

Інститут онкології
АМН України

Київський центр хірургії
печінки, підшлункової залози
та жовчних протоків, Київ,
Україна

Ключеві слова: рак підшлункової залози, полімеразна ланцюгова реакція, цитокератин-20, KRAS, юкстарегіонарні лімфовузли, мікрокарциноз.

ОСОБЛИВОСТІ ТА КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНОГО ВИЯВЛЕННЯ ОКУЛЬТНИХ МЕТАСТАЗІВ У РЕГІОНАРНИХ ЛІМФОВУЗЛАХ ХВОРИХ НА РАК ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ

Резюме. Проаналізовано результати досліджень, присвячених вивченню клінічної значущості молекулярно-біологічного виявлення поодиноких ракових клітин у регіонарних лімфовузлах хворих на рак голівки підшлункової залози (стадія N0M0) за наявності мутації онкогена KRAS та експресії мРНК цитокератину-20. Висвітлено методіку збору біоматеріалу для цього дослідження за допомогою полімеразної ланцюгової реакції та прогностичну цінність результатів останньої порівняно з рутинним гістологічним дослідженням.

Рак підшлункової залози (РПЗ) за рівнем захворюваності займає 14-те місце у світі, кожного року реєструють приблизно 216 000 нових випадків захворювання на РПЗ. Незважаючи на значний прогрес у розумінні патогенезу й пошук нових підходів до лікування пацієнтів з РПЗ, прогноз цього захворювання несприятливий. Сьогодні не існує ефективного тесту або скринінгової програми для ранньої діагностики РПЗ. 5-річну виживаність виявляють тільки у хворих, яким виконали R0-резекцію з приводу РПЗ, але вона не перевищує 5%. 80% хворих помирають протягом 1 року від встановлення діагнозу РПЗ [1]. 90% РПЗ становлять протокові аденокарциноми, 70% з них — рак голівки підшлункової залози (РГПЗ) [2]. Приблизно 30% випадків РПЗ пов'язують з тютюнопалінням і менше ніж 8% — зі спадковими синдромами [3].

Єдиним шансом для досягнення довгострокової виживаності у цих хворих залишається «куративна» резекція. Стандартним на сьогодні методом резекції при РГПЗ є операція Віпля-Кауша з регіонарною лімфодисекцією, або розширена панкреатодуоденальна резекція. Лімфодисекцію починають із латерального боку верхньої брижової артерії та власної печінкової артерії, вона включає лімфовузли (ЛВ) вздовж ворітної вени, верхньої брижової вени, а також видалення ЛВ голівки підшлункової залози та панкреатодуоденальної зони. Ця процедура відповідає R1-резекції в японській номенклатурі (не плутати з R1 резекцією за UICC). Видалення параортальних, паракавальних ЛВ та ЛВ навколо черевного стовбура, селезінкової артерії та решти навколо верхньої брижової артерії відоме як R2-резекція. Саме ця операція надає можливість докладно дослідити локальні та юкстарегіонарні ЛВ, а також досягнути 5-річної виживаності у 33% відсотків хворих на РГПЗ I стадії згідно з UICC [4, 5]. Проте чистий край ре-

зекції за відсутності віддалених метастазів вдається забезпечити лише у 10–15% втручань [6], а рівень післяопераційних ускладнень залишається дуже високим — 30–40% [2]. Однак у деяких центрах досягнуто значних успіхів у цьому напрямку: післяопераційну смертність вдалося знизити у 1,5–2,2 раза [7, 8], після операції хворі перебувають у стаціонарі 8–15 днів, а загальна 5-річна виживаність досягає 13,8–16,4% [9, 10]. Та незважаючи на це, локально-регіональні рецидиви РПЗ виникають у понад 40% хворих протягом 6 міс, а в 60–80% — протягом 12 міс після радикальної резекції [11–13].

