

С.П. Осинский
В.А. Черный
Д.С. Осинский
Д.Ф. Глузман

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Институт онкологии АМН Украины, Киев, Украина

Ключевые слова:

рак поджелудочной железы, диагностика, метастазы, лимфатические узлы, костный мозг, иммуноцитохимия, молекулярно-биологические методы.

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ВЫЯВЛЕНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ И КОСТНОМ МОЗГЕ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Резюме. Приведены результаты исследований, посвященных выявлению с помощью иммуноцитохимических и молекулярно-биологических методов опухолевых клеток в лимфатических узлах и костном мозге больных при раке поджелудочной железы (РПЖ) и ряде других локализаций. У трети больных РПЖ (стадия N0) с помощью иммуноцитохимических и молекулярных методов опухолевые клетки выявляются в ретропанкреатических лимфатических узлах. У 20–65% больных РПЖ в стадии M0 раковые клетки обнаружены в костном мозге, что свидетельствует о более агрессивной природе опухоли, а также о более высокой степени риска развития отдаленных метастазов. Отмечена тесная корреляция между наличием опухолевых клеток в костном мозге и реакцией опухоли на проводимое лечение. Широкое применение молекулярно-биологических методов выявления опухолевых клеток в костном мозге больных с различными злокачественными опухолями в целях повышения эффективности диагностики и лечения требует стандартизации методологических подходов и технологий и универсализации исследовательских протоколов.

Заболеваемость раком поджелудочной железы (РПЖ), одной из наиболее трудных для лечения форм злокачественных опухолей, продолжает повышаться. РПЖ является одной из основных причин смертности вследствие злокачественных опухолей в США и европейских странах, включая Украину [1–3]. Показатель общей 5-летней выживаемости больных составляет лишь 0,4–20% [4]. Неблагоприятный прогноз является следствием несвоевременной диагностики из-за малочисленности и неспецифичности симптомов на ранних стадиях РПЖ, а также анатомо-физиологических особенностей органа. Даже у операбельных больных, число которых не превышает 30% [5], медиана выживаемости составляет лишь 18 мес [6], а показатель 5-летней выживаемости после экстирпации поджелудочной железы, осуществленной в специализированных хирургических центрах, едва достигает 30% [7, 8]. Столь неутешительные результаты лечения объясняются ранним метастазированием РПЖ в региональные лимфатические узлы и печень [9, 10].

При рутинном гистологическом исследовании удаленных во время операции лимфатических узлов дискретные опухолевые клетки или их малые

агрегаты в препаратах трудно идентифицировать [11, 12]. В то же время микрометастазы, которые выявлены у 75% больных с РПЖ даже в стадиях T1 и T2, могут быть причиной неудачи первичного лечения [13].

В настоящее время мы не располагаем точными тестами для определения стадии РПЖ до операции. Отсутствуют также достоверные и доступные критерии для выявления больных с высоким риском развития метастазов после удаления первичной опухоли. В то же время установление распространенности опухолевого процесса до выявления его клинических признаков является важным для правильного выбора тактики лечения. Наиболее часто используемый метод определения в сыворотке крови больных РПЖ экспрессии белка СА 19–9 не удовлетворяет онкологов, так как его содержание может быть повышенным при заболеваниях поджелудочной железы неопухолевой природы или нарушении функции печени.

Благодаря достижениям иммуноцито- и иммуногистохимической, а также молекулярно-биологической техники сегодня можно выявлять так называемые микрометастазы (или оккультные метастазы) в

лимфатических узлах, смывах из плевральной и брюшной полости, в крови и костном мозге. Появляющиеся в литературе данные указывают на то, что применение моноклональных антител (мкАТ) к белкам цитоскелета, ряду ткане- и органоспецифических и опухолеассоциированных антигенов позволяет выявлять опухолевые клетки в лимфатических узлах и других биологических объектах с высокой степенью точности [14, 15]. Особый интерес представляют цитокератины — белки, которые являются неотъемлемыми составными частями цитоскелета нормальных и злокачественно трансформированных эпителиальных клеток. Применение мкАТ к цитокератинам, которые экспрессируются опухолями эпителиального происхождения, позволяет идентифицировать единичные опухолевые клетки среди окружающих 10^5 – 10^6 неопухолевых клеток лимфатического узла или костного мозга. Исходя из этого цитокератины можно рассматривать в качестве надежных маркеров клеток эпителиальной природы.

