Больным себя считает с начала февраля 2009г., когда впервые стал отмечатьобщую слабость и кашель. С конца апреля стала беспокоить одышка при физической нагрузке. 28.04.09г. обратился к участковому терапевту районной поликлиники. На основании результата рентгенологического исследования у больного не исключалась опухоль верхней доли правого легкого. При проведении фибробронхоскопии в стационарных условиях 15.05.09г. в верхнедолевом бронхе правого легкого с переходом на промежуточный определялось опухолевидное образование. 19.05.09г. проведено гемофильтроцитологическое исследование венозной крови больного, где были обнаружены ЦРК в количестве двух клеток (рисунок 68).



Ув. х 1000

Рисунок 68. Больной, 59 лет. Диагноз: «Рак верхней доли правого легкого. Стадия III». Гемофилтритроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. Среди эритроцитов две опухолевые клетки плотно расположены по отношению друг к другу с полиморфными неровными контурами ядер. Хроматин мелкозернистый. Цитоплазма вакуолизированная.

После предварительной предоперационной подготовки 21.05.09 г. выполнена операция: правосторонняя пульмонэктомия. Патогистологическое исследование удаленного операционного материала "Мелкоклеточный рак легкого". В послеоперационном периоде на 15 и 21 дни после операции проводилось гемофилтритроцитологическое исследование венозной крови больного где были обнаружены ЦРК. Послеоперационное течение гладкое. Заживление послеоперационной раны первичным натяжением. Учитывая результат патогистологического исследования операционного материала и наличие в крови больного ЦРК, ему была предложена адъювантная полихимиотерапия. После получения согласия пациенту проведен 1 курс адъювантной полихимиотерапии. В контрольных общих анализах крови и

мочи значимых отклонений не выявлено.

Выписан в удовлетворительном состоянии. В дальнейшем больной получил еще 3 курса адъювантной полихимиотерапии и находился под динамическим наблюдением. С согласия пациента проводилось повторное гемофильтроцитологическое исследование венозной крови. Кровь исследовалась: в течение первого года после операции 1 раз в квартал, в течение второго года - 1 раз в полгода, в дальнейшем 1 раз в год. До марта 2014 г. признаков рецидива и прогрессирования злокачественного новообразования легкого не выявлено. В марте 2014 г. пациент переехал на постоянное место жительства в Республику Беларусь.

Среди больных раком желудка в период их диспансерного наблюдения циркулирующие раковые клетки были обнаружены у 7 (10,9%) больных из 64 больных, что по частоте не отличалось от данных после операции на легких. Из 43 больных основной группы циркулирующие раковые клетки в периферической крови при динамическом наблюдении были выявлены у 3 (7,0%) больных. В группе сравнения они определялись у 4 (19,0%) из 21 больных. Разница на 12,0 % статистически не значима ($p > 0,05$). Анализ данных таблицы 43 показал, что темпы убывания наблюдаемых больных в анализируемых группах статистически различимы незначимо ($p = 0,157$).

Различия распределения показателей в группах в предположениях, что наблюдения связаны по полным данным статистически значимы только по летальности ($p = 0,041$). По ЦРК, появлению рецидивов они близки к значимым (соответственно, $p = 0,063$ и $p = 0,068$).

Различия распределения показателей в группах в предположениях, что наблюдения связаны по годам (без учета квартальных данных) статистически не значимы (по ЦРК – $p = 0,18$; по рецидивам – $p = 0,18$; по летальности - $p = 0,109$).

Таблица 43. Сравнительная оценка ЦРК в венозной крови, рецидива заболевания и летальности у больных раком желудка в зависимости от срока наблюдения

Сроки наблюдения	n (всего)	Группы больных													
		основная								сравнения					
		n	ЦРК		рецидив		умерли		n	ЦРК		рецидив		умерли	
			абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%		абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%
1 год в том числе	64	43	1	2,3	-	-	-	-	21	1	4,8	1	4,8	1	4,8
1 квартал	64	43	-	-	-	-	-	-	21	1	4,8	-	-	-	-
2 квартал	64	43	-	-	-	-	-	-	21	-	-	-	-	-	-
3 квартал	64	43	-	-	-	-	-	-	21	-	-	-	-	-	-
4 квартал	64	43	1	2,3	-	-	-	-	21	-	-	1	4,8	1	4,8
2 года в том числе	63	43	2	4,7	3	7,0	-	-	20	3	15,0	3	15,0	1	5,0
1 полугодие	63	43	2	4,7	1	2,3	-	-	20	3	15,0	-	-	-	-
2 полугодие	63	43	-	-	2	4,7	-	-	20	-	-	3	15,0	1	5,0
3 года	62	43	-	-	-	-	1	2,3	19	-	-	-	-	1	5,3

Различия в распределениях показателей без учета их связи по полным данным статистически незначимы (по ЦРК – $p=0,113$; по рецидивам – $p=0,258$; по летальности - $p=0,077$).

Различия распределения показателей без учета их связи по годам статистически незначимы (по ЦРК и рецидивам – $p=0,2$; по летальности - $p=0,1$).

Трехлетняя безрецидивная и общая выживаемость в анализируемых группах больных была одинаковой (таблица 44; рисунок 69, 70).

Таблица 44. Сравнительный анализ трехлетней общей и безрецидивной выживаемости у больных раком желудка

Показатель	n	Группы больных								p<
		основная				сравнения				
		абс. число	%	показатель выживаемости	± ε	абс. число	%	показатель выживаемости	± ε	
Трехлетняя безрецидивная выживаемость	64	43	67,2	0,93	0,07	21	32,8	0,81	0,16	0,309
Общая трехлетняя выживаемость	64	43	67,2	0,98	0,04	21	32,8	0,86	0,14	0,179

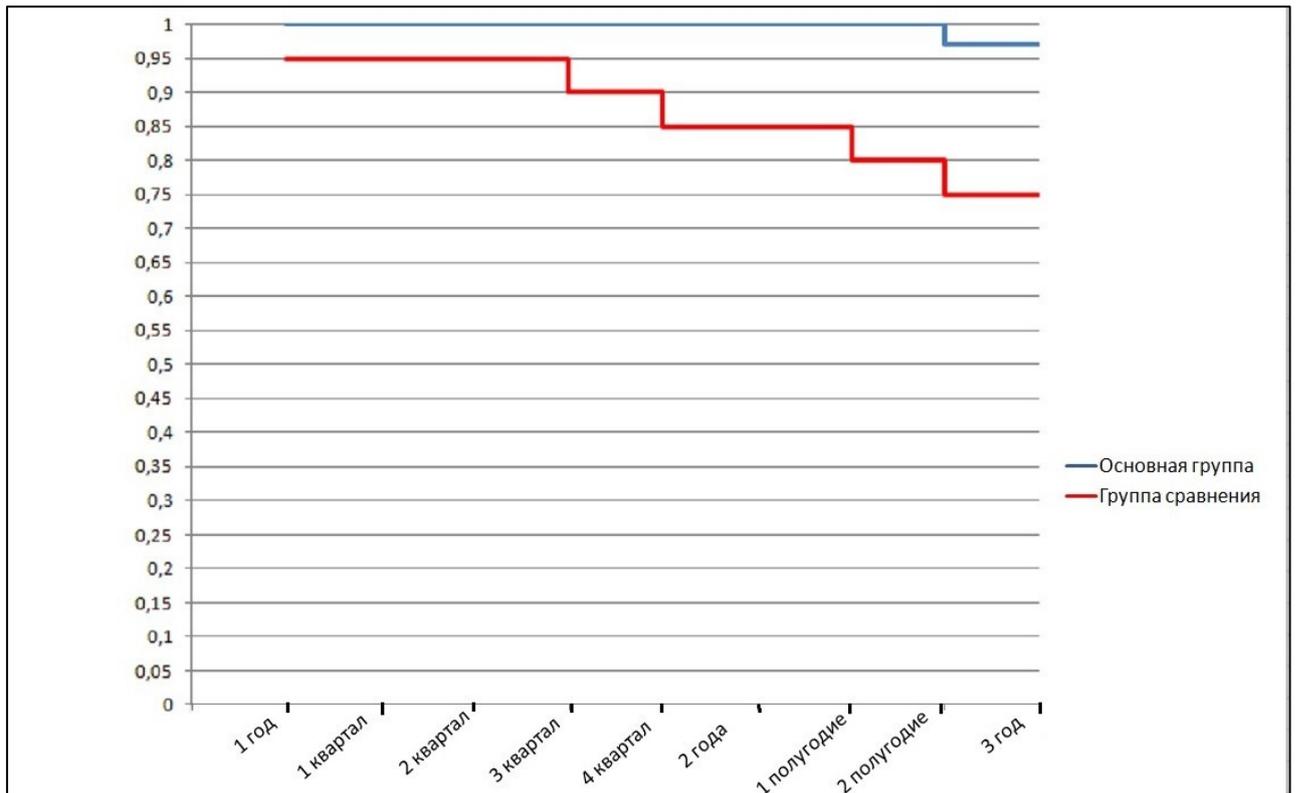


Рисунок 69. Сравнительный анализ трехлетней общей выживаемости у больных с раком желудка по методу KaplanandMeier

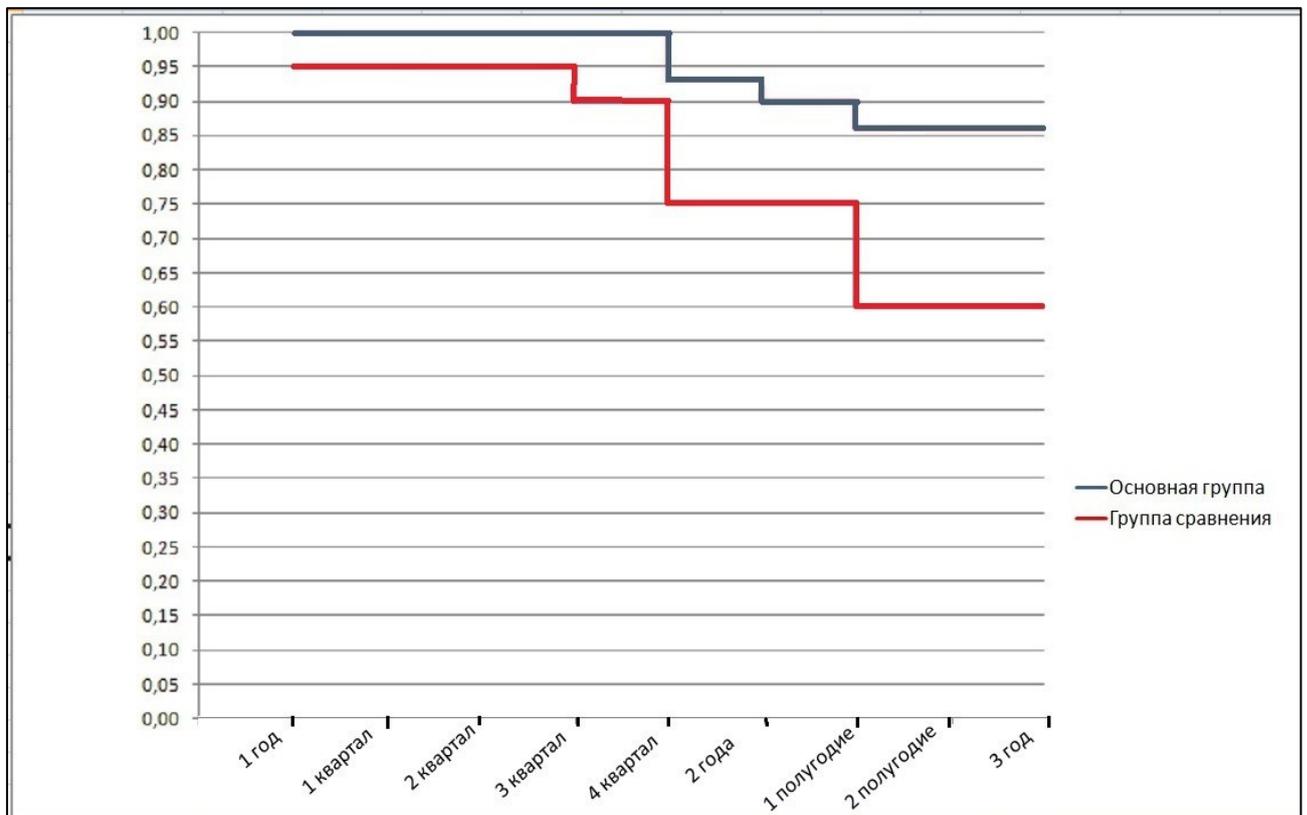


Рисунок 70. Сравнительный анализ безрецидивной выживаемости у больных с раком желудка по методу KaplanandMeier

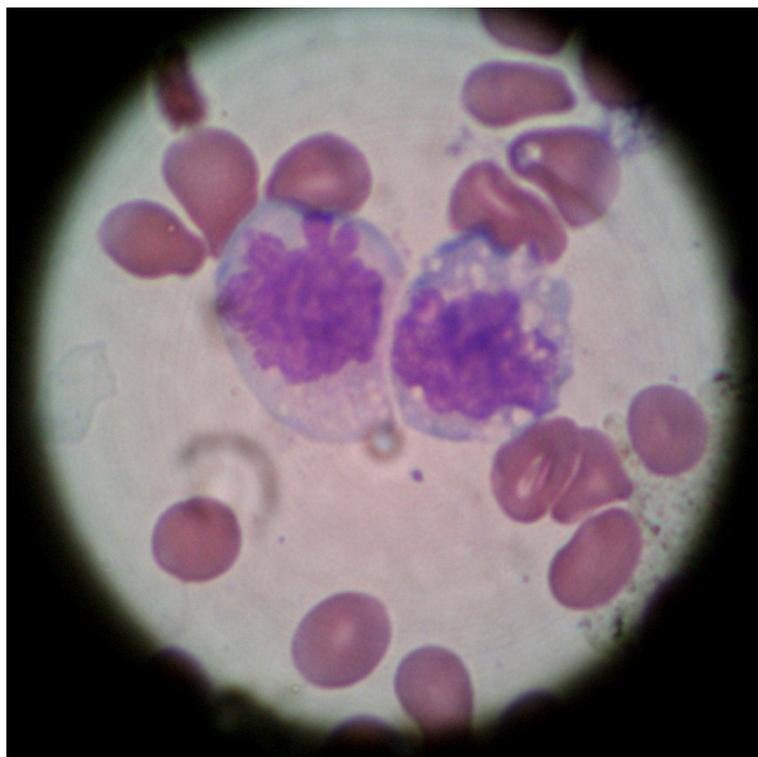
Для иллюстрации приводим следующие наблюдения.

1. Больной, 60 лет, поступил в хирургическое отделение Бурятского республиканского клинического онкологического диспансера 19 июня 2009 г.

При поступлении предъявил жалобы на рвоту после приема пищи, общую слабость, похудание на 7 кг за последние 3 месяца, боли в эпигастрии.

Больным себя считает с начала 2009 г., когда впервые стал отмечать боли в эпигастральной области и общую слабость. С конца апреля стала беспокоить рвота съеденной пищей. 26.04.09 г. обратился к участковому терапевту районной поликлиники. На основании результата рентгенологического исследования у больного не исключалась опухоль желудка. При проведении фиброгастродуоденоскопии в стационарных условиях 23.06.09 г. в выходном отделе желудка с переходом на привратник определялось язвенное образование с выраженным перипроцессом в окружности. Заключение: «Хроническая язва». 26.06.09 г. проведено гемофилтроцитологическое исследование венозной крови больного, где были обнаружены ЦРК в количестве двух клеток (рисунок 71). Цитоморфологическое заключение «Циркулирующие раковые клетки в периферической венозной крови».

После предварительной предоперационной подготовки с промыванием желудка в виду наличия у больного субкомпенсированного стеноза 30.06.09 г. выполнена операция: субтотальная резекция желудка. При ревизии органов брюшной полости обнаружена раковая опухоль выходного отдела желудка прорастающая серозный покров и единичные увеличенные препилорические лимфоузлы. Срочное интраоперационное цитологическое исследование удаленного лимфоузла обнаружило опухолевые клетки. Патогистологическое исследование удаленного операционного материала «Умеренно дифференцированная аденокарцинома желудка».



Ув. х 1000

Рисунок 71. Больной, 60 лет. Диагноз: «Рак выходного отдела желудка. Стадия III». Гемофилтроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. Среди эритроцитов две опухолевые клетки небольших размеров с полиморфными неровными контурами ядер. Хроматин мелкозернистый. Цитоплазма вакуолизированная.

