

Результаты исследования характеристик костного мозга больных плоскоклеточным раком головы и шеи, их клиническое значение

Е.Г. Тимонина¹, Н.Н. Тупицын¹, С.О. Подвязников², В.А. Спиридонова³,
М.А. Френкель¹, О.П. Колбатская¹, О.А. Чегринец¹

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 23;

²ГБОУ ДПО «РМАПО» Минздрава России; Россия, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1;

³Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; Россия, 119992, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

Контакты: Елена Геннадьевна Тимонина helentim@mail.ru

В целях выявления особенностей гемопоэза у больных плоскоклеточным раком головы и шеи (ПРГШ) нами были проанализированы показатели 41 аспирации костного мозга в зависимости от клинико-морфологических характеристик опухоли и определяемых микрометастазов в костном мозге. Морфологическое и молекулярное исследование пунктатов проводили в лаборатории иммунологии гемопоэза РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Выявленные изменения клеточного состава костного мозга больных ПРГШ заключаются в увеличении относительного содержания сегментоядерных нейтрофилов, снижении уровня молодых форм гранулоцитарного ряда без изменения индекса созревания нейтрофилов и процента клеток гранулоцитарного ростка. Для низкодифференцированного ПРГШ характерной чертой является гипоклеточность костного мозга. Достоверное повышение лейко-эрритробластического соотношения обусловлено редукцией эритроидного ряда; индекс созревания эритроидных клеток возрастает за счет увеличения процента окси菲尔ных нормобластов в костном мозге больных с местно-распространенным ПРГШ. Отработан высокочувствительный метод детекции матричной РНК специфического белка плоскоклеточного рака E48 с использованием методов полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и Саузерн-блоттинга с последующим иммуноферментным анализом, позволяющим распознать микрометастазы в костный мозг у 35 % больных ПРГШ. У пациентов с выявленными микрометастазами в костный мозг определено достоверное снижение пропорции полихроматофильных нормобластов и достоверное повышение уровня клеток гранулоцитарного ряда при нормальных показателях лимфоцитов и других клеточных элементов миелограмм. Установлено, что при наличии пораженных регионарных лимфатических узлов у больных ПРГШ достоверно чаще выявляют микрометастазы в костный мозг и прогрессирование опухоли происходит в сроки до 9 мес.

Ключевые слова: костный мозг, микрометастазы, плоскоклеточный рак головы и шеи, гемопоэз, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, амплифицированная комплементарная ДНК E48

DOI: 10.17650/2222-1468-2016-6-1-55-67

Results of investigating the characteristics of bone marrow in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck, their clinical value

E.G. Timonina¹, N.N. Tupitsyn¹, S.O. Podvyaznikov², V.A. Spiridonova³, M.A. Frenkel¹, O.P. Kolbatskaya¹, O.A. Chegrinets¹

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center at the Ministry of Health of Russia; 23 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia;

²Russian Medical Academy of Postgraduate Education at the Ministry of Health of Russia;

2/1 Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russia;

³A.N. Belozerskiy Research Institute of Physicochemical Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University; Build. 40, 1 Leninskie Gory, 119992, Moscow, Russia

To reveal the specific features of hematopoiesis in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), the authors analyzed the indicators of 41 bone marrow aspirates in relation to the clinical and morphological characteristics of the tumor and micrometastases detected in bone marrow. Puncture samples were morphologically and molecularly examined at the Laboratory of Hematopoiesis Immunology, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center. The found changes in the bone marrow cell composition in HNSCC patients showed themselves as an increase in the relative count of segmented neutrophils and a decrease in the level of immature granulocytes with no alterations in the neutrophil maturation index and in the percentage of granulocyte lineage cells. Bone marrow hypopcellularity is a characteristic feature of high-grade HNSCC. The significantly enhanced leuko-erythroblastic ratio was due to a reduction in red blood cells: the erythroid cell maturation index rose, by increasing the percentage of bone marrow oxyphilic normoblasts in patients with locally advanced HNSCC. A highly sensitive method for detecting mRNA of the specific squamous cell carcinoma protein

E48 was perfected using reverse-transcription polymerase chain reaction and Southern blotting, followed by an enzyme immunoassay that could recognize bone marrow micrometastases in 35 % of the patients with HNSCC. The patients with found bone marrow micrometastases showed a significant decrease in the proportion of polychromatophilic normoblasts and a significant increase in granulocytes in the presence of normal values of lymphocytes and other cellular elements of myelograms. It was established that in the presence of regional lymph node involvement, bone marrow micrometastases were significantly more frequently in the patients with HNSCC and tumor progression over a period of up to 9 months.

Key words: bone marrow, micrometastases, head and neck squamous cell carcinoma, hematopoiesis, reverse-transcriptase polymerase chain reaction, amplified complementary DNA E48

Введение

Злокачественные опухоли головы и шеи составляют около 5 % всех неоплазий, при этом наиболее часто выявляется плоскоклеточный рак (до 80 %). Несмотря на высокий процент местно-распространенных форм, в последние годы благодаря новым современным методам отмечаются успехи в лечении плоскоклеточного рака головы и шеи (ПРГШ). В то же время отдаленные результаты остаются неудовлетворительными, что в первую очередь может говорить об особенностях клинического течения заболевания [1, 2].

Возникновение локальных рецидивов болезни, обнаружение регионарных и, в отдельных случаях, отдаленных метастазов подтолкнули клиницистов к изучению факторов прогноза при ПРГШ [3–5]. Ряд научных работ посвящен определению морфологических и биологических характеристик опухолевого процесса, популяционного состава и кинетических характеристик опухолевых клеток методом проточной ДНК-цитометрии, позволяющим оценивать биологические свойства опухолей [6–8]. Ведущими факторами прогноза остаются распространенность опухолевого процесса, размер опухоли, наличие метастазов в регионарные лимфатические узлы (ЛУ), а также локализация рака орофарингеальной зоны и степень дифференцировки клеток плоскоклеточного рака.

Ряд публикаций свидетельствуют о том, что более достоверная информация о распространенности опухолевого процесса может быть получена при исследовании костного мозга (КМ) больных ПРГШ [9, 10].

Роль КМ как возможной мишени гематогенного метастазирования доказана на многих опухолях эпителиальной природы. Наиболее детально изучено поражение КМ при раке молочной железы (47,0–62,5 % случаев) [11–14]. В публикациях описаны случаи КМ-микрометастазов при раке предстательной железы (до 54–85 %), немелкоклеточном раке легкого (32–40 %), раке почки (28–40 %), колоректальном раке (8–13 %) [15–20]. Микрометастазирование в КМ при ПРГШ не изучалось вплоть до 1999 г., когда была опубликована научная работа R. N. Brakenhoff и соавт. [21]. В ней отмечено, что наличие небольших опухолевых кластеров или единичных опухолевых клеток в КМ больных различными типами эпителиальных опухолей

можно установить методами цитохимии и молекулярной биологии, а именно – посредством полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Кроме того, наиболее часто используются тканеспецифичные маркерные антигены, такие как цитokerатины. Специфичной для выявления метастатических клеток ПРГШ является экспрессия гена *E48* на уровне матричной РНК (мРНК) в ОТ-ПЦР, которая позволяет обнаруживать метастатические клетки в КМ и периферической крови больных ПРГШ с высокой чувствительностью и специфичностью (1 опухолевая клетка на 10 млн миелокариоцитов).

В 2004 г. присутствие микрометастазов в КМ в качестве вероятного фактора прогноза ПРГШ было продемонстрировано D. R. Colnot и соавт. [9]. Ими была показана экспрессия гена *E48* клетками КМ-пунктата в 40 % случаев у больных ПРГШ. Отмечено, что обнаружение мРНК-транскриптов гена *E48* в КМ больных ПРГШ сопряжено с неблагоприятным прогнозом. Было установлено, что выживаемость больных ПРГШ с метастатическим поражением не менее 2 ЛУ достоверно снижается при наличии микрометастазов в КМ ($p = 0,02$). Эти данные указывают на возможность более точного стадирования опухолевого процесса и объективной оценки групп пациентов, нуждающихся в проведении дополнительных лечебных мероприятий.

