

MIKROMETASTÁZY A VOLNÉ NÁDOROVÉ BUŇKY, METODY DETEKCE, VÝZNAM VYŠETŘENÍ U KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

MICROMETASTASES AND ISOLATED TUMOR CELLS, METHODS OF DETECTION, EXAMINATION SIGNIFICANCE IN COLORECTAL CANCER

TOMÁŠEK J.¹, VYZULA R.², COUFAL O.², REJTHAR A.³, KISS I.¹

¹ ODDĚLENÍ KLINICKÉ ONKOLOGIE, FN BRNO

² MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

³ FAKULTNÍ NEMOCNICE U SVATÉ ANNY, BRNO

Souhrn: Přítomnost metastáz je podstatný faktor, který ovlivňuje prognózu pacientů se solidními nádory. Vysoké procento relapsů choroby se objevuje také u velké skupiny pacientů, kde po primární, nejčastěji chirurgické léčbě, nebylo běžnými diagnostickými metodami prokázáno zbytkové onemocnění. Děje se tak díky časně diseminaci nádorových buněk, které nejsou při standardním stagingu zachyceny. K tomuto rozsevu nádorových buněk muselo dojít již před operací nebo teoreticky při resekci primárního nádoru. Tyto jednotlivé buňky mohou být detekovány různými imunohistochemickými nebo molekulárními metodami. Doposud nevyřešeným problémem zůstává skutečný prognostický význam zachytu volných nádorových buněk a neorganoidních mikrometastáz u kolorektálního karcinomu a jeho váha při rozhodování o indikaci adjuvantní terapie.

Klíčová slova: kolorektální karcinom, volné nádorové buňky, mikrometastázy, detekce mikrometastáz, imunohistochemie, RT-PCR

Summary: The presence of metastases is one of the important prognostic determinants in patients with solid tumours. Despite obtaining a potentially curative primary treatment (mostly resection), many patients do develop recurrent disease. The residual disease, however, is not found by routine diagnostic methods. Tumour progression can be caused by early tumour cell dissemination, undetectable by current standard techniques of clinical staging. Obviously, such tumour cell dissemination must have occurred prior to, or, theoretically, at the time of surgical manipulation. Tumour cells can be detected by various immunohistochemical methods or molecular techniques. The real prognostic significance of the detection of isolated tumour cells and micrometastases in colorectal carcinoma and its importance for indication of adjuvant therapy still remains a question.

Key words: colorectal carcinoma, isolated tumor cells, micrometastases, micrometastases detection, immunohistochemistry, RT-PCR

Úvod

Většina pacientů s karcinomem tlustého střeva a konečníku má v případě kompletní resekce primárního nádoru s histologicky negativními uzlinami (stadium Dukes' A nebo B) relativně dobrou prognózu. Pět let po resekci karcinomu kolorekta však přežívá přibližně jen 85–95 % pacientů stadia Dukes' A a 60–70 % pacientů stadia Dukes' B. U 5–40 % pacientů se tedy objevuje během 5 let lokální recidiva onemocnění nebo vzdálené metastázy (1, 2, 3). Prospěch adjuvantní chemoterapie nebyl u této skupiny nemocných prokázán, podle současných kritérií tedy není indikována. Relaps onemocnění po potenciálně kurativním resekcím výkonu lze vysvětlit v naprosté většině případů pouze hematogenní nebo lymfogenní diseminací nádorových buněk ještě před resekci, eventuálně teoreticky možným peroperačním rozsevem. Běžnými stagingovými metodami nejsou tyto buňky a mikroskopické částičky nádorové tkáně zachyceny. Právě na takovéto minimální zbytkové onemocnění je cílena adjuvantní terapie, nyní běžně indikovaná až při histologickém průkazu nádorových buněk v lymfatických uzlinách (stadium Dukes' C s pětiletým přežíváním 30–50 %). Detekce diseminovaných nádorových buněk v časných stádiích kolorektálního karcinomu tedy může pomoci identifikovat rizikovou skupinu pacientů, která bude mít prospěch z adjuvantní léčby (4). Problémem zůstává určit kdy přítomnost jednotlivých izolovaných nádorových buněk v krvi, kostní dřeni a v dalších orgánech znamená skutečně časnou formu vzdáleného metastazování a tedy vlastně klinické stadium IV. a kdy jde pouze o migrující buňky bez metastatického potenciálu.

