

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ ЦИТОКЕРАТИНА 19 ПРИ РАКЕ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.М. Шпадарук, Р.М. Смолякова, Э.В. Макаревич

РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, г. Минск, Беларусь

Ключевые слова: рак поджелудочной железы, микрометастазы, цитокератин19, лимфатические узлы, полимеразная цепная реакция, периферическая кровь

Цель: определить экспрессию гена цитокератина 19 в клетках периферической крови и лимфатических узлах для ранней диагностики микрометастазов и интенсификации адьювантного лечения у пациентов раком поджелудочной железы.

Материал и методы: материалом исследования послужили данные о 21 пациенте раком поджелудочной железы. Для обнаружения диссеминированных опухолевых клеток в лимфатических узлах и периферической крови пациентов РПЖ применялась полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Результаты: экспрессия эпителиального гена СК-19 детектирована в лимфатических узлах у 18 (85,7 %), в периферической крови у 5 (23,8 %) пациентов РПЖ. Единичные диссеминированные опухолевые клетки в периферической крови и лимфатических узлах диагностированы у 14,3% пациентов при I ст. опухолевого процесса, II ст. — у 19 %, III ст. — у 38,1 %, IV ст. — у 14,3 %. У 33,3 % пациентов РПЖ при I и II стадии имеются метастазы в региональных лимфатических узлах и периферической крови.

MOLECULAR GENETIC EVALUATION OF EXPRESSION CYTOKERATIN 19 IN PANCREATIC CANCER

E.M. Shpadaruk, R.M. Smolyakova, E.V. Makarevich

Keywords: pancreatic cancer, micrometastases, tsitokeratin19, lymph nodes, polymerase chain reaction, peripheral blood

Purpose: To determine the gene expression of cytokeratin 19 in peripheral blood and lymph nodes for early detection of micrometastases and adjuvant treatment intensification in patients with pancreatic cancer.

Materials and Methods: The study is based on material data on 21 patients with pancreatic cancer. For the detection of disseminated tumor cells in lymph nodes and peripheral blood of prostate cancer patients used the polymerase chain reaction with reverse transcription (RT-PCR).

Results: Expression of epithelial gene CK-19 is detected in the lymph nodes in 18 patients (85.7 %) in the peripheral blood and in 5 (23.8 %) patients had prostate cancer. Single disseminated tumor cells in peripheral blood and lymph nodes were diagnosed in 14.3 % of patients in I st. tumor, II Art. — In 19 %, III Art. — At 38,1 %, IV Art. — In 14.3 %. In 33.3 % of patients with prostate cancer stages I and II has metastasized to regional lymph nodes and peripheral blood.

ВВЕДЕНИЕ

Рак поджелудочной железы (РПЖ) относится к наиболее агрессивным злокачественным опухолям и отличается высокой резистентностью к специальным методам лечения.

Метастатическое поражение лимфатических узлов является одним из наиболее важных прогностических и предиктивных факторов у пациентов при солидных злокачественных новообразованиях.

При раке поджелудочной железы лимфогенным путем в 40–50 % случаев поражаются вначале регионарные, а затем отдаленные лимфатические узлы: мезентериальные, забрюшинные, ворот печени, желудка, сальника, брыжейки поперечно-ободочной кишки. Изредка поражаются медиастиналь-

ные и паратрахеальные, надключичные лимфатические узлы [1].

Одной из главных причин неблагоприятного течения заболевания является раннее распространение опухолевых клеток в кровеносном русле [2]. Точность определения клинической стадии заболевания лимитирована.

Гематогенное метастазирование отмечается в 50–55 % случаев, из них — по системе воротной вены в 25 % поражается печень, а в остальных — лёгкие, надпочечники, почки, кости, иногда кожа.

Факторы, определяющие продолжительность латентного периода от начала диссеминации опухолевых клеток до клинической манифестации метастазов, неясны. Но уже сегодня бесспорна клиническая значимость присутствия опухолевых кле-

ток в лимфатических узлах, кровяном русле и костном мозге [3, 4].