Специфика роста гистогенетически различных опухолей приводит к разнообразным клиническим проявлениям в организме в целом, в том числе в системе кроветворения. Следует отметить, что гемопоэз у больных ПРГШ ранее детально не изучался, тем более в группах пациентов с наличием опухолевых клеток в КМ.

Вышеизложенное послужило основанием для проведения настоящего исследования, цель которого – изучение роли КМ-пунктата в выявлении микрометастазов в КМ для уточнения истинной распространенности опухолевого процесса, а также оценки показателей гемопоэза у больных ПРГШ.

Материалы и методы

Материалом для настоящего исследования послужили аспираты КМ 41 (38 (92,7 %) мужчин, 3 (7,3 %) женщины) больного ПРГШ, проходившего обследо-

Таблица 1. Распределение пациентов по стадии и локализации опухолевого процесса

Стадия	Классификация TNM	Локализация				Всего, n (%)
		слизистая оболочка полости рта	гортаноглотка	ротоглотка	язык	
II	T2N0M0	1	1	2	5	9 (22,0)
III	T1–2N1M0	—	2	—	2	4 (9,8)
	T3N0M0	1	—	1	1	3 (7,3)
	T3N1M0	1	—	1	4	6 (14,6)
IVa	T1–3N2M0	—	2	1	3	6 (14,6)
	T4aN0M0	2	—	—	—	2 (4,9)
	T4aN1–2M0	1	—	4	2	7 (17,0)
IVb	T(любая)N3M0	2	2	—	—	4 (9,8)
Всего, n (%)		8 (19,5)	7 (17,0)	9 (22,0)	17 (41,5)	41 (100)

вание и лечение в хирургическом отделении № 11 опухолей верхних дыхательно-пищеварительных путей (ОВДПП) РОНЦ им. Н.Н. Блохина в период с 2007 по 2014 г. Возраст пациентов варьировал от 33 до 75 лет, медиана – 54,4 года. Исследуемую группу составили первичные больные со II–IV стадиями заболевания.

Пациентам были проведены стандартные общеклинические и лабораторные исследования систем и органов, по результатам которых отдаленных метастазов не выявлено.

Рак языка определялся у 17 (41,5 %) больных, ротоглотки – у 9 (22 %), слизистой оболочки дна полости рта – у 8 (19,5 %), гортаноглотки – у 7 (17 %). Объем опухоли и степень распространенности процесса колебались значительно, наиболее часто определялась IV стадия заболевания – у 19 (46,3 %) пациентов (табл. 1).

При гистологическом исследовании биоптатов опухоли во всех случаях был определен плоскоклеточный рак с разной степенью дифференцировки опухолевых клеток (табл. 2).

Всем больным ПРГШ перед проведением специального лечения, применяемого в клинике ОВДПП РОНЦ им. Н.Н. Блохина с учетом локализации и распространенности опухолевого процесса, выполнялась функциональная биопсия КМ в области задней верхней ости подвздошной кости. Специальное лечение включало сочетание различных методов воздействия на опухоль. На 1-м этапе проводили 2 курса полихимиотерапии (ПХТ) в неоадьювантном режиме, после завершения которых оценивали степень регрессии опухоли. В зависимости от полученного эффекта выполняли хирургическое вмешательство, лучевую терапию (ЛТ) либо их комбинацию (табл. 3).

Химиолучевое лечение было выполнено 30 (73,2 %) больным. Комплексной терапии, включающей 2 курса неоадьювантной ПХТ по схеме PF (в 1–3-й дни 5-фторурацил 500 мг/м² внутривенно струйно, в 4-й день цисплатин 100 мг/м² внутривенно капельно на фоне антиэметиков, премедикации и водной нагрузки; 2-й курс – через 21 день), ЛТ на первичный очаг и зону

Таблица 2. Степень дифференцировки ПРГШ

Степень дифференцировки	Стадия опухолевого процесса				Всего, n (%)
	II	III	IVa	IVb	
Высокодифференцированный	2	8	7	—	17 (41,5)
Умеренно дифференцированный	7	5	4	2	18 (43,9)
Низкодифференцированный	—	—	4	2	6 (14,6)
Всего, n (%)	9 (22,0)	13 (31,7)	15 (36,6)	4 (9,8)	41 (100)

Таблица 3. Методы лечения пациентов с ПРГШ

Локализация опухоли	Объем проведенного лечения				Всего, n (%)
	комплексное	химиолучевое	оперативное	отказ от лечения	
Слизистая оболочка полости рта	2	4	1	—	7(17,1)
Гортаноглотка	1	5	—	1	7(17,1)
Ротоглотка	2	8	—	—	10(24,4)
Язык	4	13	—	—	17(41,4)
<i>Всего, n (%)</i>	<i>9 (22,0)</i>	<i>30 (73,2)</i>	<i>1 (2,4)</i>	<i>1 (2,4)</i>	<i>41 (100)</i>

регионарных ЛУ шеи (разовая очаговая доза – 2 Гр, суммарная очаговая доза – 44–50 Гр) с последующим хирургическим вмешательством в дальнейшем подверглись 9 (22 %) пациентов. В эту же группу включили 2 больных, которым было выполнено комплексное лечение с включением таксанов по схеме: таксотер 75 мг/м² и цисплатин 75 мг/м² в 1-й день, 5-фторурацил 750 мг/м² каждые 24 ч в виде непрерывной внутривенной 120-часовой инфузии с дальнейшим проведением 5 циклов сочетанного химиолучевого лечения. Одному пациенту с раком слизистой оболочки полости рта (T4N2M0) была выполнена радикальная операция на 1-м этапе лечения из-за выраженного болевого синдрома и угрозы распада опухоли. Еще 1 больному был проведен 1 курс ПХТ, от дальнейшего лечения он отказался.

В нашей работе период наблюдения составил от 3 до 9 мес. Из 41 пациента, получившего лечение, прогрессирование опухолевого процесса было отмечено у 12 (29,3 %). У 2 (4,9 %) больных при IV стадии рака орофарингеальной области прогрессирование опухолевого процесса привело к летальному исходу через

7–8 мес динамического наблюдения. Живы без прогрессирования опухолевого процесса в сроки наблюдения до 9 мес 28 (68,3 %) пациентов (рис. 1).

Забор аспириата КМ из верхней задней ости подвздошной кости (*spina iliaca posterior superior*) выполнялся по общепринятой методике иглой Jamshidi. При морфологическом исследовании пунктатов особое внимание обращали на качество забора КМ, стараясь брать не более 0,5 мл. Полученный материал помещали в пробирки «Вакутайнер» (1,0–1,5 мг K₂ЭДТА), тщательно перемешивали, маркировали и направляли в лабораторию иммунологии гемопоэза РОНЦ им. Н.Н. Блохина.

Микроскопическое исследование выполнялось двумя экспертами-гемоцитологами, просматривали 6 препаратов КМ по следующим параметрам:

- поиск метастатических клеток в препаратах КМ;
- подсчет и описание миелограммы.

Для оценки КМ-кроветворения после подсчета КМ-элементов производился расчет индексов миелограммы:

- индекс созревания эритроцитов;
- индекс созревания нейтрофилов;
- соотношение лейкоцитов и эритроцитов (Л/Э).

Для оценки количественных значений аспирированных КМ и периферической крови были использованы границы нормальных показателей В.В. Соколова и И.А. Грибовой (1972) [22]; эти расчетные значения соответствуют $M \pm 1,5\sigma$ и включают 80–90 % наблюдений. Нормы расчетных индексов красной крови: средний объем эритроцитов (в фемтолитрах), среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците (в пикограммах), концентрация гемоглобина в эритроцитарной массе (в граммах на литр), – рассчитывали по Ю.В. Кузнецовой (2003) [15].

Молекулярный анализ аспириата проводили методом ОТ-ПЦР. Исследовали мРНК от 4 до 54 млн миелокариоцитов.

