

Napovedna vrednost med operacijo določenih mikrozasevkov v prvi varnostni bezgavki pri raku želodca

The prognostic value of micrometastases found intraoperatively in the first draining lymph node in gastric cancer patients

Tomaž Jagrič,¹ Mojca Plankl,³ Arpad Ivanecz,² Matjaž Horvat,² Borut Gajzer,² Zoran Grubič,³ Stojan Potrč,² Tomaž Marš³

¹ Oddelek za abdominalno in splošno kirurgijo Maribor, Univerzitetni Klinični center Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor

² Oddelek za abdominalno in splošno kirurgijo Maribor, Univerzitetni Klinični center Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor

³ Inštitut za patofiziologijo, Medicinska fakulteta v Ljubljani, Zaloška 4, 1000 Ljubljana

Korespondenca/ Correspondence:

asist. Tomaž Jagrič, dr. med, Oddelek za abdominalno in splošno kirurgijo Maribor, Univerzitetni Klinični center Maribor, Ljubljanska 5, Maribor 2000; e-mail: tomaz.jagric@gmail.com

Izvleček

Izhodišče: Koncept varnostne bezgavke (VB) se je v študijah začel uveljavljati tudi pri zdravljenju raka želodca. Čeprav lahko mikrozasevke (MZ) v VB z imunohistokemijo z dovolj veliko natančnostjo dokažemo, je ta metoda dolgotrajna, kar omeji njeno uporabnost med operacijo. V študiji smo predstavili in opredelili napovedni pomen novega koncepta presajanja ene VB za MZ na manjši študijski skupini bolnikov.

Bolniki in metode: V študijsko skupino smo vključili skupno 23 bolnikov. Devet bolnikov smo izbrali kot kontrolno skupino. Prva z modrilom obarvana bezgavka je bila opredeljena kot VB in poslana na ločeno analizo z RT-qPCR na izražanje CEA in CK-20 kot označevalca za MZ. Značilnosti bolnikov in patohistološke značilnosti tumorja smo primerjali s prisotnostjo MZ in poiskali morebitne povezave.

Rezultati: Štirinajst bolnikov je bilo brez MZ. Pri štirih bolnikih (28,6 %) smo odkrili MZ. MZ so se pojavljali bistveno pogosteje pri bolnikih z difuzno obliko žleznega raka po Laurenu, imeli so bistveno višje vrednosti tumorskega označevalca CA 19-9 in so bili bistveno starejši kot bolniki brez MZ.

Zaključki: Čeprav naši prvi rezultati kažejo možno uporabno vrednost med operacijo, pa bo potrebno občutljivost in značilnost naše metode potrditi na večjih skupinah in podkrepiti z dolgoročnimi rezultati, preden bomo lahko metodo ene VB uporabljali v klinični praksi.

Abstract

Background: The concept of sentinel lymph node screening has been recently introduced in gastric cancer treatment. Even through micrometastases can be shown reliably by immunohistochemistry, such staining methods are lengthy and laborious, which precludes its intraoperative use. In this study, the clinical and prognostic implications of a new single sentinel lymph node screening for micrometastases concept were evaluated on a small study group.

Methods: Twenty-three patients were included in our study. Nine were selected as a control group. The first stained lymph node was defined as the true sentinel lymph node. This lymph node was sent separately for RT-qPCR analysis to determine CEA and CK-20 expression as markers of micrometastases. Patient and tumor characteristics were analysed and possible correlations with micrometastatic involvement were determined.

Results: Fourteen patients were found to be No. Four patients (28.6 %) had micrometastases. Micrometastases were more prominent in patients with diffuse gastric cancer, with higher CA 19-9 values. Patients with micrometastases were also found to be older than those without them.

Conclusions: Even through these results indicate the potential use of a single SNL in intraoperative decision making, the sensitivity and specificity of our method has to be evaluated on a larger series, supported by long-term recurrence and survival results.

Ključne besede:

rak želodca, varnostna bezgavka, mikrozasevki, RT-qPCR

Key words:

gastric cancer, sentinel lymph node, micrometastases, RT-qPCR

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2012;
81: 775–83

Prispelo: 31. avg. 2011,
Sprejeto: 17. apr. 2012

Uvod

Koncept varnostne bezgavke se je od prve objave Mortona in sod. (1992) za bolnike z melanomom^{1,2} postopoma uveljavil tudi na drugih področjih onkološke kirurgije, šele v zadnjih letih tudi pri obravnavi bolnikov z rakom želodca. Varnostna bezgavka (VB) je opredeljena kot prva bezgavka, kamor se drenirajo maligne celice primarnega tumorja,^{3,4} kar pomeni, da se mikrozasevki (MZ) prvi razvijejo v teh bezgavkah. Čeprav je klinični in napovedni pomen teh »spečih« zasevkov nejasen, je bilo v zadnjem času objavljenih več študij, ki govorijo v prid vplivu MZ na napoved izida pri bolniku z rakom želodca.⁵⁻⁷