Серед незалежних позитивних прогностичних факторів довгострокової виживаності оперованих хворих при локальнопоширеній формі РГПЗ найважливішим є відсутність мікроскопічних ознак пухлини на краю резекції. Негативне значення для прогнозу має високий рівень поліплоїдії, наявність мутованих p53 та KRAS у первинній пухлині, розмір останньої більший ніж 2 см та низький ступінь гістологічного диференціювання [9, 14–18], хоча A. Taparfel та співавтори ставлять під сумнів роль останніх двох чинників [19]. Лімфоваскулярна, періневрально, ретроперитонеальна та судинна інвазія (найчастіше у ворітну вену) також мають значний негативний вплив на післяопераційну виживаність [20–22]. М. Kayağara та співавтори [23] наполягають на важливості оцінки періневральної інвазії не тільки інтрапанкреатичного, але й екстрапанкреатичного нервового сплетіння, оскільки вже на ранніх стадіях РПЗ малігнізовані клітини інфільтрують периневрій останнього. Виходячи з цього, він вважає, що справжня R0-резекція може бути виконана тільки у разі дисекції верхньобрижового, черевного та печінкового нервового сплетіння.

Ще один вагомий негативний прогностичний фактор — метастатичне ураження регіонарних ЛВ

[13, 21, 24, 25]. Однак J.Y. Fortner та співавтори [26] не підтвердили цей факт у своєму дослідженні, до якого залучили 56 хворих на РГПЗ, котрим виконали радикальну операцію, а також не виявили кореляції між розміром первинної пухлини та частотою метастатичного ураження регіонарних ЛВ. Проте більшість вчених вважають, що ураження регіонарних, особливо юкстарегіонарних ЛВ негативно впливає на безрецидивну та загальну виживаність [19, 27, 28]. О. Ishikawa та співавтори [29] наводять дані, що метастатичне ураження локальних та юкстарегіонарних ЛВ достовірно асоціює з нижчою виживаністю хворих, ніж у випадках ураження тільки локальних ЛВ [4].

Роль регіонарних ЛВ у дисемінації РГПЗ вивчають багато вчених [30]. Рутинно видалені ЛВ досліджуються гістологічно. Однак при подальшому спостереженні у радикально оперованих хворих із тумор-негативними ЛВ також розвивалися ранні локально-регіонарні рецидиви. Очевидно, патогістологічне дослідження не завжди дає змогу виявити метастатичне ураження ЛВ. Це призводить до гіподіагностики нодального статусу й помилкової оцінки прогнозу захворювання. За допомогою методу серійних зрізів (забарвлення гематоксилін-еозинном великої кількості послідовних зрізів одного препарату) було встановлено [31, 32], що частота виявлення тумор-позитивних ЛВ зростає при цьому на 20–30%. Цей факт спонукає використовувати більш чутливі діагностичні методи. Сьогодні з цією метою широко застосовують імуногістохімічні (ІГХ) та молекулярно-біологічні методи, що базуються, зокрема, на використанні полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). У серії досліджень із використанням ІГХ- та ПЛР-методів встановили, що у 53–73% хворих окремі ракові клітини наявні у гістологічно тумор-негативних ЛВ [33–38]. Деякі дослідники також повідомляють про клінічну релевантність цих результатів щодо прогнозу виживаності [35, 38–41]. Але таких досліджень проведено поки що небагато, й кількість хворих, залучених до аналізу, становить лише 10–20 осіб.

Звернемо увагу на феномен виявлених за допомогою сучасних чутливих методів ракових клітин — поодиноких або їх кластерів. Як їх називати? Метастазом у ЛВ можна вважати вторинне вогнище злоякісного росту, яке є наслідком адгезії ракової клітини, її екстравазації, проліферації, неоангіогенезу та стромальної реакції у лімфоїдній тканині. Мікрометастазом називають вогнище не більше 0,2 см [42]. Якщо вищенаведених ознак не виявляють, а відзначають місце лише молекулярні ознаки наявності малігнізованих клітин, Р. Hermanek [15] пропонує розцінювати цей феномен як *мікрокарциноз*.

Встановлено, що ІГХ-методи чутливі для виявлення мікрокарцинозу та мікрометастазів за допомогою імунобарвників до пухлиноасоційованих та епітелійспецифічних антигенів: цитокератини і

Вег-Ер4 вважають ефективними маркерами, що мають клінічну релевантність [43]. Так, за допомогою ІГХ-дослідження з використанням епітелійспецифічних антитіл Вег-Ер4 одержано дані про виживаність 13 хворих із ураженням ЛВ та 5 хворих без ознак ураження [38]. Медіана виживаності (МВ) відповідно становила 13 та 20 міс, а медіана безрецидивної виживаності (МБрВ) — 7 і 20 міс (різниця статично достовірна).