Ведение культур эукариотических клеток. Клеточные линии RPMI 8226 и A431 культивировали во фла-



Рис. 1. Прослеженность больных ПРГШ после проведенного лечения

конах (25 и 75 см 2) в СО $_2$ -инкубаторе при температуре 37 °С и содержании СО $_2$ 5 %. Для ведения этих культур клеток использовали культуральную среду RPMI 1640 или DMEM с добавлением 10 % телячей эмбриональной сыворотки и антибиотика. Высевали клетки каждые 3 – 4 дня.

Техника проведения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией

Выделение ДНК. К клеточной суспензии добавляли $0,1$ % от объема раствора SDS и проводили разрушение мембран клеток посредством троекратного замораживания/размораживания. Далее добавляли равное по объему количество фенола, встряхивали содержащее пробирки на вортексе и центрифугировали при $13\,400$ об/мин в течение 10 мин. Затем верхнюю фазу переносили в пробирку с равным объемом смеси фенол + хлороформ + изоамиловый спирт в соотношении $25:24:1$, интенсивно встряхивали и центрифугировали при $13\,400$ об/мин в течение 10 мин. Отбирали верхнюю фазу, добавляли к ней равный объем хлороформа и снова центрифугировали при $13\,400$ об/мин в течение 10 мин. Далее снова отбирали верхнюю фазу, переносили ее в новую пробирку и добавляли 10 % от объема 3 М ацетата натрия (рН $5,0$) и равное по объему количество изопропилового спирта и оставляли на ночь в морозильной камере при температуре -20 °С, на следующий день пробирку вновь центрифугировали при $13\,400$ об/мин в течение 10 мин. Осадок высушивали и ресуспендировали дейонизованной водой.

Выделение РНК. К клеточной суспензии добавляли гуанидин-тиоцианатный буфер (4 М гуанидин тиоцинат, 25 мМ натрия цитрат рН $7,0$, $0,5$ % натрия N-лаурилсаркозинат, $0,1$ % β-меркаптоэтанол), выдерживали 10 мин при комнатной температуре, добавляли 10 % от объема 3 М ацетата натрия (рН $5,0$), интенсивно перемешивали содержащее пробирки, добавляли равный объем фенола, выдерживали 5 мин при комнатной температуре, добавляли смесь хлороформ + изоамиловый спирт в соотношении $24:1$, интенсивно перемешивали и центрифугировали при $13\,400$ об/мин в течение 10 мин. Далее отбирали верхнюю фазу, переносили ее в новую пробирку, повторяли экстракцию с фенолом и хлороформом. После этого отбирали водную фазу, добавляли $2,5$ объема этилового спирта и оставляли на ночь в морозильной камере при температуре -20 °С, затем центрифугировали при $13\,400$ об/мин в течение 10 мин, осадок высушивали и ресуспендировали дейонизованной водой.

ОТ. Реакцию проводили стандартно в объеме 40 мкл. К 20 мкл РНК добавляли 2 мкл политимида нового олигонуклеотида (18 звеньев) и на 5 мин помещали пробирку в термостат при температуре $+70$ °С. Добавляли 8 мкл 5 -кратного буфера для ОТ, 4 мкл смеси дезоксирибонуклеотидов, 4 мкл ингибитора

рибонуклеазы и на 5 мин помещали пробирку в термостат при температуре $+37$ °С. После добавления 2 мкл фермента MMuIV OT и на 1 ч помещали пробирку в термостат при температуре $+42$ °С. Фермент инактивировали 10 мин при температуре $+70$ °С.

ПЦР проводилась на амплификаторе «Терцик» (Россия). В случае каждой пары праймеров использовалась индивидуальная программа. Для амплификации комплементарной ДНК (кДНК) E48 использовали следующие пары праймеров: E-48 forward: 5'-CAGAC GACATCAGAGATGAGGACAGC-3' и E48 reverse: 5'-GGCAGACCACAGAATGCTTGC-3'.

Условия амплификации: денатурация при $+90$ °С (1 мин), отжиг праймеров при $+65$ °С, элонгация при $+72$ °С (1 мин). Цикл повторяли 40 раз. Продукт амплификации – 130 пар оснований (п. о.).

Контроль качества мРНК оценивали по амплификации мРНК β-глобина. Использовали праймеры: β-globin forward: 5'-CTGGGCAGGCTGCTGGTG-3' и β-globin reverse: 5-GCTTGTCAAGTCAGCTC-3'.

Условия амплификации: денатурация при $+94$ °С (45 с), отжиг праймеров при $+60$ °С, элонгация при $+72$ °С (30 с). Цикл повторяли 30 раз. Продукт амплификации – 210 п. о.

Амплификацию геномной ДНК E48 осуществляли с теми же праймерами, что и амплификацию мРНК E48, денатурация при $+94$ °С. Продукт амплификации – 908 п. о.

ПЦР с включением ^{32}P проводилась на амплификаторе «Терцик» (Россия). Для амплификации использовали следующие пары праймеров: E-48 forward: 5'-CAGACGACATCAGAGATGAGGACAGC-3' и E-48 reverse: 5'-GGCAGACCACAGAATGCTTGC-3'.

Реакцию проводили в объеме 50 мкл: к 20 мкл кДНК добавляли 5 мкл 10 -кратного буфера для ПЦР, 5 мкл хлорида магния, 1 мкл смеси dNTP (1 мкл dATP + 1 мкл dTTP + 1 мкл dGTP + 1 мкл ^{32}P -dCTP + 6 мкл воды), 16 мкл воды, 2 мкл праймеров E48, 1 мкл TAG-полимеразы. Продукт амплификации – 130 п. о.

ПЦР с включением BrdUTP проводилась на амплификаторе «Терцик» (Россия). Для амплификации использовали следующие пары праймеров: E-48 forward: 5'-CAGACGACATCAGAGATGAGGACAGC-3' и E-48 reverse: 5'-GGCAGACCACAGAATGCTTGC-3'.

Реакцию проводили в объеме 50 мкл: к 20 мкл кДНК добавляли 5 мкл 10 -кратного буфера для ПЦР, 5 мкл хлорида магния, 1 мкл смеси dNTP (1 мкл dATP + 1 мкл dCTP + 1 мкл dGTP + 1 мкл BrdUTP + 6 мкл воды), 16 мкл воды, 2 мкл праймеров E48, 1 мкл TAG-полимеразы. Продукт амплификации – 130 п. о.

Электрофорез. Для разделения ПЦР-продукта амплифицированных фрагментов использовали $1,5$ % легкоплавкую агарозу на ТВЕ-буфере с добавлением Ethidium bromide (Helicon, Россия) или SYRB Green

(Roche, Германия). Электрофорез проводили в электрофоретической камере Helicon (Россия) в течение 25–30 мин. Гель документировали на видеосистеме GI-2.

Саузерн-блоттинг. Проводили электрофоретический перенос на Criterion Blotter (Bio Rad) в течение 15 мин при 30 В. Мембрану предварительно инкубировали в ТВЕ-буфере на протяжении 5 мин.

Ультрафиолетовая (УФ) фиксация. Фиксацию мембранны проводили в камере УФ-облучения CL-1000 Ultraviolet Crosslinker (БиоХимМак, Россия) в течение 10 мин в режиме 2000–4000.

Иммуноферментное окрашивание мембран Hybond-N+ Саузерн-блоттинга. Мембрану инкубировали в течение 5 мин в 0,1 Трис-NaCl (рН 7,5); 15 мин – в блокирующем буфере (0,1 Трис-NaCl, рН 7,5 + 5 % обезжиренного сухого молока); 45 мин – с анти-BrdU (в разведении 1:1000 в блокирующем буфере) при температуре +37 °C; затем производили 3 отмычки по 5 мин в Трис-NaCl.

Инкубацию с анти-мышьими антителами, меченными пероксидазой хрина (разведение 1:2000 в блокирующем буфере), проводили в течение 30 мин при температуре +37 °C; далее – 3 отмычки по 5 мин в Трис-NaCl. ECL добавляли на мембрану Amersham Hybond-N+ на 1 мин, затем экспонировали мембрану с пленкой Amersham Hyperfilm в течение 1 сут. Следующий этап – проявление в темной комнате: проявитель и фиксаж – по 5 мин, промывка водой и высушивание.

