

Д.С. Осинский<sup>1</sup>  
Л.Д. Гуменюк<sup>2</sup>  
Г.А. Вакуленко<sup>3</sup>  
Л.А. Налескина<sup>2</sup>  
С.П. Осинский<sup>2</sup>  
Д.А. Шапочка<sup>2</sup>  
А.В. Ковельская<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Городской клинический  
онкологический центр

<sup>2</sup>Институт  
экспериментальной патологии,  
онкологии и радиобиологии  
им. Р.Е. Кавецкого  
НАН Украины

<sup>3</sup>Национальный  
медицинский университет  
им. А.А. Богомольца,  
Киев, Украина

**Ключевые слова:** рак желудка,  
опухоль Крукенберга,  
перстневидно-клеточная  
карцинома, метастазирование,  
ангиогенез.

## О РАЗЛИЧИЯХ АНГИОГЕНЕЗА В ПЕРВИЧНОМ РАКЕ ЖЕЛУДКА И ОПУХОЛИ КРУКЕНБЕРГА: ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ГИПОТЕЗЫ ПАРАЛЛЕЛЬНОГО МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

**Обоснование и цель:** рак желудка (РЖ) метастазирует в различные органы и ткани, в частности в яичник, метастазы в котором называются опухолью Крукенберга (ОК). В аспекте обсуждения модели параллельного метастазирования интересным является вопрос о сходстве и различии между первичной опухолью и метастазами по основным параметрам их агрессивности. Цель исследования состояла в определении основных показателей гипоксия-ассоциированного фенотипа (ангиогенез, лимфоцитарная и макрофагальная инфильтрация) РЖ и ОК. **Объект и методы:** проанализирован клинический случай: больная Г., 50 лет, диагноз — РЖ (недифференцированная слизепродуцирующая аденокарцинома) с метастазами в обоих яичниках. Иммуногистохимическое исследование метастазов с использованием МкАТк CD7 и CD20 подтвердило истинность диагноза ОК (фенотип CD7<sup>-</sup>CD20<sup>+</sup>). Выполнено иммуногистохимическое определение некоторых показателей ангиогенеза и клеточных элементов стромы (VEGF<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, Flt-1<sup>-</sup>, CD68<sup>-</sup>, IL-10<sup>-</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD20<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup> и CD45RO-положительные клетки) в первичной опухоли и ОК. **Результаты:** выявлены различия первичного РЖ и ОК — более высокая активность ангиогенеза (VEGF<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>) в ОК. **Вывод:** полученные данные указывают на большую агрессивность ОК, подтверждают реальность модели параллельного метастазирования.

### ВВЕДЕНИЕ

Опухоль Крукенберга (ОК) относится к новообразованиям яичника, которые представляют собой метастазы злокачественных опухолей ряда локализаций, в основном органов желудочно-кишечного тракта (толстого и тонкого кишечника, аппендикса, прямой кишки, желчного пузыря, поджелудочной железы, фатерова сосочка), мочевого пузыря, шейки матки, хотя первичными могут быть также новообразования молочной железы [1]. Показано, что аденокарциномы, в составе которых определяются перстневидные клетки, значительно чаще метастазируют в яичник. Примечательно также, что наиболее часто метастазы в яичнике возникают при раке желудка (РЖ), располагающемся в пилорической части [2]. Опухоль носит имя немецкого гинеколога и патолога F.E. Krukenberg (1871–1946), установившего ее гистологическое строение в 1896 г., ошибочно приняв за первичную саркому яичника. В действительности же опухоль была впервые описана Paget в 1854 г., а в последующем — Wilks в 1859 г. (цит. по [3]). Спустя 6 лет выяснилось, что ОК является метастатической, а наиболее частым первичным очагом выступают новообразования органов желудочно-кишечного тракта (Schlahaufser, 1902 (цит. по [3])). Микроскопически ОК состоит из муцин-секретирующих перстневидных клеток и стромальных клеток

яичника. В ОК выявляют как тубулярные структуры или кластеры, так и лобулярные — с узлами, разделенными стромой [4]. Выявление перстневидных клеток, «нагруженных муцином», очень важно для установления диагноза ОК.