В послеоперационном периоде на 15 и 21 дни после операции проводилось гемофилтроцитологическое исследование. В венозной крови больного при проведении гемофилтроцитологического исследования от 20.07.09 г. были обнаружены ЦРК. Послеоперационное течение гладкое. Заживление послеоперационной раны первичным натяжением. Учитывая наличие в крови больного ЦРК, ему была предложена АХТ в режиме Мейо. После получения согласия пациенту проведен 1 курс АХТ в данном режиме. В контрольных общих анализах крови и мочи значимых отклонений не выявлено. Выписан в удовлетворительном состоянии. В дальнейшем больной получил еще 3 курса АХТ по схеме 5–ФУ/ЛВ и находился под динамическим наблюдением. С согласия пациента проводилось повторное гемо-

филтритроцитологическое исследование венозной крови. Кровь исследовалась в следующем порядке: в течение первого года после операции 1 раз в квартал, в течение второго года - 1 раз в полгода, в дальнейшем 1 раз в год. До настоящего времени признаков рецидива и прогрессирования ЗНО не выявлено.

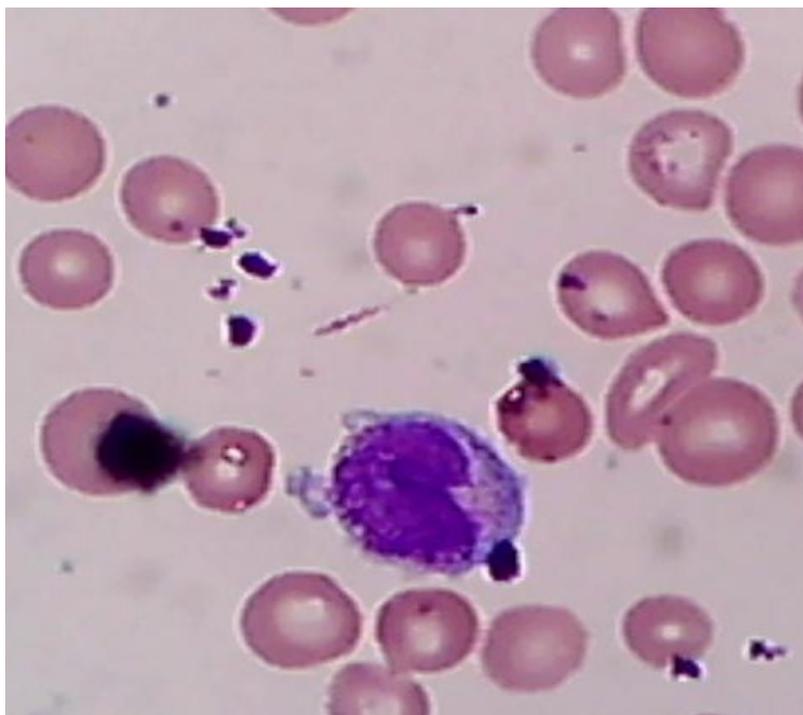
В данном наблюдении обнаружение ЦРК в периферической крови способствовало правильному выбору в тактике лечения.

2. Больной, 57 лет, обратился в поликлинику Бурятского республиканского клинического онкологического диспансера 11.05.09 г. При обращении предъявлял жалобы на затрудненное прохождение твердой пищи при глотании, общую слабость и ноющие боли в эпигастрии.

Из анамнеза известно, что боли в животе начали беспокоить с декабря 2008г., стал отмечать повышенную утомляемость, похудание. В связи с тем, что появилось затрудненное глотание твердой пищи, вынужден был обратиться к участковому терапевту в апреле 2009г. При прохождении 24.04.09г. фиброгастроуденоскопии было выявлено опухолевидное образование в теле желудка. Была взята биопсия. Диагноз: «Рак тела желудка».

Больной был направлен на оперативное вмешательство во II хирургическое отделение Бурятского республиканского клинического онкологического диспансера, где находился на стационарном лечении с 18.05.09г. по 08.06.09г. После поступления выполнено гемофилтритроцитологическое исследование венозной крови больного, где были обнаружены ЦРК (рисунок 72).

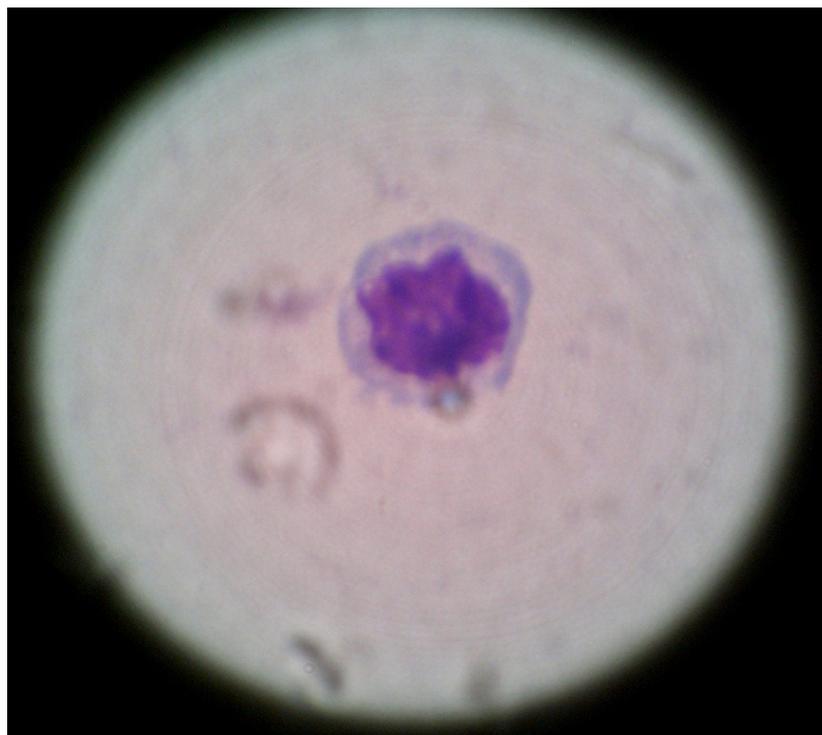
22.05.09г. выполнена чрезбрюшинная гастрэктомия с резекцией абдоминального отдела пищевода и лимфаденэктомией. При ревизии органов брюшной полости в верхней трети тела желудка, с переходом на часть абдоминального отдела пищевода выявлена злокачественная опухоль язвенно-инфильтративной формы на протяжении 9 см.



Ув. х 1000

Рисунок 72. Больной, 57 лет. Диагноз: «Рак тела желудка. Стадия IIIa». Гемофилтритроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. Двухядерная опухолевая клетка с эксцентрически расположенным ядром. Хроматин нежной структуры.

Определяются увеличенные, плотные парапанкреатические лимфоузлы. Принимая во внимание резектабельный характер процесса и удовлетворительное общее состояние больного, было принято решение выполнить радикальную комбинированную операцию в вышеуказанном объеме. Послеоперационное течение гладкое, дренажная трубка из брюшной полости удалена на пятые сутки после операции. Заживление послеоперационной раны первичным натяжением, швы сняты на двенадцатые сутки после оперативного вмешательства. В послеоперационном периоде на 15 и 21 сутки после проведения операции, у больного с целью гемофилтритроцитологического исследования взята венозная кровь в количестве 8 мл. Выполненное 06.06.09 г. гемофилтритроцитологическое исследование обнаружило в периферической крови больного ЦРК (рисунок 73). На предложение провести ему адьювантную полихимиотерапию, больной ответил отказом. Выписан в удовлетворительном состоянии под диспансерное наблюдение.



Ув. х 1000

Рисунок 73. Больной, 57 лет. Диагноз: «Рак тела желудка. Стадия IIIa». Гемофильтроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. Среди эритроцитов опухолевая клетка мелкого размера с центрально расположенным ядром. Контуры ядра неровные, фестончатые. Хроматин мелкозернистый, комковатый. Цитоплазма необильная, границы четкие.

В начале декабря 2009 г. у больного появились первые симптомы дисфагии при приеме твердой пищи. Дисфагия в дальнейшем нарастала и во второй половине декабря стала беспокоить при приеме полужидкой пищи. При очередном диспансерном осмотре выполненное рентгенологическое исследование выявило рецидив злокачественной опухоли в области пищеводно-кишечного соустья. С 28 декабря 2009 г. по 14 января 2010 г. больной находился на повторном стационарном лечении во II хирургическом отделении Бурятскогореспубликанского клинического онкологического диспансера. После предварительной операционной подготовки 30 декабря 2009 г. выполнена в виду незеректабельности опухоли паллиативная операция: еюностомия по Майдлю. Послеоперационный период протекал

без осложнений. Выписан с рекомендацией симптоматического лечения по месту жительства. В конце февраля 2010 г. у больного появилась желтушность кожных покровов, проведенное ультразвуковое исследование брюшной полости выявило множественные метастазы в обеих долях печени. 21.03.14 наступил летальный исход.

Данное наблюдение больного с выявленными в послеоперационном периоде ЦРК согласуется с рецидивом опухолевого процесса в желудке при отсутствии проведения адьювантной полихимиотерапии.

Среди больных раком толстой кишки в период их диспансерного наблюдения ЦРК были выявлены у 4 (3,7%) из 108 больных, что было меньше чем у больных раком легких на 13,5% ($p < 0,01$) и не отличалось от данных больных раком желудка.

Из 80 оперированных пациентов основной группы циркулирующие раковые клетки были выявлены у 2 (2,5%) больных и из 28 больных группы сравнения – у 2 (7,2%) больных (таблица 45). Различия статистически незначимы ($p > 0,25$).

Общая трехлетняя выживаемость у больных основной группы, страдающих раком толстой кишки превышала данные группы сравнения со статистической значимостью ($p = 0,0048$). Различия по трехлетней безрецидивной выживаемости были статистически незначимыми (таблица 46; рисунок 74, 75)

Таблица 45. Сравнительная оценка ЦРК в венозной крови, рецидива заболевания и летальности у больных раком толстой кишки в зависимости от срока наблюдения

Сроки наблюдения	n (всего)	Группы больных													
		основная								сравнения					
		n	ЦРК		рецидив		умерли		n	ЦРК		рецидив		умерли	
			абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%		абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%
1 год в том числе	108	80	-	-	-	-	-	-	28	-	-	-	-	-	-
1 квартал	108	80	-	-	-	-	-	-	28	-	-	-	-	-	-
2 квартал	108	80	-	-	-	-	-	-	28	-	-	-	-	-	-
3 квартал	108	80	-	-	-	-	-	-	28	-	-	-	-	-	-
4 квартал	108	80	-	-	-	-	-	-	28	-	-	-	-	-	-
2 года в том числе	108	80	1	0,9	1	0,9	-	-	28	1	3,6	1	3,6	-	-
1 полугодие	108	80	1	0,9	-	-	-	-	28	1	3,6	-	-	-	-
2 полугодие	108	80	-	-	1	0,9	-	-	28	-	-	1	3,6	-	-
3 года	107	80	1	0,9	1	0,9	-	-	27	1	3,6	1	3,6	1	3,6

Таблица 46. Сравнительный анализ трехлетней общей и безрецидивной выживаемости у больных раком толстой кишки

Показатель	n	Группы больных								
		основная				сравнения				p<
		абс. число	%	показатель выживаемости	± ε	абс. число	%	показатель выживаемости	± ε	
Трехлетняя безрецидивная выживаемость	108	80	74,0	0,96	0,04	28	26,0	0,93	0,08	0,9
Общая трехлетняя выживаемость	108	80	74,0	1,00	-	28	26,0	0,86	0,12	0,005

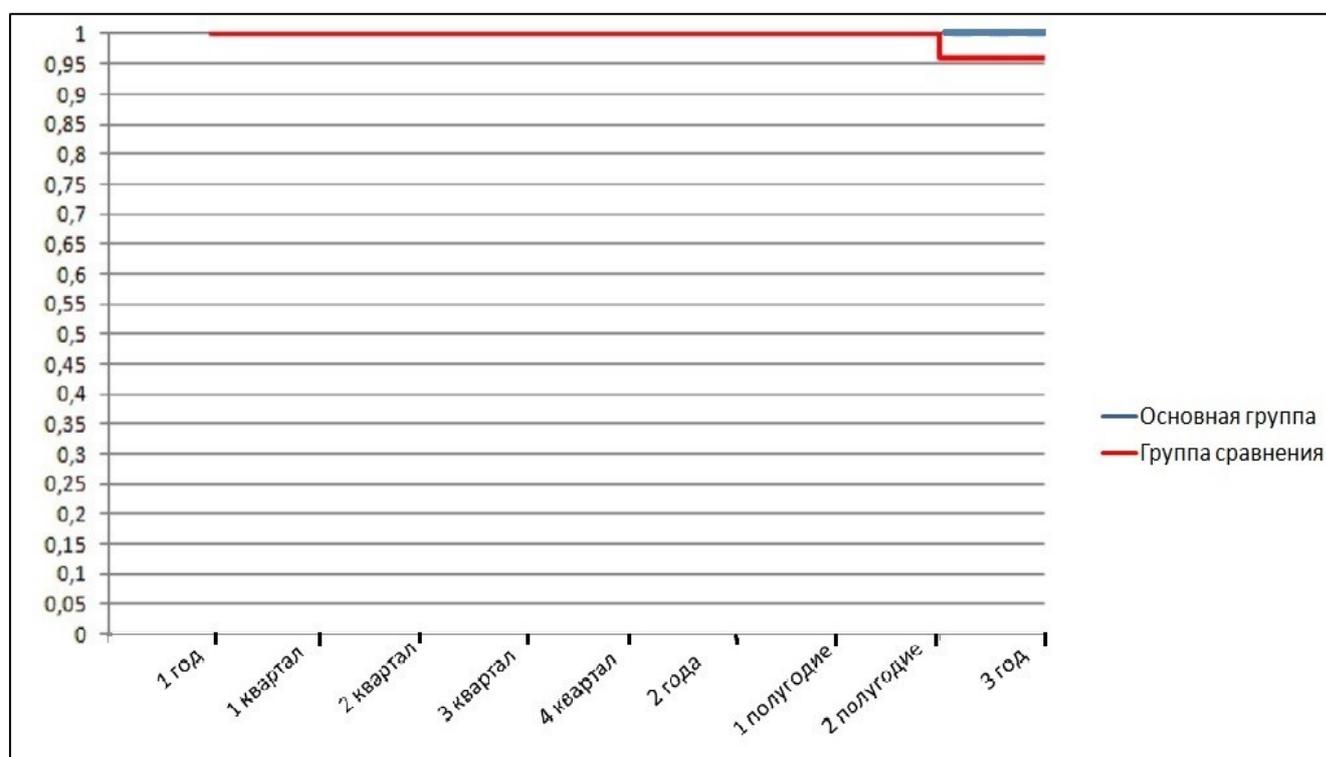


Рисунок 74. Сравнительный анализ трехлетней общей выживаемости у больных с раком толстой кишки по методу KaplanandMeier