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Мембрану предварительно инкубировали в 0,7 М гидроксида натрия в течение 10 мин; затем 5 мин в 0,1 Трис-NaCl (рН 7,5); 15 мин – в блокирующем буфере (0,1 Трис-NaCl, рН 7,5 + 5 % обезжиренного сухого молока); 45 мин – с анти-BrdU (в разведении 1:1000 в блокирующем буфере) при температуре +37 °C; после чего производили 3 отмычки по 5 мин в Трис-NaCl, инкубацию с анти-BrdU (+FITC) в течение 30 мин при температуре +37 °C, 3 отмычки по 5 мин в Трис-NaCl. Сканирование мембранны осуществляли на приборе Typerhoon 9410 (ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»).

Статистический анализ данных

Статистическую обработку результатов исследования проводили методом математического анализа данных с применением пакета компьютерных программ Excel и SPSS.10 for Windows и использованием методической литературы [23, 24]: анализ ранговых корреляций, сравнение средних значений двух выборок и t-критерий для независимых выборок с оценкой по уровню значимости; подсчет распределения частот по категориям с непрерывными и дискретными переменными; критерий Сомерса для качественных переменных.

Результаты и обсуждение

Возможности использования нерадиоактивных методов молекулярной диагностики метастатического поражения костного мозга при плоскоклеточном раке головы и шеи

При морфологическом исследовании образцов КМ 41 больного ПРГШ (по 6 мазков в каждом случае) метастатических клеток выявлено не было.

Нами проведено молекулярное исследование КМ у 41 больного ПРГШ различных стадий заболевания. РНК выделяли из 4,4–54,0 млн миелокариоцитов. У всех пациентов определяли экспрессию гена E48 в стандартной ОТ-ПЦР с использованием для выявления продукта ПЦР красителя бромистого этидия, внесенного в агарозный гель. Ни в одном из изученных образцов КМ экспрессии гена E48 на уровне мРНК не обнаружено.

В целях определения чувствительности обнаружения продукта ПЦР РНК выделяли из 100 тыс. клеток линии A431, которая постоянно экспрессирует белок E48. Выделенную общую РНК разводили в 10, 100, 1000, 10 000 и 100 000 раз, проводили ОТ, затем ПЦР. Бромистый этидий выявлял продукт ПЦР, соответствующий мРНК E48, выделенной из 100 клеток линии A431. Подобная чувствительность обнаружения продукта ПЦР не является достаточной для выявления микрометастазов ПРГШ в КМ больных.

Мы заменили ДНК-связывающий краситель бромистый этидий на более чувствительный – SYBR Green I. При проведении экспериментов на клеточной линии A431 SYBR Green I позволяет выявлять продукт

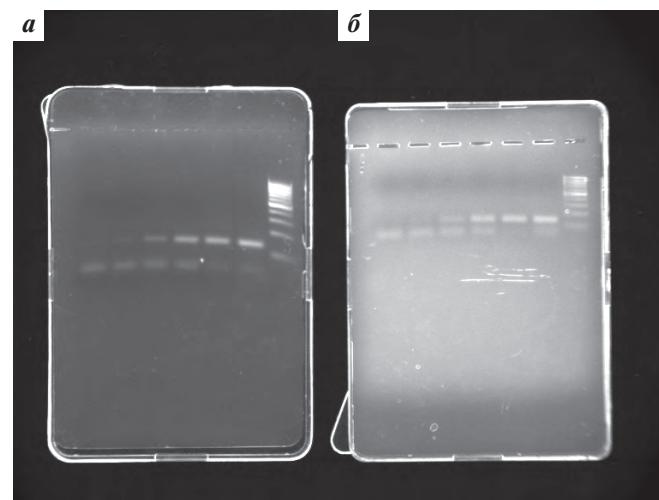


Рис. 2. Сравнение чувствительности SYBR Green I (a) и бромистого этидия (b) (титрование мРНК линии A431). Справа налево: маркер молекулярной массы, далее – последовательно продукты ПЦР, соответствующие мРНК линии A431, выделенной из 100 000, 10 000, 1000, 100, 10 и 1 клетки. Бромистый этидий выявляет мРНК из 100 клеток, SYBR Green I – мРНК из 10 клеток (слабая полоса). Продукт ПЦР соответствует 130 п. о. Верхняя полоса – несвязавшиеся праймеры, интенсивность этой полосы возрастает при уменьшении количества специфического продукта ПЦР

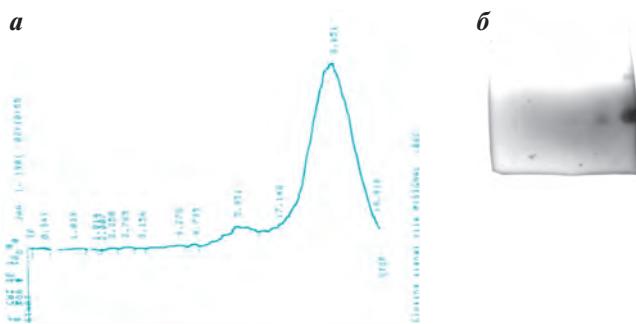


Рис. 3. Радиохроматография (а) и радиоавтография (б) агарозного геля с ^{32}P -dCTP, включенным в кДНК E48 (130 п. о.) линии A431 (радиоавтограф LB2722-2 (BERTHOLD, Германия) с проточным детектором LB6280 и системой обработки данных (интегратором) HP3396A)

амплифицированной мРНК E48, выделенной из 10 клеток. Но в этом случае окрашивание амплифицированной кДНК в 130 п. о. является крайне слабым и не всегда воспроизводимым. При внесении 30 мкл продукта ПЦР в агарозный гель экспрессия мРНК E48 выявляется в 10 клетках линии A431, однако этой чувствительности также недостаточно для обнаружения микрометастазов. Необходимый порог чувствительности должен соответствовать мРНК 1 клетки линии A431 (рис. 2).

Для повышения чувствительности обнаружения экспрессии E48 нами была предпринята попытка повышения чувствительности обнаружения продукта ОТ-ПЦР за счет использования радиоизотопной метки (радиоактивно меченные нуклеотиды по ^{32}P). При замене холодного dCTP на радиоактивно меченный ^{32}P -dCTP на этапе ПЦР нуклеотид включался в ДНК, что было установлено посредством как радиохроматографии, так и последующей радиоавтографии (рис. 3).

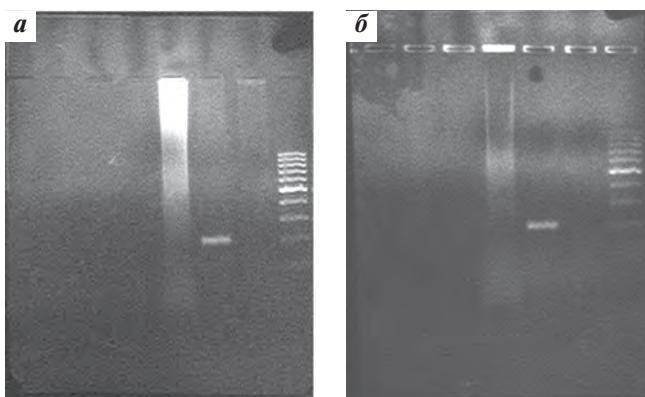


Рис. 4. Эффективность переноса амплифицированной кДНК E48 (130 п. о.) методом Саузерн-блоттинга из агарозного геля на мембрану после электрофоретического разделения продуктов ПЦР: а – агарозный гель после разделения продуктов ПЦР; б – мембрана Hybond-N+ после переноса на нее продуктов ПЦР с геля. Справа налево: на 1-й дорожке маркеры молекулярной массы, 2-я дорожка пустая, 3-я дорожка – продукт амплификации кДНК E48, по молекулярной массе соответствует 130 п. о. Рисунок демонстрирует высокую эффективность электрофоретического переноса на мембрану