В 1938 г. Novak и Gray были предложены критерии для диагностики ОК: 1) локализация опухоли в яичнике, 2) внутриклеточная продукция муцина неопластическими перстневидными клетками, 3) диффузная саркоматоидная пролиферация стромы яичника. Эти признаки были затем включены в классификации ВОЗ (цит. по [3]). Отличить ОК от первичной опухоли яичника можно с помощью иммуногистохимического (ИГХ) анализа. В частности, ОК характеризуется фенотипом СК7<sup>-</sup>СК20<sup>+</sup>, тогда как опухоль яичника — СК7<sup>+</sup>СК20<sup>-</sup> [5, 6].

В настоящее время активно обсуждается вопрос двух моделей метастатического прогрессирования: линейного и параллельного [7, 8]. Линейное прогрессирование рассматривает «генетическое» развитие клеток, которые будут образовывать метастазы, в собственно первичной опухоли с последующей их диссеминацией в отдаленные органы и ткани с полнотью сформировавшимся злокачественным фенотипом. Опухолевые клетки из первичного узла попадают в новые места (ткани) и на протяжении

различных промежутков времени адаптируются в новом микроокружении. В данном случае адаптация рассматривается как «индуктивный» или «образовательный» процесс, в котором опухолевые клетки «учатся» интерпретировать сигналы, поступающие из микроокружения. Модель базируется на постулате Фулдса о ступенчатом прогрессировании морфологических аномалий, сопровождающих развитие опухоли. При этом генотип клеток, образующих метастазы, практически такой же, как и клеток первичной опухоли.

Параллельное прогрессирование предполагает раннюю диссеминацию опухолевых клеток, менее развитых в «генетическом» плане, и их соматическое прогрессирование в новом месте. В связи с этим адаптация в отдаленном органе является следствием процессов мутации, селекции и наследования новых признаков. Модель уходит корнями в 1950-е годы, когда была сделана попытка получить количественные характеристики роста опухоли. В ходе исследований было установлено, что метастазирование может быть инициировано задолго до появления первых симптомов или диагностирования первичной опухоли. При этом подчеркивается генетическое «неравенство» клеток первичной опухоли и клеток метастазов.

Установив наличие ОК у наблюдаемой нами больной, мы решили определить основные показатели гипоксия-ассоциированного профиля первичной опухоли, в данном случае РЖ, и его метастаза — ОК с целью выявления возможных различий между ними.

### ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Больная Г., 50 лет, обратилась с жалобами на наличие пальпируемого образования в правой подвздошной области. При дальнейшем обследовании установлен диагноз: РЖ с метастазами в обоих яичниках. В ходе оперативного вмешательства, при ревизии выявлена опухоль по задней стенке в нижней трети тела желудка размером 3×3 см, не прорастающая серозную оболочку. В обоих яичниках определяются опухолевидные образования размером 15×15 см. Других патологических очагов в брюшной полости не выявлено. Выполнено оперативное вмешательство в объеме паллиативной субтотальной резекции желудка по Б-П в модификации Бальфура и лимфодиссекции D-2 с надвлагалищной ампутацией матки с придатками. При патогистологическом исследовании установлено: 1) аденокарциному желудка (G3) с наличием перстневидных клеток, инвазией в жировую клетчатку, множественными опухолевыми эмболами в просвете сосудов, участками перинеуральной инвазии; в 10 лимфатических узлах выявлены метастазы опухоли; опухолевые эмболы в сосудах клетчатки; 2) метастазы низкодифференцированной аденокарциномы желудка в обоих яичниках (ОК).

В дальнейшем больная получила 6 курсов адъювантной химиотерапии. Проведено гистологическое исследование первичной опухоли желудка и ОК.

Для того, чтобы доказать истинность диагноза ОК, исключив происхождение данного новообразования из ткани яичника, было проведено ИГХ исследование ткани удаленного метастатического очага с использованием МкАТ к антигенам CD7 и CD20 (клон СВС.37, изотип IgG2b, карра и клон L26, изотип IgG2a, карра соответственно; Dako, Дания). Выбор антител обусловлен тем, что ОК, как отмечено выше, характеризуется иммунофенотипом CD7-CD20<sup>+</sup> [5, 6].