Razlog, da se kljub vse večjem številu študij, ki obravnavajo koncept VB pri obravnavi bolnikov z rakom želodca, ta koncept še ni uveljavil tudi v praksi, je potrebno iskati v nasprotujočih si rezultatih študij. Nekateri avtorji trdijo, da posamezne rakaste celice v bezgavkah nimajo zadostnega proliferativnega potenciala, da bi se razvile v pravo metastazo.^{3,8,9} Razlog za takšno razlago pomena MZ je verjetno povezan z metodo določanja MZ, ki se razlikuje med študijami. Dokazovanje MZ z ustaljenimi histološkimi metodami (hematoksilin in eozin) zaradi manjšega števila rezin, ki se uporabljajo pri ustaljenem patohistološkem pregledu, ni dovolj natančno, da bi zanesljivo izključilo prisotnost MZ.¹⁰ Imunohistokemija (IHK) je bistveno natančnejša metoda, vendar lahko tudi pri tej metodi dobimo lažno pozitivne rezultate, predvsem zaradi navzkrižne reakcije protiteles s stromalnimi celicami in vnetnimi celicami, ali lažno negativne rezultate zaradi celic zunaj rezne ploskve vzorca.¹⁰ Izmed naštetih metod se je polimerazna verižna reakcija z reverzno transkriptazo (RT-PCR) izkazala za najbolj zanesljivo metodo določanja MZ.¹¹ Glavna pomanjkljivost metode je, da je postopek izvedbe sorazmerno dolg, zato je primerna le za študijske namene in retrospektivno analizo, ne pa kot metoda za klinično prakso. Nenazadnje pa so pri tem pomembni tudi stroški metode in koristi analize vseh bezgavk, ki jih dobimo pri operaciji raka želodca.

Zaradi naštetih pomanjkljivosti metode RT-qPCR in želje po hitrih rezultatih, ki bi jih lahko uporabili še med samo operacijo, smo uvedli koncept presajanja mikrometastaz z metodo RT-qPCR ene t. i. prave varnostne bezgavke. Ker je za dokončno potrditev takšnega koncepta potrebno vrednotiti rezultate velikih serij bolnikov in njihovih dolgoročnih preživetij, smo v okviru predstavljene študije določali pogostost izražanja mikrozasevkov v varnostni bezgavki in primerjali rezultate z drugimi študijami, v katerih so mikrozasevke dokazovali v več VB. Zastavili smo si vprašanje, ali je analiza zgolj prve bezgavke z metodo RT-qPCR, kamor se rak najprej drenira, zadosti natančna in zanesljiva metoda za klinično uporabo.

Metode**Izbira bolnikov in študijske skupine**

Od začetka avgusta 2009 do decembra 2010 je bilo v študijo vključenih 23 bolnikov, ki so bili na Univerzitetnem kliničnem centru Maribor na Oddelku za abdominalno in splošno kirurgijo operirani zaradi raka želodca in z drugo patologijo. Vsi bolniki so pred vključitvijo podpisali privolitev za sodelovanje v študiji. Študijo je odobrila Etična komisija Republike Slovenije. Od triindvajsetih bolnikov, ta skupina je opredeljena kot študijska skupina, je bilo devet izbranih v kontrolno skupino. Kontrolna skupina je služila za izračun značilnosti in zanesljivosti rezultatov izražanja molekularnih označevalcev karcinoembrionalni antigen (CEA) in citokeratin 20 (CK-20) v bezgavkah. V pozitivno kontrolno skupino so bili uvrščeni bolniki, ki so imeli zanesljivo izražanje omenjenih označevalcev v bezgavkah. S tem pristopom smo poizkušali ugotoviti, s kakšno zanesljivostjo lahko prikažemo prisotnost rakastih celic želodca v odstranjenih bezgavkah. Zato smo štirim bolnikom z makroskopskimi zasevki v bezgavkah odvzeli le-te za molekularno analizo z RT-qPCR. Kot negativno kontrolo, ki je služila za dokaz, da metoda RT-qPCR ne daje lažno pozitivnih rezultatov, smo izbrali bezgavke bolnikov, ki niso imeli raka želodca in so bili operirani zaradi drugih bolezni, ki niso



Slika 1: Obarvanje VB z modrilom Patente Blue V. Opomba: A: submukozna infiltracija z modrilom; B: prikaz limfnih poti in prve obarvane varnostne bezgavke; C: odstranitev prve varnostne bezgavke.

povezane z rakom želodca. V tej skupini je bilo pet bolnikov (desna femoralna kila, benigna stenoza pilorusa, Crohnova bolezen, primarni jetrnocelični tumor in adenom sigme). Med operacijo smo odvzeli bezgavke v bližini operacijskega polja in jih analizirali na izražanje CEA in CK-20 po enakem protokolu kot VB iz študijske skupine.

V končni študijski skupini so bili vključeni le bolniki s histološko dokazanim žleznim rakom želodca in s stadijem T₁ (rak, omejen na lamino proprijo), N₀ (rak brez zasevkov v bezgavkah) do T₃ (rak, ki vdira v subserozno plast želodčne stene) N₀ in brez oddaljenih metastaz. Od prvotno vključenih 27 bolnikov je 14 bolnikov ustrezalo vključitvenim pogojem.