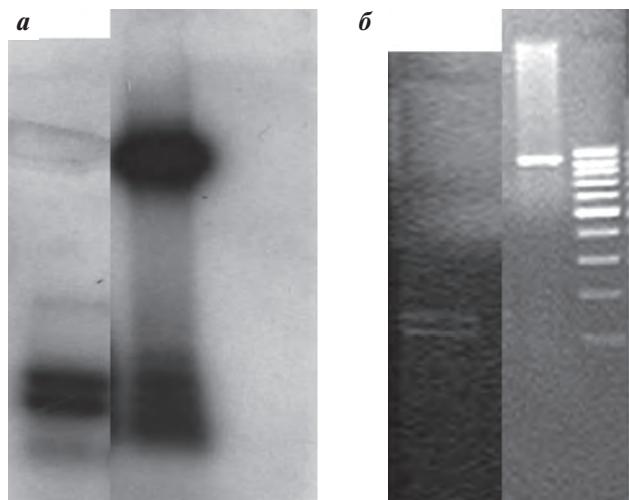


Рис. 5. Сравнение чувствительности выявления мРНК E48 радиоактивным методом (а) и в обычной ПЦР (б). Справа налево: 1-я дорожка соответствует маркеру, вторая – геномной ДНК E48 (908 п. о.), третья – кДНК E48 (130 п. о.). Рис. а: 1-я дорожка не видна, так как маркеры не являются радиомеченными. Рис. б: значительное усиление сигнала после радиоавтографии

Определение порога чувствительности радиоактивного мечения выполняли на линии A431. РНК, выделенную из 100 000 клеток A431, последовательно разводили и проводили ОТ. Радиоактивно меченный нуклеотид (^{32}P -dCTP) добавляли на этапе ПЦР-амплификации кДНК, полностью замещая им холодный dCTP. Последующий электрофорез в агарозном геле проводили по стандартной методике.

Мы использовали электрофоретический Саузерн-блоттинг (см. рис. 3), который позволяет проводить реакцию в более короткое время и избежать диффузии, снижающей чувствительность метода. Это особенно ценно при определении мРНК единичных опухолевых клеток. Эффективность электрофоретического переноса продуктов ПЦР из агарозного геля на мембрану Hybond-N+ показана на рис. 4.

Использование радиоактивной метки и электрофоретического Саузерн-блоттинга повышает чувствительность обнаружения до 1 клетки линии A431. Это видно на примере как гена E48, так и кДНК (рис. 5).

Однако применение радиоактивной метки имеет ряд ограничений из-за того, что радиоактивность – изотоп с короткой жизнью (период полураспада ^{32}P 2 нед) и требует регулярных поставок, объем которых невозможно заранее спланировать с учетом поступления больных. Поэтому необходимо вести поиск более чувствительных нерадиоактивных методов. Для этого потребовалось придание ДНК иммуногенности. В качестве иммуногена использовали BrdUTP. При оценке эффективности видно его включение в продукты с различной молекулярной массой: 130 п. о. – кДНК E48, 210 п. о. – кДНК β-глобина, 908 п. о. – ДНК гена E48 с инtronом (рис. 6).

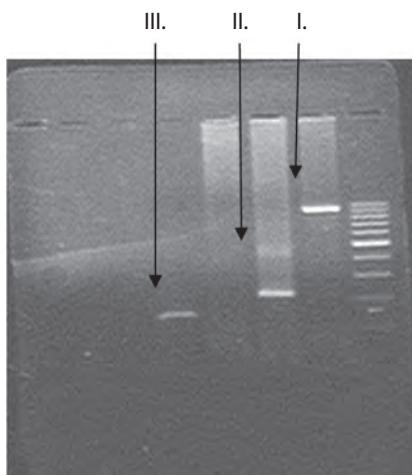


Рис. 6. Включение BrdUTP (вместо dTTP) в продукт ПЦР: I – 908 п. о. – ген E48; II – 210 п. о. – β-глобин; III – 130 п. о. – кДНК E48

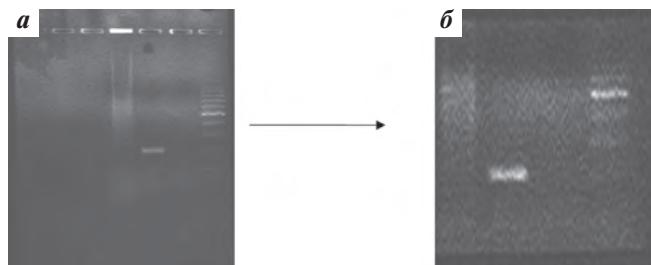


Рис. 7. Фиксация ДНК с включенным BrdUTP УФ-облучением: а – мембрана после блоттинга; б – УФ-фиксация (увеличенный фрагмент)

Таким образом, использование BrdUTP на этапе ПЦР позволяет эффективно выявлять ПЦР-продукты с различной молекулярной массой (130 п. о., 210 п. о., 908 п. о.). Однако в этих экспериментах не исключена возможность включения нуклеотидов (dTTP), привнесшихся на этапах ОТ и синтеза кДНК E48. Прямое подтверждение включения BrdUTP и иммуногенности продукта ПЦР может быть получено только иммунологически.

Поскольку любое иммунологическое проявление требует многократных отмывок от несвязавшихся антител, то необходима дополнительная фиксация ДНК к мембране, что в нашем случае было осуществлено с помощью УФ (рис. 7).

После отмывок и нанесения флуоресцирующих антител к BrdU в ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича» проводили сканирование мембранны на приборе Typhoon 9440 (лазер 488 нм), детектировали излучение 532 нм (рис. 8).

Таким образом, продукт ПЦР с включенным BrdU выявляется с помощью флуоресцирующих антител прямым коньюгатом анти-BrdU-FITC (см. рис. 8).

По данным литературы [25], флуоресцентное окрашивание уступает иммуноферментному по чувствительности в несколько раз. Это хорошо известно как из иммуногистохимического опыта окрашивания

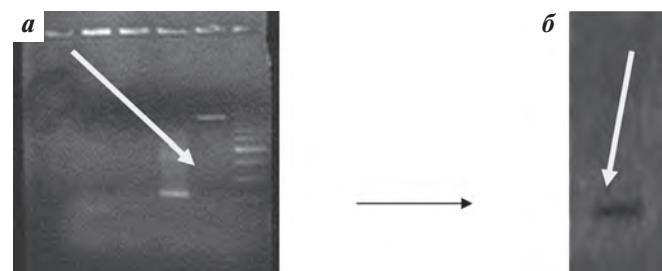


Рис. 8. Иммунолюминесцентное проявление BrdU, включенного в кДНК E48. Сканирование мембранны: а – после электрофоретического иммуноблоттинга (справа налево): маркер молекулярной массы, геномная ДНК E48 (908 п. о.), кДНК E48 (130 п. о.), бромистый этидий; б – фрагмент мембранны с полосой кДНК E48 после окрашивания FITC-меченными антителами к BrdU, отмыток и проявления на приборе Typhoon 9440

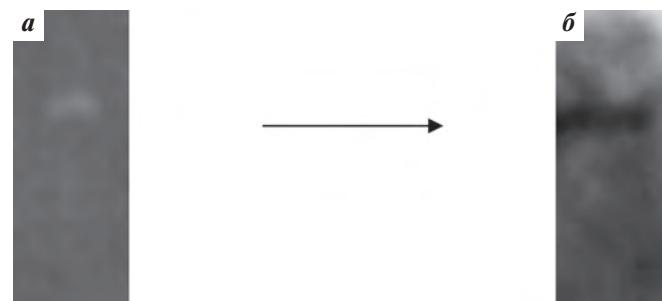


Рис. 9. Высокая чувствительность хемилюминесцентного проявления (линия A431): а – нейлоновая мембрана Hybond-N+ после непрямого иммуноферментного окрашивания и отмывок перенесенной Саузерн-блоттингом амплифицированной кДНК E48 (окрашивание бромистым этидием); б – фотопленка после хемилюминесцентного проявления связавшихся с ДНК антител, меченых пероксидазой хрена (значительное усиление сигнала)

тканей, так и из использования иммуноферментного окрашивания продуктов ПЦР с хемилюминесцентной детекцией сигнала. Чувствительность иммуноферментного метода соответствует чувствительности метода детекции мРНК с радиоактивной гибридизацией (^{32}P -dTTP). По этим причинам мы оценили возможность использования непрямого иммуноферментного метода для выявления BrdU-меченной кДНК E48. В качестве субстрата в этих случаях стандартно применяли ECL (рис. 9).