Існує також чутливий молекулярний метод детекції епітелійспецифічних та пухлиноасоційованих антигенів на рівні мРНК — реверс-транскриптазна ПЛР (РТ ПЛР) [44]. Цей метод дає змогу досліджувати більш за розміром зразки тканин, ніж ІГХ, однак сам зразок у ході реакції руйнується. Зберігається лише комплементарна ДНК (кДНК), що становить дезоксинуклеїнову копію всіх РНК, що містились у досліджуваному зразку тканини. кДНК може роками зберігатися при температурі нижче -74°C . Одержано дані [45], що ІГХ дає меншу кількість хибнопозитивних результатів, ніж неморфологічні методи, такі як проточна цитометрія або ПЛР. Та незважаючи на це, РТ ПЛР використовується для детекції цитокератину-20 (СК-20) як маркера поширення ракових клітин у крові, кістковому мозку та ЛВ [46–49]. Встановлено [50], що експресія мРНК СК-20 відбувається у 8 (89%) хворих із 9 на колоректальний рак. У 14 з 22 хворих на поширену форму РПЗ у периферичній крові встановлено експресію СК-20, у той час як у крові жодного з 22 здорових чоловіків експресії СК-20 не виявлено [51]. В іншому дослідженні [52] відзначали підвищення у 3,2 раза рівня мРНК СК-20 в 11 (46%) з 24 зразків РПЗ. Це дозволило авторам зробити висновок про доцільність використання СК-20 як маркера детекції метастазів при РПЗ.

Крім виявлення маркерних генів у хворих на РПЗ, ПЛР-технології також використовують для визначення мутацій у генах-супресорах і протоонкогенах, наприклад *p53* і *KRAS* [53]. Вперше інформацію про мутацію *KRAS* у метастазі у ЛВ людини 1985 р. опублікували V. Prassolov та співавтори [54]. Мутації у кодоні 12, 13 або 61 гена *KRAS* конвертують його в активний онкоген [55]. У 1988 р. було з'ясовано, що мутації у кодоні 12 гена *KRAS* відбуваються приблизно у 90% випадків екзокринного РПЗ [56]. Схожі дані пізніше отримали R.H. Hruban та співавтори [57], які дослідили 450 зразків аденокарциноми підшлункової залози й продемонстрували, що у 85% з них виникли мутації у кодоні 12 гена *KRAS*. У 1991 р. був запропонований відносно простий та чутливий метод детекції точкової мутації у кодоні 12 гена *KRAS* [58]. Це так звана ПЛР збагачення, або RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism — рестрикція поліморфізму довжини) ПЛР. Суть її в тому, що після першої ампліфікації (ПЛР) відбувається рестрикція та повторна ампліфікація тільки тієї ДНК, що містить мутацію або становить поліморфізм. У дослідження [40] залуче-

ВЗГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ

но 12 хворих на РГПз з первинною пухлиною стадії T1–T3 (за UICC), для детекції окультних метастазів у регіонарних ЛВ використовували RFLP ПЛР. Автори звітують про 60% 5-річну виживаність у групі хворих без молекулярних ознак метастазування у регіонарних ЛВ проти нульової 5-річної виживаності у хворих з ознаками метастазування у регіонарні ЛВ. За результатами статистичного аналізу різниця була достовірною. Т. Yamada та співавтори [41], котрі залучили до експерименту 18 хворих на РГПз, також повідомили про достовірну різницю виживаності у 13 хворих з молекулярними ознаками метастазів у юкстарегіонарних ЛВ та 5 хворих без ознак метастазування [34]. МВ та МБрВ не наведені. На відміну від попереднього дослідження, використовували так звану реакцію MASA (специфічна ампліфікація мутантного алелю), що також ґрунтується на ПЛР.

N. Ando та співавтори [36] виявляли *KRAS*-мутації з метою визначення ураження парааортальних ЛВ у хворих на РГПз. Дослідникам не вдалося встановити статистично достовірного зв'язку з клінічним прогнозом у 7 хворих без ознак і у 8 хворих з ознаками ураження ЛВ. На відміну від цих даних, в іншому дослідженні [39] відзначено достовірно вищу виживаність 42 хворих із неураженими ЛВ порівняно з 12 хворими, у яких виявлено молекулярні (*KRAS*) ознаки метастазування в парааортальні ЛВ.