Приведем несколько примеров, показывающих значение новых диагностических технологий. Ishida и соавторы [12] обнаружили микрометастазы в лимфатических узлах у 9,4% больных раком желудка с помощью традиционных гистологических методик, а при иммуноцитохимическом исследовании — у 17,6% пациентов. Авторы сделали вывод, что присутствие микрометастазов в лимфатических узлах является обязательным фактором, который нужно учитывать при определении прогноза у больных раком желудка. Cai и соавторы [16] у 13% больных раком желудка в лимфатических узлах определили метастазы при окраске гематоксилином-эозином и у 34% — при иммуноцитохимическом исследовании. Примечательно, что у 25% больных метастазы были выявлены в лимфатических узлах, в которых обычными методами раковые клетки обнаружены не были. Об обнаружении с помощью иммуногистохимических методов раковых клеток в лимфатических узлах больных раком желудка, у которых с помощью традиционных методов диагностируют стадию N0, сообщили Harrison и соавторы [17].

У больных РПЖ при использовании иммуноцитохимических и молекулярно-биологических методов также обнаруживали опухолевые клетки в лимфатических узлах в тех случаях, когда при обычном гистологическом исследовании их не выявляли. Demeure и соавторы [18] исследовали регионарные лимфатические узлы с учетом того факта, что в 90–95% случаев в клетках РПЖ определяют мутацию кодона 12 *K-ras*. С помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), направленной на выявление мутированного онкогена *K-ras*, авторы обнаружили опухолевые клетки (по крайней мере в одном из лимфатических узлов) у 73% больных РПЖ в стадии T1–N0M0. Авторы сделали вывод, что микрометастазы в регионарных лимфатических узлах являются основной причиной неблагоприятного прогноза у больных РПЖ в стадии T1.

Примечательна работа Kayahara и соавторов [9], в которой описано, что парааортальные лимфатические узлы могут быть безопасно удалены во время оперативного вмешательства у больных РПЖ и раком желудка. Применение обычных гистологических методик позволило выявить метастазы в регионарных лимфатических узлах у больных, оперированных по поводу рака головки (76% случаев), тела и хвоста (83% случаев) поджелудочной железы. У 18% больных метастазы были обнаружены в парааортальных лимфатических узлах. Не удалось установить корреляцию между размером опухоли и вовлечением в процесс парааортальных лимфатических узлов. Все парааортальные лимфатические узлы, пораженные метастазами, располагались в 16М области (между чревным стволом и верхней брыжеечной артерией). Только у 33% больных метастатическое поражение парааортальных лимфатических узлов было обнаружено до или во время операции. Авторы пришли к выводу, что расширенная панкреатэктомия, включающая удаление парааортальных лимфатических узлов от чревного ствола до верхней брыжеечной артерии, может улучшить прогноз у больных с инвазивной протоковой аденокарциномой поджелудочной железы (исключая больных, у которых процесс является запущенным). По мнению авторов, у большинства больных РПЖ необходимо проводить расширенное удаление лимфатических узлов, включая парааортальные. На значение исследования лимфатических узлов с целью выявления метастазов указывают Magistrelli и соавторы [19] и Belassai и соавторы [20], которые установили, что размер первичной опухоли и состояние лимфатических узлов при РПЖ являются наиболее значимыми прогностическими факторами.

Приведенные данные достаточно убедительно демонстрируют диагностическую ценность иммуноцитохимического исследования лимфатических узлов у больных РПЖ. Выявление метастатического поражения лимфатических узлов дает возможность корректировать стадию заболевания и соответственно тактику лечения.

Не менее серьезной проблемой, от решения которой во многом зависит выбор правильного лечения больного с онкопатологией и благоприятный исход заболевания, является обнаружение метастазов до их клинических проявлений. Современные диагностические методы, даже с учетом новейших технологий, не дают возможности выявить одиночные, диссеминированные опухолевые клетки. Для обозначения этих клеток, которые не выявляются с помощью обычных светооптических методов, Sloane и соавторы [21] использовали термин «микрометастазы». Хотя этот термин применяется довольно широко, высказываются мнения о необходимости его изъятия или коррекции [22]. Следует обратить внимание на рекомендацию Hegmanek и соавторов [23] отличать единичные раковые клетки от микрометастазов. Авторы считают, что микроме-

тастазы — это образования из опухолевых клеток, наибольший размер которых равен или менее 0,2 см. Циркулирующие (диссеминированные) опухолевые клетки, которые не формируют таких образований, предложено называть одиночными опухолевыми клетками, а их скопления — малыми кластерами. Одиночные опухолевые клетки не контактируют со стенками сосудов или лимфатических синусов и не пенетрируют их. При наличии одиночных опухолевых клеток отсутствует внесосудистая (внесосудная) реакция элементов стромы. Микростазазы же образуются тогда, когда происходит имплантация опухолевых клеток в том или ином органе или ткани и их пролиферация, что часто сопровождается соответствующей реакцией стромальных элементов. Диагностирование микростазазов возможно на основе использования гистологических и иммуногистологических методов.