Проведение исследований на модельной системе – клетках линии A431 – с использованием разведений РНК и добавлением различных количеств клеток к нормальному КМ позволило установить, что данным методом возможно обнаруживать 1 клетку A431 среди 10 млн миелокарциоцитов КМ. В 11 контрольных образцах КМ (здоровые лица или пациенты с гемобластозом) сигнал E48 не обнаружен (исследовали от 5×10^6 до 3×10^7 миелокарциоцитов).

Иммуноферментное проявление BrdUTP, включенного в продукт ОТ-ПЦР после Саузерн-блоттинга с использованием в качестве субстрата ECL, значительно повышает чувствительность обнаружения метастатических клеток ПРГШ в КМ и позволяет выделять мРНК из 1 клетки.

Таким образом, нами разработан высокочувствительный нерадиоактивный метод детекции экспрессии мРНК E48, включающий 16 этапов. Разумеется, данный метод является достаточно трудоемким.

1. Выделение общей РНК.
2. Выполнение ОТ.
3. Проведение ПЦР с включением BrdUTP вместо dTTP.
4. Разделение продуктов ПЦР электрофорезом в агарозном геле.
5. Электрофоретический Саузерн-блоттинг, перенос продуктов ПЦР на нейлоновую мембрану.
6. Высушивание мембранны.
7. Фиксация ДНК к мемbrane УФ-облучением.
8. Блокирование неспецифического связывания антител.
9. Обработка мембранны антителами к BrdU.
10. Отмычки от несвязавшихся антител.
11. Нанесение вторичных антител, меченых пероксидазой хрина.
12. Отмычки от несвязавшихся антител.
13. Нанесение субстрата ECL.
14. Помещение мембранны в тонкую пленку (необходимо избегать контакта влажной мембранны с фотопленкой).
15. Экспозиция с высокочувствительной фотопленкой в специальных кассетах.
16. Проявка фотопленки.

Подводя итог этому разделу работы, можно отметить, что нами оценен ряд методов, позволяющих повысить чувствительность обнаружения амплифицированной кДНК E48. Наиболее приемлемыми с точки зрения возможности обнаружения 1 метастатической клетки ПРГШ среди 10 млн миелокариоцитов явились радиоактивный метод и иммуноферментный метод с усилением хемилюминесцентного сигнала.

С использованием высокочувствительных методов исследование проведено у 19 больных ПРГШ ($4,4 \times 10^6 - 5,4 \times 10^7$ миелокариоцитов). В 2 случаях из 19 было отмечено низкое качество РНК (не было сигнала мРНК β -глобина). Из 17 оставшихся пациентов у 6 (35,3 %) выявлен продукт экспрессии E48, 130 п. о. (в позитивных случаях изучено $1,1 \times 10^7 - 2,7 \times 10^7$ миелокариоцитов).

Характеристика гемопоэза у больных плоскоклеточным раком головы и шеи

Возникновение опухоли и ее дальнейшее развитие приводят к разнообразным клиническим проявлениям в организме. Сложный комплекс биологически активных веществ, продуцируемых опухолью, оказывает влияние на системы и органы человека, в том числе на гемопоэз.

Анализ 41 аспираата КМ показал, что миелограммы больных независимо от количества миелокариоцитов характеризуются уменьшением содержания молодых

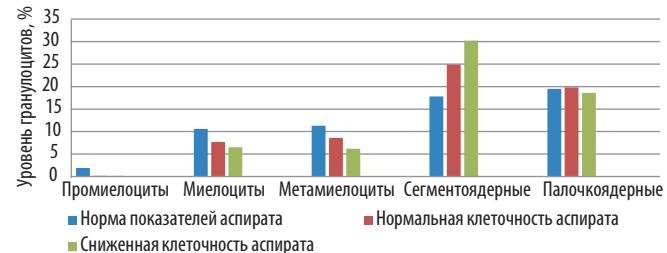


Рис. 10. Изменение клеточного состава гранулоцитарного ростка



Рис. 11. Уровень моноцитов и лимфоцитов в КМ больных ПРГШ

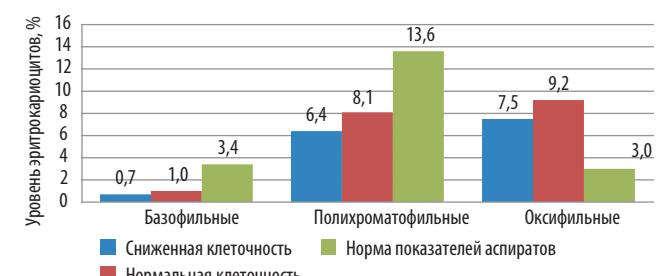


Рис. 12. Редукция клеток эритроидного ряда в КМ больных ПРГШ

форм и увеличением зрелых элементов нейтрофильно-го ряда (в сравнении с нормой) без изменения индекса созревания нейтрофилов и процента клеток гранулоцитарного ростка (рис. 10).

Количество моноцитов и лимфоцитов было достоверно выше нормы у пациентов с нормальной и сниженной клеточностью ($p = 0,05$) (рис. 11).

При сравнении с нормой показателей клеток эритроидного ростка было выявлено снижение базофильных и полихроматофильных нормобластов с одновременным повышением содержания окси菲尔ных форм ($p = 0,05$), что привело к увеличению индекса созревания эритроидных клеток. При этом сумма клеток эритроидного ряда не выходила за пределы нормальных значений (рис. 12).

В группе больных с метастазами в КМ (MTC^+) отмечено достоверное повышение суммарного количества клеток гранулоцитарного ростка до 72 % в сравнении с пациентами без микрометастазов в КМ (MTC^-) за счет всех (зрелых и незрелых) морфологически распознаваемых форм (рис. 13).

Учитывая данные изменения, закономерным является снижение показателя индекса созревания ней-

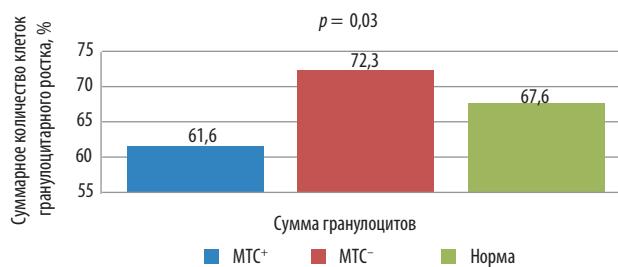


Рис. 13. Суммарное количество клеток гранулоцитарного ряда в 2 группах больных ПРГШ

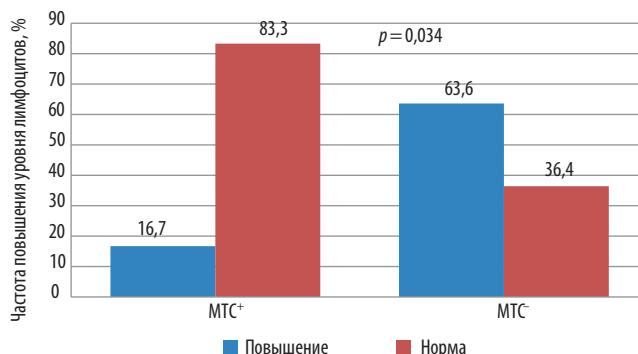


Рис. 14. Частота повышения уровня лимфоцитов в КМ 2 групп больных ПРГШ

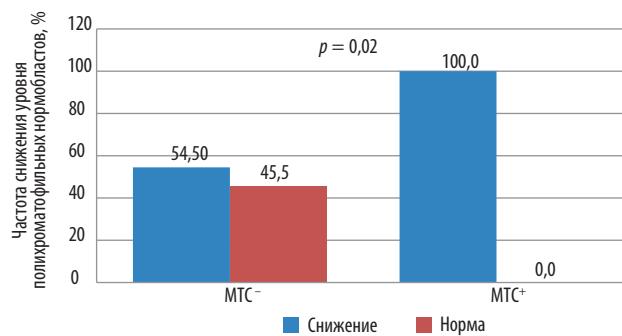


Рис. 15. Частота снижения уровня полихроматофильных нормобластов в КМ 2 групп больных ПРГШ

трофилов (среднее значение нормы – 0,6). В обеих группах отмечено снижение индекса созревания нейтрофилов до 0,4 ($p = 0,76$). Уровень лимфоцитов у MTC⁺- пациентов был в пределах нормы, что отличает их от остальных больных ПРГШ и косвенно свидетельствует об отсутствии разбавления периферической кровью (рис. 14).