Наші дослідження були проведені на базі Хірургічної клініки університету м. Ульм (Німеччина) [59] із залученням 28 радикально оперованих хворих на РГПз, від яких отримано 531 регіональний ЛВ (у середньому 19 ЛВ від хворого). Результати не підтвердили статистично достовірної залежності між наявністю молекулярних ознак метастазів (ні *KRAS* мутації, ні експресії мРНК СК-20 окремо) у віддалених ЛВ та виживаністю хворих. У групі з *KRAS*-позитивними юкстарегіонарними ЛВ, що складалася з 9 хворих, МВ і МБрВ, 2-річна актуальна виживаність і 2-річна безрецидивна виживаність були рівні та становили відповідно 18 міс та 33%. У групі з *KRAS*-негативними віддаленими ЛВ, що складалася з 5 хворих, ці показники відповідно становили 24 й 16 міс, 60 та 40%. При порівнянні актуальної виживаності в цих групах методом log rank достовірність похибки p дорівнювала 0,58 при статистичній значущості $p \leq 0,05$. У групі з СК-20-позитивними віддаленими ЛВ, що складалася з 9 хворих, МВ і МБрВ, 2-річна актуальна виживаність та 2-річна безрецидивна виживаність становили відповідно 18 й 16 міс, 33 та 22%. У групі з СК-20-негативними віддаленими ЛВ, що складалася з 5 хворих, ці показники відповідно становили 33 й 26 міс, 67 та 56%. При порівнянні актуальної виживаності в цих групах методом log rank достовірність похибки p становила 0,38 при статистичній значущості $p \leq 0,05$. У наведених дослідженнях простежено тільки тенденцію до зниження виживаності хворих з мікрокарциномом, але статистичної значимості не встановлено. Однак статис-

тичну значущість різниці між виживаністю хворих з та без мікрокарцинозу у парааортальних ЛВ було встановлено, коли ознакою мікрокарцинозу вважали наявність позитивних СК-20- й *KRAS*-маркерів в одному ЛВ. Це можна пояснити тим, що цей комбінований маркер є адекватним для виявлення саме живих пухлинних клітин, тому що мРНК (у тому числі й СК-20) є короткоживучою молекулою і швидко деградує після загибелі клітини, а наявність *KRAS*-мутації свідчить про агресивний фенотип. Це підтверджує доцільність подальшого використання комбінованих геномних та епігеномних маркерів з метою виявлення ракових клітин з метастатичним потенціалом й, відповідно, визначення їх прогностичної цінності у клініці.

Причиною розбіжностей у результатах оцінки клінічного значення явища мікрокарцинозу є відсутність чіткої стандартизації методики приготування проб для молекулярно-біологічного дослідження, суб'єктивність оцінки й відсутність чітких стандартів щодо кількості й частоти зрізів при гістологічному дослідженні, а також обмеження кількості учасників. У більшості названих робіт з використанням ПЛР ЛВ одразу після видалення поділяли на дві рівні частини через ворота у їх сагітальній площині. Одну половину заморожували у рідкому азоті (-180°C) для подальшого подрібнення й екстракції нуклеїнових кислот. У разі детекції геномних мутацій (наприклад *KRAS*) екстрагували ДНК. Іншу половину послідовно заливали формаліном, етанолом, ксилітом, потім парафіном, з парафінового блоку виготовляли зрізи, забарвлювали гематоксилін-еозином й досліджували мікроскопічно. Таким чином, одну половину ЛВ досліджували тільки молекулярно, а іншу — тільки гістологічно. Якщо нашою метою є виявлення мікрокарцинозу, тобто ізольованих пухлинних клітин, які ще не мають ознак мікрометастазу, то виходячи з дефініції мікрометастазу, серійні зрізи парафінового блоку потрібно виконувати не більше як через 2 мм. А першу половину ЛВ слід не заморожувати, а також спочатку досліджувати гістологічно. Після цього всі залишки блоків від обох половин ЛВ необхідно обробляти ксилітом й екстрагувати ДНК згідно з протоколом відповідного «кіту». Цю методику було відпрацьовано у власному досліді. Таким чином, 100% тканини ЛВ досліджується гістологічно, завдяки серійним зрізам з кроком ≤ 2 мм уникається можливість помилкового розцінення мікрометастазу як мікрокарцинозу, детекція *KRAS*-мутації чи іншого маркера є ознакою наявності ізольованих ракових клітин без морфологічних ознак неоангіогенезу й стромальної реакції. Отже, тільки дотримання цих вимог щодо процедури дослідження тканин одночасно з розширенням вибірки хворих для можливості використання непараметричних статистичних методів дасть нам змогу достовірно оцінити прогностичну роль мікрокарцинозу ЛВ як клінічного явища.