Operacija, barvanje in odstranitev varnostne bezgavke

Operacijo smo pričeli s pregledom celotne trebušne votline na znake razvoja bolezni. Določili smo klinični stadij, mesto tumorja in resektabilnost. Bolnike z zasevki v bezgavkah in razširitvijo tumorja preko seroze smo izključili iz študije. Vse operacije so bile opravljene po doktrinah za raka želodca.¹⁴⁻¹⁶ V študijski skupini je bila pri sedmih opravljena totalna gastrektomija, pri šestih pa distalna subtotalna gastrektomija, pri enem bolniku smo naredili proksimalno subtotalno gastrektomijo. Kirurški vzorci so bili pregledani po ustaljenih patohistoloških doktrinah za raka želodca.

Pred začetkom resekcije želodca smo na štirih ali petih mestih v okolico tumorja submukozno vbrizgali barvilo Patente Blue V (Guerbet Patent Blue V Sodium 2,5 %, Guerbet, Roissy, Francija). Limfni drenaži modrila smo sledili do prve bezgavke. Po povprečno 17 ± 6.8 minutah se je obarvala

prva bezgavka, ki smo jo označili, in jo odstranili za ločeno analizo RT-qPCR (Slika 1). Odstranjeno varnostno bezgavko smo hranili v posebnem pufru z RNazo – RNA-later RNA Stabilization Reagent –, ki omogoči ohranitev mRNA in prepreči razkroj mRNA v vzorcih VB. Vzorce smo do analize RT-qPCR hranili pri 0 do 4 °C.

Osamitev mRNA iz varnostne bezgavke in analiza z RT-qPCR

Po homogenitaciji in osamitvi celotne RNA, ki smo jo iz vzorcev osamili s kompletom RNeasy Mini Plus (Qiagen, Hilden, Germany) in po navodilih proizvajalca, smo iz izolirane RNA sintetizirali cDNA s kompletom High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) po navodilih proizvajalca. Q-PCR smo izvedli z ABI PRISM SDS 7500 (Applied Biosystems) s sistemom TaqMan v formatu za 96 vzorcev. Uporabljali smo TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) in naslednje po naročilu izdelane Gene Expression Assay-e (Applied Biosystems) pare oligonukleotidov oz. sonde: za CEACAM5 Hs 00237075_m1, za KRT20 Hs00300643_m1 in za GAPDH 4333764. Kot prazno vrednost Ct za določitev izražanja CEACAM5 in CK-20 smo izbrali cikel 35. Tak pristop je naveden tudi v literaturi (Kubota in sod., 2003; Osaka in sod., 2004).

Statistična analiza

Za statistično analizo smo uporabili SPSS za Windows XP version 15. TNM stadij, UI-CC-stadij, anatomsko lego tumorja, histološki tip, perinevralno invazijo, limfno invazijo in žilno invazijo ter prisotnost mikrozasovkov smo obravnavali kot neodvisne spremenljivke. Primerjavo zveznih spremenljivk

med skupinama smo opravili s Studentovim t-testom, za diskretne spremenljivke smo uporabili Hi-kvadrat test s Fisherjevo metodo. Analizirali smo rezultate RT-qPCR odstranjenih bezgavk. Za določanje občutljivosti in specifičnosti dokazovanja mikro-zasevkov z metodo RT-qPCR smo s kontingenčno tabelo primerjali izražanje CEA in CK-20 mRNA v bezgavkah kontrolne skupine bolnikov, ki niso bili operirani zaradi rakastega obolenja, in izražanja mRNA pri bolnikih z rakom želodca v bezgavkah z makroskopskimi zasevki. Vrednosti $p < 0,05$ je bila meja statistične značilne razlike.

Rezultati

Bolniki in patohistološke značilnosti tumorjev

Značilnosti bolnikov in patohistološke značilnosti tumorjev so prikazani v Tabeli 1. Osem od 14 No bolnikov, ki smo jih vključili v študijsko skupino, so imeli intestinalni tip žleznega raka (57,1 %). Glede na umeščenost je imelo devet bolnikov raka spodnje tretjine želodca (64,3 %), nihče od bolnikov No ni imel raka zgornje tretjine želodca. Med bolniki je prevladoval položaj raka na majhni krivini (pet bolnikov, 35,7 %), temu

Tabela 1: Značilnosti bolnikov in patohistološke značilnosti tumorjev.

| | | |
|---|--|--|
| Spol | moški 10 ženske 4 | (71,4 %) (28,6 %) |
| Starost | 65 ± 10.8 leta | |
| Histološki tip po Laurenu | intestinalni 8 difuzni 2 mešani 2 | (57,1 %) (14,3 %) (14,3 %) |
| Položaj tumorja po tretjinah | srednja tretjina 4 spodnja tretjina 9 | (28,6 %) (64,3 %) |
| Položaj tumorja | manjša krivina 5 velika krivina 3 sprednja stena 1 zadnja stena 4 celotni obod 1 | (35,7 %) (21,4 %) (7,1 %) (28,6 %) (7,1 %) |
| Makroskopski izgled zgodnjega raka želodca po Murakami | I 2 IIb 2 IIc 3 III 2 | (14,3 %) (14,3 %) (21,4 %) (14,3 %) |
| Bormannov tip | III 3 IV 2 | (21,4 %) (14,3 %) |
| T stadij | T1a 5 T1b 3 T2 4 T3 2 | (35,7 %) (21,4 %) (28,6 %) (14,3 %) |
| Diferenciacija | tubularni dobro diferenciran 3 tubularni zmerno diferenciran 3 tubularni slabo diferenciran 5 pečatno celični 1 | (21,4 %) (21,4 %) (35,7 %) (7,1 %) |
| CEA | 1.4 ± 1.07 ng/ml | |
| AFP | 3.5 ± 1.92 ng/ml | |
| CA 19-9 | 10.33 ± 13.27 ng/ml | |
| Velikost tumorja | 34.1 ± 22.11 mm | |
| Povprečni čas odvzema VB | 17.8 ± 6.9 min | |
| Popovprečno število odstranjenih bezgavk | 12.4 ± 7.9 bezgavk | |