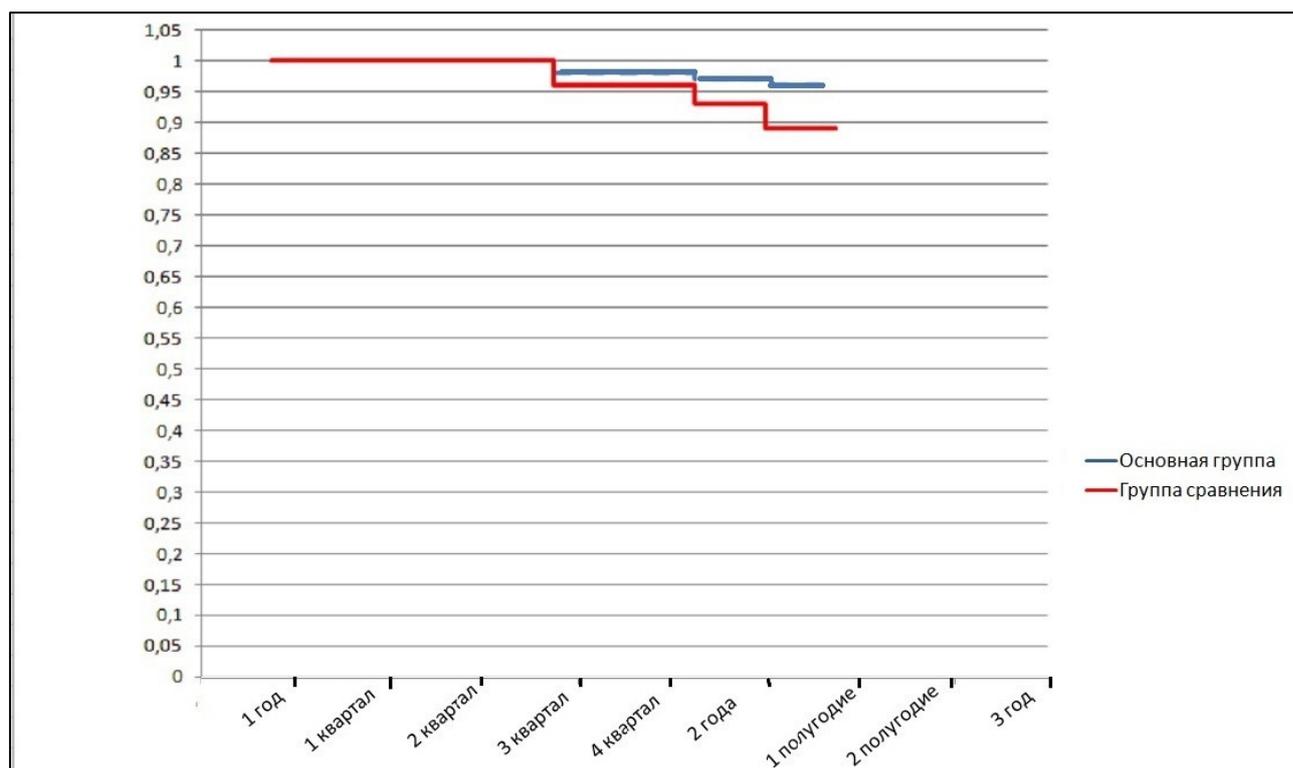


Рисунок 75. Сравнительный анализ трехлетней безрецидивной выживаемости у больных с раком толстой кишки по методу KaplanandMeier

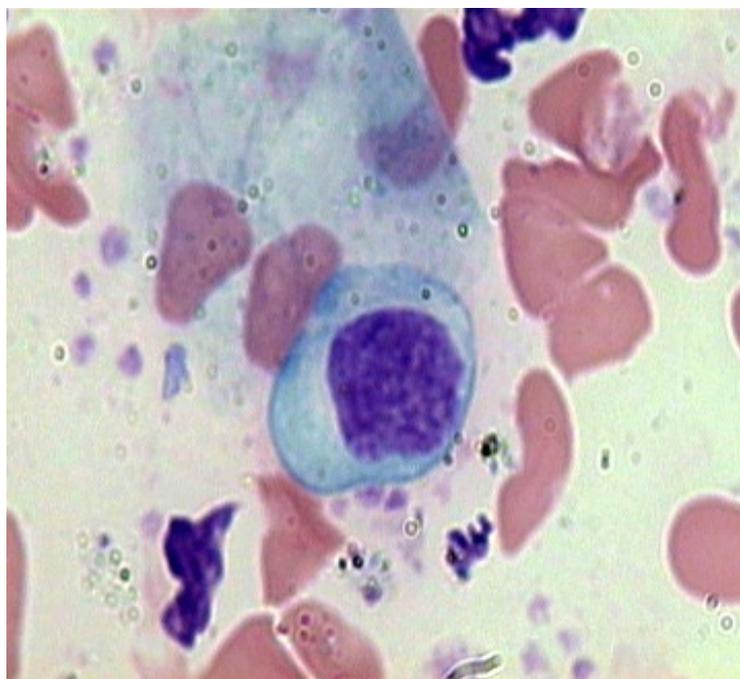
В качестве иллюстрации приводим следующее наблюдение.

Больной, 74года, поступил во II хирургическое отделение Бурятского республиканского клинического онкологического диспансера 05 марта 2010г. с диагнозом: «Рак восходящего отдела толстой кишки. Стадия II».

При поступлении предъявлял жалобы на боли в правой половине живота, вздутие, запоры. Из анамнеза известно, что заболел в сентябре 2010г., когда впервые стал отмечать периодические боли в животе, постепенно нарастала общая слабость, появилось вздутие, возникли запоры. В феврале 2010г. боли усилились, что послужило поводом обращения к участковому терапевту поликлиники по месту жительства. При ирригоскопии 19 февраля 2010г. в восходящем отделе толстой кишки определялся на протяжении 5 см дефект наполнения. 2 марта 2010г. проведена фиброколоноскопия со взятием биопсийного материала. Получено патогистологическое заключение: «Аденокарцинома».Общее состояние относительно удовлетворительное. Кожные покровы и видимые слизистые нормальной окраски и влажности. Периферические лимфоузлы не увеличены. Со стороны

обеих легочных полей выслушивается везикулярное дыхание, хрипов нет. Тоны сердца ритмичные, ясные. АД-120/80мм.рт.столба, пульс 73 удара в 1 минуту. Живот при пальпации мягкий, болезненный в правых отделах. В общем анализе крови, общем анализе мочи и биохимическом анализе крови значимых отклонений не выявлено. Выполненное 10 марта 2010 года гемофилтритроцитологическое исследование обнаружило в венозной крови больного ЦРК. 12.03.2010 г. под эндотрахеальным наркозом выполнена операция в объеме правосторонней гемиколэктомии с лимфаденэктомией. При ревизии брюшной полости определялась опухоль восходящего отдела толстой кишки не прорастающая ее серозный покров. Патогистологическое заключение операционного материала: «Темноклеточная аденокарцинома».

Послеоперационное течение протекало гладко, заживление послеоперационной раны первичным натяжением. Выполненное больному на двадцать первые сутки после проведенного оперативного вмешательства гемофилтритроцитологическое исследование обнаружило в его венозной крови ЦРК (рисунок 76).



Ув. х 1000

Рисунок 76. Больной, 74 года. Диагноз: «Рак восходящего отдела толстой кишки. Стадия II» Гемофилтритроцитологическое исследование венозной крови. Окраска азур-эозином. Опухолевая клетка округлой формы с крупным ядром. Контур ядра неровные, хроматин глыбчатый.

На предложенную ему адъювантную химиотерапию больной ответил письменным отказом и был выписан в удовлетворительном состоянии с рекомендацией: динамическое наблюдение в поликлинике онкологического диспансера. При контрольном осмотре через полгода после выписки у больного выявлен рецидив опухоли в области илеотрансверзоанастомоза. Ввиду отказа больного от повторной операции, в июне 2011 г. из-за прогрессирования основного заболевания наступил летальный исход.

Резюме

У больных ЗНО легких, желудка и толстой кишки, получивших специальное лечение, при динамическом наблюдении с помощью гемофилтродитологического исследования в 10% случаев выявляются циркулирующие раковые клетки, что может служить основанием для назначения адъювантной химиотерапии.

Частота выявления циркулирующих раковых клеток после операции у больных, оперированных по поводу легких, больше, чем у больных, оперированных по поводу рака толстой кишки на 13,5% ($p < 0,01$). Период времени между выявлением после операции ЦРК и рецидивом опухоли составлял 5,5-6,5 месяцев.

У радикально оперированных больных раком легкого, толстой кишки проведение адъювантной химиотерапии статистически значимо снижало на протяжении трехлетнего наблюдения частоту выявления циркулирующих раковых клеток в периферической крови ($p = 0,035$) в послеоперационном периоде, рецидивов злокачественных новообразований ($p = 0,027$) и летальных исходов ($p = 0,041$).

Особенно данная тенденция была выражена у больных раком легкого (снижение частоты ЦРК после операции со статистической значимостью $p = 0,046$; рецидивов – $p = 0,041$; летальности – $p = 0,041$). При раке желудка отмечено статистически значимое снижение летальности ($p = 0,041$).

Различия распределения показателей частоты выявления ЦРК, рецидивов, летальных исходов в зависимости от года определения ЦРК после операции в течение 3-летнего периода наблюдения не были статистически значимыми

($p > 0,109$).

Общая и безрецидивная трехлетняя выживаемость у радикально оперированных больных раком легкого, желудка, толстой кишки при выявлении в периферической крови ЦРК при проведении в послеоперационном периоде адъювантной химиотерапии превосходит данные после изолированного хирургического лечения со статистической значимостью, соответственно, $p=0,0004$ и $p=0,0016$.

Общая трехлетняя выживаемость у радикально оперированных больных раком легкого и толстой кишки с выявляемыми циркулирующими раковыми клетками выше у больных, получавших адъювантную химиотерапию со статистической значимостью различий, соответственно, $p=0,007$ и $p=0,005$.

У больных раком легкого после адъювантной химиотерапии также выше различия по безрецидивной выживаемости со статистической значимостью $p=0,001$. При раке желудка различия общей и безрецидивной выживаемости не зависели от проведения адъювантной химиотерапии ($p=0,179$ и $p=0,308$).

Темпы убывания наблюдаемых больных на протяжении 3-лет наблюдения были статистически незначимыми ($p=0,157-0,18$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема установления риска развития рецидивов злокачественных новообразований после радикальных операций, определения адекватных показаний к адъювантной полихимиотерапии остается актуальной.

Целью исследования явилось улучшение диагностики и лечения злокачественных новообразований путем выявления циркулирующих раковых клеток в периферической венозной крови с помощью гемофилтроцитологического исследования для принятия решения о применении адъювантной полихимиотерапии, прогноза течения процесса у радикально оперированных больных.

Для достижения указанной цели разработана и оценена методика и технология определения ЦРК, все положительные на ЦРК результаты гемофилтроцитологического исследования периферической венозной крови больных были подтверждены заключениями патоморфологического исследования операционного материала на наличие опухоли, изучена сравнительная оценка результатов гемофилтроцитологического и иммунофлуоресцентного методов исследования у одних и тех же пациентов.

С целью решения поставленных задач выполнено гемофилтроцитологическое исследование периферической венозной крови у 511 лиц. Среди них было 338 радикально оперированных больных по поводу злокачественных новообразований, включавших 112 пациентов раком легкого, 81 больной раком желудка, 145 больных раком толстой кишки. В качестве контрольных использовались результаты обследования 173 доноров.

Кроме проведения гемофилтроцитологического исследования периферической венозной крови план обследования больных включал общепринятый согласно стандартам комплекс инструментальных и лабораторных методов исследования.

Таким образом, в основу работы положено достаточное количество научно-исследовательского материала для решения поставленных задач. Сопоставлены результаты обследования больных со злокачественными новообразованиями и в качестве контроля большой группы доноров. Дизайн исследования обеспечил

адекватный поставленным задачам набор материала с исключением заболеваний, изучение особенностей которых не входило в цель исследования. Сравнимые группы обследованных лиц были сопоставимы по основным характеристикам. Контрольная группа лиц, включавшая доноров, позволила установить степень специфичности гемофилтритроцитологического метода исследования.

Для проведения гемофилтритроцитологического исследования использовалось разработанное для этой цели специальное устройство.

С целью оценки диагностической значимости гемофилтритроцитологического метода определения ЦРК в периферической венозной крови у больных проведено обследование 384 лиц. Из них 211 (основная группа) были пациентами с подозрением на наличие злокачественных новообразований органов грудной и брюшной полости.

Установлено, что у 198 больных (93,8%) с подозрением на ЗНО при проведении гемофилтритроцитологического исследования в периферической крови были обнаружены циркулирующие раковые клетки. Проведенное в дальнейшем у этих больных целенаправленное инструментальное обследование с патогистологическим исследованием биопсийного или операционного материала, подтвердило у них наличие злокачественной опухоли.

Среди 198 больных, у которых при гемофилтритроцитологическом исследовании были установлены ЦРК, у 28(14,1%) пациентов имелись I-II стадии злокачественного процесса. У 13 (6,2%) больных с гистологически верифицированными ЗНО I-II стадии, ЦРК в периферической крови не были выявлены. Чувствительность гемофилтритроцитологического исследования составила 93,8%.

Доказано, что частота выявления циркулирующих раковых клеток в крови при различных нозологических формах ЗНО колебалась от 75,0% до 97,6%.

Для подтверждения или опровержения полученных с помощью гемофилтритроцитологических исследований результатов, вышеуказанные мазки-отпечатки фильтрата венозной крови исследованы иммунофлуоресцентным методом. С этой целью проведена оценка наличия ЕpCAM (CD 326) – положительных клеток в 24 цитологических мазках-отпечатках, полученных с помощью устройства для ге-

мофилтритроцитологического исследования венозной крови с нанофилтритром диаметр которого 6000 нм. В результате исследования было показано, что в 16 пробах из 18 положительных на ЦРК наблюдалось наличие ЕpСАМ (CD 326) – положительных клеток. Кроме того отсутствие ЦРК в венозной крови в 6 исследованиях подтверждено обоими методами. Следовательно, результаты экспертизы подтверждают эффективность выделения циркулирующих раковых клеток из венозной крови больных с помощью гемофилтритроцитологического метода исследования.

Таким образом, применение гемофилтритроцитологического исследования у больных с подозрением на наличие злокачественной опухоли, способствует диагностике злокачественного новообразования. Проведение гемофилтритроцитологического исследования позволило обнаружить ЦРК в крови у 93,8% пациентов. Это дало основание для целенаправленного инструментального обследования и установления диагноза ЗНО. В тоже время у доноров циркулирующие раковые клетки не обнаруживались, что свидетельствовало о 100% специфичности методики.

Установлено, что методика гемофилтритроцитологического исследования позволяет установить наличие ЦРК в периферической венозной крови у радикально оперированных больных со злокачественными новообразованиями на 15 и 21 сутки после операции в 76,6% случаев. В связи с этим, одним из показаний к назначению адьювантной полихимиотерапии у радикально оперированных больных раком легкого, желудка и толстой кишки может являться обнаружение в периферической венозной крови на 15 и 21 сутки после операции ЦРК.

По уровню полученных в ходе проведения химиотерапии повреждений ЦРК, сопоставимых с соответствующими степенями лекарственного патоморфоза, оценивалось качество и полнота проведения АХТ.

С помощью гемофилтритроцитологического исследования доказано, что в ходе проведения АХТ статистически значимое преобладание наиболее выраженных III и IV уровней повреждений ЦРК (III-IV степени ЛП) над наименее выраженными I и II уровнями повреждений (I-II степени ЛП) отмечены при злокачественных новообразованиях толстой кишки – в среднем на 30,0% ($p < 0,001$). При раке же-

лудка наоборот наименее выраженные I и II уровни повреждений ЦРК (I-II степени ЛП) преобладали над наиболее выраженными III и IV уровнями повреждений (III-IV степенями ЛП) на 58,2% ($p < 0,001$). При раке легкого в целом не отмечено статистически значимой разницы между наиболее и наименее выраженными уровнями повреждений ЦРК (степенями ЛП).

Установлено, что I уровень повреждений ЦРК (I степень ЛП) после 2 курса АХТ чаще наблюдался при раке желудка и был отмечен у 41,9% больных, что было больше, чем при раке легкого на 24,1% ($p < 0,02$). При раке толстой кишки больные с I уровнем повреждений ЦРК (I степень ЛП) после 2 курса АХТ не наблюдались.

II и III уровни повреждений циркулирующих раковых клеток (II-III степени ЛП) при проведении адъювантной химиотерапии одинаково часто отмечены при всех трех видах злокачественных новообразований.

IV уровень повреждений раковых клеток (IV степень ЛП) после 2 курса АХТ наблюдался при раке легкого и толстой кишки, соответственно, в 12,9% и 20,0% случаев. При раке желудка этот уровень повреждения ЦРК не отмечен.

По результатам исследования наиболее чувствительны к химиотерапии были злокачественные новообразования толстой кишки, самая резистентная была опухоль желудка.

Перед началом адъювантной полихимиотерапии при проведении гемофильтроцитологического исследования венозной крови радикально оперированных больных концентрация ЦРК в 8,0 мл периферической крови была в основной группе, следующей: 5 и более ЦРК у 109, а 4 и менее у 76 пациентов. Наибольшее количество радикально оперированных больных с концентрацией 5 и более ЦРК установлено у пациентов, оперированных по поводу рака толстой кишки, соответственно, наименьшее – у больных раком желудка. В группе пациентов с концентрацией ЦРК 4 и менее также преобладали больные с раком толстой кишки, а меньше всего было больных оперированных по поводу рака желудка. Больные оперированные по поводу рака легких занимали промежуточное положение.

После проведенного 2 курса АХТ у радикально оперированных больных по

поводу рака легких число ЦРК в 8,0 мл снизилось у 19 до 3 ЦРК и более, у 35 до 2 ЦРК и менее, а у 8 пациентов исчезли полностью. У радикально оперированных больных по поводу рака желудка после 2 курса АХТ также отмечалось уменьшение концентрации ЦРК до 3 и более у 15, до 2 и менее у 28 пациентов.

