

Kliniczna wiarygodność śródoperacyjnej oceny stanu regionalnych węzłów chłonnych metodą biopsji odciskowej węzła wartownika we wczesnym raku piersi

Tomasz Jastrzębski¹, Kamil Drucis¹, Grażyna Gulida², Janusz Jaśkiewicz¹

1 - Klinika Chirurgii Onkologicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny

2 - Zakład Anatomii Patologicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny

Adres do korespondencji:

dr hab. med. Tomasz Jastrzębski

Klinika Chirurgii Onkologicznej

Gdański Uniwersytet Medyczny

80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 7

tel./fax 58 3492 440, jasek@gumed.edu.pl

Streszczenie:

Wiarygodne określenie stanu regionalnych węzłów chłonnych jest jednym z podstawowych kryteriów rzetelnej oceny stopnia zaawansowania raka piersi. U chorych, u których pachowe węzły chłonne nie są wyczuwalne (cN0) standardem postępowania jest ocena węzłów wartowniczych (WW). Za kryteria wiarygodnej oceny WW uznaje się skuteczność metody powyżej 90% oraz ilość wyników fałszywie ujemnych poniżej 5%.

W latach 2002 – 2005 u 81 chorych z rakiem piersi bez klinicznych cech przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, u których zidentyfikowano węzeł wartownik, wykonano śródoperacyjnie ocenę stanu SN metodą biopsji odciskowej. Węzły wartownicze były oceniane podwójną metodą izotopowo-barwnikową. Oba znaczniki były podawane śródskórnym przytoczkowo. W grupie 81 chorych przebadano 99 węzłów wartowników oznaczonych w obrębie dołu pachowego. Biopsja odciskowa wykazała obecność przerzutów u 13 chorych. U 11 z nich wielkość ogniska przerzutowego była większa niż 2 mm (makroprzerzut), zaś u pozostałych dwóch poniżej 2 mm (mikroprzerzut).

Rutynowe badanie histopatologiczne pooperacyjne całego węzła chłonnego wykazało obecność mikroprzerzutów u następnych 2 chorych, u których wynik biopsji odciskowej był ujemny (wyniki fałszywie ujemne).

W pozostałych przypadkach dokładne badanie histopatologiczne potwierdziło obecność przerzutów raka piersi (brak wyników fałszywie ujemnych). Na podstawie uzyskanych wyników skuteczność ogólna metody biopsji odciskowej oceniono na 86,7%, zaś czułość na 100%.

Summary

Aim of the study:

Evaluation of cytology examination of sentinel node material collected with intraoperative imprint biopsy in patients with breast cancer.

Material:

The material of the study were 81 patients with breast cancer, without clinical signs of metastases into regional lymph nodes, in whom sentinel nodes were identified and evaluated with intraoperative imprint

biopsy in the years 2002-2005. The average number of sentinel nodes identified per patient was 1.23 (ranging from 1 to 3). The average tumour size in clinical examination was 1.8 mm.

Methods:

Sentinel node was identified with two tracer techniques: dye and radiotracer, with lymphoscintigraphy applied in each case. Patient was qualified for intraoperative sentinel node evaluation only if the node was visualized with lymphoscintigraphy. The removed lymph nodes were bisected along the long axis across the entrance of the lymph vessel into the node. Imprint biopsy was performed by pressing the cut surfaces of each half of the sectioned node to the surface of a glass slide. Two imprints were made from each excised sentinel node. Imprints were fixed in 95% ethanol and stained with hematoxylin and eosin. Then both parts of sentinel node were fixed in 10% buffered formalin and subjected to standard pathologic examination as well as to standard immunohistochemical staining with use of cytokeratin.

Results:

On the basis of the obtained results sensitivity of imprint biopsy was determined to be 86.7%, and specificity – 100%. PPV index was 100%, NPV index – 97.1%, and accuracy index – 97.5%. Due to the fact that false negative results concerned micrometastases only, sensitivity and specificity were determined separately also for macrometastases, with both these parameters equal to 100%. A statistically significant difference was found ($p < 0.05$, Chi-square test) for histopathological classification of the tumour type. In the subgroup of patients with SN micrometastases the lobular type of breast cancer was present in 3 out of 4 patients (75%), whereas in the subgroup of patients with macrometastases the ductal type prevailed, with lobular breast cancer diagnosed in just 1 patient (9%).

Conclusions:

Intraoperative evaluation of regional lymph nodes with the method of cytology examination of dye-stained sentinel node material collected with imprint biopsy is reliable, sure and secure for the patient, because of no false positive results observed.

Wstęp

Wiarygodne określenie stanu regionalnych węzłów chłonnych jest jednym z podstawowych kryteriów rzetelnej oceny stopnia zaawansowania raka piersi i ma bezpośredni wpływ na podejmowanie decyzji terapeutycznych. Wpływa także na ocenę rokowania u poszczególnych pacjentów. Dlatego w dobie coraz powszechniejszego stosowania metody oznaczania węzła wartownika (sentinel node – SN) niezmierną wagę przykłada się do coraz bardziej szczegółowej jego oceny, nie tylko włączając badania immunohistochemiczne (1-5), co jest standardem, ale także badania oparte na analizie RT-PCT i badania molekularne (6).