je sledila umeščenost na zadnji steni želodca (štirje bolniki, 28,6 %) in na veliki krivini (trije bolniki, 21,4 %). Zgodnjega raka (T1a in 1b) je imelo osem bolnikov (57,1 %), tip IIC po Murakami ali eksulcerirana oblika pa je bil prevladujoča makroskopska oblika teh tumorjev (trije bolniki, 21,4 %). Pet bolnikov je imelo lokalno napredovalega raka (T2, T3). Večinoma je bil rak slabo diferenciran tubularni žlezni tip (pet primerov; 35,7 %), temu sta sledila dobro (trije primeri, 21,4 %) in zmerno diferencirani tubularni žlezni rak (trije primeri, 21,4 %). En bolnik je imel slabo diferencirani pečatno-celični karcinom (7,1 %).

Določanje prisotnosti označevalcev CEA in CK-20 z metodo RT-qPCR

Na začetku študije smo z analizo RT-qPCR vzorcev kontrolne skupine bolnikov opredelili občutljivost in specifičnost določanja označevalcev CEA in CK-20. Profil izražanja označevalcev je prikazan v obliki kontingenčne tabele (Tabela 2). Statistična analiza teh vzorcev je pokazala 75 % občutljivost in 100 % specifičnosti naše metode. Negativna napovedna vrednost je bila 100 % ob pozitivni napovedni vrednosti 83,3 %. Tako smo na tem vzorcu dokazali, da negativen rezultat RT-qPCR analize izključuje možnost prisotnosti posameznih rakavih celic v VB.

V nadaljevanju smo opredelili značilnosti študijske skupine (Tabela 3). Od 14 histološko potrjenih bolnikov No, smo MZ dokazali pri štirih bolnikih (28,6 %), medtem ko pri ostalih desetih bolnikih z analizo RT-qPCR nismo uspeli dokazati izražanja CEA ali CK-20. Ti bolniki so bili opredeljeni kot MZ- negativni. Bolnike smo nato razdelili v dve skupini. Bolnike No z mikrozasevki in bolnike No brez mikrozasevkov.

Statistična analiza ni pokazala značilnih razlik med porazdelitvami spola, položaja tumorja, makroskopskega tipa zgodnjega raka, Bormannovega tipa, velikosti tumorja, števila reseciranih bezgavk, žilne, limfangialne, perinevralne invazije, ekstrapodalne infiltracije, histološkega gradusa in porazdelitve stadija T med skupinama. Bistvena razlika pa se je pokazala pri povprečni starosti bolnikov, saj so bili bolniki z MZ povprečno starejši kot bolniki brez MZ ($55 \pm 8,7$ let v skupini brez MZ; $69 \pm 8,9$ let v skupini z MZ; $p = 0,019$). Tudi predoperativne vrednosti tumorskega označevalca CA 19-9 so bile bistveno višje v skupini z MZ ($22 \pm 17,8$ v skupini z MZ v primerjavi s 4 ± 5 v skupini brez MZ; $p = 0,045$). razlike med tumorskimi označevalci CEA in AFP so bile neznatne. Značilna razlika se je pokazala tudi pri porazdelitvi rakov po Laurenovi klasifikaciji. Pri bolnikih brez MZ je prevladoval intestinalni tip (88,9 %), medtem ko je v skupini z MZ prevladoval difuzni tip raka (66,7 %).

Razpravljanje

V državah zahodnega sveta je kljub napredku diagnostičnih postopkov diagnosticiranje želodčnega raka večinoma v njegovih napredovelih stadijih. Z uvajanjem endoskopije odprtega dostopa je v zadnjih letih prišlo do določenega napredka pri diagnosticiranju teh vrst raka, kar je prineslo izboljšanje napovedi izida tudi za bolnike z rakom želodca. Z uvajanjem gastroskopske diagnostike pri bolnikih z rakom želodca s simptomi je bil tudi v Sloveniji v zadnjih letih zabeležen majhen, vendar pomemben porast v odkrivanju zgodnjih stadijev raka želodca.^{17,18} Odkritje raka želodca v zgodnjih stadijih lahko pomeni za bolnika popolno ozdravitev tudi z uporabo manj obsežnih operacij, ki pa slonijo na natančnejših metodah določanja stadija.