Не развивая терминологическую дискуссию, подчеркнем лишь, что весьма важной является улучшенная прямая идентификация как микростазазов или циркулирующих диссеминированных опухолевых клеток на ранних стадиях заболевания или до начала лечения, так и клеток минимальной остаточной опухоли после ее хирургического удаления или регрессии после проведенного консервативного лечения. На поздних стадиях болезни это может быть использовано для определения наличия и изменения количества остаточных опухолевых клеток, что может способствовать выбору способа лечения, его коррекции в соответствии с клиническими показателями у конкретного больного.

Известно, что опухоли эпителиальной природы часто метастазируют в кости скелета. С учетом этого факта нельзя считать неожиданным обнаружение опухолевых клеток у ряда больных со злокачественными опухолями в аспиратах костного мозга, в частности полученного при пункции подвздошного гребня [24–27]. Следует отметить, что эта анатомическая структура является местом интенсивного обмена клетками между кровью и мезенхимальным интерстицием. Примечательно, что оккультные опухолевые клетки нередко выявляют в костном мозге и у больных, у которых опухоли не метастазируют в кости скелета, например при колоректальном раке. Эти находки свидетельствуют о том, что в костном мозге быстрее всего можно обнаружить оккультные опухолевые клетки. В последнее время появились многочисленные исследования, которые развивают эту проблему на основе современных знаний о молекулярных основах злокачественного роста и применения молекулярно-биологических технологий. Хорошее кровоснабжение костного мозга, развитая сеть синусов и мельчайших капилляров, насыщенность разнообразными клеточными элементами, своеобразие микроокружения являются оптимальными условиями для метастазирования опухолевых клеток в костный мозг [28].

Согласно данным ряда исследователей метастазы могут быть выявлены в костном мозге у больных с опухолями, у которых не удалось получить доказательств метастазирования с помощью традиционных клиничко-диагностических методов [29–32]. Наиболее часто метастазы в костный мозг наблюдаются при опухолях молочной железы, предстательной железы, щитовидной железы, раке легкого, нейробластоме и гипернефроме. Примечательна в этом отношении работа Браун и соавторов [33], в которой четко показано, что выявление цитокератин-положительных клеток в костном мозге больных раком молочной железы является независимым критерием прогноза данного заболевания. Опухолевые клетки с помощью иммуноцитохимических методов и мКАТ были обнаружены также в костном мозге у больных раком желудка, поджелудочной железы, колоректальным и кардиоэзофагеальным раком, с опухолями головы и шеи и даже у пациентов с опухолями головного мозга [34–36].

Имеются различные мнения о значении обнаружения раковых клеток в костном мозге: от предположения, что эти клетки (или микростазазы) — это лишь транзитные опухолевые элементы, попавшие из опухоли в циркуляцию и затем в костный мозг, до допущения, что они отражают метастатический потенциал первичной опухоли. В свое время Fidler [37] высказал предположение, что только 0,01% опухолевых клеток, которые попадают в кровотоки, способны дать начало развитию метастазов. К сожалению, проблема не получила должного развития, но естественно предположить, что не из всех клеток первичной опухоли, осевших в костном мозге, разовьются очаги метастатического поражения. Во-первых, они должны сохранить жизнеспособность и пролиферативную активность после возможного взаимодействия как со стромальными элементами костного мозга, так и с иммунокомпетентными клетками. Во-вторых, они должны пройти весьма сложный путь из костного мозга до тех органов и тканей, где они смогут имплантироваться, и через целый ряд сложных биологических реакций в ходе межклеточных взаимодействий дать начало росту метастатического узла. Получены новые данные о молекулярных механизмах образования метастазов, в частности, об участии хемокинов и их рецепторов в своеобразном «целевом» метастазировании клеток первичных опухолей в те или иные ткани и органы [38].