В группе радикально оперированных больных по поводу рака толстой кишки после проведения 2 курса АХТ тоже отмечено снижение числа ЦРК до 3 и более у 7 больных, до 2 и менее - у 57, а у 16 пациентов они полностью отсутствовали.

После завершения адьювантной полихимиотерапии у всех 185 радикально оперированных больных основной группы циркулирующих раковых клеток в венозной крови при гемофилтритроцитологическом исследовании не определялось.

Таким образом, выявленные с помощью гемофилтритроцитологического исследования периферической венозной крови циркулирующие раковые клетки у послеоперационных больных являются показанием к назначению им АХТ. Кроме того по уровню полученных с помощью гемофилтритроцитологического исследования повреждений ЦРК возможно оценить эффективность проведенной АХТ, а ее завершенность - по их отсутствию в венозной крови больных.

Динамическое наблюдение в течение 1-3 лет за радикально оперированными больными злокачественными новообразованиями позволило выявить следующую закономерность во взаимосвязи определения у больных ЦРК и появление рецидива опухолевого роста. Период времени между этими проявлениями составил 5,5-6,5 месяцев. Случаев рецидива злокачественной опухоли у данной группы диспансерных больных при отсутствии в предшествующий период ЦРК на протяжении указанных сроков наблюдения не отмечено.

Установлено, что у больных раком легкого в период их диспансерного наблюдения ЦРК в венозной крови были обнаружены у 17,2% больных. В основной группе при динамическом наблюдении ЦРК в периферической крови были выделены у 8,1%, а в группе сравнения у 40,0% больных. Разница между частотой встречаемости выявления ЦРК в основной группе и группе сравнения статистически значима ($p < 0,01$). Анализ данных показал, что темпы убывания наблюдаемых

больных в анализируемых группах статистически не значимы. Доказано, что различия распределения показателей в группах в предположениях, что наблюдения связаны по полным данным, статистически значимы: по ЦРК (12,6%) $p=0,046$, по рецидивам (12,6%) $p=0,041$, по летальным исходам (7,8%) $p=0,041$.

Различия распределения показателей в группах в предположениях, что все наблюдения связаны по годам, незначимы по всем показателям, без учета их связи по полным данным незначимы по частоте выявления ЦРК, рецидивов, по летальности. Без учета связи по годам различия всех показателей также статистически незначимы.

Сравнительный анализ трехлетней безрецидивной и общей выживаемости у больных раком легкого выявил значимые различия между основной группой и группой сравнения. В основной группе разница по трехлетней общей и безрецидивной выживаемости превышала данные группы сравнения на 42,6% со статистической значимостью $p=0,007$ и $p=0,001$, соответственно.

Установлено, что у больных раком желудка в период их диспансерного наблюдения ЦРК были обнаружены у 10,9% больных, что по частоте не отличалось от данных после операции на легких. В основной группе из 43 больных ЦРК в периферической крови при динамическом наблюдении были выявлены у 7,0% больных, а в группе сравнения - у 19,0%. Разница в 12% статистически не значима ($p>0,05$). Анализ данных показал, что темпы убывания наблюдаемых больных в анализируемых группах статистически различимы не значимо ($p=0,157$). Различия распределения показателей в группах в предположениях, что наблюдения связаны по полным данным, статистически значимы только по летальности 3,0% ($p=0,041$). По ЦРК, появлению рецидивов они не значимы.

Различия распределения показателей в группах в предположениях, что наблюдения связаны по годам (без учета квартальных данных) статистически не значимы (по ЦРК – $p=0,18$; по рецидивам – $p=0,18$; по летальности - $p=0,109$). Различия в распределениях показателей по ЦРК, рецидивам и по летальности без учета их связи по полным данным также статистически не значимы. Различия распределения показателей по ЦРК и рецидивам без учета их связи по годам ста-

статистически не значимы.

Трехлетняя безрецидивная и общая выживаемость у радикально оперированных больных в сравниваемых группах больных раком желудка была одинаковой.

Установлено, что у больных раком толстой кишки в период их диспансерного наблюдения ЦРК были выявлены у 4 (3,7%) из 108 радикально больных, что было меньше чем у больных раком легких на 13,5% ($p < 0,01$) и не отличалось от данных больных раком желудка. В основной группе ЦРК в периферической крови после операции были выявлены у 2 (2,5%) больных из 80, а в группе сравнения – у 2 (7,2%) больных из 28. Различия статистически не значимо ($p > 0,25$). Доказано, что общая трехлетняя выживаемость у больных основной группы, страдающих раком толстой кишки превышала данные группы сравнения на 48% со статистической значимостью ($p = 0,0048$). Различия по трехлетней безрецидивной выживаемости были статистически не значимыми.

Установлено, что в целом в основной группе больных состоящих на диспансерном учёте ЦРК были выявлены у 10 (5,4%) из 185 пациентов, а в группе сравнения у 16 (21,6%) из 74 больных. Различия в 16,2% случаев статистически значимы ($p < 0,01$). Темпы убывания наблюдаемых больных были одинаковыми и составили 0,18. Доказано, что различия в распределении показателей по полным данным были статистически значимыми: по ЦРК 3,3% ($p = 0,035$); по рецидивам 3,3% ($p = 0,027$); по летальности 4,8% ($p = 0,041$).

Различия в распределении всех показателей в группах в предположениях, что наблюдения связаны по годам (без учета квартальных данных) статистически не значимы. Различия в распределении всех показателей в группах без учета их связи по полным данным также статистически не значимы. Различия в распределении всех показателей в группах без учета их связи по годам статистически не значимы.

Трехлетняя безрецидивная и трехлетняя общая выживаемость в основной группе больных превышала данные группы сравнения на 42,8% со статистической значимостью, соответственно $p = 0,0016$ и $p = 0,00046$.

Таким образом, у больных злокачественными новообразованиями легких, желудка и толстой кишки, получивших специальное лечение с помощью гемофильтрацитологического исследования в 10% случаев при динамическом наблюдении выявляются циркулирующие раковые клетки.

Частота выявления циркулирующих раковых клеток после операции у больных, оперированных по поводу рака легких, больше, чем у больных, оперированных по поводу рака толстой кишки на 13,5% ($p < 0,01$). Период времени между выявлением после операции ЦРК и рецидивом опухоли составлял 5,5-6,5 месяцев.

У радикально оперированных больных раком легкого, толстой кишки проведение адъювантной химиотерапии статистически значимо снижало на протяжении трехлетнего наблюдения частоту выявления циркулирующих раковых клеток в периферической крови на 15,3% ($p = 0,035$) в послеоперационном периоде, рецидивов злокачественных новообразований на 15,3% ($p = 0,027$) и летальных исходов – 12% ($p = 0,041$). Особенно данная тенденция была выражена у больных раком легкого (снижение частоты ЦРК после операции со статистической значимостью на 12,6% ($p = 0,046$); рецидивов 12,6% ($p = 0,041$); летальности 7,8% ($p = 0,041$). При раке желудка отмечено статистически значимое снижение летальности соответственно по группам – 3% ($p = 0,041$).

Различия распределения показателей частоты выявления ЦРК, рецидивов, летальных исходов в зависимости от года определения ЦРК после операции в течение 3-летнего периода наблюдения не были статистически значимыми.

Общая и безрецидивная трехлетняя выживаемость у радикально оперированных больных раком легкого, желудка, толстой кишки при выявлении в периферической крови ЦРК при проведении в послеоперационном периоде адъювантной химиотерапии превосходит данные после изолированного хирургического лечения на 42,8% со статистической значимостью, соответственно, $p = 0,0004$ и $p = 0,0016$.

Общая трехлетняя выживаемость у радикально оперированных больных раком легкого с выявляемыми циркулирующими раковыми клетками выше у боль-

ных, получавших адъювантную химиотерапию на 42,6% ($p=0,007$), а раком толстой кишки на 48,0% ($p=0,005$). У больных раком легкого после адъювантной химиотерапии также выше различия по безрецидивной выживаемости на 42,6% со статистической значимостью $p=0,001$. При раке желудка различия общей и безрецидивной выживаемости не зависели от проведения адъювантной химиотерапии. Темпы убывания наблюдаемых больных на протяжении 3-х лет наблюдения были статистически незначимыми.

Таким образом, диагностика циркулирующих раковых клеток с использованием гемофилтритроцитологического исследования периферической венозной крови у больных злокачественными новообразованиями обоснована возможностью их выявления у 93,8% пациентов, отсутствием их у здоровых доноров. Исследование циркулирующих раковых клеток в периферической венозной крови у радикально оперированных больных раком легкого, желудка и толстой кишки на 15 и 21 день после операции позволяет выявить их в 76,6% случаев, что является основанием для назначения адъювантной химиотерапии. По данным динамического гемофилтритроцитологического исследования уровней повреждений циркулирующих раковых клеток у радикально оперированных больных раком легкого, желудка, толстой кишки, получавших полихимиотерапию, наиболее чувствительными к ней оказались новообразования толстой кишки, наименее – желудка. Так при проведении АХТ частота III-IV уровней повреждений в циркулирующих раковых клетках у больных раком толстой кишки наблюдалась в 65,0% случаев, в том числе IV уровня – в 20,0%; раком легкого - в 45,2%, в том числе IV уровня – в 12,9%; раком желудка – в 20,9% без единого наблюдения IV уровня. В течение 3 лет после радикальной операции по поводу рака легкого, желудка, толстой кишки с выявляемыми в периферической крови циркулирующими раковыми клетками возможно их повторное определение у 10,0% больных. При этом у больных раком легкого частота выявления ЦРК составила 17,2%, при раке желудка – 10,9%, при раке толстой кишки – 3,7%. Различия показателей статистически значимы только между раком легкого и раком толстой кишки. Период времени между выявлением после операции ЦРК в периферической крови и рецидивом опухоли составил 5,5-

6,5 месяцев. Адьювантная полихимиотерапия у радикально оперированных раком легкого и толстой кишки с выявленными в периферической венозной крови циркулирующими раковыми клетками на протяжении трех лет наблюдения после операции уменьшает частоту последующего их выявления, рецидивы опухоли и летальность. Последняя уменьшается также при раке желудка. Снижение частоты выявленных ЦРК и рецидивов при раке желудка близко к статистически значимому. Общая трехлетняя выживаемость у радикально оперированных больных раком легкого и толстой кишки с выявляемыми в периферической венозной крови циркулирующими раковыми клетками, выше у пациентов, получавших адьювантную полихимиотерапию. При раке желудка она не зависела от проведения адьювантной полихимиотерапии. Безрецидивная трехлетняя выживаемость у радикально оперированных больных раком легкого с выявляемыми в периферической венозной крови циркулирующими раковыми клетками выше у пациентов, получавших адьювантную полихимиотерапию. При раке желудка и толстой кишки она не зависела от проведения адьювантной полихимиотерапии.

Темпы убывания радикально оперированных больных раком легкого, желудка, толстой кишки с выявляемыми в периферической крови циркулирующими раковыми клетками на протяжении трех лет наблюдения после операции не зависят от применения адьювантной химиотерапии. Различия показателей выявления в периферической крови циркулирующих раковых клеток в послеоперационном периоде, развитие рецидивов, летальных исходов у радикально оперированных больных раком легкого, желудка и толстой кишки с обнаруженными ЦРК на протяжении трех лет не зависят от годовых результатов обследования.

Выводы

1. Диагностика циркулирующих раковых клеток с использованием гемофилтритроцитологического исследования периферической венозной крови у больных злокачественными новообразованиями обоснована возможностью их выявления у 93,8% пациентов, отсутствием их у здоровых доноров. Проведение методом иммунофлуоресцентции экспертизы результатов гемофилтритроцитологического исследования мазков-отпечатков крови подтверждает в 91,6% случаев эффективность выделения ЦРК из венозной крови больных гемофилтритроцитологическим методом исследования.

2. Исследование циркулирующих раковых клеток в периферической венозной крови у радикально оперированных больных раком легкого, желудка и толстой кишки на 15 и 21 день после операции позволяет выявить их в 76,6% случаев, что является основанием для назначения адъювантной химиотерапии.

3. По данным динамического гемофилтритрологического исследования уровней повреждений циркулирующих раковых клеток у радикально оперированных больных раком легкого, желудка, толстой кишки, получавших полихимиотерапию, наиболее чувствительными к ней оказались новообразования толстой кишки, наименее – желудка. При проведении АХТ частота III-IV уровней повреждений в циркулирующих раковых клетках у больных раком толстой кишки наблюдалось в 65,0% случаев, в том числе IV уровня – в 20,0%; раком легкого - в 45,2%, в том числе IV уровня – в 12,9%; раком желудка – в 20,9% без единого наблюдения IV уровня.

4. В течение 3 лет после радикальной операции по поводу рака легкого, желудка, толстой кишки с выявляемыми в периферической крови циркулирующими раковыми клетками возможно их повторное определение у 10,0% больных. При этом у больных раком легкого частота выявления ЦРК составила 17,2%, при раке желудка – 10,9%, при раке толстой кишки – 3,7%. Различия показателей статистически значимы только между раком легкого и раком толстой кишки. Период времени между выявлением после операции ЦРК в периферической крови и рециди-

вом опухоли составил 5,5-6,5 месяцев.

5. Адьювантная полихимиотерапия у радикально оперированных раком легкого и толстой кишки с выявленными в периферической венозной крови циркулирующими раковыми клетками на протяжении трех лет наблюдения после операции уменьшает частоту последующего их обнаружения, рецидивы опухоли и летальность. Последняя уменьшается также при раке желудка. Снижение частоты выявленных ЦРК и рецидивов при раке желудка близко к статистически значимому.

6. Общая трехлетняя выживаемость у радикально оперированных больных раком легкого и толстой кишки с выявляемыми в периферической венозной крови циркулирующими раковыми клетками, выше у пациентов, получавших адьювантную полихимиотерапию. При раке желудка она не зависела от проведения адьювантной полихимиотерапии.

7. Безрецидивная трехлетняя выживаемость у радикально оперированных больных раком легкого с обнаруженными в периферической венозной крови циркулирующими раковыми клетками выше у пациентов, получавших адьювантную полихимиотерапию. При раке желудка и толстой кишки она не зависела от проведения адьювантной полихимиотерапии.

8. Темпы убывания радикально оперированных больных раком легкого, желудка, толстой кишки с выявляемыми в периферической крови циркулирующими раковыми клетками на протяжении трех лет наблюдения после операции не зависят от применения адьювантной химиотерапии.

9. Различия показателей выявления в периферической крови циркулирующих раковых клеток в послеоперационном периоде, развитие рецидивов, летальных исходов у радикально оперированных больных раком легкого, желудка и толстой кишки с определенными ЦРК на протяжении трех лет не зависят от годовых результатов обследования.