Mikrometastázy a volné nádorové buňky, definice a otázka klasifikace

Průkaz volných nádorových buněk (VNB) je nutné jednoznačně odlišit od diagnostiky mikrometastáz. Mikrometastázy jsou ložiska nádorových buněk menší než 2 mm, vzdálená od primárního nádoru. Dochází zde k implantaci nádorových buněk do postiženého orgánu, průniku cévní stěnou nebo stěnou lymfatických sinusů, velmi často je patrná stromální reakce hostitelské tkáně. Extravaskulární nebo extrasinusoidálně dochází k proliferaci nádorových buněk (5). Je tedy patrné, že mikrometastázy lze prokázat pouze histologickým vyšetřením. Zásadní biologickou charakteristikou, která je odlišuje od makroskopických metastáz, je nepřítomnost cévního zásobení těchto útvarů. Buňky mikrometastáz jsou plně závislé na pasivní difúzi kyslíku a živin, což omezuje jejich růst přibližně na 2 mm. K další progresi dochází až nastartováním angiogenní kaskády s novotvorbou cév v metastatické tkáni. – mikrometastáza se mění v klasickou makroskopickou metastázu (6, 7). Naproti tomu VNB jsou jednotlivé cirkulující buňky nebo maximálně shluky několika buněk mimo tkáňový svazek, které neproliferují a nevyvolávají reakci stromatu hostitelské tkáně. Většina těchto buněk je v Go fázi buněčného cyklu. Pouze velmi malé procento (0,05 %) z nich přežívá a stává se zárodkem skutečného metastatického ložiska (8).

V posledních letech došlo k velkému rozvoji metod používaných v diagnostice VNB. VNB lze diagnostikovat morfologickými metodami (imunohistochemie, flow cytometrie), jednak nemorfologickými molekulárními metodami (polymerázová řetězová reakce).

Vzhledem k velmi rozporným výsledkům studií, které sledují prognostický význam detekce minimálního onemocnění je nezbytné pro jejich porovnávání používat jednotnou klasifikaci mikrometáz a VNB. Průkaz mikrometastáz a VNB nelze jednoduše zařadit do současné TNM klasifikace a např. průkaz VNB v uzlině popsat jako pN1. Přesun některých pacientů do vyšších stádií onemocnění by znemožnil porovnávat léčebné výsledky. Vedlo by to k nárůstu počtu pacientů ve vyšších stádiích a zároveň k obrovské nehomogenitě souborů pacientů (9). Na druhé straně je nutné výsledky vyšetření VNB popisovat jednotně. Hermanek (5) navrhuje velmi dobrý systém klasifikace rozšiřující TNM systém. V případě, že je histologické vyšetření lymfatické uzliny negativní a je pátráno morfologickými metodami po VNB, použije se symbol „i“ v závorce za pN0, pokud je použita některá nemorfologická - molekulární metoda, objeví se „mol“ (tbl 1)

Tabulka 1: Návrh klasifikace VNB v lymfatických uzlinách (Hermanek P).

pN0	Histologicky nezachycena uzlinová metastáza, nebylo pátráno po VNB
pN0(i-)	Histologicky nezachycena uzlinová metastáza, negativní výsledek morfologického vyšetření na VNB
pN0(i+)	Histologicky nezachycena uzlinová metastáza, pozitivní výsledek morfologického vyšetření na VNB
pN0(mol-)	Histologicky nezachycena uzlinová metastáza, negativní výsledek nemorfologického vyšetření na VNB
pN0(mol+)	Histologicky nezachycena uzlinová metastáza, pozitivní výsledek nemorfologického vyšetření na VNB

V případě, že se jedná o sentinelovou uzlinu, použije se symbol „(sn)“ (např. pN0 (i+)(sn)).

Obdobně je popisován nález VNB v kostní dřeni, krvi nebo jiných orgánech se specifikací vyšetřované tkáně (např. M0(i+,liver), M0(mol-, blood). Karcinom prsu již má v TNM klasifikaci zakotven popis mikrometastázy v uzlině (pN1a). Pro ostatní nádory a lokalizace mikrometastáz je navržen symbol „(mi)“ (např. pN1(mi), pM1(mi)). Je vhodné znovu zdůraznit, že mikrometastázy lze diagnostikovat pouze histologicky.