В этой связи примечательно, что микростазазы в костном мозге чаще обнаруживают при раке молочной железы, чем, например, при колоректальном раке. Это можно объяснить биологическими особенностями роста первичных опухолей и/или какими-то характерными свойствами их клеток, способствующими выживанию клеток рака молочной железы в костном мозге, что согласуется с известной теорией Педжета о «семенах и почве». Следует также учитывать значение факторов микроок-

ружения, которые поддерживают рост клеток рака молочной железы, но не клеток колоректального рака. Эта гипотеза может объяснить, почему клинические признаки метастатического поражения костей скелета у больных с колоректальным раком наблюдаются крайне редко, несмотря на присутствие диссеминированных клеток колоректального рака в костном мозге [14].

Следует указать на ошибочность мнения о том, что находящиеся в костном мозге клетки первичных опухолей образуют метастазы лишь в костях скелета. Наличие микрометастазов в костном мозге больных раком молочной железы часто сочетается с обнаружением метастазов как в костях скелета, так и в мягких тканях, а также с развитием местных рецидивов. Авторы полагают, что опухолевые клетки, обнаруженные в костном мозге, отражают метастатический потенциал опухоли [39]. К выводу о том, что ранние метастазы в костный мозг не коррелируют с другими показателями метастазирования, а скорее отражают более агрессивную биологическую характеристику первичных опухолей, пришли и другие авторы [40, 41].

Факторы, определяющие продолжительность латентного периода от начала диссеминации опухолевых клеток до клинической манифестации метастазов, неясны. Изучение этих вопросов является важным для понимания механизмов метастазирования и разработки средств борьбы с ним. Но уже сегодня бесспорна клиническая значимость выявления опухолевых клеток в костном мозге. Установлено, что большинство осевших в костном мозге опухолевых клеток ко времени хирургического вмешательства не являются активно пролиферирующими. По этой причине важным может быть проведение адьювантной терапии, которая ставит своей целью воздействовать как на пролиферирующие, так и на непролиферирующие клетки. Проведение периодического мониторинга костного мозга и периферической крови на наличие опухолевых клеток в процессе лечения помогло бы в выборе наиболее эффективных в каждом конкретном случае терапевтических подходов. Исследования по обнаружению и характеристике опухолевых клеток, диссеминировавших в костный мозг, позволят получить новые данные, которые могут стать оценочными для определения стадии развития опухоли и прогнозирования течения заболевания, а также выявить специфические маркеры для ранней оценки эффективности адьювантной терапии.

Исследований по выявлению опухолевых клеток в костном мозге больных РПЖ не столь много, но имеющиеся весьма информативны и дают возможность по-новому оценивать как полноту диагностики заболевания, так и тактику лечения.

Juhl и соавторы [42] исследовали костный мозг больных РПЖ с применением мКАТ к РЭА, СА-19-9 и цитокератинам и обнаружили раковые клетки у 58–61% больных. В группе неонкологических боль-

ных результаты были отрицательные. Показано также, что у 20% больных РПЖ в I–II стадии, у 65% — в III–IV стадии и у 45% больных после радикальной операции были обнаружены цитокератин-положительные клетки в костном мозге. Те же авторы установили [43], что присутствие раковых клеток в костном мозге больных РПЖ коррелировало со стадиями развития процесса. При этом цитокератин-положительные клетки оказались в костном мозге больных со стадией T1.

Thorban и соавторы [44] установили, что возникновение рецидива у больных после полного удаления опухоли сочеталось с обнаружением цитокератин-положительных клеток в костном мозге. Наличие подобных клеток оказалось весьма информативным показателем повышенной способности первичной опухоли к диссеминации и критерием для отбора больных с целью проведения неоадьювантной терапии.

Thorban и соавторы [45, 46] обнаружили цитокератин-положительные клетки в костном мозге у 58,3% операбельных больных РПЖ и у 55,6% больных с распространенным процессом. В костном мозге неонкологических больных цитокератин-положительные клетки не были обнаружены ни в одном случае. Примечательно, что у 35,7% больных, которым проведено полное хирургическое удаление опухоли, но у которых были обнаружены цитокератин-положительные клетки в костном мозге, с течением времени были выявлены отдаленные метастазы. У больных, у которых подобные клетки не были выявлены, метастазы не были обнаружены на протяжении такого же периода наблюдения. Авторы пришли к заключению, что наличие в костном мозге клеток, взаимодействующих с мКАТ к цитокератинам, свидетельствует о потенциальном риске раннего метастазирования.