Выполнено также ИГХ изучение ангиогенеза и клеточных элементов стромы, в частности VEGF-, CD34-, Flt-1-, CD68-, IL-10-, CD3-, CD4-, CD20-, CD8- и CD45RO-положительных клеток в первичной опухоли и ОК. В ИГХ реакциях были использованы поликлональные антитела против CD3 (RTU, Dako, Дания), VEGFR-1 (Flt-1) (sc-316, Santa Cruz Biotechnology Inc., США), IL-10 (ab34843, Abcam, Великобритания) и МкАТ против CD4 (клон EPR685, Epitomics, США), CD8 (клон C8/144B, Dako, Дания), CD34 (клон PR-M1, Dako, Дания), CD45RO (клон UCHL1, Sigma, США), VEGF (клон V61, Dako, Дания), CD68 (клон PG-M1, Dako, Дания).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гистологическое исследование показало, что первичная опухоль желудка представляет собой недифференцированный слизеобразующий рак (рис. 1). В ткани желудка определяется разрастание неоднотипных по строению структур: местами железистых, а также солидных, состоящих из анаплазированных опухолевых клеток, компактно или рыхло лежащих в стромальном компоненте. Часть клеток характеризуется секреторной активностью, о чем свидетельствует наличие ячеистых структур из перстневидных клеток с просветленной цитоплазмой и оттесненным к периферии, не всегда четко видимым ядром.

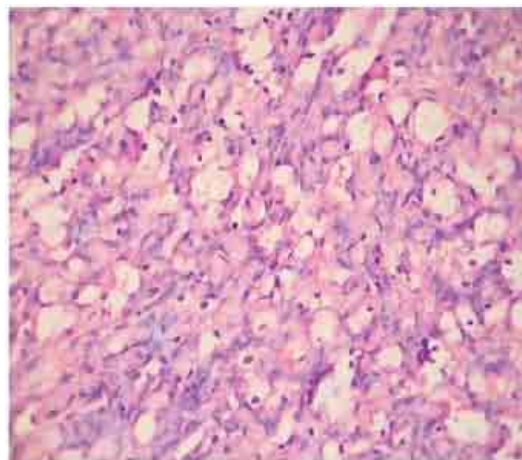


Рис. 1. Аденокарцинома желудка с наличием перстневидных клеток. Окраска гематоксилином и эозином, × 400

Гистологическая структура ОК представлена на рис. 2. В ткани яичника на фоне интенсивного

разрастания рыхло лежащей тонковолокнистой соединительной ткани, по архитектонике имеющей сходство с фибромой, определяются различного размера скопления анаплазированных эпителиальных клеток, расположенных в виде небольших групп, тяжей, атипичных железисто-солидных, тубулярных структур (см. рис. 2, а). Ядра клеток интенсивно окрашены, цитоплазма светлая, слегка базофильная. Имеются перстневидные клетки с просветленной цитоплазмой и оттесненным к периферии в виде полумесяца ядром (см. рис. 2, б).

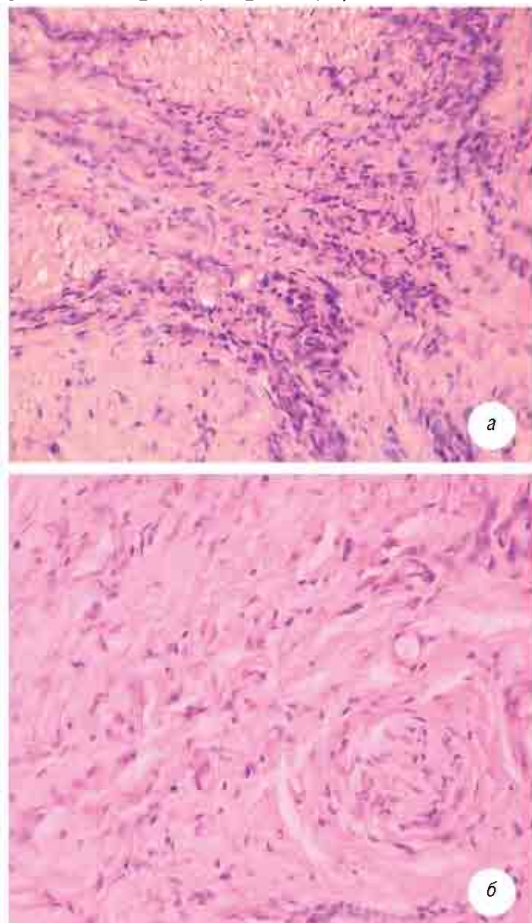


Рис. 2. Гистологическая структура ОК. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$

ИГХ исследование, результаты которого представлены на рис. 3, четко показывает наличие большого количества CD20-положительных клеток в ткани новообразования яичника. ИГХ реакция при выявлении антигена CD7 оказалась отрицательной. Полученные данные подтвердили, что удаленная опухоль яичника является истинной ОК.