С помощью молекулярно-генетических методов в лимфатических узлах пациентов, у которых установлена стадия опухолевого процесса T1-2N0, микрометастазы обнаруживаются: при раке молочной железы в 36 % случаев, раке пищевода — 17–71 %, желудка — 22–36 %, поджелудочной железы — 72 %, колоректальном раке — 58 %, немелкоклеточном раке легкого — 15 % случаев [5].

Цитокератин 19 (ген СК19) является одним из наиболее эффективно используемых молекулярных маркеров для определения микрометастазов рака поджелудочной железы. В норме он не экспрессируется в клетках крови и лимфатических узлах, но экспрессируется в опухолевой ткани поджелудочной железы [6].

Анализ современной литературы показал, что выявление диссеминированных опухолевых клеток в лимфатических узлах и периферической крови при РПЖ, в дополнение к клинико-патологическим данным, представляется чрезвычайно важными для точного определения степени распространенности опухолевого процесса, выделения группы высокого риска раннего рецидива заболевания, выбора обоснованного метода лечения и мониторинга эффективности проводимой терапии. Новые знания о биологии опухоли, новые принципы диагностики и прогнозирования заболевания, а также новые подходы к комбинированной терапии позволят повысить эффективность лечения и общую выживаемость пациентов раком поджелудочной железы [7, 8].

Цель исследования — определить экспрессию гена цитокератина 19 в клетках периферической крови и лимфатических узлах для ранней диагностики микрометастазов и интенсификации адьювантного лечения у пациентов раком поджелудочной железы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом настоящего исследования послужили данные о 21 пациенте раком поджелудочной железы I–IV стадии, находившихся на лечении в РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова.

Возраст пациентов, включенных в исследование, варьировал от 39 до 81 года, средний возраст — $58,0 \pm 8,9$ лет.

Больные включались в исследование с обязательным морфологическим подтверждением диагноза. При анализе степени распространенности опухолевого процесса в анализируемой группе пациентов РПЖ преобладала (47,6 %) II стадия. У 14,3 % пациентов диагностирована I и III стадия распространенности опухолевого процесса соответственно, IV ст. — у 5 (23,8 %).

У пациентов РПЖ преобладала аденокарцинома головки (57,1 %) поджелудочной железы,

рак тела, хвоста и тотальное поражение выявлены в 14,3 % случаях соответственно.

Для обнаружения единичных диссеминированных опухолевых клеток в лимфатических узлах и периферической крови пациентов РПЖ применялась полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Выделение РНК у пациентов РПЖ из регионарных лимфатических узлов, забранных во время оперативного вмешательства, осуществлялось с помощью RNAqueous-4PCR Kit (Ambion, США). Для получения сДНК применяли набор для обратной транскрипции High-Capacity сДНК Reverse Transcription Kit (Ambion, США).

В качестве положительного контроля при проведении ПЦР использовали образцы опухолевой ткани поджелудочной железы. В качестве отрицательного контроля применяли лимфоциты периферической крови клинически здорового лица.

С помощью компьютерной программы Microsoft Office Excel 2007 уточняли значения средних арифметических (M), среднеквадратических отклонений (y) и ошибок среднего (m). Характер распределения выборки выживаемости оценивали в программе Statistica 6.0 (StatSoft Ink, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие злокачественной опухоли приводит к определенным морфологическим и функциональным изменениям лимфатических узлов (ЛУ).

Поражение регионарных лимфатических узлов является независимым прогностическим фактором при ряде заболеваний [9]. Гиподиагностика приводит к занижению стадии и выбору неадекватного лечения.

Данные современной литературы свидетельствуют о том, что с использованием иммуногистохимии и ПЦР детектируются отдельные опухолевые клетки в гистологически туморонегативных лимфатических узлах у 53–73% пациентов. Некоторые авторы сообщают также о клинической релевантности этих результатов в прогнозе выживаемости [10].