Uvajanje koncepta varnostne bezgavke, ki je pomenil revolucijo pri zdravljenju raka melanoma in dojke, bi lahko pomenil pomemben napredek tudi v diagnostiki in zdravljenju raka želodca. Čeprav nekatere raziskave že kažejo klinični pomen MZ v varnostni bezgavki (VB), je tako uporaba IHK kot tudi molekularno-bioloških me-

Tabela 2: Kontingenčna tabela.

| | Kontrolna skupina | | Skupaj |
|-------------------|-------------------|-----------|--------|
| | negativen | pozitiven | |
| RT-qPCR negativni | 5 | 1 | 6 |
| RT-qPCR pozitivni | 0 | 3 | 3 |
| Skupaj | 5 | 4 | 9 |

Tabela 3: Primerjava bolnikov z mikrozasevki in brez mikrozasevkov v varnostni bezgavki.

| | | Ekspresivnost RT-qPCR | | p |
|------------------------------|--|--|--|-----------|
| | | pozitiven | negativen | |
| Spol | Moški Ženski | 2 (50 %) 2 (50 %) | 8 (80 %) 2 (20 %) | NS |
| Starost | | 55 ± 8,7 let | 69 ± 8,9 let | p = 0.019 |
| Lauren | intestinalni difuzni mešani | 0 (0 %) 2 (66,7 %) 1 (33,3 %) | 8 (88,9 %) 0 (0 %) 1 (11,1 %) | p = 0.037 |
| Tretjina | Srednja Spodnja | 2 (50 %) 2 (50 %) | 2 (22,2 %) 7 (77,8 %) | NS |
| Ležišče | manjša velika sprednja zadnja celotni obod | 2 (50 %) 1 (25 %) 0 (0 %) 1 (25 %) 0 (0 %) | 3 (30 %) 2 (20 %) 1 (10 %) 3 (30 %) 1 (10 %) | NS |
| Murakama | I IIb IIc III | 1 (50 %) 0 (0 %) 1 (50 %) 0 (0 %) | 1 (14,3 %) 2 (28,6 %) 2 (28,6 %) 2 (28,6 %) | NS |
| Bormannov tip | III IV | 1 (50 %) 1 (50 %) | 2 (66,7 %) 1 (33,3 %) | NS |
| T-stadij | T1a T1b T2 T3 | 1 (25 %) 1 (25 %) 1 (25 %) 1 (25 %) | 4 (40 %) 2 (20 %) 3 (30 %) 1 (10 %) | NS |
| Diferenciacija | dobro zmerno slabo pečatnocelični | 0 (0 %) 1 (33,3 %) 2 (66,7 %) 0 (0 %) | 3 (33,3 %) 2 (22,2 %) 3 (33,3 %) 1 (11,1 %) | NS |
| Limfangialna invazija | negativna pozitivna | 4 (100 %) 0 (0 %) | 9 (90 %) 1 (10 %) | NS |
| Žilna invazija | negativna pozitivna | 4 (100 %) 0 (0 %) | 10 (100 %) 0 (0 %) | NS |
| Perinevralna invazija | negativna pozitivna | 3 (75 %) 1 (25 %) | 8 (80 %) 2 (20 %) | NS |
| Ekstranodalna invazija | negativna pozitivna | 4 (100 %) 0 (0 %) | 10 (100 %) 0 (0 %) | NS |
| CEA | | 1 ± 0 ng/ml | 1,57 ± 1,3 ng/ml | NS |
| AFP | | 3 ± 1,7 ng/ml | 3,8 ± 2,2 ng/ml | NS |
| CA 19-9 | | 22 ± 17,8 ng/ml | 4 ± 5 ng/ml | p = 0.045 |
| Velikost tumorja | | 30 ± 12 mm | 35 ± 25,5 mm | NS |
| Število odstranjenih bezgavk | | 13 ± 9,8 | 12 ± 7,5 | NS |
| Delež pozitivnih bezgavk | | 52 ± 43,7 % | 26 ± 28,2 % | NS |

tod določanja MZ še vedno primerna le za študijske namene. Predvsem zaradi retrospektivnih analiz vzorcev in dolgotrajnih protokolov uporaba takšnih rezultatov med samo operacijo ni mogoča, zaradi česar z dokazom MZ v bezgavkah še ni mogoče med operacijo spremeniti odločitve o obsegu limfadenektomije. Pri uporabi HE in IHK je glavna ovira veliko število rezin, ki jih je potrebno narediti, da lahko z zadostno natančnostjo izključimo MZ v bezgavki. Za razliko od metod HE in IHK je metoda RT-qPCR za določanje MZ bolj občutljiva in specifična metoda, hkrati pa omogoča pregled celotne bezgavke v enem delovnem koraku, s čimer je izguba celic zunaj rezne ploskve izključena. V želji zmanjšati število vzorcev in čas pregleda VB, smo si v raziskavi zastavili vprašanje, ali je mogoče že z analizo prve bezgavke, v katero se drenirajo tumorske celice, dokazati MZ z metodo RT-qPCR.