Суммарное количество клеток эритроидного ростка в КМ в 2 рассматриваемых группах пациентов (MTC⁺ и MTC⁻) достоверно не различалось, отличия касались только полихроматофильных нормобластов ($4,6 \pm 1,2$ и $8,0 \pm 1,2$ соответственно, $p = 0,02$). При выявлении микрометастазов процентное содержание этих клеток было достоверно снижено и не было зафиксировано ни одного случая, где бы количество полихроматофильных нормобластов колебалось в нормальных пределах (рис. 15).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о существовании отличий в показателях КМ-кроветворения у больных ПРГШ по сравнению с нормой.

Взаимосвязь показателей гемопоэза с клиническими и морфологическими характеристиками опухоли

Особеностей КМ-кроветворения в зависимости от пола и возраста больных не выявлено. Нами установлено, что локализация опухолевого процесса имела ограниченную связь с показателями миелограмм. При раке ротовоглотки отмечено снижение уровня миелоцитов ($p = 0,03$) и повышение содержания лимфоцитов ($p = 0,04$). Следует отметить, что при проведении молекулярного исследования КМ наибольшую группу представляли больные раком языка. Нами были оценены 2 группы пациентов в зависимости от локализации опухоли: поражение языка ($n = 8$) и остальные локализации орофарингеальной зоны ($n = 9$) – ротовоглотка ($n = 2$), гортаноглотка ($n = 2$), слизистая оболочка полости рта ($n = 5$) (табл. 3).

Наиболее часто микрометастазы в КМ выявляются при раке языка (в 2,5 раза чаще, чем при других локализациях), однако в нашем исследовании мы не получили корреляции между наличием микрометастазов в КМ и локализацией опухолевого процесса ($p = 0,232$).

В зависимости от размера первичной опухоли показано нарушение дифференцировки эритрокариоцитов без изменения их процентного содержания ($21,8 \pm 2,9\%$) в миелограмме при размере опухоли T4

Таблица 3. Выявление микрометастазов в зависимости от локализации опухолевого процесса

Микрометастазы	Локализация опухолевого процесса		χ^2	p
	язык, n (%)	остальные, n (%)		
Наличие	4 (50)	2 (22)	1,431	0,232
Отсутствие	4 (50)	7 (78)		

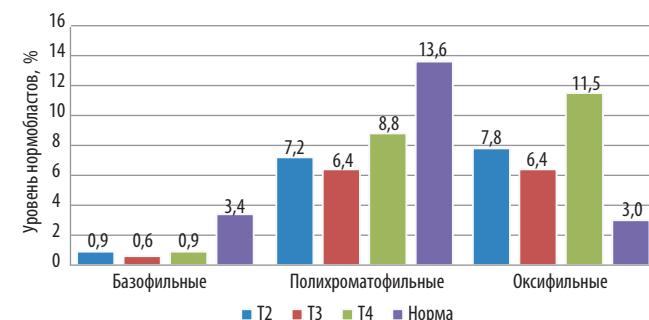


Рис. 16. Влияние размера первичной опухоли на эритроидный росток

Таблица 4. Взаимосвязь первичного объема опухоли и поражения КМ

Размер первичной опухоли	Микрометастазы		χ^2	p
	наличие, n (%)	отсутствие, n (%)		
T2	3 (42,9)	4 (57,1)	1,466	0,481
T3	1 (16,7)	5 (83,2)		
T4	2 (50,0)	2 (50,0)		

и изолированное повышение окси菲尔льных нормобластов (11,5 %; $p < 0,05$) в этой группе, что достоверно отличается от содержания данных элементов в нормальном КМ и у больных с размером опухоли T2 и T3 (рис. 16).

Объем первичной опухоли не имел статистически значимой взаимосвязи с наличием микрометастазов ПРГШ в КМ (табл. 4).

Обращает на себя внимание тот факт, что микрометастазы в КМ могут обнаруживаться даже при опухолях небольшого размера (T2).

Нами оценены аспиранты КМ больных с поражением регионарных ЛУ и без. Существенных различий в показателях клеточного состава КМ не выявлено ($p > 0,05$). Различия определялись только в количестве миелокариоцитов ($24,3 \times 10^3/\text{мкл}$ и $48,1 \times 10^3/\text{мкл}$ в группах с поражением ЛУ и без соответственно; $p = 0,01$). В зависимости от размера и количества пораженных ЛУ отмечено снижение уровня миелокариоцитов при N0 – $24,3 \pm 3,7 \times 10^3/\text{мкл}$ против N1 – $46,5 \pm 8,3 \times 10^3/\text{мкл}$ и N2 – $47,6 \pm 15,6 \times 10^3/\text{мкл}$ ($p < 0,05$) (табл. 5).

При сравнении 2 групп больных – с положительным сигналом мРНК E48 в КМ и при отсутствии мРНК E48 – поражение регионарных ЛУ (N1–3) наблюдалось чаще у пациентов с микрометастазами в КМ ($p = 0,046$) (табл. 6).

Стадия опухолевого процесса в большей степени определяет прогноз течения заболевания, так как включает совокупность 2 критериев: локальное распространение и поражение зон регионарного метастазирования. При сопоставлении показателей миело-

Таблица 5. Клеточность КМ в зависимости от статуса ЛУ (N0 и N1)

Клеточность КМ	Регионарные метастазы		χ^2	p
	N0, n (%)	N1, n (%)		
Сниженная	9 (64,3)	1 (9,1)	7,819	0,005
Нормальная	5 (35,7)	10 (90,9)		

Таблица 6. Поражение регионарных ЛУ (N1–3) и микрометастазы в КМ

Микрометастазы в КМ	Поражение регионарных ЛУ		χ^2	p
	нет, n (%)	есть, n (%)		
Наличие	0 (0)	4 (100)	2,0	0,046
Отсутствие	3 (37,5)	5 (62,5)		

грамм при различных стадиях (II, III, IVa, IVb) опухолевого процесса статистически достоверных различий получено не было. Также нами не установлено взаимосвязи микрометастатического поражения КМ со стадией заболевания ПРГШ ($p = 0,78$).

Степень дифференцировки опухолевых клеток плоскоклеточного рака имеет достоверную взаимосвязь с особенностями КМ-кроветворения у больных ПРГШ. Так, для низкодифференцированных опухолей оказалось характерным резкое снижение клеточности КМ ($14,5 \times 10^3/\text{мкл}$; $p = 0,091$) и изолированное снижение уровня метамиелоцитов (5,3 %; $p = 0,049$) в сравнении с умеренно дифференцированными опухолями (рис. 17).