Результаты сравнительного ИГХ исследования первичной (РЖ) и метастатической (ОК) опухоли представлены в таблице.

Примечательно увеличение количества VEGF- и CD34-положительных клеток в ОК в 4 и 2,2 раза соответственно, что указывает на активный ангиогенез. Следует отметить и увеличение числа CD68-положительных клеток, хотя и незначительное, всего лишь в 1,2 раза. В то же время стоит подчеркнуть, что, как известно, CD68<sup>+</sup> клетки представляют со-

бой M2-макрофаги, участвующие в ангиогенезе. Полученные данные свидетельствуют о более агрессивном характере метастатической ОК по сравнению с первичным РЖ и подтверждают предположение о характерологическом «неравенстве» клеток первичной опухоли и ее метастазов.

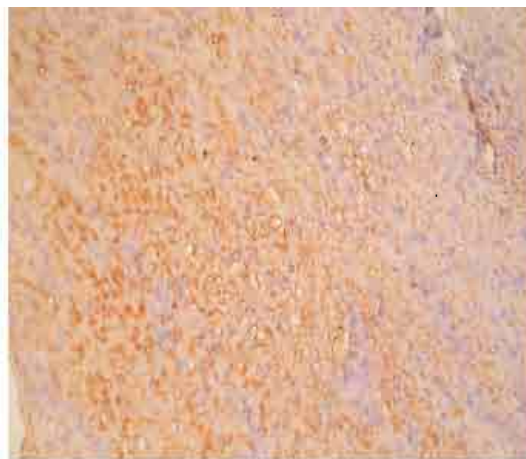


Рис. 3. ОК. Наличие CD20-положительных клеток. ИГХ реакция,  $\times 400$

Таблица

Количество клеток, экспрессирующих изученные маркеры (по данным ИГХ анализа)

Маркер	РЖ, %	ОК, %
VEGF	14	58
Flt-1	0	0
CD34 (оценка микрососудистой плотности)	40 мкс/мм <sup>2</sup>	88 мкс/мм <sup>2</sup>
CD68	44	50
CD3	7	5
CD4	8	10
CD8	13,5	17
CD45RO	0	0
IL-10	25	18

Следует также отметить наличие в костном мозгу большой цитокератинположительных (диссеминированных опухолевых) клеток, хотя и в незначительном количестве ( $3 \cdot 10^6$  мононуклеаров костного мозга). Это согласуется с подтвержденным наличием отдаленных метастазов (категория M1). В костном мозгу выявлены также Flt-1-положительные клетки, которые, вероятно, принимают активное участие в формировании «ниши» для опухолевых клеток как в костном мозгу, так и в отдаленных органах, в частности в яичниках. Примечательно, что ни в первичной опухоли желудка, ни в ОК Flt-1-положительные клетки не выявлены. Это может указывать на сложность формирования «предметастатической ниши» в отдаленных органах и необязательность участия в этом процессе Flt-1-положительных клеток, предположение о чем, на основании модельных экспериментов, было высказано ранее [9]. Вместе с тем можно допустить, что в описанном нами случае исследовали первичную опухоль с наличием отдаленных метастазов в поздней стадии опухолевого процесса, в котором участие Flt-1-положительных клеток может быть не обязательным.

Полученные нами данные о более активном ангиогенезе в ОК согласуются с результатами работы G. Lou и соавторов [10], в которой продемонстрировано, что количество VEGF-положительных клеток было заметно больше в ОК (71,1%) по сравнению с первичной эпителиальной карциномой яичника (31,1%). При этом в ткани высоко- и умереннодифференцированного РЖ выявлено практически такое же количество VEGF-положительных клеток (73,7%). При менее агрессивном новообразовании доля таких клеток оказалась меньше и составила 56,3%.