Результаты проведенных молекулярно-генетических исследований установили, что экспрессия эпителиального гена СК-19 детектирована в морфологически интактных лимфатических узлах у 18 (85,7 %) пациентов раком поджелудочной железы.

На электрофореграмме (рисунок 1) представлен анализ результатов выявления микрометастазов в крови и лимфатических узлах по экспрессии гена СК-19 у пациентов при раке поджелудочной железы.

Сравнительный анализ экспрессии гена СК-19 в периферической крови показал, что единичные диссеминированные опухолевые клетки диагностированы у 5 (23,8 %) пациентов раком поджелудочной железы.

Согласно мнению ряда исследователей констатируется, что операция способствует освобождению и отрыву раковых клеток в ответ на воздействие цитокинов и других неспецифических медиаторов повреждения. Опухолевые клетки начинают определяться практически во всех кровеносных сосудах [11].

Проведенными молекулярно-генетическими исследованиями установлено, что единичные диссеминированные опухолевые клетки в периферической крови и лимфатических узлах диагностированы у 14,3 % пациентов при I ст. опухолевого процесса, II ст. — у 19 %, III ст. — у 38,1 %, IV ст. — у 14,3 % (рисунок 2).

В целом, у 33,3 % пациентов РПЖ при I и II стадии имеются метастазы в региональных лимфатических узлах и периферической крови. Выявление микрометастазов в крови и лимфатических уз-

лах позволяет поддержать мнение ряда специалистов, что позиция N в системе TNM должна оцениваться с учетом результатов исследования лимфатических узлов с помощью молекулярно-генетических методов [12].

Особо следует отметить, что у всех пациентов РПЖ с диагностированными одновременно единичными диссеминированными опухолевыми клетками в периферической крови и лимфатических узлах развился ранний рецидив заболевания в первые 6 месяцев после лечения с неблагоприятным прогнозом.

Использование метода ОТ-ПЦР позволило выявить диссеминированные опухолевые клетки по экспрессии СК-19 при N0 у 73 % пациентов, N1 — у 100 % пациентов при раке поджелудочной железы ($p < 0,05$) (таблица 1)

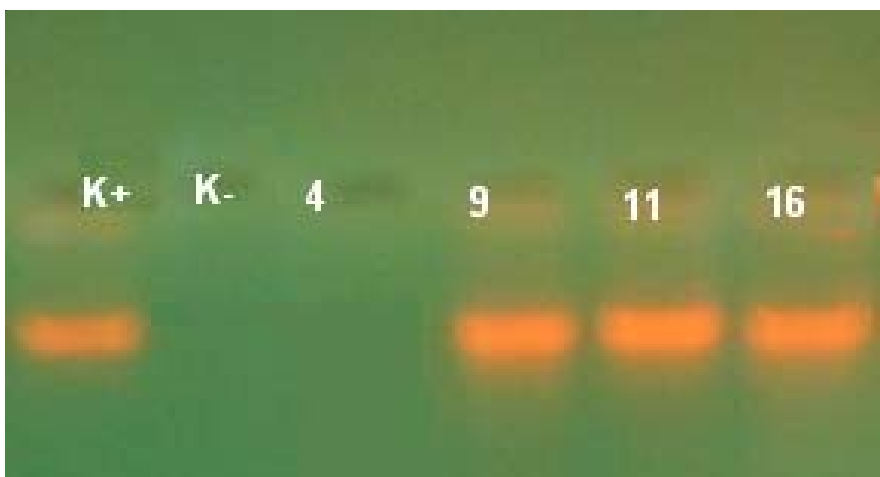


Рисунок 1 — Гель-электрофорез гена СК-19 (в образцах 9,11,16 выявлена экспрессия СК-19; К+ — положительный контроль, К— отрицательный контроль) при раке поджелудочной железы