V številnih študijah je bilo dokazano, da je dokazovanjem hkratnega izražanja več označevalcev z metodo PCR bolj zanesljiva metoda kot dokazovanje enega označevalca.⁵ Zato smo se v naši raziskavi odločili za uporabo dveh označevalcev CEA in CK-20, s katerima smo dosegli negativno napovedno vrednost 100 % in pozitivno napovedno vrednost 83,3 % v kontrolni skupini. Podobne vrednosti so dobili tudi v drugih študijah, v katerih so potrdili, da je takšno testiranje bistveno bolj zanesljivo od IHK.^{4,5,10,19}

V predstavljeni študiji je varnostna bezgavka opredeljena kot prva bezgavka, kamor se drenira vbrizgano barvilo okoli tumorja, ki je bil po patohistološki preiskavi potrjen kot No. S to metodo smo pri štirih od 12 No bolnikov dokazali MZ (28,6 %). V drugih raziskavah, v katerih so ovrednotili več bezgavk na bolnika, so ugotavljali pogostost MZ od 10–30 %.^{3-10,19-22} Podobno pogostost MZ smo lahko dobili že z analizo prve bezgavke, kamor se drenira tumor. Ishii in sod. so poročali, da MZ niso uspeli z metodami IHK odkriti zunaj skupine bezgavk, ki so se obarvale po vnosu modrila.²² Zato smo si v okviru naše študije postavili vprašanje, ali lahko natančna analiza prisotnosti MZ prve bezgavke, to je bezgavke, ki se najprej obarva po vnosu modrila v predel

tumorja, napove status bezgavk pri bolniku No. Če upoštevamo, da so pri študijah varnostne bezgavke analizirali povprečno dve do štiri bezgavke na bolnika,^{3-10,19-22} pogostost MZ pri takšnih bolnikih No in končno dejstvo, da se MZ najprej pojavijo v varnostni bezgavki,²² bi vsaj teoretično zadostoval pregled ene same, t. i. »prave« varnostne bezgavke. Morebitna ovira naše študije je vprašanje, ali smo s to metodo zares pokazali pravilno VB. Obstaja namreč verjetnost, da pot drenaže vbrizganega barvila v okolico tumorja ni enaka drenažni poti samega tumorja. Vendar obstaja več možnosti, kako bi izpopolnili način iskanja »prave« varnostne bezgavke. Poznane so številne analize, kjer so z natančnimi patoanatomskimi raziskavami pokazali najbolj pogosta drenažna mesta za posamezno umestitev tumorja.³⁰ Glede na izsledke te študije lahko sklepamo, da ima ležišče tumorja v ustreznem dobro določenem področju dokaj predvidljivo pot dreniranja. Tako bi lahko že med samim odvzemom preverili, ali odvzeta varnostna bezgavka pripada pravilni skupini bezgavk, v katerih so zasevki najbolj verjetni. Dodatno pa bi lahko zanesljivost metode povečali s predoperativnim vbrizgavanjem radiokolooidnih označevalcev med gastroskopskim pregledom na mesto tumorja. Ne samo, da se na takšen način olajša prikaz zgodnjih primerov raka želodca, ki se makroskopsko ne dajo odkriti pri tipanju želodca med operacijo, ampak tudi sama drenažna pot z večjo gotovostjo sledi drenažni poti malignih celic. Omenjene metode prikaza varnostne bezgavke so predmet bodočih raziskav, katerih rezultati bi lahko gotovo prispevali k večji natančnosti in zanesljivosti predoperacijskega označevanja tumorja in varnostne bezgavke.

Preliminarni rezultati naše študije kažejo, da so se MZ bistveno pogosteje pojavljali pri starejših bolnikih. To bi lahko odražalo slabši imunski odziv starejših bolnikov. Sansoni in sod. so poročali o slabšem delovanju celic naravnih ubijalk in njihovi manjši učinkovitosti pri odstranjevanju rakavih celic v bezgavkah, kar vodi v večjo pogostost MZ pri tej populaciji.^{3,23,24} Mikrozasevke smo pogosteje odkrili pri difuznem tipu želodčnega raka. To opažanje se ujema z ugotovitvami

drugih avtorjev.²⁵ Nazadnje pa smo ugotovili tudi razliko pri predoperacijskih vrednostih tumorskega označevalca CA 19–9, ki so imele bistveno višje vrednosti pri bolnikih z MZ. Čeprav so navadno vrednosti označevalca CA 19–9 višje pri makroskopskih zasevkih v bezgavkah,^{26–28} pa do sedaj ni bilo dokazane povezave med povišanimi vrednostmi označevalca in MZ v varnostnih bezgavkah. Vse omenjene razlike so po našem mnenju pomembni dejavniki tveganja za prisotnost MZ v varnostni bezgavki in jih je potrebno upoštevati že pri predoperacijski pripravi in načrtovanju obsega limfadenektomije pri posameznem bolniku.