Metody zjišťování mikrometastáz a volných nádorových buněk

Histopatologie

Přítomnost nádorových buněk v krvi byla popsána již v 19. století (10). V polovině 20. století se objevují úvahy o mikrometastázách u karcinomu prsu. Tato diagnóza patří svým charakterem mezi systémové nemoci (11), metastická kaskáda je nastarována již v časném stadiu, kdy je primární nádor minimální velikosti. Jedinou možností, jak prokázat nádorové postižení v uzlinách, které byly při standardním vyšetření negativní, tehdy bylo seriové prořezání uzlin. V roce 1948 byla v časopisu Cancer publikována práce autorů Saphira a Amromina (12), kteří každý blok materiálu s axilárními uzlinami rozřezali více než 300x. Touto metodou byly zachyceny metastázy u 33% pacientek, které měly původně negativní nález. Klasické barvení preparátů hematoxylinem a eosinem bylo dominantní metodou do počátku osmdesátých let. V řadě publikovaných studií z té doby bylo demonstrováno, že mnohočetné prořezání preparátů barvených tímto způsobem zvyšuje počet záchytů metastatického postižení uzlin až o 20 – 30% (13,14). Výsledek vyšetření samozřejmě podstatným způsobem ovlivňuje počet nalezených lymfatických uzlin v operačním preparátu. Vyššího počtu nalezených uzlin v resekátu lze dosáhnout použitím metodik projasnění tukové tkáně. Tyto metody barevně a konzistencí odlišují lymfatické uzliny od okolní tkáně, což je důležité pro záchyt velmi drobných uzlin (15).

Imunohistochemie

Imunohistochemické metody citlivost záchytu buněk epiteliálních nádorů dále zvýšily asi o 15% (16,17,18,19). Základem tohoto vyšetření je stabilní přítomnost cytokeratinů nebo jiných antigenů v epiteliální nádorové buňce a naopak jejich absence v normální vyšetřované tkáni. U různých typů epiteliálních nádorů lze detekovat např. epiteliální membránové antigeny (EMA), specifické epiteliální glykopeptidy, CEA, Ca 19-9 a s menší specifitou i estrogenové a progesteronové receptory nebo PSA (7). Pomocí monoklonálních protilátek např. proti cytokeratinům lze detekovat i nádorovou buňku mezi 10⁵ mezenchymálními buňkami kostní dřene (20). Často není používána monoklonální protilátka proti jednomu cytokeratinu ale směs protilátek proti několika cytokeratinům. Do praxe se metoda nejdříve dostala u karcinomu prsu. Podle typu použité protilátky se objevují 1 – 3% falešně pozitivních nálezů (21). Většina publikovaných studií neprokázala prognostický význam imunohistochemické detekce nádorových buněk u pacientů s kolorektálním karcinomem stadia Dukes' A a Dukes' B (tbl. 2). Ovšem např. von Greenon takovouto závislost popsal (22). 6 ze 14 pacientů s imunohistochemicky prokázanými uzlinovými metastázami zemřelo během 66 měsíců, naproti tomu jen 1 z 38 pacientů, kteří měli toto vyšetření negativní. Isaka (23) na svém souboru pacientů prokazuje signifikantně horší prognózu pacientů s karcinomem rekta v případě imunohistochemicky prokázaného postižení uzlin. Je ovlivněno pětileté přežívání pacientů, v případě desetiletého přežívání již rozdíl zachycen nebyl.

Tabulka 2: Detekce VNB v lymfatických uzlinách u pacientů s kolorektálním nádorem stadia Dukes' A a Dukes' B imunohistochemicky.

autor	antigen ^a	počet uzlin ^b	počet pacientů ^c	prognostický význam
Adell (24)	cytokeratin	81/467, 17,3%	39/100, 39%	ne
Broll (25)	cytokeratin	neuvedeno	6/32, 19%	ne
Öberg (2)	cytokeratin	77/609, 11,6%	47/147, 32%	ne
Greenon (22)	TAG 72, cytokeratin	33/568, 5,8%	14/50, 28%	ano
Isaka (23)	cytokeratin 8,18	19/644, 2,9%	9/42, 21,4%	ano
Nakanishi (26)	cytokeratin, p53	127/1633, 8% 13/522, 2,5%	30/44, 68% 8/18, 44%	ne ne

^a většinou není použita monoklonální protilátka specifická proti jednomu cytokeratinu ale proti více cytokeratinům (AE1/AE3, KI-1, CAM5.2, Ber-EP4 a další)
^b pozitivní uzliny/celkový počet vyšetřených uzlin
^c pacienti s pozitivními uzlinami/celkový počet vyšetřených pacientů stadia Dukes' A a Dukes' B

Flow cytometrie

VNB nejsou v jednotlivých tkáních roztroušeny rovnoměrně. Může to vést k falešně negativitě vyšetření. K detekci VNB v kostní dřeni lze použít flow cytometrické vyšetření. Imunocytochemicky označené nádorové buňky jsou touto metodou rychle stanoveny a na rozdíl od klasické imunohistochemie in situ je možná také jejich přesnější kvantifikace. Senzitivita vyšetření je vysoká, lze zachytit deset nebo méně buněk mezi 10⁵ buňkami kostní dřene (47).