Практические рекомендации

1. После выполнения радикального хирургического вмешательства целесообразно проведение гемофилтроцитологического исследования с целью определения показаний к адъювантной ПХТ.
2. Для достижения адекватного лечебного эффекта у послеоперационных больных с выявленными ЦРК необходимо проведение 4-6 курсов адъювантной ПХТ, до достижения IV уровня их повреждений.
3. Гемофилтроцитологическое исследование периферической венозной крови целесообразно применять у радикально оперированных больных раком легкого, желудка, толстой кишки получивших АХТ для оценки качества проведенной полихимиотерапии, коррекции лечебной тактики и прогноза возможных рецидивов заболевания.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АПК	антигенпрезентирующие клетки
АФП	альфа-фетопроtein, сывороточный белок, продуцируемый клетками желточного мешка и печени и являющийся серологическим маркером соответствующих опухолей
БРКОД	Бурятский республиканский клинический онкологический диспансер
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ГБУЗ	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения
ЗНО	злокачественные новообразования
ОМ	онкомаркеры
ПСА	простатспецифический антиген
ПХТ	полихимиотерапия
ПЦ	потоковая цитометрия
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РПЖ	рак предстательной железы
РЭА	раково-эмбриональный антиген
РЯ	рак яичников
СА15-3	опухоль-ассоциированный антиген, маркер выбора для рака молочной железы
СА19-9	опухоль-ассоциированный антиген, маркер выбора для рака поджелудочной железы
СА72-4	опухоль-ассоциированный антиген, маркер выбора для рака желудка
СА125	опухоль-ассоциированный антиген, маркер выбора для рака яичников
СК	сыворотка крови
ЦК	цитокератин

ЦРК	циркулирующие раковые клетки
ЭДТА	динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты
APC	Adenomatous polyposis coli
BCR-ABL	белок слитный
BRCA 1	1 ген-супрессор, ассоциированный с карциномой молочной железы
BRCA 2	2 ген-супрессор, ассоциированный с карциномой молочной железы
BeEP 4	антитела, специфичные для эпителиальных антигенов
CD 4	маркер Т-хелперов
CD 8	маркер Т-супрессоров
CD 4 и CD 8	корцепторы TCR, взаимодействующие с презентирующей молекулой MHC-II или MHC-I
CD 44	молекула адгезии
CD 45	поверхностный фосфат
COX -2	изоформа циклооксигеназы
CXCR	химокин-рецептор участвующий в метастатическом процессе
DC	дендритные клетки
EpCam	антитела, специфичные для эпителиальных антигенов
EGFR	карциноэмбриональный антиген
FISH	флюоресцентная insitu гибридизация
HER2	рецептор эпидермального фактора роста 2
IL-2	интерлейкин -2
IL-6	интерлейкин - 6
IL-10	интерлейкин - 10
IL-12	интерлейкин - 12
IL-23	интерлейкин - 23
MACS™	магнитно-активируемая система сортировки клеток
MagSweeper	иммуномагнитный автоматический разделитель клеток

MHC I и II	главный комплекс гистосовместимости I и II
NK	натуральные киллеры
NKT	натуральные киллеры с T-клеточным рецептором
PDMS	полидиметилсилоксан
p53	супрессорный ген, кодирующий белок p53
RAS	рефрактерная сидеробластная анемия
RT-PCR	обратная полимеразная цепная реакция
TCR	антигенраспознающий рецептор T-клеток
TGF- β	трансформирующий фактор роста бета
$\gamma\delta$ -T	гамма-дельта T-клетки
VEGF	сосудистый эндотелиальный фактор роста

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ / под ред. М.И. Давыдова и Е.М. Аксель // М. Издательская группа РОНЦ, 2014. - 226с.
2. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой // М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России. - 2018.- 250с.
3. Состояние онкологической помощи населению России в 2016 году. / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой //М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России. - 2017.- 235с.
4. Энциклопедия клинической онкологии: Руководство для практикующих врачей / Под. ред. М.И. Давыдова. // М.: РЛС, 2004. – 1536 с.
5. Клинические рекомендации. Онкология. 2-е издание/под ред. акад. В.И. Чиссова, проф. С.Л. Дарьяловой // М.: «ГЭОТАР-Медиа». – 2009.-925 с.
6. Cristofanilli, M. Circulating tumor cells in breast cancer: advanced tools for “tailored” therapy? / M.Cristofanilli, J.Mendelsohn // PNAS. – 2006. – Vol. 103. – P. 17073-17074.
7. Dawood, S. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: from prognostic stratification to modification of the staging system? / S.Dawood, K. Broglio, V.Valero *et al.* // *Cancer*. – 2008. – Vol. 113. – P. 2422-2430.
8. Dirix, L. Genomics and circulating tumor cells: promising tools for choosing and monitoring adjuvant therapy in patients with early breast cancer? / L.Dirix, P.Van Dam *et al.*// *Curr. Opin. Oncol.* – 2005. – Vol. 17(6). – P. 551-558.
9. Hanahan, D. The hallmarks of cancer / D.Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell*. – 2000. – Vol. 100. – P. 57-70.
10. Лядов, В.К. Выделение циркулирующих в крови опухолевых клеток методом «изоляции по размеру» (ISET) / В.К. Лядов, М.А. Скрыпникова, О.П. Попова // *Вопросы онкологии*, 2014. - Т60, V.60.-№5.- С.548-551.

11. Meng, S. uPAR and HER-2 gene status in individual breast cancer cells from blood and tissues / S.Meng, D.Tripathy et al. // PNAS. – 2006. – Vol. 103(46). – P. 17361-17365.
12. Ошибки в клинической онкологии / Под ред. В.И. Чиссова, А.Х. Трахтенберга. // М.: Медицина, 2001. – 544 с.
13. Состояние онкологической помощи населению России в 2015 году. / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой // М.: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал «НМИРЦ» Минздрава России. - 2016. – 236 с.
14. Сидоренко, Ю.С. Стратегия и тактика превентивной онкологии / Ю.С. Сидоренко, А.В. Шапошников // Вопросы онкологии. – 2009. – Т. 55. – С. 671-678.
15. Аничков, Н.М., Кветной И.М., Коновалов С.С. Биология опухолевого роста (молекулярно-медицинские аспекты). – М.: Олма-Пресс., 2004. – 216 с.
16. Oppmann, B. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12 / B. Oppmann, R. Lesley, B. Blom et al. // Immunity. – 2000. – Vol. 13. – P. 715-725.
17. Stratton, M.R. The cancer genome / M.R. Stratton, P.V. Campbell, P.A. Futreal // Nature. – 2009. – Vol. 458. – P. 719-724.
18. Weinberg, R.A. Cancer: A Genetic Disorder. In: Mendelsohn J., Howley P., Israel M. et al., editors. The Molecular Basis of Cancer, 3rd edition. – Saunders. – Philadelphia, 2008. – P. 3-17.
19. Мошкин, А.В. Обеспечение качества клинической лабораторной диагностики. / А.В. Мошкин, В.В. Долгов // Медиздат. – 2004. - 216 с.
20. Clark, W. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression / W. Clark, D. Elder, D. Gurrey et al. // J. Natl. Cancer Inst. – 1989. – Vol. 81. – P. 1893-1904.
21. Malmberg, K.J. Effective immunotherapy against cancer: A question of overcoming immune suppression and immune escape? // Cancer Immunol. Immunother. – 2004. – Vol. 53. – P. 879-892.

22. Pages, F. Effector memory T cells, early metastases, and survival in colorectal cancer / F.Pages, A.Berger, M.Camus et al. // *New Engl. J. Med.* – 2005. – Vol. 353. – P. 2564-2663.
23. Prendergast, G.C. *Molecular Cancer Therapeutic: Strategies for Drug Discovery and Development.* // New York: Willey-Liss, 2004.
24. Zou, W. Immunosuppressive networks in the tumor environment and their therapeutic relevance // *Nat. Rev. Cancer.* – 2005. – Vol. 5. – P. 263-274.
25. Martin, G. S. Cell Signaling and cancer // *Cancer Cell.*-2003.-Vol. 177.-P. 167-174.
26. Girardi, M. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells / M.Girardi, D.E.Oppenheim, C.R. Steele et al. // *Science.* – 2001. – Vol. 294. – P. 605-609.
27. Groh, V. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium / V.Groh,S.Bahram, S.Bauer et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA).* – 1996. – Vol. 93. – P. 12445-12450.
28. Bauer, S. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA / S.Bauer, V.Groh, J.Wu et al. // *Science.*- 1999.- Vol. 285. – P.727-729.
29. Groh, V. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB / V.Groh, R.Rhinehart, H. Secrist et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA).* – 1999. – Vol. 96. – P. 6879-6884.
30. Kabalitz, D. Features and functions of gamma delta T lymphocytes: focus on chemokines and their receptors / D.Kabalitz, D.Wesch // *Crit. Rev. Immunol.*-2003.-Vol. 23.-P. 339-370.
31. Kabaletz ,D.Perspectives of gammadelta T cells in tumor immunology /D.Kabalitz, D.Wesch, W.He // *Cancer Res.*- 2007.-Vol. 67.-p. 5-8
32. Soloski M.J. Recognition of tumor cells by the innate immune system // *Curr. Opin. Immunol.* – 2001. – Vol.13. -P.154-162.

33. Diefenbach, A. Selective associations with signaling proteins determine stimulatory activity of NKG2d / A.Diefenbach, E.Tjmasello, M.Lucas et al // *Nat. Immunol.*-2002.-Vol. 12. – P. 1142-1149.
34. Piontek, G. E. YAC1 MHC class I variants reveal an association between decreased NK sensitivity and increased H-2 expression after interferon treatment or in vivo passage / G. E.Piontek, K.Taniguchi, H. G. Ljunggren et al. // *J. Immunol.*-1985.-Vol. 135.-P. 4281-4288.
35. Wu, J. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10 / J.Wu, A.B. Bakker et al. // *Science.* -1999. –Vol.285. –P.730-732.
36. Biassoni, R. Human natural killer cell receptors: insights into their molecular function and structure / R.Biassoni, C.Cantoni, D.Marras et. al.// *J. Cell Mol. Med.* – 2003/ - Vol.7 – P.376-387.
37. Diefenbach, A.Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity / A.Diefenbach, E.R.Jensen, A.M.Jamieson, D.H. Raulet // *Nature.*-2001.-Vol. 413. – P. 165-171.
38. Groh, V. Costimulation of CD8 α beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells / V.Groh, R.Rhinehart, J.Randolph-Habecker et al. // *Nat. Immunol.* – 2001. – Vol. 2. – P. 255-260.
39. Vetter, C.S. Expression of CD94/NKG2 subtypes on tumor-infiltrating lymphocytes in primary and metastatic melanoma / C.S.Vetter, P.T.Straten, P. Terheyden et al. // *J. Invest. Dermatol.* -2000. –Vol.114. –P.941-947.
40. Mantovani, A. Macrophages polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes / A.Mantovani, S.Sozzani, M. Locati et al. // *Trends Immunol.*-2002.-Vol. 23.-P. 549-555.
41. Martinez, F.O. Transcriptional profiling of the human monocytemacrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression / F.O. Martinez, S.Gordon, M.Locati, A.Mantovani // *J. Immunol.*-2006.-Vol. 177.-P. 7303-7311.
42. Ohm, J. E. VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency / J. E.Ohm, D. P. Carbone // *Immunol. Res.*-2001.-Vol. 23.-P. 263-272.

43. Thomas, D.A. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance /D.A.Thomas, J.Massague // *Cancer cell.* – 2005. – Vol.8. –P.369-380.
44. Allen-Mersh, T.G. Role of circulating tumor cells in predicting recurrence after excision of primary colorectal carcinoma / T.G.Allen-Mersh, T.K.McCullough, H.Patel et al. // *Br. J. Surg.* – 2007. – Vol. 94. – P. 96-105.
45. Bendelac, A. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function/A.Bendelac, V.N.Rivera, S.H.Park, J.H. Roferk // *Ann. Rev. Immunol.* – 1997. – Vol. 15/ - P.535-562.
46. Elsakov, P. The contribution of founder mutations in BRCA1 to breast and ovarian cancer in Lithuania / P.Elsakov,J. Kurtinaitis, S.Petratis et. al. // *Clin genet.*-2010. – Vol. 78. – P. 373-376.
47. Blume-Jensen, P. Oncogenic kinase signaling /P.Blume-Jensen, T.Hunter // *Nature.* – 2001. – Vol. 411. – P. 355-365.
48. Medzhitov, R. Innate immune recognition: mechanisms and pathways / R.Medzhitov, C.A. Janeway // *Immunol. Rev.* – 2000. – Vol. 173. – P. 89-97.
49. Zijlmans, H.J. Role of tumor-derived proinflammatory cytokines GM-CSF, TNF-alpha, and IL-12 in the migration and differentiation of antigen-presenting cells in cervical carcinoma / H.J. Zijlmans,G.J.Fleuren, H.J. Baelde et al. // *Cancer (Philad.)*. -2006. –Vol.109. –P.556-565.
50. Datta, S.R.Cellular survival: a play in three Acts/ S.R. Datta, A.Brunet, M.E. Greenberg // *Genes Dev.* – 1999. – Vol. 13. – P. 2905-2927.
51. Carr, W.H. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand/ W.H. Carr, M.J.Pando, P.Parham // *J. Immunol.*-2005.-Vol. 175.-P.5222-5229.
52. Christopher, S.N.G. Mechanisms of immune evasion by renal cell carcinoma: Tumor-induced T-lymphocyte apoptosis and NFkB suppression /S.N.G. Christopher,A.C. Novick, C.H. Tannenbaum et al. // *Urology.* – 2002. – Vol. 59. – P. 9-14.

53. Chung, Y.K. An electrical biosensor for the detection of circulating tumor cells / Y.K. Chung, J.Reboud, K.C. Lee et al. // *Biosens. Bioelectron.* – 2010. – Vol. 26(5).–P. 2520-2526.
54. O'Reilly, M.S. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma / M.S. O'Reilly, L.Holmgren, Y.Shing et al. // *Cell.* – 1994. – Vol. 79. – P. 315-328.
55. Morel, Y.The TNF superfamily members LIGHT and CD154 (CG40 ligand) costimulate induction of dendritic cell maturation and elicit specific CTL activity /Y.Morel, A.Truneh, R. W. Sweet et al.// *J. Immunol.*-2001.-Vol. 167.-P. 2479-2486.
56. Steeg, P.S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges // *Nat. Med.* – 2006. – Vol. 12(8). – P. 895-904.
57. Nair, S. Injection of immature dendritic cells into adjuvant-treated skin obviates the need for ex vivo maturation / S.Nair, C. McLaughlin, A. Weizer et al. // *J. Immunol.*-2003.-Vol. 171.-P. 6275-6282.
58. Raulet, D.H. Self-tolerance of natural killer cells / D.H. Raulet, R.E. Vance // *Nat. Rev. Immunol.* – 2006. – Vol. 6. – P. 520-531.
59. Zhang, Q. Adoptive transfer of tumor-reactive transforming growth factor-beta insensitive CD8+T cells: Eradication of autologous mouse prostate cancer / Q.Zhang, X. Yang, M. Pins et al. // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65. – P. 1761-1769.
60. Raffaghello, L. Immunotherapy of neuroblastoma: present, past and future / L.Raffaghello, V.Pistoia // *Expert. Rev. Neurother.*-2006.-Vol. 6.-P. 509-518.
61. Darnell, J.E. Jr. JakSTAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins / J.E. Jr. Darnell,I.M.Kerr, G.R. Stark // *Science.* – 1994. – Vol. 264. – P. 1415-1421.
62. O'Garra, A. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation / A.O'Garra, N.Arai // *Trends Cell. Biol.* – 2000. – Vol. 10. – P. 542-550.
63. Rane, S.G. Janus kinases: components of multiple signaling pathways / S.G. Rane, E.P. Reddy // *Oncogene.* – 2000. – Vol. 19. – P. 5662-5679.

64. Shankaran, V. IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity / V.Shankaran, H. Ikeda, A.T. Bruce et al. // *Nature*. – 2001. – Vol. 410. – P. 1107-1111.
65. Wallach, D. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms/ D.Wallach, E.E.Varfolomeev, N.L. Malinin et al. // *Annu. Rev. Immunol.* – 1999. – Vol. 17. – P. 331.
66. Кадагидзе З.Г. Цитокины // *Практ. онкол.* – 2003. – №3. – С.131-139.
67. Симбирцев, А.С. Цитокины: классификация и биологические функции // *Цитокины и воспаление.* – 2004. – №2. – С.16-21.
68. Allavena, P. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages / P. Allavena, L. Piemonti, D. Longoni et al. // *Europ. J. Immunol.* – 1998. – Vol. 28. – P. 359-369.
69. Bettelli, E. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH 17 and regulatory T cells / E.Bettelli, Y.Carrier, W. Gao et al. // *Nature*. – 2006. – Vol. 441. – P. 235-238.
70. Hunter, C.A. New IL-12-family members: IL-23 and Il-27, cytokines with divergent functions // *Nat. Rev. Immunol.* – 2005. – Vol. 5. – P. 521-531.
71. Li, M.O. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses / M.O. Li, Y.Y.Wan, S. Sanjabi et al. // *Annu. Rev. Immunol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 99-146.
72. Mocellin, S. Interleukin-10 and immune response against cancer: A counterpoint / S.Mocellin, F.M.Marincola, H.A. Young // *J. Leukoc. Biol.* – 2005. – Vol. 78. – P. 1043-1051.
73. Ferrara, R. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis / R.Ferrara, H.P. Gerber // *Acta Haematol.* – 2001. – Vol. 106. – P. 148-166.
74. Huang, B. Gr-1+CD115+immature myeloid suppressor cells mediated the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor – bearing host / B.Huang,P.Y.Pan, Q.Li et al. // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66. – P. 1123-1131.
75. Kerbel, R.S. Tumor angiogenesis: past, present and the near future // *Carcinogenesis.* – 2000. – Vol. 21. – P. 505-515.