У проаналізованих вище дослідженнях з використанням ПЛР наявність зв'язку виявлених молекулярних елементів з клінічним прогнозом може бути пов'язана саме з похибками в діагностиці мікрометастазів. Справа в тому, що виявлена за допомогою ПЛР знахідка *KRAS*-мутації (або будь-якої іншої) свідчить тільки про наявність у досліджуваному зразку відрізка ДНК, навіть не обов'язково цілого гена. Т.Л. Wu та співавтори [60] встановили, що у циркулюючій крові у хворих онкологічного профілю містяться не тільки пухлинні клітини, а також і позаклітинна пухлинна ДНК довжиною до 500 нуклеотидів. ДНК такої довжини достатньо для «успішної» ПЛР. До цього полінуклеотиду можуть адгезувати так звані праймери (олігонуклеотиди, що підбираються до специфічної генетичної послідовності з обох боків досліджуваного відрізка). Праймери активують ДНК-полімеразу, після цього починається так звана ампліфікація специфічної послідовності (багатократна реплікація, число копій сягає 2^{30} – 2^{40}). Тобто за результатом ПЛР ми не можемо визначити, скільки саме ДНК було у зразку? Була це внутрішньоклітинна чи позаклітинна ДНК? Була це жива ракова клітина чи фагоцитована? І навіть якщо це була жива клітина, не можна забувати, що не кожна ракова клітина, яка залишила своє первинне місце розташування, має метастатичний потенціал, принаймні по відношенню до ЛВ. На мембрані клітини — «кандидата в метастази» — мусить бути репрезентований цілий спектр рецепторів, що зроблять можливою адгезію цієї клітини до лімфоцитів, ендотеліоцитів та тромбоцитів. Клітина з метастатичним потенціалом експресує різні типи інтегринів та інших молекул, що у разі лімфогенної дисемінації мають спорідненість до стромальних елементів ЛВ: вітронектину та фібронектину [61, 62]. Тільки за умов надійної адгезії з багатьма структурними елементами ЛВ можлива подальша пухлинна проліферація та інвазія.

Всі ці питання ставлять під сумнів прогностичне клінічне значення мікрокарцинозу, якщо його оцінювати за допомогою тільки одного методу. Матеріали цього огляду свідчать про необхідність підвищення рівня морфологічного дослідження регіонарних ЛВ. Статус ЛВ є суттєвим прогностичним фактором, який має бути точно оцінений. Звичайне гістологічне дослідження забарвленням гематоксилін-еозином при адекватній частоті зрізів (< 2 мм) дає можливість виявляти мікрометастази. За умов рутинного дослідження кількість зрізів ЛВ повинна становити не менше 5. Сьогодні молекулярне дослідження може лише доповнювати патогістологічне, але ніяк не замінити його. Питання виявлення мікрокарцинозу у клініці поки що залишається відкритим і має надалі комплексно досліджуватися й у регіональних ЛВ, кістковому мозку, циркулюючій крові з використанням більш широкого спектра генетичних та епігеномних маркерів і нових технологій кількісної ПЛР у реальному часі, що значно прискорює

рять цю процедуру, яка триває 6–8 год від моменту отримання біоматеріалу.

ПОДЯКА

Виконання цієї роботи стало можливим завдяки підтримці Німецької служби академічного обміну DAAD та Фонду наукових досліджень *Pankreaskarzinom Stiftung*, Німеччина, у 2002–2003 р.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was provided under support of DAAD research fellowship and *Pankreaskarzinom Stiftung*, Germany, 2002–2003.