Molekulárně-biologické metody

Počátkem devadesátých let se objevuje metoda polymerázové řetězové reakce (PCR). PCR umožňuje detekovat přítomnost i naprosto minimálního množství určitého fragmentu DNA v záplavě ostatní DNA. Děje se tak díky mnohonásobné specifické amplifikaci hledaného úseku DNA. Proti imunohistochemickým metodám má PCR vyšší senzitivitu a specifitu, v optimálním případě umožňuje detekovat i nádorovou buňku mezi 10⁷ buňkami zdravé nepostižené tkáně (21). Velkou výhodou je částečná automatizace vyšetření. Limitující je

naopak, kromě PCR in situ, chybějící možnost morfologického posouzení detekovaných nádorových buněk. Technika PCR in situ však zmenšuje objem vyšetřovaného vzorku. Jsou v zásadě 3 přístupy k detekci VNB pomocí PCR.

a) *detekce nádorově specifických chromozomálních aberací*
Tuto metodu lze použít v diagnostice hematologických malignit nebo některých sarkomů (27). Doposud nebyla nalezena chromozomální aberace specifická pro kolorektální karcinom, u této diagnózy tedy zatím nemá toto vyšetření použití.

b) *detekce nádorově specifických mutací DNA (mutant allele specific amplification method „MASA“)*

V případě kolorektálního karcinomu se jedná například o mutace K-ras (kodon 12 nebo 13) nebo mutace p53. Metodu lze použít pouze v případě jednoznačně prokázané přítomnosti mutace v primárním nádoru. Mutace k-ras nebo p53 lze detekovat u 60-80% kolorektálních karcinomů. Dalším omezujícím faktorem je možnost falešné pozitivní vyšetření v případě detekce volné nádorové DNA, která se může uvolňovat z nekrotických rozpadlých nádorových buněk (28). I při těchto limitech metody byly publikovány pozoruhodné výsledky. Při použití MASA techniky je v časných stádiích kolorektálního karcinomu prokazována přítomnost nádorových buněk u 52–64% pacientů. Hayashi (29) retrospektivně vyšetřil 120 pacientů Dukes' A nebo B. 71 pacientů mělo mutaci K-ras resp. p53. Z těchto 71 pacientů mělo 37 pozitivní nález v lymfatických uzlinách. Z těchto 37 pacientů mělo 27 recidivu onemocnění do 5 let od diagnózy. 34 z 71 pacientů mělo negativní vyšetření uzlin a ani u jednoho nedošlo během 5 let k recidivě. Tyto výsledky jistě bude nutno ověřit prospektivní studií.

c) *detekce exprese genů charakteristických pro nádorové buňky pomocí RT – PCR*

Karcinomové buňky exprimují určité „markerové“ geny. Zjištěním této exprese (m-RNA) lze karcinomové buňky detekovat. Předpokladem samozřejmě je, že nejsou exprimovány buňkami normálně přítomnými ve vyšetřované tkáni. Metoda polymerázové řetězové reakce reverzní transkriptázy (RT PCR) umožňuje amplifikaci a tedy detekci mRNA cytokeratinu (CK) 18,19, 20, CEA, matrilysinu nebo guanylyl-cyklyasy C (33,34,35) eventuálně jiných bílkovin. Nález m-RNA odpovídá přítomnosti živých buněk, protože volná RNA z nekrotických buněk je velmi rychle rozložena (36). Proti imunohistochemii nabízí tato metoda vyšší senzitivitu. V optimálním případě lze zachytit i nádorovou buňku mezi 10⁷ nenádorovými buňkami (37). Tak vysoká senzitivita ovšem může negativně ovlivnit specifitu metody. K falešně pozitivním výsledkům může dojít kontaminací prób při jejich zpracování, amplifikací pseudogenů nebo nelegitimní exprese zkoumaného genu. Nelegitimní exprese znamená nepatrnou minimální expresi tkáňověspecifického genu jinou tkání (38). Většina autorů udává vzhledem k uvedeným skutečnostem senzitivitu nižší (1:10⁴ až 1:10⁶). Při důkladném odzkoušení metody s velkým počtem odpovídajících negativních kontrol s nenádorovou tkání je také specifita vysoká.