Интересна работа Soeth и соавторов [47], в которой представлены результаты исследования с помощью ПЦР проб костного мозга больных РПЖ на наличие РНК, специфичной для цитокератина-20. Установлено, что у 19% больных с IV стадией заболевания пробы костного мозга дали положительные результаты. Это оказалось несколько неожиданным, так как количество выявленных подобным способом цитокератин-положительных клеток оказалось в 2–3 раза меньше такового, определяемого с помощью иммуноцитохимических методов. Не исключено, что метод ПЦР может давать ложноотрицательные результаты, особенно при выявлении оккультных опухолевых клеток. Следует также учитывать возможное наличие в исследуемой ткани ингибиторов, которые могут снижать чувствительность метода [36].

Подтверждением могут служить результаты работы Vogel и соавторов [48], в которой цитокератин-положительные клетки были обнаружены в костном мозге у 38% больных РПЖ. Частота обнаружения таких клеток повышалась при более поздних стадии-

яя заболевания, определяемых по системе TNM. Все больные, у которых в костном мозге определяли цитокератин-положительные клетки, умерли в течение 18 мес, тогда как 30% больных, у которых такие клетки не были выявлены, дожили до 5-летнего рубежа. Авторы рекомендуют исследовать костный мозг на наличие цитокератин-положительных клеток и применять этот тест как новый прогностический маркер у больных РПЖ.

Rodeg и соавторы [49] обнаружили цитокератин-положительные клетки в костном мозге у 48,4% операбельных больных РПЖ и у 58,8% — с распространенным опухолевым процессом. Число таких клеток колебалось от 1 до 83 на $5 \cdot 10^5$ миелокариоцитов. Цитокератин-положительные клетки выявляли на различных стадиях развития опухоли и поражения лимфатических узлов. У 40% больных, которым была произведена радикальная операция, но в костном мозге определяли цитокератин-положительные клетки, в течение последующих 3–48 мес были обнаружены отдаленные метастазы, а у 46,7% больных — местный рецидив заболевания. В то же время ни у одного из больных, в костном мозге которых не были выявлены цитокератин-положительные клетки, метастазы или рецидивы не наблюдались. Авторы пришли к выводу, что иммуноцитохимическое обнаружение опухолевых клеток в костном мозге больных РПЖ может помочь выявить больных с потенциальным риском раннего развития метастазов, выбрать соответствующую терапевтическую тактику и спрогнозировать ее результаты.

С определенной осторожностью высказываются Broil и соавторы [50], которые, не отрицая приведенных выше данных и отмечая их диагностическое и прогностическое значение, указывают на необходимость стандартизации как иммуноцитохимических, так и молекулярно-биологических методов, применяемых для выявления опухолевых клеток в костном мозге, лимфатических узлах, венозной крови и в экссудатах из серозных полостей организма. Исследователи считают, что лишь после стандартизации этих методов можно будет делать обобщающие заключения. С этим мнением трудно не согласиться, но хотелось бы возразить авторам, что оптимизация методов, применяемых сегодня в клинике, и сопоставление получаемых результатов с клиническими показателями могут принести реальную пользу как больным, так и в решении проблемы клинического значения применения указанных выше методов для диагностики и коррекции проводимого лечения.

В качестве подтверждения можно привести мнение Braun and Pantel [51], которые полагают, что иммуноцитохимический анализ костного мозга больных онкологического профиля оказывает серьезную и реальную помощь в диагностике, выборе тактики лечения и прогнозировании дальнейшего течения заболевания и результатов терапии. Авторы рекомендуют применять этот метод в целях

улучшения «стадирования» процесса, выбора адьювантной терапии, мониторинга реакции микрометастазов на адьювантную терапию, создания и контроля новой стратегии терапии опухолей. В то же время существует ряд проблем, которые необходимо разрешить. Среди них обнаружение в костном мозге у 1–3% пациентов неонкологического профиля цитокератин-положительных клеток [32]. Одной из вероятных причин этого может быть наличие экспрессии (хотя и очень редко) цитокератина-18 на неэпителиальных клетках костного мозга (например, плазматических клетках). При этом следует заметить, что ложноположительные результаты не столь опасны, как ложноотрицательные. Необходимо также стандартизация методологии обнаружения клеток, в частности выбор мКАТ, методики получения трепанобиоптата или пунктата костного мозга, количество анализируемых клеток. Рекомендуется разработка стандартизованных методов исследования костного мозга на наличие опухолевых клеток и тестирование их в различных клинических центрах для выработки унифицированных практических рекомендаций [22].