ЛІТЕРАТУРА

1. **Warshaw AL, Fernandez-del Castillo C.** Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med* 1992; **326**: 455–6.
2. **Stewart B, Kleihues P. (Eds).** World Cancer Report. IARC Press. Lyon 2003: 248–52.
3. **Cameron JL. ed.** Pancreatic Cancer. Hamilton, London. BC Decker. 2001: 25–36.
4. **Sener S, Fremgen A, Menck H, et al.** Pancreatic cancer: A report of treatment and survival trends for 100 313 patients diagnosed from 1985–1995, using the national cancer database. *J Am Coll Surg* 1999; **189**: 1–7.
5. **Sobin LH, Wittekind Ch.** TNM Classification of malignant tumors.—5th ed.: Wiley-Liss, New York. 1997: 87–91.
6. **Beger HG, Rau B, Gansauge F, et al.** Treatment of pancreatic cancer: challenge of the facts. *World J Surg* 2003; **27**: 1075–84.
7. **Guoma D, van Geenen RCI, van Gulik THM.** Rates of complications and death after pancreaticoduodenectomy: risk factors at the impact of hospital volume. *Ann Surg* 2000; **232**: 786–94.
8. **Gordon T, Burleyson G, Tielsch J, et al.** The effects of regionalization on cost and outcome for one high-risk general surgical procedure. *Ann Surg* 1995; **221**: 43–9.
9. **Griffin J, Smallay S, Jewel W, et al.** Patterns of failure after curative resection of pancreatic carcinoma. *Cancer* 1990; **66**: 56–61.
10. **Westerdahl J, Andrew-Sandberg A, Ihse I.** Recurrence of exocrine pancreatic cancer: local or hepatic? *Hepatogastroenterology* 1993; **40**: 384.
11. **Takahashi S, Ogata Y, Miyazakai H, et al.** Aggressive surgery for pancreatic duct cell cancer: feasibility, validity, limitations. *World J Surg* 1995; **19**: 653–60.
12. **Trede M, Schwall G, Seger HD.** Survival after pancreaticoduodenectomy. 118 consecutive resections without an operative mortality. *Ann Surg* 1990; **211**: 447–58.
13. **Kayahara N, Nagakawa T, Keno K, et al.** An evaluation of radical resection for pancreatic cancer based on the mode of recurrence as determined by autopsy and diagnostic imaging. *Cancer* 1993; **72**: 2118.
14. **Willet C, Lewandrowski K, Warshaw A, et al.** Resecton margins in carcinoma of the head of the pancreas. Implications for radiation therapy. *Ann Surg* 1993; **217**: 144–8.
15. **Hermanek P.** Pathology and biology of pancreatic adenocarcinoma. *Langenbeck's Arch Surg* 2000; **383**: 116–20.
16. **Magistrelli P, Antinori A, Crucitti A, et al.** Prognostic factors after surgical resection for pancreatic carcinoma. *J Surg Oncol* 2000; **74**: 36–40.
17. **Benassai G, Mastrorilli M, Quatro G, et al.** Factors influencing survival after resection for ductal adenocarcinoma of the head of the pancreas. *J Surg Oncol* 2000; **74**: 212–8.
18. **Geer R, Brennan M.** Prognostic factors for survival after resection of pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg* 1993; **165**: 68–73.
19. **Tanapfel A, Wittekind C, Hunefeld G.** Ductal adenocarcinoma of the pancreas histopathological features and prognosis. *Int J Pancreatol* 1992; **12**: 145–52.