Pomocí RT-PCR v různých modifikacích lze detekovat nádorové buňky v lymfatických uzlinách podle různých autorů u 16 – 100% pacientů stadia Dukes' A nebo Dukes' B (tbl 3). Liefers (39) ve svém souboru 26 pacientů popsal signifikantně horší prognózu pacientů s pozitivními uzlinami. K detekci VNB použil CEA – RT-PCR. Výsledky této studie jsou však kontroverzní, protože bylo vyšetřeno průměrně jen 7 uzlin na pacienta a autoři použily malý počet negativních kontrol. Navíc je nedostatečná specifita CEA – RT-PCR, byla zachycena exprese CEA také v uzlinách pacientů bez nádorového onemocnění (40,41). Futamura (42) kombinoval detekci CEA a cytokeratinu 20 pomocí RT-PCR u 13 pacientů stadia Dukes' A nebo B. Překvapivě u všech pacientů byly VNB zachyceny. Pomocí CK 20 – RT – PCR detekoval Weitz nádorové buňky u 87% pacientů stadia Dukes' A a Dukes' B (43). Záchyt VNB v lymfatických uzlinách je mnohem vyšší než známé procen-

to relapsů odpovídající časným stádiím kolorektálního karcinomu. Při stratifikaci souboru (16 pacientů) podle lokalizace postižených uzlin se ukázalo, že v 8 případech (50%) byly postiženy pouze uzliny kolem velkých cév, ve 2 (12%) pouze parakolické uzliny. Tyto uzliny jsou při lymfadenektomii odstraněny a nemají tedy asi žádný prognostický význam. U 6 pacientů (38%) však byla pozitivní tzv. apikální uzlina. Apikální uzlina je v tomto smyslu poslední spádová uzlina nádoru před resekční linií. Opakovaně bylo prokázáno, že histopatologicky prokázané meta v apikální uzlině zhoršují prognózu pacienta (45,46). U 30 – 40 % pacientů Dukes' A a Dukes' B dochází k relapsu onemocnění. Nabízí se tedy hypotéza, že prokázané VNB v apikální uzlině prokazují diseminaci nádorových buněk za hranice resekční linie. Tito nemocní by mohli mít prospěch s adjuvantní terapií. Nyní probíhá follow up tohoto souboru pacientů, výsledky by mohly podpořit prognostický význam vyšetření apikální uzliny na VNB pomocí detekce CK 20 – RT-PCR.

Tabulka 3: Detekce VNB v lymfatických uzlinách u pacientů s kolorektálním nádorem stadia Dukes' A a Dukes' B metodou RT-PCR.

autor	detekovaný gen	počet uzlin ^a	počet pacientů ^b
Liefers (39)	CEA	36/192, 19%	14/26, 54%
Futamura (42)	CK20, CEA	10/202, 50,5%	13/13, 100%
Weitz (43)	CK20	137/269, 50,9%	14/16, 87,5%
Mori (40)	CEA	47/87, 54%	4/7, 57%
Dorudi (4)	CK20	8/127, 6,2%	4/14, 28,6%
Wong (44)	CD 44	neudáno	1/6, 16%
Waldman (34)	guanylyl cyklyasa C	6/23, 26,1%	2/7, 28,6%
Ichikawa (35)	matrilysin	8/60, 13%	2/10, 20%

^a pozitivní uzliny / celkový počet vyšetřených uzlin

^b pacienti s pozitivními uzlinami / celkový počet vyšetřených pacientů stadia Dukes' A a Dukes' B

Diseminace VNB kolorektálního karcinomu v krvi a v kostní dřeni

Vysoké procento záchytu VNB v regionálních lymfatických uzlinách ve stadiu Dukes' A a Dukes' B podporuje terapeutický význam lymfadenektomie v časných stádiích kolorektálního karcinomu. Je ovšem nutné posoudit také význam hematogenní cesty nádorové diseminace. Pokud jsou nádorové buňky prokázány v krvi nebo v kostní dřeni, nevede chirurgický výkon k úplné eliminaci nádorových buněk z organismu. Klinický význam takového nálezu zůstává nejasný.