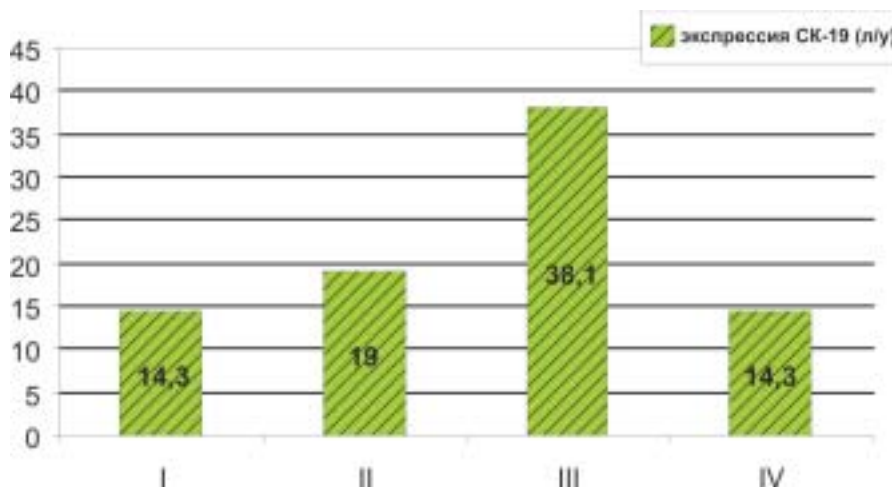


Рисунок 2 — Экспрессии СК-19 в лимфоузлах у пациентов РПЖ в зависимости от распространенности опухолевого процесса

Таблица 1

Оценка микрометастатического поражения лимфоузлов у пациентов РПЖ

Состояние регионарных лимфоузлов (световая микроскопия)	Отсутствие экспрессии СК-19 (ОТ-ПЦР)	Наличие экспрессии СК-19 (ОТ-ПЦР)
N0	3	8
N1	0	10

Как видно из таблицы, световая микроскопия имеет ограничение возможностей чувствительности по детекции микрометастазов в их лимфатических узлах у пациентов при раке поджелудочной железы.

Выживаемость пациентов с микрометастазами в лимфатических узлах соответствовала выживаемости пациентов с pN2 (рисунок 3).

Аналогичные результаты были получены в других исследованиях [10]. Показано, что наличие метастазов является неблагоприятным прогностическим признаком безрецидивной и общей выживаемости, в основном за счет развития гематогенных метастазов.

Как видно из рисунка 3, общая выживаемость пациентов РПЖ с экспрессией СК-19 в лимфоузлах в среднем составила 12–15 месяцев.

Таким образом, молекулярно-генетический метод определения экспрессии гена СК-19 в лимфатических узлах и периферической крови при РПЖ, в дополнение к клинико-патологическим данным, представляется чрезвычайно важными для точного определения степени распространенности опухолевого процесса, выделения группы высокого риска раннего рецидива заболевания, выбора обоснованного метода лечения и мониторинга эффективности проводимой терапии.