20. Ozaki H, Hiraoka T, Miyamoto R, *et al.* The prognostic significance of lymph node metastasis and intrapancreatic perineural invasion in pancreatic cancer after curative resection. *Surg Today* 1999; **29**: 16–22.
21. Gebhardt C, Meyer W, Reichel M, *et al.* Prognostic factors in the operative treatment of ductal pancreatic carcinoma. *Langenbecks Archives of Surgery* 2000; **385**: 14–20.
22. Luttges J, Vogel I, Menke M, *et al.* The retroperitoneal resection margin and vessel involvement are important factors determining survival after pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the head of the pancreas. *Virchows Arch* 1998; **433**: 237–42.
23. Kayahara M, Nagakawa T, Ueno I, *et al.* Surgical strategy for carcinoma of the pancreas head based on clinicopathologic analysis of nodal involvement and plexus invasion. *Surgery* 1995; **117**: 616–23.
24. Ishikawa O, Ohigashi H, Sasaki Y, *et al.* Practical usefulness of lymphatic and connective tissue clearance for the carcinoma of the pancreas head. *Ann Surg* 1988; **208**: 215–20.
25. Sperti C, Bonadimani B, Pasquali C, *et al.* Recurrence after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas-clinicopathologic features and survival. *Tumori* 1993; **79**: 325–30.
26. Fortner JG, Klimstra DS, Senie RT, *et al.* Tumor size is the primary prognosticator for pancreatic cancer after regional pancreaticoduodenectomy. *Ann Surg* 1996; **223**: 147–53.
27. Magistrelli P, Antinori A, Crucitti A, *et al.* Surgical resection of pancreatic cancer. *Tumori* 1996; **85**: 22–6.
28. Delcore R, Rodriguez F, Forster J, *et al.* Significance of lymph node metastases in patients with pancreatic cancer undergoing curative resection. *Am J Surg* 1996; **172**: 463–69.
29. Ishikawa O, Ohigashi H, Sasaki Y, *et al.* Practical grouping of positive lymph nodes in pancreas head cancer treated by an extended pancreatectomy. *Surgery* 1997; **121**: 2444–9.
30. Осинский СП, Черный ВА, Осинский ДС, Глузман ДФ. Диагностическое и прогностическое выявление опухолевых клеток в лимфатических узлах и костном мозге больных раком поджелудочной железы с помощью молекулярно-биологических методов. *Онкология* 2001; **3**: 96–102.
31. Gusterson B. Are micrometastases clinically relevant? *British J Hospitalization* 1991; **47**: 247–8.
32. Dowlathahi K, Fan M, Snider H, *et al.* Lymph node micrometastases from breast carcinoma: reviewing the dilemma. *Cancer* 1997; **80**: 1188–97.
33. Ghossein RA, Bhattacharya S. Molecular detection and characterisation of circulating tumour cells and micrometastases in solid tumours. *Eur J Cancer* 2000; **36**: 1681–94.
34. Cai J, Ikeguchi M, Tsujitani S, *et al.* Micrometastases in lymph nodes of mucosal gastric cancer. *Gastric Cancer* 2000; **3**: 91–6.
35. Harrison LE, Choe JK, Goldstein M, *et al.* Prognostic significance of immunohistochemical micrometastases in node negative gastric cancer patients. *J Surg Oncol* 2000; **73**: 153–7.
36. Ando N, Nakao A, Nomoto S, *et al.* Detection of mutant K-ras in dissected paraaortic lymph nodes of patients of pancreatic carcinoma. *Pancreas* 1997; **15**: 274–378.
37. Demuere M, Doffek K, Komorowsky R, *et al.* Adenocarcinoma of the pancreas. Detection of occult metastases in regional lymph nodes by PCR based assay. *Cancer* 1998; **83**: 1328–34.
38. Hosch S, Knoefel W, Metz S, *et al.* Early lymphatic tumor dissemination in pancreatic cancer: frequency and prognostic significance. *Pancreas* 1997; **15**: 154–9.
39. Niedergethman M, Rexin M, Hildenbrand R, *et al.* Prognostic implications of routine, immunohistochemical, and molecular staging in resectable pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2002; **26**: 1578–87.
40. Tamagawa E, Ueda M, Takahashi S, *et al.* Pancreatic lymph nodal and plexus micrometastases detected by enriched polymerase chain reaction and non-radioisotopic single strand conformation polymorphism analysis: A new predictive factor for recurrent pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 1997; **3** (11): 2143–9.
41. Yamada T, Nakamori S, Ohzato H, *et al.* Outcome of pancreatic cancer patients based on genetic lymph node staging. *Int J Oncol* 2000; **16**: 1165–71.
42. Wittekind Ch. Diagnosis and staging of lymph node metastasis. *Rec Res in Cancer Res* 2000; **157**: 20–8.
43. Braun S, Pantel K, Muller P, *et al.* Micrometastases of bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000; **342**: 525–33.