Мы проанализировали миелограммы больных в зависимости от дальнейшего течения опухолевого процесса после проведенного лечения. Прогрессирование опухолевого процесса отмечено у 12 пациентов. Сравнение миелограмм в 2 группах (с прогрессированием опухоли, $n = 12$, и без такового, $n = 28$) выявило изменения в отдельных показателях аспирантов. В группе больных с прогрессированием опухолевого процесса определялось снижение клеточности КМ практически в 2 раза по сравнению с группой без прогрессирования ($27,1 \pm 5,2$ и $46,0 \pm 8,5$ соответственно), однако статистически достоверных различий не получено ($p = 0,17$). Кроме того, уровень молодых клеток гранулоцитарного ростка – промиелоцитов у пациентов с прогресси-



Рис. 17. Влияние степени дифференцировки первичной опухоли на показатели аспиранта КМ

Таблица 7. Взаимосвязь прогрессирования опухолевого процесса и наличия микрометастазов в КМ пациентов

Микрометастазы в КМ	Прогрессирование опухолевого процесса		χ^2	<i>p</i>
	нет, <i>n</i> (%)	есть, <i>n</i> (%)		
Наличие	3 (50,0)	3 (50,0)	3,61	0,057
Отсутствие	10 (90,9)	1 (9,1)		

рованием опухоли был снижен и составил $0,017 \pm 0,01$, в то время как в группе без прогрессирования – $0,3 \pm 0,06$ (*p* = 0,016).

Молекулярный анализ аспиратов КМ показал, что в группе с положительным сигналом *E48* частота прогрессирования заболевания составила 50 %, у пациентов без поражения КМ – 9,1 % (*p* = 0,057) (табл. 7).

Выводы

Подводя итог вышеизложенному, стоит отметить, что изменения в миелограммах больных ПРГШ могут свидетельствовать о своего рода «реакции» КМ на опухолевый рост, что согласуется с современными представлениями о влиянии опухолевых клеток на КМ-кроветворение. В случаях с выявленными микрометастазами эти изменения носят более очертанный характер и заключаются в увеличении суммарного содержания клеток гранулоцитарного ростка и снижении полихроматофильных нормобластов при нормальном уровне лимфоцитов и ряда других клеток КМ. Патогенетической причиной этих изменений, возможно, является продукция опухолевыми клетками комплекса биологически активных веществ, которые влияют на КМ-кроветворение. Кроме того, эти изменения возможно расценивать как проявления местного иммунного ответа на присутствие чужеродного компонента в КМ больных ПРГШ.

Л И Т Е Р А Т У РА / REFERENCES

- Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2013 году. Под ред.: М.И. Давыдова, Е.М. Аксель. М., 2015. [Statistics of malignant neoplasms in Russia and CIS countries in 2013. By eds.: M.I. Davydov, E.M. Aksel'. Moscow, 2015. (In Russ.)].
- Пачес А.И. Опухоли головы и шеи. М.: Медицина, 2000. С. 126–42; 320–40. [Paches A.I. Head and neck tumors. Moscow: Meditsina, 2000. Pp. 126–42; 320–40. (In Russ.)].
- Матякин Е.Г. Клинические аспекты регионарного метастазирования рака языка и гортани. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1988. [Matyakin E.G. Clinical aspects of the regional tongue and pharynx metastases. Author's abstract of thesis ... of doctor of medicine. Moscow, 1988. (In Russ.)].
- Нуммаев Г.М. Рак гортаноглотки (современные методы диагностики, лечения и прогноза). Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1988. [Nummaev G.M. Hypopharynx cancer (modern diagnostics, treatment and forecast method). Author's abstract of thesis ... of doctor of medicine. Moscow, 1988. (In Russ.)].
- Kademan D., Bell R.B., Bagheri S. et al. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. J Oral Maxillofac Surg 2005;63(11): 1599–605.
- Ахундов А.А. Клиническое значение диплоидности ДНК при плоскоклеточном раке слизистой оболочки полости рта. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2000. [Akhundov A.A. Clinical value of the DNA diploidy at the epidermoid cancer of the oral mucosa. Author's abstract of thesis ... of candidate of medicine. Moscow, 2000. (In Russ.)].
- Уваров А.А. Органосохраняющие методы лечения местно-распространенного рака орофарингеальной области. Дис. ... д-ра мед. наук. М., 1997. [Uvarov A.A. Organ-preserving methods of treatment of the local cancer of the oropharyngeal area. Thesis ... of doctor of medicine. Moscow, 1997. (In Russ.)].
- Худират С.А. Анализ ДНК-цитометрических данных и их использование для прогнозирования течения опухолевого процесса при злокачественных опухолях слизистой оболочки полости рта и гортани. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1998. [Khudirat S.A. Analysis of DNA-cytometric data and its use for the forecasting of the tumor process course at malignant neoplasms of the mouth cavity and pharynx. Author's abstract of thesis ... of candidate of biology. Moscow, 1998. (In Russ.)].
- Colnot D.R., Nieuwenhuis E.J., Kuik D.J. et al. Clinical significance of micrometastatic cells detected by E48 (Ly-6D) reverse transcription-polymerase chain reaction in bone marrow of head and neck cancer patients. Clin Cancer Res 2004;10(23): 7827–33.
- Partridge M., Brakenhoff R., Phillips E. et al. Detection of rare disseminated tumor cells identifies head and neck cancer patients at risk of treatment failure. Clin Cancer Res 2003;9(14):5287–94.
- Крохина О.В. Микрометастазы рака молочной железы в костный мозг. Иммunoморфологическая диагностика. Дис. ... канд. мед. наук. М., 2003. [Krokhina O.V. Micrometastases of the mammary gland cancer to the bone marrow. Immuno-morphologic diagnostics. Thesis ... of candidate of medicine. Moscow, 2003. (In Russ.)].
- Mansi J.L., Easton D., Berger U. et al. Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: prognostic significance after 6 years' follow-up. Eur J Cancer 1991;27(12):1552–5.
- Harbeck N., Untch M., Pache L., Eiermann W. Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up. Br J Cancer 1994;69(3):566–71.
- Wiedswang G., Borgen E., Karesen R. et al. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. J Clin Oncol 2003;21(18):3469–78.
- Кузнецов Ю.В., Kovrigina E.S., Байдун Л.В. и др. Использование эритроцитарных индексов и показателей обмена железа в дифференциальной диагностике микроцитарных анемий. Гематология и трансфузиология 2000;45(6):46–8. [Kuznetsov Yu.V., Kovrigina E.S., Baydun L.V. et al. Using of erythrocyte indices and of iron exchange indices in the differential diagnostics of microcytic anemias. Hematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology 2000;45(6):46–8. (In Russ.)].

16. Hofmann T., Buchner A., Hofstetter A. et al. Prognostic relevance of disseminated tumour cells in bone marrow of patients with transitional cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2007;43(18):2678–84.
17. Pantel K., Aignherr C., Kollerman J. et al. Immunocytochemical detection of isolated cells in bone marrow of patients with untreated stage C prostatic cancer. *Eur J Cancer* 1995;31A(10):1627–32.
18. Pantel K., Izbicki J., Passlick B. et al. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet* 1996;347(9002):649–53.
19. Soeth E., Röder C., Juhl H. et al. The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal-cancer patients by a cytokeratin-20-specific nested reverse-transcriptase-polymerase-chain reaction is related to the stage of disease. *Int J Cancer* 1996;69(4):278–82.
20. Weitz J., Kienle P., Magener A. et al. Detection of disseminated colorectal cancer cells in lymph nodes, blood and bone marrow. *Clin Cancer Res* 1999;5(7):1830–6.
21. Brakenhoff R.H., Stroomer J.G., ten Brink C. et al. Sensitive detection of squamous cells in bone marrow and blood of head and neck cancer patients by E48 reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Clin Cancer Res* 1999;5(4):725–32.
22. Соколов В.В., Грибова И.А. Гематологические показатели здорового человека. М.: Медицина, 1972. [Sokolov V.V., Gribova I.A. Hematologic indices of healthy humans. Moscow: Meditsina, 1972. (In Russ.)].
23. Наследов А.Д. SPSS. Компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках. СПб.: Питер, 2005. [Nasledov A.D. SPSS. Computer analysis of data in psychology and social sciences. Saint Petersburg: Piter, 2005. (In Russ.)].
24. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М., 2006. [Rebrova O.Yu. Statistic analysis of medical data. Application of the applied programs' package STATISTICA. Moscow, 2006. (In Russ.)].
25. Dakhama A., Hegele R.G. A nonradioactive method for rapid and sensitive detection of polymerase chain reaction products by use of bromo-desoxyuridine. *Mod Pathol* 1996;9(8):849–53.