Ključnega pomena za praktično rabo našega koncepta je vprašanje, kako zanesljiv je rezultat No s preiskavo ene VB z RT-qPCR in ali bi na podlagi takšnega rezultata zmanjšali obseg odstranitve bezgavk (limfadenektomije). Trenutne smernice za zdravljenje zgodnjega raka želodca, ki so bile sprejete na zadnjem evropskem srečanju za raka želodca, določajo, da je obseg limfadenektomije, ne glede na dejansko stanje stadija N, lahko manjši kot pri lokalno napredovalem raku. Minimalno število odvzetih bezgavk je za deset bezgavk manjše, kot jih sicer odstranimo pri standardni limfadenektomiji D2 (25 bezgavk). Glede na visoko značilno negativno napovedno vrednost, ki smo jo potrdili z našo kontrolno skupino, ob rezultatu No analize RT-qPCR varnostne bezgavke, lahko z gotovostjo izključimo MZ v tej bezgavki, zato bi ostal predviden obseg limfadenektomije manjši. Če bi se po naši analizi, pokazala verjetnost MZ v varnostni bezgavki, bi bolnika označili že med operacijo kot N1, kar bi pomenilo, da je edino pravilno zdravljenje, ki omogoča dolgoročno preživetje D2 limfadenektomija, kljub temu, da se trenutno za zgodnjega raka želodca priporoča zmanjšan obseg limfadenektomije.

Z natančnejšim prepoznavanjem prave varnostne bezgavke in upoštevanjem dodatnih kazalnikov tveganja za MZ v varnostni bezgavki, vse kaže, da bi lahko bila analiza ene same »prave« varnostne bezgavke zadostna za dokaz prisotnosti MZ v bezgavkah. Prednosti te metode so še posebej očitni, če upoštevamo stroške in čas, ki bi bil potreben za takšno analizo. Z RT-qPCR lahko pre-

gledamo celoten vzorec v enem koraku, kar zmanjša možnost spregledanih celic zunaj rezne ploskve, kot se lahko zgodi pri IHK. To prednost metode RT-qPCR smo lahko z našim protokolom v celoti izrabili, za razliko od drugih študij, v kateri so bezgavko razdelili na več delov in nekatere rezine preiskovali z RT-qPCR, druge pa z IHK.^{4,10} Zmanjšana občutljivost in specifičnost, ki so jo v takšnih študijah beležili, lahko gre vsaj deloma na račun izgube malignih celic zunaj rezne ploskve.

Kljub obetavnim rezultatom študije je potrebna določena mera zadržanosti. Rezultati študije so bili narejeni na majhnem, vendar statistično dovolj velikem vzorcu bolnikov, za večjo težo rezultatov bo potrebno nadaljevanje študije na večjem vzorcu, z analizami ponovitve bolezni in dolgoročnih preživetji, ki bodo lahko dokončno potrdili veljavnost metode. Če bomo pokazali, da je pregled prve varnostne bezgavke varen način za dokazovanje MZ, bomo metodo uvedli v operacijsko prakso. Z razvojem novih protokolov RT-qPCR, ki lahko dajo enakovredne rezultate, vendar v veliko krajšem času (20 do 60 minut),^{5,29} bi lahko koncept »prave« varnostne bezgavke odprl vrata v obdobje krojenja zdravljenja še med samo operacijo raka želodca.

Literatura

1. Arigami T, Natsugoe S, Uenosono Y, Mataka Y, Ehi K, Higashi H, et al. Evaluation of sentinel node concept in gastric cancer based on lymph node micrometastasis determined by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Annals of Surgery*, 2006; 243: 341–347.
2. Morton DL, Wen DR, Wong JH. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg*, 1992; 127: 392–399.
3. Yanagita S, Natsugoe S, Uenosono Y, Kozono T, Ehi K, Arigami T, et al. Sentinel node micrometastases have high proliferative potential in gastric cancer. *Journal of Surgical Research*, 2008; 145: 238–243.
4. Osaka H, Yashiro M, Sawada T, Katsuragi K, Hirakawa K. Is a lymph node detected by the dye-guided method a true sentinel node in gastric cancer? *Clinical Cancer Research*, 2004; 10: 6912–6918.
5. Yanagita S, Natsugoe S, Uenosono Y, Arigami T, Arima H, Kozono T, et al. Detection of micrometastases in sentinel node navigation surgery for gastric cancer. *Surgical Oncology*, 2008; 17: 203–210.
6. Doekhie FS, Mesker WE, van Krieken JH, Kok NF, Hartgrink HH, Kranenburg EK, et al. Clinical re-