44. Bilchik A, Miyashiro M, Kelley M, *et al.* Molecular detection of metastatic pancreatic carcinoma cells using a multi marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Cancer* 2000; **88**: 1037–44.
45. Yamamoto N, Kato Y, Yanagisawa S, *et al.* Predictive value of genetic diagnosis for cancer micrometastasis: histologic and experimental appraisal. *Cancer* 1997; **80**: 1393–8.
46. Soeth E, Roeder C, Juhl H. Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolated from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. *Cancer Res* 1997; **57**: 3106–10.
47. Weitz J, Kienle P, Lacroix J, *et al.* Dissemination of tumor cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1998; **4**: 343–8.
48. Funaki N, Tanaka J, Ohshio G, *et al.* Cytokeratine 20 mRNA in peripheral venous blood of colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer* 1998; **77**: 1327–32.
49. Futamura M, Takagi Y, Koumura H, *et al.* Spread of colorectal cancer micrometastases in regional lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen and cytokeratins 20. *J Surg Oncol* 1998; **68**: 34–40.
50. Wyld D, Selby P, Perren T, *et al.* Detection of colorectal cancer cells in peripheral blood by reverse-transcriptase polymerase chain reaction for cytokeratin 20. *Int J Cancer* 1998; **79**: 288–93.
51. Chausovsky G, Luchansky M, Figer A, *et al.* Expression of cytokeratin 20 in the blood of patients with disseminated carcinoma of the pancreas, colon stomach and lung. *Cancer* 1999; **86**: 2398–405.
52. Wildi S, Kleef J, Maruyama H, *et al.* Characterization of cytokeratin 20 in expression in pancreatic and colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 2840–7.
53. Yamaguchi K, Chijiwa K, Torato N, *et al.* Ki-ras codon 12 and P53 mutations: a molecular examination of the main tumor, liver, portal vein, peripheral arterial blood and para-aortic lymph node in pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol* 2000; **93**: 1939–45.
54. Prassolov V, Sakamoto H, Sugimura S. Activation of c-Ki-ras gene in human pancreatic cancer. *Jpn J Cancer Res* 1985; **76**: 792–5.
55. Bos JL. K-ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989; **49**: 4682–9.
56. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, *et al.* Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1998; **53**: 549–54.
57. Hruban RH, van Mansfeld ADM, Offerhaus GJA, *et al.* K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* 1993; **143**: 545–54.
58. Kahn S, Jiang W, Culbertson T, *et al.* Rapid and sensitive nonradioactive detection of mutant K-ras genes via «enriched» PCR amplification. *OncoGene* 1993; **6**: 1079–83.
59. Zemskov SV. Molecular detection in regional lymph nodes in patients with cancer of the head of the pancreas. *Clinical relevance*. *Uni Ulm* 2004: 84.
60. Wu TL, Zhang D, Chia JH, *et al.* Cell free DNA measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clinica Chimica Acta*. 2002; **321**: 77–87.
61. Nip J, Shibata H, Loskutoff D. Human melanoma cells derived from lymphatic metastases use integrin $\alpha V\beta 3$ to adhere to lymph node vitronectin. *J Clin Invest* 1992; **90**: 1406–13.
62. Tawil N, Gowri V, Djoneidi M. Integrin $\alpha 3\beta 1$ can promote adhesion and spreading of metastatic breast carcinoma cells on the lymph node stroma. *Int J Cancer* 1996; **66**: 703–10.

**SPECIFICS AND CLINICAL IMPORTANCE
OF MOLECULAR BIOLOGICAL DETECTION
OF OCULT METASTASES IN LYMPH NODES
OF PATIENTS WITH PANCREATIC CANCER**

S.V. Zemskov

Summary. The paper reviews findings of investigations aiming to study the clinical importance of molecular biological detection of single cancer cells in regional lymph nodes of patients with cancer of the head of pancreas (stage n0m0) based on the mutation of kras oncogene and cytokeratin 20 mrna expression. a technique is discussed which can

ВЗГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ

be used to collect biomaterial for this test with the help of polymerase chain reaction and the prognostic value of the latter as compared to routine histologic examination.

Key Words: pancreatic cancer, polymerase chain reaction, cytokeratin 20, KRAS, juxtraregional lymph nodes, microcarcinosis.

Адреса для листування:

Земсков С.В.
03022, Київ, вул. Ломоносова, 33/43
Інститут онкології АМН України