Интересны попытки применения методов молекулярной биологии для обнаружения опухолевых клеток [52]. В этой работе были применены методы ПЦР и иммуноблотинга для определения mRNA ряда маркеров опухолевой прогрессии (ген *c-met* рецептора фактора роста гепатоцитов; β -1,4-N-ацетил-галактозаминил-трансфераза; β -хорионический гонадотропин человека) в крови и тканях больных РПЖ. Было показано, что у 76–82% пациентов с IV стадией заболевания реакция на данные маркеры в крови была положительной. Установлено также, что при исследовании крови реакция была положительной при выявлении по крайней мере одного маркера у 88% больных со II–III стадией. В связи с этим следует заметить, что было бы весьма интересно и важно провести исследование костного мозга больных с помощью ПЦР на наличие в нем этих или других маркеров опухолевой прогрессии, в частности метастазирования.

Нами начаты исследования по выявлению опухолевых клеток в костном мозге больных РПЖ с использованием иммуноцитохимических методов и мКАТ к панцитокератинам, белку p53 и раковоэмбриональному антигену (РЭА). Образцы костного мозга получали путем стерильной пункции. Опухолевые клетки выявляли в мазках костного мозга и во фракции моноклеаров. В настоящее время могут быть представлены результаты исследования костного мозга 12 больных. Установлено, что у 35–44% больных РПЖ в стадии T2–3N–1M0 в костном мозге определены опухолевые клетки. Установлена также прямая корреляция между наличием опухолевых клеток в костном мозге этих больных и реакцией опухоли на проводимое лечение. В частности, медиана выживаемости больных с цитокератин-положительными клетками в костном мозге соста-

вила 5 мес, с цитокератин-отрицательными — 9,5 мес. Установлено при этом, что наличие цитокератин-положительных клеток в костном мозге не коррелирует с экспрессией РЭА и белка p53. Примечательно, что экспрессия белка p53 не коррелировала с прогнозом заболевания.

Основываясь на приведенных выше данных литературы и результатах собственных, пока еще немногочисленных, исследований по изучению лимфатических узлов и костного мозга больных РПЖ, можно прийти к следующему выводу. У трети больных РПЖ, у которых при использовании обычных методов метастазы в лимфатических узлах не определяют, с помощью иммуногистохимических и молекулярно-биологических методов могут быть обнаружены опухолевые клетки. Это свидетельствует о необходимости дополнительного исследования лимфатических узлов при оперативном лечении. У 20–65% больных РПЖ при стадии M0 обнаруживают опухолевые клетки в костном мозге, что может указывать как на более агрессивную биологическую характеристику данной опухоли, так и на повышенный риск появления отдаленных метастазов. Установлена прямая корреляционная связь между наличием опухолевых клеток в костном мозге и реакцией опухоли на проводимое лечение. Наличие оккультных опухолевых клеток в костном мозге больных с ранними стадиями РПЖ может быть фактором прогноза и назначения оптимальной терапии; при более поздних стадиях заболевания оно может определять наличие остаточных опухолевых клеток, что позволяет внести коррективы в программу лечения. Для решения вопроса о значении методики выявления опухолевых клеток в костном мозге больных РПЖ и с другими формами злокачественных опухолей в системе диагностики необходимы стандартизация методических подходов и унифицированные протокольные исследования в различных клиниках.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа поддержана Международным Противоопухолевым Союзом (международный грант онкологических технологий, ICRET No 227/2000).

ЛИТЕРАТУРА

1. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. *Cancer J Clin Oncol* 1999; **49**: 8–31.
2. Black RJ. Cancer incidence and mortality in the European Union: Cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur J Cancer* 1997; **33**: 1075–107.
3. Шалимов СА. Рак поджелудочной железы: заболеваемость и некоторые статистические аспекты. В кн: «Лікування розповсюджених злоякісних новоутворень підшлункової залози та заочеревинного простору», Матеріали наукового симпозиуму, Київ, 7–8 жовтня 1999; К.: АТ «Телеоптик», 1999, 3–6.
4. Wenger FA, Peter F, Zieren J, et al. Prognosis factors in carcinoma of the head of the pancreas. *Dig Surgery* 2000; **17**: 29–35.
5. Herfarth C, Klar E. Pancreatic cancer: indication for resective surgery. In: Beger H, Buchler M, Schoenberg M (eds) *Cancer of the pancreas*, 1st edn Ulm: Universitätsverlag Ulm GmbH, 1996; 335–40.