Hematogenní diseminace VNB časných stádií kolorektálního karcinomu detekovaná imunocytologicky korelovala s časnějším relapsem a kratší dobou přežívání (48). Pacienti s flow cytometricky detekovanými VNB v kostní dřeni měli vyšší pravděpodobnost vzniku vzdálených metastáz (49). S vyšším klinickým stadiem stoupá také procento pacientů s nálezem VNB v kostní dřeni (50, 51). Weitz (52) uvádí následující rozložení četnosti postižení kostní dřeni: Dukes' A - 9%, Dukes' B - 32%, Dukes' C - 44%, Dukes' D - 83%. Záchyt VNB v kostní dřeni neznamená vyšší pravděpodobnost relapsu onemocnění v kostech (51). Bylo prokázáno, že při resekčním výkonu se zvyšuje počet VNB v krvi (52) a to více v krvi spádových mesenterických žil proti vzorkům krve periferní a z centrální žíly (53). To ukazuje na filtrační funkci jater a dalších orgánů pro tyto nádorové buňky. Jaký je skutečný metastatický potenciál těchto buněk a zda to ovlivňuje prognózu pacientů je zatím nejasné.

Perspektivy detekce VNB

Nález VNB v lymfatických uzlinách, kostní dřeni, krvi nebo jiných tkáních může znamenat vyšší riziko metastazování v blízké nebo vzdálenější budoucnosti a tedy horší prognózu paci-

enta. Vyšetření VNB může být užitečné k selekci rizikovějších pacientů, kteří by mohli profitovat z další adjuvantní terapie. VNB, které mají metastatický potenciál ve své většině neproliferují, nachází se v G fázi buněčného cyklu. Možnosti klasické adjuvantní chemoterapie, která působí jen na proliferující buňky, jsou při jejich likvidaci velmi omezené. Perspektivní se ale v této indikaci jeví terapeutické použití monoklonálních protilátek a jejich kombinace s chemoterapií (54). Fenotypizace VNB a mikrometastáz na přítomnost cílových antigenů by pomohla v cílené indikaci takovéto léčby (55).

Přítomnost VNB nelze na základě současných znalostí hodnotit jako nezávislý prediktivní faktor. Aby bylo možno zhodnotit skutečný význam VNB, bude nutné standardizovat metodu vyšetření do studií zařadit velké množství pacientů na více pracovištích a výsledky zhodnotit multivariační analýzou se zahrnutím všech známých a uvažovaných možných prediktivních faktorů.

Práce byla podpořena Výzkumným záměrem MZČR č. 00065269705.

Literatura:

- Audisio R.A., Setti - Carraro P., Segala M., Capko D. et al: Follow-up in colorectal cancer patients: a cost benefit analysis. *Ann. surg. Oncol.* 3, 1996, 349 – 357
- Öberg A., Stenling R., Tavelin B. et al: Are lymph node micrometastases of any clinical significance in Dukes Stages A and B colorectal cancer? *Dis. Colon Rectum* 41, 1998, 1244-1249
- Deans G.T., Parks T.G., Rowlands B.J. et al: Prognostic factors in colorectal cancer. *Br. J. Surg.* 1992, 79: 608 – 13
- Dorudi S., Kinrade E., Marshall N.C. et al: Genetic detection of lymph node micrometastases in patients with colorectal cancer. *Br. J. Surg.* 85(1), 1998, 98-100
- Hermanek P., Hutter R.V.P., Sobin L.H. et al: Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer* 1999, 86 : 2668 – 73
- Kell M.R., Winter D.C., O'Sullivan G.C. et al: Biological behaviour and clinical implications of micrometastases. *Br. J. Surg.* 2000, Dec, 87(12): 1629 – 39
- Hermanek P.: Disseminated tumor cells versus micrometastasis: definitions and problems. *Anticancer Res.* 1999, Jul – Aug, 19 (4A): 2771 – 4
- Abati A., Liotta L.A.: Looking forward in diagnostic pathology. The molecular superhighway. *Cancer* 1996, 78: 1-3.
- Feinstein A.R., Sosin D.M., Wells C.K.: The Will Rogers Phenomenon. Stage migration and new diagnostic techniques as a source of misleading statistics for survival in cancer. *N. Engl. J. Med.* 1985, 312: 1604 – 8
- Sanson M. Fait remarquable de diath. *se. Gaz Med de Paris* 1834, 2:140. Citoval Papac R.: Bone marrow metastases. *Cancer* 1994, 74:2403-13
- Brown D.C., Purushotham A.D., Birmie G.D. et al.: Detection of intraoperative tumor cell dissemination in patients with breast cancer by use of reverse transcription and polymerase chain reaction. *Surgery* 117, 1995, 96-101
- Saphir O., Amromin G.D. Obscure axillary lymph node metastasis in carcinoma of the breast. *Cancer* 1948, 1:238, Citoval: Giuliano A., Kelemen P.: Sophisticated techniques detect obscure lymph node metastases in carcinoma of the breast. *Cancer* 83, 1998, 391-393
- Gusterson B. Are micrometastases clinically relevant? *Br. J. Hosp.* 1991, 47: 247
- Wilkinson E.J., Hause L.: Probability in lymph node sectioning. *Cancer* 1974, 33: 1269
- Haboubi N.Y., Abdalla S.A., Amini S. et al. The novel combination of fat clearance and immunohistochemistry improves prediction of the outcome of patients with colorectal carcinomas: a preliminary study. *Internat. J. Colorect. Dis.* 1998,13,(2),99-102
- Giuliano A., Kelemen P.: Sophisticated techniques detect obscure lymph node metastases in carcinoma of the breast. *Cancer* 83, 1998, 391-393
- Trojani M., de Mascarel I., Candre J.M., Bonichon F.: Micrometastases to axillary lymph nodes from carcinoma of breast: detection by immunohistochemistry and prognostic significance. *Br. J. Cancer* 55, 1987, 303-306
- Hainsworth P.J., Tjandra J.J., Stillwell R.G. et al.: Detection and significance of occult metastases in node-negative breast cancer. *Br. J. Surg* 80, 1993, 459-463
- Nasser I.A., Lee A.K.C., Bosari S. et al: Occult axillary lymph node metastases in „node negative“ breast carcinoma. *Hum. Pathol.* 24, 1993, 950-957.
- Osborne M.P., Wong G.Y., Asina S. et al.: Sensitivity of immunocytochemical detection of breast cancer cells in human bone marrow. *Cancer Res.* 51, 1991, 2706-2709
- Johnson P.W.M., Burchill S.A., Selby P.J.: The molecular detection of circulating tumor cells. *Br. J. Cancer* 1995, 72:268
- Greenston J.K., Insehart C.E., Rice R. et al.: Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Dukes B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. *Cancer* 1994, 73: 563
- Isaka N., Nozue M., Doy M. et al.: Prognostic significance of perirectal lymph node micrometastases in Dukes B rectal carcinoma: an immunohistochemical study by CAM5.2. *Clin. Cancer Res.* 1999, 5: 2065
- Adell G., Boeryd B., Fralund B. et al.: Occurrence and prognostic importance of micrometastases in regional lymph nodes in Dukes B colorectal carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur. J. Surg.* 1996, 162: 637
- Broll R., Schauer V., Schimmelpennin H. et al.: Prognostic relevance of occult tumor cells in lymph nodes of colorectal carcinomas. *Dis Colon Rectum* 1997 Dec, 40(12): 1465-71
- Nakanishi Y., Ochiai A., Yamauchi Y. et al.: Clinical implications of lymph node micrometastases in patients with colorectal cancers. A case control study. *Oncology* 1999 Nov., 57(4):276-80
- Willeke F., Ridder R., Mechttersheimer G. et al.: Analysis of FUS-CHOP fusion transcripts in different types of soft tissue liposarcoma and their diagnostic implications. *Clin. Cancer Res.* 1998, 4: 1779
- Yamamoto N., Kato Y., Yanagisawa A. et al.: Predictive value of genetic diagnosis for cancer micrometastasis. *Cancer*, 1997, 80: 1393
- Hayashi N., Arakawa H., Nagase H. et al.: Genetic diagnosis identifies occult lymph node metastases undetectable by the histopathological method. *Cancer Res* 54:3853