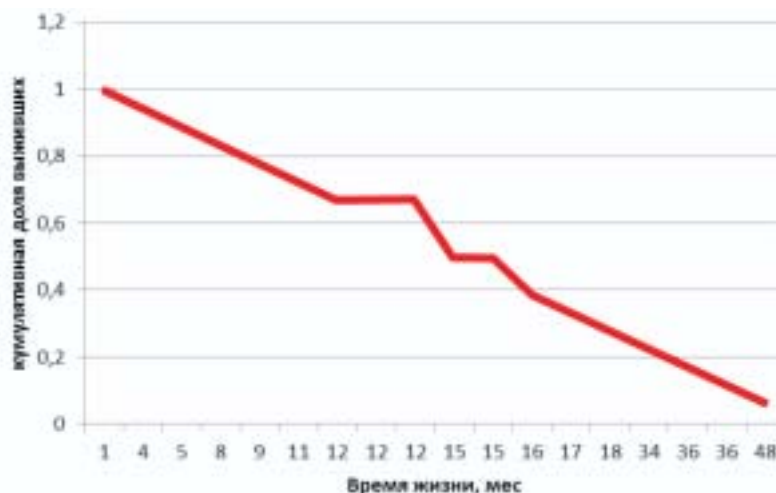


Рисунок 3 — Общая выживаемость пациентов с экспрессией СК-19 в лимфоузлах

ВЫВОДЫ

1. Диссеминированные опухолевые клетки диагностированы у пациентов при раке поджелудочной железы в лимфатических узлах у 18 (85,7 %), в периферической крови у 5 (23,8 %) пациентов по экспрессии эпителиального гена цитокератина 19. Выявление гена СК 19 в периферической крови и лимфатических узлах является фактором неблагоприятного прогноза и критерием раннего развития заболевания.

2. У 33,3 % пациентов РПЖ при I и II стадии имеются метастазы в региональных лимфатических узлах и периферической крови.

3. При РПЖ диссеминированные опухолевые клетки с экспрессией СК-19 при N0 обнаружены у 73 % пациентов, при N1 — у 100 % пациентов при раке поджелудочной железы ($p < 0,05$), что свидетельствует о высокой чувствительности молекулярно-генетического метода оценки степени распространенности опухолевого процесса.

Список литературы

1. *Treatment and survival in 13560 patients with pancreatic cancer and incidence of the disease in the West Midlands: an epidemiological study / S. Bramhall [et al.] //*

Brit. J. Surg. — 1995. — Vol. 82, № 1. — P. 111–115.

2. Detection of ras gene mutations in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma / M. Tada [et al.] // *Cancer Res.* — 1993. — № 53. — P. 2472–2474.

3. Immunocytochemical detection of isolated tumor cells in bone marrow of patients with untreated stage prostatic cancer / K. Pantel [et al.] // *Eur. J. Cancer.* — 1995. Vol. 31A, № 10. — P. 1627–1632.

4. Immunocytological detection of micrometastasis cells: comparative evaluation of findings in the peritoneal cavity and the bone marrow of gastric, colorectal and pancreatic cancer patients / H. Juhl [et al.] // *Int. J. Cancer. Res.* — 1996. — Vol. 87. — P. 793–797.

5. A real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reactions (RT-PCR) to detect breast carcinoma cells in peripheral blood / J. Aerts [et al.] // *Annals of Oncology.* — 2001. — № 12. — P. 39–46.

6. Adenocarcinoma of Pancreas: Detection of occult metastases in regional lymph nodes by a polymerase chain reaction-based assay / M. J. Demeure [et al.] // *Cancer.* — 2000. — № 83. — P. 1328–1334.

7. Molecular alteration associated with improved survival in pancreatic cancer patients treated with radiation or chemotherapy / S.T. Dergman [et al.] // *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* — 1998. — № 5. — P. 272–296.

8. Molecular detection of circulating cancer cells during surgery in patients with biliary pancreatic cancer / F. Miyazono [et al.] // *Amer. J. Surg.* — 1999. — Vol. 177. — P. 475–479.

9. Sirivatanauksorn V., Sirivatanauksorn Y., Lemoine N.R. Molecular pattern of ductal pancreatic cancer // *Langenbeck's Arch. Surg. Spriger-Verlag.* — 1998. — № 83. — P. 105–115.

10. Sensitive detection of rare cancer cells in sputum and peripheral blood samples of patients with lung cancer by preoprogprspecific RT-PCR / J. Lacroix [et al.] // *Int. J. Cancer.* — 2001. — Vol. 92. — P. 1–8.

11. The detection of micrometastasis in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19 / A. Schoenfeld [et al.] // *Eur. J. Cancer.* — 1999. — Vol. 33. — P. 1245–1256.

12. Clinical application of K-ras oncogene mutations in pancreatic carcinoma: Detection of micrometastases / S. Nomoto [et al.] // *Sem. Surg. Oncol.* — 1998. — Vol. 15. — P. 40–46.