76. Kusmartsev, S. Antigen-specific inhibition of CD8⁺T cells response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species / S.Kusmartsev, Y.Nefedova, D. Yoder, D.Gabrilovich // *Immunol.* – 2004. – Vol. 172. – P. 989-999.
77. Colonna, M. Plasmacytoid dendritic cells in immunity / M. Colonna, G.Trinchieri, Y.J. Liu // *Nat. Immunol.* – 2004. – Vol. 5. – P. 1219-1226.
78. Figdor, C.G. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way / C.G. Figdor, I.J.de Vris, W.J.Lesterhuis, C.J. Melief // *Nat. Med.* – 2004. – Vol. 10. – P. 475-480.
79. Gerundolo, V. Dendritic cells: A journey from laboratory to clinic / V.Gerundolo, I.F.Hermans, M.Salio et al. // *Nat. Immunol.* - 2000. - № 5. - P. 7-10.
80. Torre-Amione, G. A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance / G.Torre-Amione, R.D.Beauchamp, H.Koeppen et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*. – 1990. – Vol.87. – P.1486-1490.
81. Toutirais, O. Constitutive expression of TGF-beta1, interleukin-8 by tumor cells as a major component of immune escape in human ovarian carcinoma / O.Toutirais, P.Chartier, D.Dubois et al. // *Europ. Cytokine netw.* -2003. – Vol. 14. – P. 246-255.
82. Брондз, Б.Д. Т-Лимфоциты и их рецепторы в иммунологическом распознавании. // М.: Наука, 1987. – 471 с.
83. Дейчман, Г.И. Естественный отбор и ранние изменения фенотипа опухолевых клеток *in vivo*: приобретение механизмов защиты // *Биохимия.* – 2000. – №65. – С. 92-111.
84. Суслов, А.П. Макрофаги и противоопухолевый иммунитет // *ВИНИТИ. Итоги науки и техники. Серия Онкология.* – 1990. – Т. 19. – С. 1-162.
85. Boon, T. Tumor antigens recognized by T-lymphocytes / T. Boon, J.-C.Cerottini, Van den Eynde B. et al. // *Ann. Rev. Immunol.* – 1994. – Vol. 12. – P. 337-365.

86. Deichman, G.I. Cell transforming genes and tumor progression: in vivo unified secondary phenotypic cell changes // *Int. J. Cancer.* – 1998. – Vol. 75. – P. 277-283.
87. Liyanage, U.K. Prevalence of regulatory T-cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas and breast adenocarcinoma / U.K.Liyanage, T.T.Moor, H.G. Joo et al. // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 10. – P. 2756-2761.
88. Shevach, E.M. CD4+CD25+suppressor T-cells: More questions than answers // *Nat. Rev. Immunol.* – 2002. – Vol. 2. – P. 389-400.
89. Shevach, E.M. Fatal attraction: Tumors beckon regulatory T cells // *Nat. Med.* – 2002. – Vol. 10. – P. 900-901.
90. Medzhitov, R. Innate immunity: impact on the adaptive immune response / R.Medzhitov, C.A. Janeway // *Current Opinion in Immunology.* – 1997. – Vol. 9. – P. 4-9.
91. Medzhitov, R. Innate immunity: the virtues of a nonclicional system of recognition / R.Medzhitov, C.A. Janeway // *Cell.* – 1997. – Vol. 91. – P. 295-298.
92. Ricobon, A. Immunosuppression in renal cancer: Differential expression of signal transduction molecules in tumor-infiltrating, near-tumor tissue, and peripheral blood lymphocytes / A.Ricobon, R.Gunelli, R.Ridolphi et al. // *Cancer Invest.* - 2004. – Vol. 22. – P. 871-877.
93. Schmielau, J. Suppressed T-cell receptor zeta chain expression and cytokine production in pancreatic cancer patients / J.Schmielau, M.Nalesnik, O.J. Finn // *Clin. Cancer Res.* – 2001. – Vol. 7 (Suppl. 3). – P. 933-939.
94. Schreiber, H. Tumor immunology, 1993 // *Fundamental Immunology.* Third Edition. W.E. Paul, editor. – Raven Press, Ltd., New York – P. 1143-1178.
95. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний / Под ред. П. И. Переводчиковой .-3-е изд., доп. и пер.-М.: Практическая медицина .2011-512 с.

96. Копнин, Б.П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза (обзор) // Биохимия. – 2000. – Т.65. – С.5-33.
97. DePinho, R.A. The age of cancer // Nature. – 2000. – Vol. 408. – P. 248-254.
98. Enver, T. Loops, lineage, and leukemia / T.Enver, M.Greaves // Cell. – 1998. – Vol. 94. – P. 9-12.
99. Evan, G.I. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer / G.I. Evan, K.H. Vousden // Nature. – 2001. – Vol. 411. – P. 342-348.
100. Green, D.R. Apoptotic pathways: the roads to ruin // Cell. – 1998. – Vol. 94. – P. 695-698.
101. Green, D.R. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors // Cell. – 2000. – Vol. 102. – P. 1-4.
102. Heldin, C.-H. Signal transduction: multiple pathways, multiple options for therapy // Stem Cells. – 2001. – Vol. 19. – P.295-303.
103. Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis // Nature. – 2000. – Vol. 407. – P. 770-776.
104. McClatchey, A.I. Modeling metastasis in the mouse // Oncogene. – 1999. – Vol. 18. – P. 5334-5339.
105. Ponder, B.A.J. Cancer genetics // Nature. – 2001. – Vol. 411. – P. 336-341.
106. Roovers, K. Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery / K.Roovers, R.K. Assoian // BioEssays. – 2000. – Vol. 22. – P. 818-826.
107. Saaristo, A. Mechanisms of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis / A. Saaristo, T. Karpanen, K. Alitalo // Oncogene. – 2000. – Vol. 19. – P. 6122-6129.
108. Bertucci, F. Breast cancer revisited using DNA array-based gene expression profiling / F.Bertucci, P.Viens, P. Hingamp et al. // Int. J. Cancer. – 2003. – Vol. 103. – P. 565-571.

109. Schmitt, C.A. Apoptosis and therapy /C.A.Schmitt, S.W. Lowe // *J. Pathol.* – 1999. – Vol. 187. – P. 127-137.
110. Schwartz, M.A. Interactions between mitogenic stimuli, or, a thousand and one connections / M.A. Schwartz, V. Baron // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1999. – Vol. 11. – P. 197-202.
111. Shay, J.W. When do telomeres matter? / J.W. Shay, D.E. Wright // *Science.* – 2001. – Vol. 291. – P. 839-840.
112. Sherr, C.J. The Pezcoller Lecture: Cancer Cell Cycles Revisited // *Cancer Res.* – 2000. – Vol. 60. – P. 3689-3695.
113. Arun, B. The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention / B. Arun, P. Goss // *Semin. Oncol.* – 2004. – Vol. 31 (Suppl. 7). – P. 22-29.
114. Honecker, F. New insights into the pathology and molecular biology of human germ cell tumors / F. Honecker, J.W. Oosterhuis, F. Mayer et al. // *World J. Urol.* – 2004. – Vol. 22. – P. 15-24.
115. Sherr, C.J. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression / C.J. Sherr, J.M. Roberts // *Gen. Dev.* – 1999. – Vol. 13. – P. 1501-1512.
116. Sherr, C.J., DePinho R.A. Cellular Senescence: Mitotic Clock or Culture Shock? // *Cell.* – 2000. – Vol. 102. – P. 407-410..
117. Stambolic, V. Modulation of cellular apoptotic potential: contributions to oncogenesis /V. Stambolic, T.W. Mak, J.R. Woodgett // *Oncogene.* – 1999. – Vol. 18. – P. 6094-6103.
118. *The Genetic Basis of Human Cancer* / Eds B. Vogelstein, K.W. Kinzler. – McGraw Hill. – New York, 1998.
119. Zhu, L. Coordinating cell proliferation and differentiation /L. Zhu, A.I. Skoultchi // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2001. – Vol. 11. – P. 91-97.
120. Folkman, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1990. – Vol. 82. – P. 4-6.
121. Hanahan, D. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis / D. Hanahan, J. Folkman // *Cell.* – 1996. – Vol. 86. – P. 353-364.

122. Lauren, J. Is angiopoietin-2 necessary for initiation of tumor angiogenesis? / J.Lauren, Y.Gunji, K.Alitalo // *Amer. J. Pathol.* – 1998. – Vol. 153. – P. 1333-1339.
123. Martiny-Baron, G. VEGF-mediated tumour angiogenesis: a new target for cancer therapy / G. Martiny-Baron, D.Marme // *Current opinion in Biotechnology.* – 1995. – Vol. 6. – P. 675-680.
124. O'Reilly, M.S. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth/ M.S.O'Reilly, T.Boem, Y. Shing et al. // *Cell.* – 1997. – Vol. 88. – P. 277-285.
125. Risau W. Mechanisms of angiogenesis // *Nature.* – 1997. – Vol. 386. – P. 671-674.
126. Senger, D.R. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology/ D.R. Senger, Van De Water L., L.F. Brown et al. // *Cancer and Metastasis Rev.* – 1993. – Vol. 12. – P. 303-324.
127. Bosch, F.X. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer / F.X.Bosch, A.Lorincz, N.Munoz et al. // *J. Clin. Pathol.* – 2002. – Vol. 55. – P. 244-265.
128. Folkman, J. Role of angiogenesis in tumour growth and metastasis // *Semin. Oncol.* – 2002. – Vol. 29 (Suppl. 16). – P. 15-18.
129. Graziano, D.F. Tumor antigens and tumor antigen discovery /D.F. Graziano, O.J. Finn // *Cancer. Treat. Res.* – 2005. – Vol. 123. – P. 89-111.
130. Хансон, К.П. Современные представления о канцерогенезе рака шейки матки / К.П. Хансон, Е.Н. Имянитов // *Практич. онкол.* – 2002. – №3. – С. 145-155.
131. Adlard, J.W. Prediction of the response of colorectal cancer to systemic therapy / J.W. Adlard, S.D.Richman, M.T.Seymour, P.Quirke // *Lancet Oncol.* – 2002. – Vol. 3. – P. 75-82.
132. Fisher, R.I. Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma / R.I. Fisher, S.A.Rosenberg, G.Fife // *Cancer J. Sci. Amer.* – 2000. – Vol. 6 (Suppl. 1). – P. 55-57.

133. Pleasance, E.D. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome / E.D. Pleasance, R.K.Cheetham, P.J. Stephens et al. // Nature. – 2009 (in press).
134. Riley, L.B. The molecular basis of cancer and the development of targeted therapy / L.B. Riley, D.C. Desai // Surg. Clin. North. Amer. – 2009. – Vol. 89. – P. 1-15.
135. Хансон, К.П. Функциональная онкогеномика – новое направление в молекулярной онкологии / К.П. Хансон, Е.Н. Имянитов // Молекулярная медицина. – 2004. – Т. 1. – С. 3-9.
136. Dieckmann, K.P. Clinical epidemiology of testicular germ cell tumors / K.P.Dieckmann, U.Pichlmeier // World J. Urol. – 2004. – Vol. 22. – P. 2-14.
137. Ichihara, M. RET and neuroendocrine tumors / M. Ichihara, Y. Murakumo, M. Takahashi // Cancer Lett. – 2004. – Vol. 204. – P. 197-211.
138. Kopnin B. Genetic events responsible for colorectal tumorigenesis: achievements and challenges // Tumori.-1993.-Vol. 79.-P. 235-243.
139. McDermott, D.F. Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma / D.F. McDermott, M.M.Regan, J.I. Clark et al. // J. Clin. Oncol. – 2005. – Vol. 23. – P. 133-141.
140. Имянитов Е.Н. Молекулярная диагностика в онкологии // Мол. биол. – 2008. – Т. 42. – №5. – С. 1-14.
141. Croce C.M. Oncogenes and cancer // New Engl. J. Med. – 2008. – Vol. 358. – P. 502-511.
142. Имянитов, Е.Н. Молекулярная онкология: клинические аспекты. / Е.Н. Имянитов, К.П. Хансон // СПб.: СПбМАПО, 2007. – 214 с.
143. Hesketh R. The Oncogene Handbook Academic press. – New York, 1995.
144. Lodish H. et al. Molecular Cell Biology // Scient. Amer. Books, Inc. – New York, 1995.

145. Brandel, C. Introduction to Protein Structure. / C.Brandel, J.Tooze //Garland Publishing, Inc. – New York, 1998.
146. Hunter T. Signaling-2000 and Beyond // Cell. – 2000, January 7. – Vol. 100. – P. 113-127.
147. Klausner, R. The fabric of cancer cell biology-weaving together the strands // Cancer Cell. – 2002. – Vol. 1. – P. 3-10.
148. Nigg, E. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints // Nature Rev. – 2001. – Vol. 2. – P. 21-32.
149. Robinson,D. The protein tyrosine kinase family of the human genome / D.Robinson,Y.M.Wu, S.F. Lin // Oncogene. – 2000. – Vol. 19. – P. 5548-5557.
150. Testori, A. Phase III comparison of Vitespen, an autologous tumor-derived heat shock protein gp96 peptide complex vaccine, with physician's choice of treatment for stage IV melanoma: The C-100-21 study group / A.Testori, J.Richards, I. Whitman et al. // J. Clin. Oncol. – 2008. – Vol. 26. – P. 955-962.
151. Van Herpen, C.M. Immunochemotherapy with interleukin-2, interferon-alfa and 5-fluorouracil for progressive metastatic renal cell carcinoma: A multicenter phase II study / C.M.van Herpen, R.L.Jansen, W.H. Kruit et al. // Brit. J. Cancer. – 2000. – Vol. 82. – P. 772-776.
152. Yang, J.C. Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer / J.C. Yang, R.M.Sherry, S.M. Steinberg et al. // J. Clin. Oncol. – 2003. – Vol. 21. – P. 3127-3132.
153. Cancer Immunome Database Ludwig Institute for Cancer Research, Office of information Technology.-Lausanne, Switzerland [http:// www2.licr.org/Cancer-ImmunomeDB/](http://www2.licr.org/Cancer-ImmunomeDB/)
154. Database of human tumor antigens recognized by T cells. Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori (INT).-Milan, Italy. http://www.institutomori.mi.it/INT/AreaProfessionale/human_Tumor/default.asp?LinkAttivo=17B

155. Garner, M.J. Epidemiology of testicular cancer: an overview / M.J. Garner, M.C.Turner, P.Ghadirian, D.Krewski // *Int. J. Cancer.* – 2005. – Vol. 116. – P. 331-339.
156. Giaccone, G. EGFR inhibitors: what have we learned from the treatment of lung cancer? /G. Giaccone, J.A. Rodriguez // *Nat. Clin. Pract. Oncol.* – 2005. – Vol. 2. – P. 554-561.
157. Guevara-Patino, J.A. Optimization of a self antigen for presentation of multiple epitopes in cancer immunity / J.A. Guevara-Patino, M.E. Engelhorn et al. // *J Clin. Invest.* – 2006. – Vol. 116. – P. 1382-1390.
158. Wolfel, T. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma /T.Wolfel, M.Hauer, J.Schneider et al. // *Science.* –1995. –Vol.269. –P.1281-1284.
159. Чумаков П.М. Функция гена p53: выбор между жизнью и смертью // *Биохимия.* – 2000. – №65. – С. 34-47.
160. Blagosklonny M.V. Do VHL and HIF-1 mirror p53 and Mdm-2. Degradation-transactivation loops of oncoproteins and tumor suppressors // *Oncogene.* – 2001. – Vol. 20. – P. 395-398.
161. Ghebranious, N. Mouse models in tumor suppression / N. Ghebranious, L.A. Donehower // *Oncogene.* – 1998. – Vol. 17. – P. 3385-3400.
162. Grana, X. Role of the retinoblastoma protein family, pRb, p107 and p130 in the negative control of cell growth / X. Grana, J.Garriga, X.Mayol // *Oncogene.* – 1998. – Vol. 17. – P. 3365-3383.
163. Graziano, F. Prognostic molecular markers for planning adjuvant chemotherapy trials in Dukes' B colorectal cancer patients: how much evidence is enough? / F.Graziano, S.Cascinu // *Ann. Oncol.* – 2003. – Vol. 14. – P. 1026-1038.
164. Guttman, D.H. Functional analysis of neurofibromatosis 2 (NF2) missense mutations/ D.H.Guttman, A.C.Hirbe, C.A. Haipek // *Hum. Mol. Genet.* – 2001. – Vol. 10. – P. 1519-1529.
165. Knudson, A.G. Antioncogenes and human cancer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – Vol. 90. – P. 10914-10921.