6. Hunstad DA, Norton JA. Management of pancreatic carcinoma. *Surg Oncol* 1995; **4**: 61–74.
7. Trede M, Schwab M. The extensive, palliative cancer operation. Is it worthwhile? What are its aims? *Langenbecks Arch Chir* 1996; Suppl II (Kongressbd 1996): 86–90.
8. Nagakawa T, Nagamori M, Futagami F, et al. Results of extensive surgery for pancreatic carcinoma. *Cancer* 1996; **77**: 640–5.
9. Kayahara M, Nagakawa T, Ohta T, et al. Analysis of paraaortic lymph node involvement in pancreatic carcinoma. A significant indication for surgery? *Cancer* 1999; **85**: 583–90.
10. Sperti C, Pasquali C, Piccoli A, Pedrazzoli S. Recurrence after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. *World J Surg* 1997; **21**: 195–200.
11. Mori M, Mimori K, Inoue H, et al. Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1995; **55**: 3417–20.
12. Ishida K, Katsuyama T, Sugiyama A, Kawasaki S. Immunohistochemical evaluation of lymph node micrometastases from gastric carcinomas. *Cancer* 1997; **79**: 1069–76.
13. Nagai H, Kuroda A, Marioka Y. Lymphatic and local spread of T1 and T2 pancreas cancer: a study of autopsy material. *Ann Surg* 1986; **204**: 65–71.
14. Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**: 1113–24.
15. Ghossein RA, Bhattacharya S. Molecular detection and characterisation of circulating tumour cells and micrometastases in solid tumours. *Eur J Cancer* 2000; **36**: 1681–94.
16. Cai J, Ikeguchi M, Tsujitani S, et al. Micrometastasis in lymph nodes of mucosal gastric cancer. *Gastric Cancer* 2000; **3**: 91–6.
17. 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.
18. Demeure MJ, Doffek KM, Komorowski RA, Wilson SD. Adenocarcinoma of the Pancreas. Detection of occult metastases in regional lymph nodes by a polymerase chain reaction-based assay. *Cancer* 1998; **83**: 1328–34.
19. Magistrelli P, Antinori A, Crucitti A, et al. Prognostic factors after surgical resection for pancreatic carcinoma. *J Surg Oncol* 2000; **74**: 36–40.
20. Benassai G, Mastroilli M, Quarto G, et al. Factors influencing survival after resection for ductal adenocarcinoma of the head of the pancreas. *J Surg Oncol* 2000; **74**: 212–8.
21. Sloane JP, Ormerod MG, Neville AM. Potential pathological application of immunocytochemical methods to the detection of micrometastases. *Cancer Res* 1980; **40**: 3079–82.
22. Muller P, Schlimok G. Bone marrow «micrometastases» of epithelial tumors: detection and clinical relevance. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; **126**: 607–18.
23. Hermanek P, Hutter RVP, Sobin LH, Wittekind Ch. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer* 1999; **86**: 2668–73.
24. Шевченко ИТ, Даштаянц ГА. Метастатические опухоли костей. К.: Здоров'я, 1967; 203 с.
25. Dearnaley DP, Sloane JP, Ormerod MG. Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen. *Br J Cancer* 1981; **44**: 85–90.
26. Ellis G, Ferguson M, Yamanaka E. Monoclonal antibodies for detection of occult carcinoma cells in bone marrow of breast cancer patients. *Cancer* 1989; **63**: 2509–14.
27. Schlimok G, Funke I, Holzmann B. Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 8672–6.
28. Schlimok G, Riethmuller G. Detection, characterisation and tumour genecity of disseminated tumour cells in human bone marrow. *Semin Cancer Biol* 1990; **1**: 207–15.
29. Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, et al. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol* 1991; **9**: 1749–56.

30. Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, *et al.* Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 1992; **340**: 685–9.
31. Diel IJ, Kaufman M, Goerner R, *et al.* Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis. *J Clin Oncol* 1992; **10**: 1534–9.
32. Weckermann D, Muller P, Wawroschek F, *et al.* Micrometastases of bone marrow in localized prostate cancer: correlation with established risk factors. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 3438–43.
33. Braun S, Pantel K, Muller P, *et al.* Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000; **342**: 525–33.
34. Глузман ДФ, Абраменко ИВ, Гребельная НИ, Осинский ДС. Иммуноцитохимическое выявление микрометастазов рака в костном мозге. *Лаб диагностика* 1998; **3**: 51–8.
35. Берензон ДГ, Колосков АВ, Тарасов ВА. Поражение костного мозга при солидных опухолях. *Гематол и трансфузиол* 2000; **45**: 35–8.
36. Ghossein RA, Bhattacharya S. Molecular detection and characterisation of circulating tumour cells and micrometastases in solid tumours. *Eur J Cancer* 2000; **36**: 1681–94.
37. Fidler IJ. Modulation of the organ microenvironment for treatment of cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1995; **87**: 1588–92.
38. Liotta LA. Cancer: an attractive force in metastasis. *Nature* 2001; **410**: 24–5.
39. Diel IJ, Kaufman M, Costa SD, *et al.* Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* 1996; **88**: 1652–8.
40. Menard S, Squicciarini P, Luini A, *et al.* Immunodetection of bone marrow micrometastases in breast cancer patients and its correlation with primary tumour prognostic features. *Br J Cancer* 1994; **69**: 1126–9.
41. Cote RJ, Hawes D, Chaiwun B, Beattie, *et al.* Detection of occult metastases in lung carcinomas: progress and implications for lung cancer staging. *J Surg Oncol* 1998; **69**: 265–74.
42. Juhl H, Stritzel M, Wroblewski A, *et al.* Immunocytological detection of micrometastatic cells: comparative evaluation of findings in the peritoneal cavity and the bone marrow of gastric, colorectal and pancreatic cancer patients. *Int J Cancer* 1994; **57**: 330–5.
43. Juhl H, Kalthoff H, Krueger U, *et al.* Immunocytologic detection of micro-metastatic cells in patients with gastrointestinal tumors. *Zentralbl Chir* 1995; **120**: 116–22.
44. Thorban S, Roder JD, Pantel K, Siewert JR. Immunocytochemical detection of isolated epithelial tumor cells in bone marrow of patients with pancreatic carcinoma. *Am J Surg* 1996; **172**: 297–8.
45. Thorban S, Roder JD, Pantel K, Siewert JR. Epithelial tumour cells in bone marrow of patients with pancreatic carcinoma detected by immunocytochemical staining. *Eur J Cancer* 1996; **32A**: 363–5.
46. Thorban S, Roder JD, Pantel K, Siewert JR. Immunocytochemischer Nachweis und prognostische Bedeutung von epithelialen Tumorzellen im Knochenmark bei Patienten mit Pankreaskarzinomen. *Zentralbl Chir* 1996; **121**: 487–92.
47. Soeth E, Vogel I, Roder Ch, *et al.* Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. *Cancer Res* 1997; **57**: 3106–10.

48. Vogel I, Krueger U, Marxsen J, *et al.* Disseminated tumor cells in pancreatic cancer patients detected by immunocytology: a new prognostic factor. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 593–9.

49. Roder JD, Thorban S, Pantel K, Siewert R. Micrometastases in bone marrow: prognostic indicators for pancreatic cancer. *World J Surg* 1999; **23**: 888–91.

50. Broll R, Widnhovel U, Schiedeck T, *et al.* Immunocytochemical and molecular proof of disseminated tumor cells in bone marrow, peritoneal lavage, blood and regional lymph nodes. A review of the literature and own results. *Zentralbl Chir* 1999; **124**: 286–91.

51. Braun S, Pantel K. Micrometastatic bone marrow involvement: detection and prognostic significance. *Med Oncol* 1999; **16**: 154–65.

52. Bilchik A, Miyashiro M, Kelley M, *et al.* Molecular detection of metastatic pancreatic carcinoma cells using a multimarker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Cancer* 2000; **88**: 1037–44.

MOLECULAR DETECTION OF TUMOR CELLS IN LYMPH NODES AND BONE MARROW OF PATIENTS WITH PANCREATIC CANCER

S.P. Osinsky, V.A. Chorny, D.S. Osinsky, D.F. Gluzman

Summary. Taking into account the literature data and own results it is possible to conclude that in one third of patients with pancreatic cancer with stage N0 it is possible to detect tumor cells in retropancreatic lymph nodes by means of immunocytochemical and molecular techniques. The tumor cells are detected in bone marrow in 20–65% of patients with pancreatic cancer on the stage M0. The presence of tumor cells in bone marrow can specify the more aggressive behavior of the tumor as well as the more higher risk for distant metastases in nearest future. It is observed direct correlation between presence of tumor cells in bone marrow and tumor response on anticancer treatment. The widespread application of molecular detection of tumor cells in bone marrow in the management of the patients with pancreatic and other malignant tumors is in need of standardization of methodological techniques and unification of protocol investigation.

Key Words: pancreatic cancer, diagnosis, metastases, lymph nodes, bone marrow, immunocytochemistry, molecular methods.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by a UICC International Cancer Technology Transfer Fellowship and with Federal funds from the National Cancer Institute, National Institutes of Health, under Contract N01-CO-40532, awarded to D.S.Osinsky, ICRET No 227/2000.