- levance of occult tumor cells in lymph nodes from gastric cancer patients. *Am J Surg Pathol*, 2005; 29: 1135–44.
7. Maehara LE, Oshiro T, Endo K, Baba H, Oda S, Ichiyoshi Y, et al. Clinical significance of occult micrometastasis lymph nodes from patients with early gastric cancer who died of recurrence. *Surgery* 1996; 119: 397–402.
 8. Saragoni L, Gaudio M, Morgagni P. Identification of occult micrometastases in patients with early gastric cancer using anti-cytokeratin monoclonal antibodies. *Oncological Rep* 2000; 7: 535.
 9. Morgagni P, Saragoni L, Folli S, et al. Lymph node micrometastases in patients with early gastric cancer: Experience with 139 patients. *Ann Surg Oncol*, 2001; 8: 170.
 10. Kubota K, Nakanishi H, Hiki N, Shimizu N, Tsuji E, Yamaguchi H, et al. Quantitative detection of micrometastases in the lymph nodes of gastric cancer patients with Real-time RT-PCR: A comparative study with immunohistochemistry. *Int J Cancer*, 2003; 105: 136–143.
 11. Okada Y, Fujiwara Y, Yamamoto H, Sugita Y, Yasuda T, Doki Y, et al. Genetic detection of lymph node micrometastases in patients with gastric carcinoma by multiple-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Cancer* 2001; 92: 2056–2064.
 12. Yoo MW, Park DJ, Ahn HS, Jeong SH, Lee HJ, Kim WH, et al. Evaluation of the adequacy of lymph node dissection in pylorus-preserving gastrectomy for early gastric cancer using the Maruyama index. *World J Surg*, 2010; 34: 291–295.
 13. Guadagni S, de Manzoni G, Catarci M, Valenti M, Amicucci G, De Bernardinis G, et al. Evaluation of the Maruyama Computer program accuracy for preoperative estimation of lymph node metastases from gastric cancer. *World J Surg*, 2000; 24: 1550–1558.
 14. Grau JJ, Palmero R, Marmol M, Domingo-Domenech J, Monzo M, Fuster J, et al. Time-related improvement of survival in resectable gastric cancer: the role of Japanese-style gastrectomy with D2 lymphadenectomy and adjuvant chemotherapy. *World Journal of Surgical Oncology*. 2006; 4: 53–62.
 15. Kajitani T. Japanese Research Society for the Study of Gastric Cancer: The general rules for gastric cancer study in surgery and pathology. *Jpn J Surg*. 1981; 11: 127–145.
 16. Nio Y, Tsubono M, Kawabata K, Masai Y, Hayashi H, Meyer C, et al. Comparison of Survival Curves of Gastric Cancer Patients After Surgery According to the UICC Stage Classification and the General Rules for Gastric Cancer Study By the Japanese Research Society for Gastric Cancer. *Annals of Surgery*. 1993; 218: 47–53.
 17. Primic Zakelj M, Zadnik V, Zagar T. Epidemiology of stomach cancer. 2. Mariborski Onkoloski dan, 2009. p. 1–11.
 18. Lambert R, Guilloux A, Oshima A, Pompe-Kirm V, Bray F, Parkin M, et al. Incidence and mortality from stomach cancer in Japan, Slovenia and the USA. *Int J Cancer*, 2002; 97: 811–818.
 19. Rabin I, Chikman B, Lavy R, Poluksht N, Halpern Z, Wassermann I, et al. The accuracy of sentinel node mapping according to T stage in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer*, 2010; 13: 30–35.
 20. Mori M, Mimori K, Inoue H, Barnard GF, Tsuji K, Nabara S, et al. Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by Reverse transcriptase-polymerase Chain Reaction. *Cancer Research*, 1995; 55: 3417–3420.
 21. Kim MC, Kim HH, Jung GJ, Lee JH, Choi SR, Kang DY, et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy using 99mTc tin colloid in gastric cancer. *Annals of Surgery*, 2004; 239: 383–387.
 22. Ishii K, Kinami S, Funaki K, Fujita H, Ninomiya I, Fushida S, et al. Detection of sentinel and non-sentinel lymph node micrometastases by complete serial sectioning and immunohistochemical analysis for gastric cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2008; 27: 1–7.
 23. Saito H, Osaki T, Murakami D, Sakamoto T, Kanaji S, Ohro S, et al. Recurrence in early gastric cancer – Presence of micrometastases in lymph node negative early gastric cancer patient with recurrence. *Hepatogastroenterology*, 2007; 54: 620–624.
 24. Sansoni P, Cossarizza A, Brianti V, Fagnoni F, Snelli G, Monti D, et al. Lymphocyte subsets and natural killer cell activity in healthy old people and centenarians. *Blood*, 1993; 82: 2767–2773.
 25. Wu ZY, Zhan WH, Li JH, H YL, Wang JP, Lan P, et al. Expression of E-cadherin in gastric carcinoma and its correlation with lymph node micrometastases. *World Journal of Gastroenterology*, 2005; 11: 3139–3143.
 26. Dilege E, Mihmanli M, Demir U, Ozer K, Bostanci O, Kaya C, et al. Prognostic value of preoperative CEA and CA 19–9 levels in resectable gastric cancer. *Hepatogastroenterology*, 2010; 57: 674–7.
 27. Mihmanli M, Dilege E, Demir U, Coskun H, Eroglu T, Uysalol MD. The use of tumor markers as predictors of prognosis in gastric cancer. *Hepatogastroenterology*, 2004; 51: 1544–7.
 28. Ishigami S, Natsugoe S, Hokita S, Che X, Tokuda K, Nakajo A, et al. Clinical importance of preoperative carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19–9 levels in gastric cancer. *J Clin Gastroenterology*, 2001; 32: 41–4.
 29. Ishii T, Fujiwara Y, Ohnaka S, Hayashi T, Taniguchi H, Takiguchi S, et al. Rapid genetic diagnosis with the Transcription–Reverse Transcription Concerted Reaction System for cancer micrometastasis. *Annals of Surgical Oncology*, 2004; 11: 778–785.
 30. Maruyama K, Gunven P, Okabayashi K, Sasako M, Kinoshita T. Lymph node metastases of gastric cancer. General pattern in 1931 patients. *Annals of surgery*, 1989; 210: 596–602.