166. Kastan, M.B. The many substrates and functions of ATM / M.B. Kastan, D.S. Lim // *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2000. – Vol. 1. – P. 179-186.
167. Kinzler, K.W. Gatekeepers and caretakers / K.W. Kinzler, B.Vogelstein // *Nature.* – 1997. – Vol. 386. – P. 761-763.
168. Kolodner, R.D. Eukaryotic DNA mismatch repair /R.D.Kolodner, G.T.Marsischky // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 1999. – Vol. 9. – P. 89-96.
169. Lehman, A.R. The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases // *Gen. Dev.* – 2001. – Vol. 15. – P. 15-23.
170. Levine, A.J. P53, the cellular gatekeeper for growth and division // *Cell.* – 1997. – Vol. 88. – P. 323-331.
171. Maehama, T. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase / T.Maehama, J.E.Dixon // *Trends Cell Biol.* – 1999. – Vol. 9. – P. 125-128.
172. Massagué, J. TGF β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders/ J.Massagué, S.W.Blain, R.S. Lo // *Cell.* – 2000. – Vol. 103. – P. 295-309.
173. Paggi, M.G. Who is the boss in the retinoblastoma family? The point of view Rb2/p130, the little brother / M.G.Paggi, A.Giordano // *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61. – P. 4651-4654.
174. Criscitiello, C. Circulating cancer cells and emerging blood biomarkers in breast cancer/ C. Criscitiello, C.Sotirou, M.Ignatiadis // *Curr. Opin. Oncol.* – 2010. – Vol. 22. – P. 552-558.
175. Nelson, N.J. Circulating tumor cells: will they be clinically useful? // *J.Natl Cancer Inst.* – 2010. – Vol. 102. – P. 146-148.
176. Gudmundsdottir, K. The roles of BRCA1 and BRSA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability/ K. Gudmundsdottir, A.Ashworth // *Oncogene.* – 2006. – Vol. 25. – P. 5864-5874.
177. Miki, Y. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1 / Y.Miki, J.Swensen, D. Shattuck-Eidens et al. // *Science.*-1994.- Vol. 226.-P. 66-71

178. Wooster, R. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 / R.Wooster, G. Bignell, L.Lancaster et al. // Nature.-1995.-Vol. 378.-P. 789-792.
179. Hemel, D. Breast cancer predisposition syndromes / D.Hemel, S. M. Domchek // Hematol. Oncol. Clin. North. Amer. – 2010. – Vol. 24. – P. 799-814.
180. Kurian, A. W/ BRCA1 and BRCA2 mutations across race and ethnicity : distribution and clinical implications // Curr. Opin. Obstet. Gynecol. -2010.-Vol.22.-P.72-78.
181. Neuhausen, S. L., Founder populations and their uses for breast cancer genetics // Breast Cancer Res.-2000.-Vol. 2.-P. 77-81.
182. Gayther, S.A. Frequently occurring germ-line mutations of the BRCA1 gene in ovarian cancer families from Russia / S.A.Gayther, P.Harrington, P. Russell et al. // Amer. J. Hum. Genet. – 1997. – Vol. 60. – P. 1239-1242.
183. Grudinina, N.A. Prevalence of widespread BRCA1 gene mutations in patients with familial breast cancer from St. Peterburg / N.A.Grudinina,V.I. Golubkov, O.S. Tichomirova et al. // Russ/ J/ Genet. – 2005. – Vol. 41. – P. 318-322.
184. Loginova, A. N. Spectrum of mutations in BRCA1 gene in hereditary forms of breast and ovarian cancer in Russian families / A. N.Loginova, N. L.Pospekhova, L.N.Lyubchennko, et al. // Bull. Exp. Biol. Med. -2003.-Vol.- 136.-P.276-278.
185. Smirnova, T. Y. High incidence of mutations in BRCA1 and BRCA2 genes in ovarian cancer / T. Y. Smirnova, N. L.Pospekhova, L.N.Lyubchennko, et al. // Bull. Exp. Biol. Med.-2007-Vol. 144.-P. 83-85.
186. Smyth, M.Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cells protection from tumor metastases / M.Smyth, E.Gretney, K. Takeda et al. // J. Exp. Med. – 2001. – Vol. 193. – P. 661-670.
187. Smyth, I.A. A novel pathway of antigen presentation by dendritic and endothelial cells: Implications for allorecognition and infectious diseases / I.A.Smyth, O.B.Herrera, D.Golshayan et al. // Transplantatiion. – 2006. – Vol.82. – P.15-18.

188. Suspitsin, E. N. High frequency of BRCA1, but not CHEK2 or NBS1 (NBN), founder mutations in Russian ovarian cancer patients / E. N.Suspitsin, N. Y.Sherina, D. N. Ponomariova et al. // *Hered. Cancer Clin. Pract.* -2009.-Vol. 7.-P. 5.
189. Tereschenko, I. V. BRCA1 and BRCA2 mutations in Russian familial breast cancer / I. V.Tereschenko, V. M. Basham, B. A.Ponder, P. D. Pharoah // *Hum. Mutat.* -2002.-Vol. 19.-P. 184.
190. Gorski, B. Breast cancer predisposing alleles in Poland / B.Gorski, C.Cybulski, T.Huzarski et al. // *Breast Cancer Res. Treat*– 2005. – Vol. 92. – P. 19-24.
191. Reilly, R. T. The collaboration of both humoral and cellular HER-2/neu-targeted immune responses is required for the complete eradication of HER-2/neu-expressing tumors / R. T.Reilly, J. P. Machiels, L. F. Emens et al. // *Cancer Research.* -2001.-Vol. 61.-P. 880-883.
192. Polakis, P. More than one way to skin a catenin // *Cell.* – 2001. – Vol. 105. – P. 563-566.
193. Prives, C. The p53 pathway / C.Prives, P.A. Hall // *J. Path.* – 1999. – Vol. 187. – P. 112-126.
194. Ruas, M. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives / M.Ruas, G.Peters // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1998. – Vol. 1378. – P. F115-F177.
195. Sionov, R.V. The cellular response to p53: the decision between life and death / R.V.Sionov, Y.Haupt // *Oncogene.* – 1999. – Vol. 18. – P. 6145-6157.
196. Lambros, M.B. Chromogenic and fluorescent in situ hybridization in breast cancer / M.B. Lambros, R.Natrajan, J.S. Reis-Filho // *Hum. Pathol.* – 2007. – Vol. 38. – P. 1105-1122.
197. Lo, Y.M. Introduction to the polymerase chain reaction / Y.M.Lo, K.C. Chan // *Methods Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 336. – P. 1-10.
198. McAllister, S.S. Systemic endocrine instigation of indolent tumor growth requires osteopontin / S.S.McAllister, A.M.Gifford, A.L. Greiner et al. // *Cell.* – 2008. – Vol. 133. – P. 994-1005.

199. Minna, J.D. Tumor mRNA expression profiles predict responses to chemotherapy/ J.D.Minna, L.Girard, Y.Xie // *J. Clin. Oncol.* – 2007. – Vol. 25. – P. 4329-4336.
200. Vander Heiden, M.G. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation / M.G.Vander Heiden, L.C.Cantley, C.B. Thompson // *Science.* – 2009. – Vol. 324. – P. 1029-1033.
201. Walker, R.A. Quantification of immunohistochemistry issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I // *Histopathology.* – 2006. – Vol. 49. – P. 406-410.
202. Shiloh, Y. Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart // *Annu. Rev. Genet.* – 1997. – Vol. 31. – P. 635-662.
203. Taipale, J. The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer /J.Taipale, P.A. Beachy // *Nature.* – 2001. – Vol. 411. – P. 3503-3540.
204. Crnic, I. Novel technologies and recent advances in metastasis research /I. Crnic, G.Christofori // *Int. J. Dev. Biol.* – 2004. – Vol. 48(5-6). – P. 573-581.
205. Gupta, G.P. Cancer metastasis: building a framework / G.P.Gupta, J. Massague // *Cell.* – 2006. – Vol. 127(4). – P. 679-695.
206. Pantel, K. Dissecting the metastatic cascade / K.Pantel, R.H. Brakenhoff // *Nat. Rev. Cancer.* – 2004. – Vol. 4(6). – P. 448-456.
207. Weinberg, R.A. *The biology of cancer* / Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. – New York, 2007.
208. Alix-Panabieres, C. Circulating tumor cells and bone marrow micrometastases /C.Alix-Panabieres, S. Riethdorf, K. Pantel // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14. – P. 5013-5021.
209. Pantel, K. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells /K.Pantel, R.H. Brakenhoff et al. // *Nat.Rev. Cancer.* – 2008. – Vol. 8(5). – P. 329-340.
210. Smerage, J.B. The measurement and therapeutic implications of circulating tumour cells in breast cancer/ J.B.Smerage, D.F. Hayes // *Br. J. Cancer.* – 2006. – Vol. 94 (1). – P. 8-12.

211. Budd, G.T. Circulating tumor cells versus imaging—Predicting overall survival in metastatic breast cancer /G.T.Budd, M. Cristofanilli et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – Vol. 12(21). – P. 6403-6409.
212. Cristofanilli, M. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer/ M. Cristofanilli, G.T.Budd, M.J. Ellis *et al.* // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – Vol. 351. –№ 8. – P. 781-791.
213. Cristofanilli, M. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer /M. Cristofanilli, D.F.Hayes, G.T.Budd *et al.* // *J. Clin. Oncol.* – 2005. – Vol. 23. – P. 1420-1430.
214. Crowe, N.Y. Differential antitumor immunity mediated by NKT cells subsets in vivo /N.Y.Crowe, J.M.Coquet, S.P. Berzins et al. // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol. 202. – P. 1279-1288.
215. Gerges, N. Biomarkers in cancer micrometastasis: where are we at? /N.Gerges, N.Jabado // *Bioanalysis.* – 2010. – Vol. 2. – P. 881-899.
216. Allard, W.J. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases / W.J.Allard, J. Matera et al. // *Clin. Cancer Res.* –2004. – Vol. 10(20). – P. 6897-6904.
217. Elshimali, Y.I. The clinical significance of circulating tumor cells in the peripheral blood / Y.I.Elshimali, W.W. Grody // *Diagn. Mol. Pathol.* – 2006. – Vol. 15. – P. 187-194.
218. Paterlini-Brechot, P. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions / P.Paterlini-Brechot, N.L. Benali // *Cancer Lett.* – 2007. – Vol. 253. – P. 180-204.
219. Andreopoulov, E. Circulating tumor cells as prognostic markers in metastatic breast cancer / E.Andreopoulov, M.Cristofanilli // *Exp. Rev. Anticancer Therapy.* – 2010. – Vol. 10. – P. 171-177.
220. Cristofanilli, M. Circulating tumor cells revisited / M.Cristofanilli, S.Braun // *JAMA.* – 2010. – Vol. 303. – P. 1092-1093.
221. Mavroudis, D. Circulating cancer cells // *Ann. Oncol.* – 2011. – Vol. 21 (Suppl. 7). – P. 95-100.

222. Ignatiadis, M. HER2-positive circulating tumor cells in breast cancer /M.Ignatiadis, F.Rothè, C. Chaboteaux *et al.* // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6. – P. 1-6.
223. Jacob, K. Circulating tumor cells: detection, molecular profiling and future prospects/K.Jacob, C Sollier., N.Jabado // *Expert Rev. Proteomics.* – 2007. – Vol. 4. – P. 741-756.
224. Mata, M., Circulating tumor cells: utility for predicting response to anti-EGFR therapies? / M.Mata, M.Raponi // *Expert Rev. Mol. Diagn.* – 2009. – Vol. 9. – P. 115-119.
225. Stakeborg, T. Automated genotyping of circulating tumor cells/ T. Stakeborg, C.Liu, O.Henry *et al.* // *Expert Rev. Mol. Diagn.* – 2010. – Vol. 10. – P. 723-729.
226. Den Tonder J. Circulating tumor cells: the Grand Challenge// *Lab. Chip.* – 2011. – Vol. 11. – P. 375-377.
227. Danova, M. Isolation of rare circulating tumor cells in cancer patients: technical aspects and clinical implications / M.Danova, M.Torchio, G.Mazzini // *Expert Review of Molecular Diagnostics.* – 2011. – Vol. 11. – N 5. – P. 473-485.
228. Dotan, E. Circulating tumor cells: evolving evidence and future challenges / E.Dotan,S.J. Cohen, K.R.Alpaugh, N.J. Meropol // *Oncologist.* – 2009. – Vol. 14.– P. 1070-1082.
229. Barok, M. Steps in metastasis research: analyzing, collecting and culturing circulating tumor cells /M.Barok, J. Szollosi // *Cytometry Part A.* – 2011. – Vol. 79A. – P. 93–94.
230. Yu, P. Priming of naive T cells inside tumors leads to eradication of established tumors / P.Yu, Y.Lee, W.Chin *et al.* // *Nat. Immunol.* – 2004. – Vol. 5. – P. 141-149.
231. Alunni-Fabbroni ,M. Circulating tumor cells in clinical practice: methods of detection and possible characterization / M.Alunni-Fabbroni, M.T. Sandri // *Methods.* – 2010. – Vol. 50. – P. 289-297.

232. Gertler, R. Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation /R. Gertler, R. Rosenberg, K.Fuehrer *et al.*// *Recent Results Cancer Res.* – 2003. – Vol. 162. – P. 149-155.

233. Rosenberg, R. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood / R. Rosenberg, R. Gertler, J. Friederichs *et al.* // *Cytometry.* – 2002. – Vol. 49. – P. 150-158.

234. Zheng, S. Membrane microfilter device for selective capture, electrolysis and genomic analysis of human circulating tumor cells / S.Zheng, H.Lin, J.Q .Liu *et al.* // *J. Chromatogr.* – 2007. – Vol. A. 1162. – P. 154-161.

235. De Giorgi, V. Application of a filtration- and isolation-by-size technique for the detection of circulating tumor cells in cutaneous melanoma / V.De Giorgi, P.Pinzani, F.Salvianti *et al.* // *J. Invest. Dermatol.* – 2010. – Vol. 130. – P. 2440-2447.

236. Wong, N.S. Prognostic significance of circulating tumour cells enumerated after filtration enrichment in early and metastatic breast cancer patients / N.S. Wong, H.J.Kahn, L.Zhang *et al.* // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2006. – Vol. 99. – P. 63-69.

237. Xu, T. A cancer detection platform which measures telomerase activity from live circulating tumor cells captured on a microfilter / T. Xu, B.Lu, Y.C.Tai, A.Goldkorn // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70. – P. 6420-6426.

238. Zheng, S. 3D microfilter device for viable circulating tumor cell (CTC) enrichment from blood / S.Zheng, H.K. Lin *et al* // *Biomedical Microdevices.* - 2011. - Vol. 13. - P. 203-213.

239. Martin, V.M. Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS / V.M.Martin, C.Siewert, A. Scharl *et al.* // *Exp. Hematol.* – 1998. – Vol. 26. – P. 252-264.

240. Talasaz, A.H. Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device / A.H. Talasaz,A.A.Powell, D.E. Huber *et al.* // *PNAS.* – 2009. – Vol. 106. – P. 3970-3975.

241. Chatzileontiadou, S. Circulating tumor cells in cancer patients: methodological contributions to their detection and immunomagnetic separation /

S.Chatzeleontiadou, S.Defanti, M. Manzoni *et al.* // *Cytometry*. – 2010. – Vol. 77A. – P. 194-195.

242. Stott, S.L. Isolation of circulating tumour cells using a microvortex-generating herringbone-chip / C.H.Hsu, D.I. Tsukrov *et al.* // *PNAS*. – 2010. – Vol. 107. – P. 18392-18397.

243. Deng, T. A sensitive fluorescence anisotropy method for the direct detection of cancer cells in whole blood based on aptamer-conjugated near-infrared fluorescent nanoparticles / T.Deng, J. Li, L.L. Zhang *et al.* // *Biosens. Bioelectron.* – 2010. – Vol. 25. – P. 1587-1591.

244. Eifler, R.L. Enrichment of circulating tumor cells from a large blood volume using leukapheresis and elutriation: proof of concept / R.L.Eifler, J. Lid, D. Falkenhagen *et al.* // *Cytometry B Clin. Cytom.* – 2010. – Vol. 80(2). – P. 100-111.

245. Jin, D. Time-gated flow cytometry: an ultra high selectivity method to recover ultra-rare-event μ -targets in high-background biosamples / D.Jin, J.A. Piper, R.C. Leif *et al.* // *J. Biomed. Opt.* – 2009. – Vol. 14. – P. 24-28.

246. Liu, G. Aptamer-nanoparticle strip biosensor for sensitive detection of cancer cells / G. Liu, X Mao., J.A Phillips., H.Xu, W.Tan, L. Zeng // *Anal. Chem.* – 2009. – Vol. 81. – P. 10013–10018.