- Hayashi N., Ito I., Yanagisawa A. et al.: Genetic diagnosis of lymph-node metastasis in colorectal cancer. *Lancet*, 1995, 345: 1257
- Nakamori S., Kameyama M., Fukurawa H. et al.: Genetic detection of colorectal cancer cells in circulation and lymph nodes. *Dis. Colon Rectum* 1997 Oct., 40(10 Suppl.): 29-36
- Thebo J.S., Senagore A.J., Reinhold D.S. et al.: Molecular staging of colorectal cancer: K-ras mutation analysis of lymph nodes upstages Dukes B patients. *Dis. Colon Rectum* 2000 Feb., 43(2):155-9, discussion 159-62
- Gunn J., Mc Call J.L., Yun K., Wright P.A.: Detection of micrometastases in colorectal cancer patients by K 19 and K 20 reverse transcription polymerase chain reaction. *Lab. Invest* 75(4), 1996, 611-616
- Waldman S.A., Cagir B., Rakinic J. et al.: Use of guanylyl cyclase C for detecting micrometastases in lymph nodes of patients with colon cancer. *Dis. Colon Rectum* 41(3), 1998, 310-315
- Ichikawa Y., Ishikawa T., Momiyama N. et al.: Detection of regional lymph node metastases in colon cancer by using RT-PCR for matrix metalloproteinase 7, matrilysin. *Clin. Exp. Metastasis* 16(1), 1998, 3-8
- Knebel M.D., Koch M., Weitz J. et al.: Diagnostik und Bedeutung der „Minimal Residual Disease“ bei Patienten mit kolorektalem Karzinom. *Zentralbl. Chir.* 125 (2000) Suppl. 1:15-19
- Doerbert M.K., Weitz J., Koch M. et al.: Molecular tools in the detection of micrometastatic cancer cells – technical aspects and clinical relevance. *Recent Results in Cancer Research*, 2001, 158
- Chelly J., Concordet J.P., Kaplan J.C. et al.: Illegitimate transcription of any gene in any cell type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86:2617-2621
- Liefers G.J., Cleton-Jansen A.M., van de Velde C.J. et al.: Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 339(4), 1998, 223-228
- Mori M., Mimori M., Inoue H. et al.: Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res.* 1995,55:3417-3420
- Bostick P.J., Chatterjee S., Chi D.D. et al.: Limitations of the specific reverse transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 1998, 16: 2632
- Futamura M., Takagi Y., Koumura H. et al.: Spread of colorectal cancer micrometastases in regional lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reactions for carcinoembryonic antigen and cytokeratin 20. *J. Surg. Oncol.* 68(1), 1998, 34-40
- Weitz J., Kienle P., Magener A., Koch M. et al.: Detection of Disseminated Colorectal Cancer Cells in Lymph Nodes. *Clin. Cancer Res.*, 1999 (Jul) 5: 1830-1836
- Wong L.S., Cantrill J.E., Odogwu S. et al.: Detection of circulating tumor cells and nodal metastasis by reverse transcriptase-polymerase chain reaction technique. *Br. J. Surg.*, 1997, 84:834
- Mallassagne B., Valleur P., Serra J. et al.: Relationship of apical lymph node involvement to survival in resected colon carcinoma. *Dis. Colon Rectum*, 1993, 36:645-653
- Shida H., Ban K., Matsumoto M. et al.: Prognostic significance of location of lymph node metastases in colorectal cancer. *Dis. Colon Rectum* 1992, 35:1046-1050
- O'Sullivan G.C., Collins J.K., O'Brien F. et al. Micrometastases in bone marrow of patients undergoing curative surgery for gastrointestinal cancer. *Gastroenterology* 1995, 109: 1535-40
- Lindemann F., Schlimok G., Dirschedl P. et al.: Prognostic significance of micrometastatic tumor cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet*, 1992, 340:685-689
- O'Sullivan G.C., Collins J.K., Kelly J. et al.: Micrometastases: marker of metastatic potential or evidence of residual disease? *Gut*, 1997, 40: 512-15
- Soeth E., Roder C., Juhl H. et al.: The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal cancer patients by a cytokeratin-20-specific nested reverse-transcriptase-polymerase-chain reaction is related to the stage of disease. *Int. J. Cancer* 69(4), 1996, 278-282
- Schlimok G., Funke I., Bock B. et al.: Epitelial tumor cells in bone marrow of patients with colorectal cancer: immunocytochemical detection, phenotypic characterization and prognostic significance. *J. Clin. Oncol.* 8, 1990, 831-837
- Weitz J., Kienl P., Lacroix J. et al.: Dissemination of tumor cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 1998, 4:343-348
- Koch M., Weitz J., Kienle P. et al. Comparative analysis of tumor cell dissemination in mesenteric, central and peripheral venous blood in patients with colorectal cancer. *Arch. Surg.* 2001, 136: 85 – 89
- Riethmüller G., Holz E., Schlimok G. et al.: Monoclonal antibody therapy for resected Dukes C colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 1998, 16:1788-97
- Hajdúch M., Michálek J., Papajík T., Štěrbá J., Talač R., Vyzula R., Žaloudík J. Monoklonální protilátky v onkologii, Mediforum 2000, Nové trendy