### ВЫВОД

Метастатическое поражение яичника при РЖ, известное как ОК, характеризуется значительно более активным ангиогенезом по сравнению с первичным новообразованием, свидетельствуя о наличии отличий между РЖ и ОК по одному из важных показателей опухолевого прогрессирувания, что подтверждает реальность параллельной модели метастазирования.

### БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают благодарность доктору медицинских наук, профессору Д.Ф. Глузману (Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины) за помощь в ИГХ определении CD7- и CD20-положительных клеток.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ben-Jacob TK, Gordon CR, Koniges F. Krukenberg tumors: a review. *J Surg Radiol* 2010; 1: 56–9.
2. Al-Agha OM, Nicastrì AD. An in-depth look at Krukenberg tumor. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 1725–30.
3. Wong PC, Ferenczy A, Fan L-D, McGaughey E. Krukenberg tumors of the ovary. Ultrastructural, histochemical, and immunohistochemical studies of 15 cases. *Cancer* 1986; 57: 751–60.
4. Holtz F, Hart WR. Krukenberg tumors of the ovary. A clinicopathologic analysis of 27 cases. *Cancer* 1982; 50: 2438–47.
5. Wauters CCA, Smedts F, Gerrits LGM, et al. Keratins 7 and 20 as diagnostic markers of carcinomas metastatic to the ovary. *Hum Pathol* 1995; 26: 852–5.
6. Park SY, Kim HS, Hong EK, Kim WH. Expression of cytokeratins 7 and 20 in primary carcinomas of the stomach and colon and their value in the differential diagnosis of metastatic carcinomas to the ovary. *Hum Pathol* 2002; 33: 1078–85.
7. Klein ChA. Parallel progression of primary tumors and metastases. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 302–12.
8. Stoecklein NH, Klein ChA. Genetic disparity between primary tumors, disseminated tumor cells, and manifest metastasis. *Int J Cancer* 2010; 126: 589–98.

9. Dawson MR, Duda DG, Fukumura D, Jain RK. VEGFR1-activity-independent metastasis formation. *Nature* 2009; 461: E4–E5.

10. Lou G, Gao Y, Ning X-M, Zhang Q-F. Expression and correlation of CD44v6, vascular endothelial factor, matrix metalloproteinase-2, and matrix metalloproteinase-9 in Krukenberg tumor. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5032–6.

### ABOUT DISTINCTIONS OF ANGIOGENESIS IN PRIMARY GASTRIC CANCER AND KRUKENBERG TUMOR: CONFIRMATION OF HYPOTHESIS OF PARALLEL METASTASIS

D.S. Osinsky, L.D. Gumenyuk, G.A. Vakulenko,  
L.A. Naleskina, S.P. Osinsky, D.A. Shapochka,  
A.V. Kovelskaya

**Summary. Background and aim:** the gastric cancer (GC) metastasis in different organs and tissues, in particular in an ovary, metastases in that have the name — Krukenberg tumor (KT). In the aspect of discussion the model of parallel metastasis interesting is a question about likeness and distinction between a primary tumor and metastases on the basic parameters of their aggressiveness. The aim research consisted of determination of basic indexes of hypoxia-associated phenotype (angiogenesis, lymphocytic and macrophage infiltration) of GC and KT. **Object and methods:** a clinical case is analyzed: patient G., 50 years old, diagnosis — GC (undifferentiated mucinous adenocarcinoma) with metastases in both ovaries. Immunohistochemical research of metastases with the use of McAB to CD7 and CD20 confirmed truth of diagnosis of KT (phenotype of CD7<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>). Immunohistochemical research is carried out to determine some indexes of angiogenesis and cellular elements of stroma (VEGF<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, Flt-1<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, IL-10<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup> positive cells) in a primary tumor and KT. **Results:** there were found out distinctions of primary GC and KT: higher indexes of activity of angiogenesis (VEGF<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>) are in OK. **Conclusion:** the obtained data specify on the large aggressiveness of KT, confirm reality of model of parallel metastasis.

**Key Words:** gastric cancer, Krukenberg tumor, colloid carcinoma, metastasis, angiogenesis.

#### Адрес для переписки:

Осинский Д.С.  
03115, Киев, ул. Верховинная, 69  
Киевский городской клинический онкологический центр  
E-mail: dosinsky@ukr.net

Получено: 03.07.2014