247. Wang, X. Detection of circulating tumor cells in human peripheral blood using surface-enhanced Raman scattering nanoparticles / X. Wang, X.Qiang, J.J. Beitler *et al.* // *Cancer Res.* – 2011. – Vol. 71(5). – P. 1526-1532.

248. Zimmerlin, L. Rare event detection and analysis in flow cytometry: bone marrow mesenchymal stem cells, breast cancer stem/progenitor cells in malignant effusions, and pericytes in disaggregate adipose tissue / L.Zimmerlin, V.S. Donnenberg, A.D. Donnenberg // *Methods Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 699. – P. 251-273.

249. Bao, N. Microfluidic electroporation of tumor and blood cells: observation of nucleus expansion and implications on selective analysis and purging of circulating tumor cells / N.Bao, T.T. Le, J.X.Cheng, C.Lu // *Integr. Biol.* – 2010. – Vol. 2. – P. 113-120.

250. Breton, F. A mesofluidic multiplex immunosensor for detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients / F.Breton, B.Bennett, R.Liderau *et al.* // *Biomed. Microdevices.* – 2010. – Vol. 13(1). – P. 1-9.

251. Dharmasiri, U. High-throughput selection, enumeration, electrokinetic manipulation, and molecular profiling of low-abundance circulating tumor cells using a microfluidic system / U.Dharmasiri, S.K. Njoroge, M.A. Witek *et al.* // *Anal. Chem.* – 2011. – Vol. 83(6). – P. 2301-2309.

252. Hosokawa, M. Size-selective microcavity array for rapid and efficient detection of circulating tumor cells / M.Hosokawa, T. Hayata, Y.Fukuda *et al.* // *Anal. Chem.* – 2010. – Vol. 82. – P. 6629-6635.

253. Hsieh, Y.H. Highly sensitive rare cell detection based on quantum dot probe fluorescence analysis / Y.H.Hsieh, S.J.Liu, H.W.Chen, Y.K.Lin, K.S.Liang, L.J. Lai // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2010. – Vol. 396. – P. 1135-1141.

254. Lin, H.K. Portable filter-based microdevice for detection and characterization of circulating tumor cells / H.K.Lin, S. Zheng, A.J. Williams *et al.* // *Clin. Cancer Res.* – 2010. – Vol. 16. – P. 5011–5018.

255. Moon, H.S. Continuous separation of breast cancer cells from blood samples using multi-orifice flow fractionation (MOFF) and dielectrophoresis (DEP) / H.S. Moon, K.Kwon, S.I. Kim *et al.* // *Lab. Chip.* – 2011. – Vol. 11(6). – P. 1118-1125.

256. Galanzha, E.I. *In vivo* magnetic enrichment and multiplex photoacoustic detection of circulating tumor cells / E.I.Galanzha, E.V.Shashkov, T.Kelly, J.W.Kim, L.Yang, V.P. Zharov // *Nat. Nanotechnol.* – 2009. – Vol. 4. – P. 855-860.

257. Zemp R.J. Nanomedicine: detecting rare cancer cells // *Nat. Nanotechnol.* – 2009. – Vol. 4. – P. 798-799.

258. Hofman, V.J. Cytopathologic detection of circulating tumor cells using the isolation by size of epithelial tumor cell method / V.J.Hofman, M.I.Lie, C. Bonnetaud *et al.* // *Am J Clin Pathol.* -2011.-Vol.135.-P.146-156.

259. Franken, B. Circulating tumor cells disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer / B.Franken, M.R.de Groot, W.J. Mastboom *et al.* // *Breast Cancer Res.* –2012. –Vol. 14. –№ 5. –P.R 133.

260. Riethdorf, S. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial / S.Riethdorf, V.Muller, L.Zhang et al. // *Clin Cancer Res.* –2010. –Vol. 16. – № 9. –P.2634-2645.

261. Cohen, S.J. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer / S.J. Cohen, C.J.Punt, N.Lannotti et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol. 26. – № 19. – P. 3213–3221.

262. De Bono, J.S. Farnesyltransferase inhibitors and their potential in the treatment of breast carcinoma / J.S. De Bono, A.W.Tolcher, E.K. Rowinsky // *Semin. Oncol.* – 2003. – Vol. 30 (Suppl. 16). – P. 79-92.

263. Патютко, Ю.И. Влияние циркуляции опухолевых клеток в крови на прогноз при операциях на печени по поводу злокачественных опухолей / Ю.И. Патютко, И.В.Сагайдак, Н.Н. Тупицин и др. // *Хирургия.* –2011. –№ 4. –С.22–26.

264. Fehm, T. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells / T. Fehm, E.F.Solomayer, S.Meng et al.// *Cytotherapy.* –2005. –Vol. 7. –N2. –P.171-185

265. Сергеева Н.С., Маршутина Н.В. Серологические опухолевые маркеры и их применение в клинической онкологии/Под ред. В.И. Чиссова, С.Л. Дарьяловой. – М., 2000.

266. Chen, Y. Detection of cytokeratin 19, human mammaglobin and carcinoembryonic antigen-positive circulating tumor cells by three-marker reverse transcription-PCR assay and its relation to clinical outcome in early breast cancer / Y.Chen,T.N.Zou, Z.P. Wu et al. // *Int. J. Biol. Markers.* 2010. – Vol. 25. – P. 59-68.

267. Stathopoulou, A. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance / A. Stathopoulou, I.Vlachonikolis, D.Mavroudis et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2002. – Vol. 20. – P. 3404-3412.

268. Xenidis, N. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real time polymerase chain reaction in

node-negative breast cancer patients / N.Xenidis, M.Perraki, M.Kafousi *et al.* // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 3756-3762.

269. Hayes, D.F. Is there a role for circulating tumor cells in the management of breast cancer? / D.F.Hayes, J.Smerage // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14(12). – P. 3646-3650.

270. Krishnamurthy, S. Detection of minimal residual disease in blood and bone marrow in early stage breast cancer / S. Krishnamurthy, M.Cristofanilli, B.Singh *et al.* // *Cancer.* - 2010. – Vol. 116. – P. 3330-3333.

271. Zhao, S. The prognostic role of circulating tumor cells (CTC) detected by RT-PCR in breast cancer: a meta-analysis of published literature / S. Zhao, Y.Liu, Q. Zhang *et al.* // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2011. – Vol. 130(3). – P. 809-816.

272. Allen, J.E. Circulating tumor cells and colorectal cancer / J.E. Allen, W.El-Deiry // *Curr. Colorectal Cancer Rep.* – 2010. – Vol. 6. – P. 212-220.

273. Garrigos, N. Circulating tumor cell analysis as an early marker for relapse in stage II and III colorectal cancer patients: a pilot study / N.Garrigos, J.Gallego, C.Guillen-Ponce *et al.* // *Clin. Transl. Oncol.* – 2010. – Vol. 12. – P. 142-147.

274. Rahbari, N.N. Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer / N.N.Rahbari, M.Aigner, K.Thorlund *et al.* // *Gastroenterology.* – 2010. – Vol. 138. – P. 1714-1726.

275. Thorsteinsson, M. The clinical significance of circulating tumor cells in non metastatic colorectal cancer – a review/ M. Thorsteinsson, P.Jess // *Eur. J. Cancer Surg.* – 2011. – Vol. 37(6). – P. 459-465.

276. Helo, P. Circulating prostate tumor cells detected by reverse transcription-PCR in men with localized or castration-refractory prostate cancer: concordance with CellSearch assay and association with bone metastases and with survival / P.Helo, A.M.Cronin, D.C. Danila *et al.* // *Clin. Chem.* – 2009. – Vol. 55. – P. 765-773.

277. Graves, H. Circulating tumor cells in breast cancer patients: an evolving role in patient prognosis and disease progression / H.Graves, B.J. Czerniecki // *Patholog. Res. Int.* – 2011. – Jan. 3. – P. 621090.

278. Di Pietro, A. Testicular germ cell tumours: the paradigm of chemosensitive solid tumours / A.Di Pietro, E.G.Vries, J.A. Gietema et al. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 37. – P. 2437-2456.

279. Armakolas, A. Detection of the circulating tumor cells in cancer patients / A.Armakolas, Z.Panteleakou, A.Nazos et al. // *Future Oncol.* – 2010. – Vol. 6. – P. 1849-1856.

280. Miller, M.C. Significance of circulating tumor cells detected by the CellSearch™ system in patients with metastatic breast colorectal and prostate cancer / M.C. Miller, G.V.Doyle, L.W. Terstappen // *J. Oncol.* – 2010. – P. 617421.

281. Fehm, T. Determination of HER2 status using both serum HER2 levels and circulating tumor cells in patients with recurrent breast cancer whose primary tumor was HER2 negative or of unknown HER2 status / T. Fehm, S.Becker, S.Duerr-Stoerzer et al. // *Breast Cancer Res.* – 2007. – Vol. 9 (5). – P. R74.

282. Cohen, S.J. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer / S.J.Cohen, C.J.Punt, N.Lannotti et al. // *Ann. Oncol.* – 2009. – Vol. 20. P. 1223-1229.

283. Scher, H.I. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data / H.I. Scher, X.Jia, J.S. de Bono et al. // *Lancet Oncol.* – 2009. – Vol. 10. – P. 233-239.

284. Attard, G.Utilizing circulating tumor cells: challenges and pitfalls / G.Attard,J.S. de Bono // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2011. – Vol. 21. P. 50-58.

285. Baker, M.K. Molecular detection of breast cancer cells in the peripheral blood of advanced-stage breast cancer patients using multimarker real-time reverse transcription polymerase chain reaction and a novel porous barrier density gradient centrifugation technology / M.K.Baker, K.Mikhitarian et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2003. – Vol. 9(13). – P. 4865-4871.

286. Cote, R.J. Prediction of early relapse in patients with operable breast-cancer by detection of occult bone-marrow micrometastases / R.J. Cote, P.P. Rosen et al. // *J. Clin. Oncol.* – 1991. – Vol. 9(10). – P. 1749-1756.

287. Lara, O. Enrichment of rare cancer cells through depletion of normal cells using density and flow-through, immunomagnetic cell separation / O.Lara, X.D. Tong et al. // *Exp. Hematol.* – 2004. – Vol. 32(10). – P. 891–904.

288. Benez, A. Detection of circulating melanoma cells by immunomagnetic cell sorting / A.Benez, A. Geiselhart et al. // *J. Clin. Lab. Anal.* – 1999. – Vol. 13(5). – P. 229-233.

289. Racila, E. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood / E.Racila, D.Euhus et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1998. – Vol. 95(8). – P. 4589-4594.

290. Riethdorf, S. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the cell search system / S.Riethdorf, H. Fritsche et al.// *Clin. Cancer Res.* – 2007. – Vol. 13 (3). – P. 920-928.

291. Kahn, H.J. Enumeration of circulating tumor cells in the blood of breast cancer patients after filtration enrichment: correlation with disease stage / H.J. Kahn, A.Presta et al. // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2004. – Vol. 86(3). – P. 237-247.

292. Pinzani, P. Isolation by size of epithelial tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation with real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction results and feasibility of molecular analysis by laser microdissection / P.Pinzani, B.Salvadori et al. // *Hum. Pathol.* – 2006. – Vol. 37(6). – P. 711-718.

293. Vona, G. Isolation by size of epithelial tumor cells—A new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells / G.Vona, A.Sabile et al. // *Am. J. Pathol.* – 2000. – Vol. 156 (1). – P. 57-63.

294. Vona, G. Enrichment, immunomorphological, and genetic characterization of fetal cells circulating in maternal blood / G.Vona, C.Beroud et al. // *Am. J. Pathol.* – 2002. – Vol. 160(1). – P. 51-58.

295. Vona, G. Impact of cytomorphological detection of circulating tumor cells in patients with liver cancer / G.Vona, L. Estepa et al. // *Hepatology.* – 2004. – Vol. 39(3). – P. 792-797.

296. Zabaglo, L. Cell filtration-laser scanning cytometry for the characterisation of circulating breast cancer cells / L.Zabaglo, M.G. Ormerod et al. // *Cytom. A.* – 2003. – Vol. 55A (2). – P. 102-108.
297. Tan, S. Microdevice for the isolation and enumeration of cancer cells from blood / S.Tan, L.Yobas et al. // *Biomed. Microdevices.* – 2009. – Vol. 11(4). – P. 883-892.
298. Reya, T. Stem cells, cancer, and cancer stem cells / T.Reya,S.J. Morrison et al. // *Nature.* – 2001. – Vol. 414(6859). – P. 105-111.
299. Stingl, J. Opinion-Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis /J. Stingl, C.Caldas // *Nat. Rev. Cancer.* – 2007. – Vol. 7(10). – P. 791-799.
300. Wicha, M.S. Cancer stem cells: an old idea-A paradigm shift / M.S. Wicha, S.L. Liu et al. // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66(4). – P. 1883-1890.
301. Петрова Г.В. Характеристика и методы расчета медико-статистических показателей в онкологии / Г.В. Петрова, О.П. Грецова, А.Д. Каприн, В.В. Старинский// М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» МинздраваРоссии. - 2014.- 41с.
302. Geertsen, P.F. Safety and efficacy of subcutaneous and continuous intravenous infusion rIL-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma / P.F. Geertsen, M.E. Gore, S. Negrier et al. // *Brit. J. Cancer.* – 2004. – Vol. 90. – P. 1156-1163.
303. Vogelstein, B. Cancer genes and the pathways they control / B.Vogelstein, K.W. Kinzler // *Nat. Med.* – 2004. – Vol. 10. – P. 789-799.
304. Gasser, S. The DNA damage response, immunity and cancer / S. Gasser, D.Raulet // *Semin. CancerBiol.* – 2006. – Vol. 16. – P. 344-347.
305. Добродеев, А.Ю. Лекарственный патоморфоз у больных немелкоклеточным раком легкого при комбинированном лечении. / А.Ю. Добродеев, Н.В. Васильев, А.А. Завьялов, С.А. Тузиков, С.В. Миллер, А.В. Воробьев // *Российский онкологический журнал.* -2011.-№2.-С.10-12
306. Katharim Pachmann Monitoring the Response of Circulating Epithelial Tumor Cells to Adjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Allows Detection of Patients

at Risk of Early Relapse /Katharim Pachmann, On mar Camara, Andreas Kavallaris, Sabme Krauspc, Nele Malarski, Mieczyslaw Gajda, Torsten Kroll, Cornelia Jorke, Ulrike Hammer, Annclore Altendorf-Hofniarm, Carola Rabenstein, Ulrich Pachmann, higo Runnebaum, and Klaus Hoffken // Journal of Clinical Oncology.-2008.-vol.26.-№8.-P.1208-1215

307. Jeffrey B. Smerage Circulating Tumor Cells and Response to Chemotherapy in Metastatic Breast Cancer: SWOG S0500 /Jeffrey B. Smerage, William E. Barlow, Gabriel N. Hortobagyi, Eric P. Winer, Brian Leyland-Jones, Gordon Srkalovic, Sheela Tejwani, Anne F. Schott, Murk A. O'Rourke, Danika L. Lew, Gerald V. Doyle, Julie R. Gralow,Robert B. Livingston, and Daniel F. Hayes //Journal of Clinical Oncology.-2014.-vol.32.-№ 31.-P.3483-3489

308. Travis, William D. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma / William D. Travis, Elisabeth Bram hi I la, Masayuki Noguchi, Andrew G. Nicholson, et al. // Journal of Thoracic Oncology.-2011.-vol.6.-№2.-P.244-285

309. АшрафянЛ.А., КиселёвВ.И. Современная онкология, молекулярная биология и перспективы эффективной терапии / Лев Ашрафян, Всеволод Киселёв. – М.: Молодая гвардия, 2015. – 96 с.

310. Hofman J.Veronique. Cytopathologic Detection of Circulating Tumor Cells Using the Isolation by Size of Epithelial Tumor Cell Method / VeroniqueJ. Hofman, Marius I. Ilie, Christelle Bonnetand et al. // American Society for Clinical Pathology 2011;135:146-156.

311. Smith BM, Slade MJ, English et al. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patient with metastatic breast cancer: comparison of quantative polimerase cbain reaction and immunocytochemical techniques. J Clin Oncol 2000;7:1432-9.

312. Лисаева А.А. Лечебный патоморфоз злокачественных опухолей: клинические и морфологические критерии. Класификации. Прогностическое значение лечебного патоморфоза при раке молочной железы и других опухолях /

А.А. Лисаева, Я.В. Вишневская, Е.М. Рощин и др.// Опухоли женской репродуктивной системы. - 2011. - №4 - С.19-23.