Zasadniczymi elementami oceny przerzutów do węzłów metodą SN są dwa kryteria: wiarygodność metody identyfikacji SN oraz wiarygodność oceny przerzutów raka w węzle wartownika.

Kryteria wiarygodnej oceny węzła wartownika (skuteczność metody powyżej 90% i ilość wyników fałszywie ujemnych poniżej 5%) określono na konferencji w Filadelfii w 2001 roku (7). Ocena histopatologiczna tego węzła w rutynowym badaniu pooperacyjnym jest zależna od sposobu badania (ilość skrawków, ocena barwnikowa i immunohistochemiczna) i jest standardowa dla każdego ośrodka.

Problemem pozostaje wiarygodna ocena śródoperacyjna węzła wartownika, która pozwalałaby na jednoczesowe wykonanie limfadenektomii w przypadku obecności przerzutów raka piersi lub jej ostateczne uniknięcie przy braku komórek przerzutowych w węzle.

Niniejsza praca przedstawia wyniki własne jednej z metod śródoperacyjnej oceny SN, polegającej na badaniu cytologicznym z materiału biopsji odciskowej.

Material

W latach 2002 – 2005 u 81 chorych z rakiem piersi bez klinicznych cech przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, u których zidentyfikowano węzeł wartownik, wykonano śródoperacyjnie ocenę stanu SN metodą biopsji odciskowej. Wiek chorych wynosił średnio 55,6 lat (od 41 do 78 lat). Średnia ilość oznaczonych węzłów wartowników wynosiła 1,23 (od 1 do 3). Wielkość guza w badaniu klinicznym wynosiła średnio 17 mm (od 5 do 30 mm).

U 62 chorych wykonano zabieg oszczędzający pierś (breast conserving treatment-BCT), u pozostałych 19 zmodyfikowaną amputację piersi (radical modified mastectomy). U 71 chorych leczenie miejscowe guza uzupełniono o wycięcie regionalnego układu chłonnego pachy w zakresie poziomu I-III. U pozostałych 10 (7 spośród nich kwalifikowano do programu EORTC 10981) ocenę stanu regionalnego układu chłonnego dokonano jedynie metodą oceny węzłów wartowników.

Badanie histopatologiczne guza wykazało obecność raka przewodowego naciekającego u 64 chorych, raka zrazikowatego naciekającego u 7, mieszaną postać raka inwazyjnego u 7 i DCISM u 3.

Przed rozpoczęciem badania uzyskano zgodę Terenowej Komisji Etyki Badań Naukowych.

Metoda identyfikacji węzła „wartownika”

U wszystkich chorych wykonano oznaczenie węzłów wartowniczych metodą pojedynczej iniekcji radioznacznika, sródkórnio, przytoczkowo. Znacznik barwnikowy był podawany na 10-15 minut przed rozpoczęciem zabiegu operacyjnego

Podanie znacznika izotopowego

W dniu zabiegu, około jednej godziny przed rozpoczęciem zabiegu, podawany był znacznik izotopowy (radioaktywny izotop technetu Tc99m) o aktywności 0,5 mCi (18MBq). Znacznik ten był rozpuszczony w roztworze siarczku renu (Nanocis, CIS BIO Int., Cedet, France) i podawany w objętości 0,5 cm³. Bezpośrednio przed zabiegiem operacyjnym oceniano regionalny układ chłonny wykonując limfoscintyografię stacjonarną.

Ocena śródoperacyjna węzłów wartowniczych

Węzły wartownicze były oceniane śródoperacyjnie zarówno metodą izotopową jak i barwnikową. Dla oceny izotopowej używano ręcznego detektora promieniowania gamma NeoProbe (AutoSuture, USA).

Definicja węzła wartowniczego

Dla identyfikacji węzłów wartowniczych przyjęto definicję, w myśl której są nimi węzły wykazujące najwyższą aktywność promieniowania spośród wszystkich węzłów, bez względu na zawartość znacznika barwnikowego.

Metoda wykonania biopsji odciskowej

Bezpośrednio po identyfikacji węzła wartownika w trakcie zabiegu operacyjnego i usunięciu go wykonywano, na sali operacyjnej, biopsję odciskową. Węzeł przekrawano w rzucie wejścia naczynia chłonnego do węzła a nie w jego najszerszym miejscu, co pozwalało na wykonanie odcisku na szkiełku podstawowym obu połówek węzła z okolicą najbliższą ujściu naczynia chłonnego. Oba preparaty umieszczano natychmiast w 96% roztworze alkoholu etylowego i przesyłano do oceny cytologicznej.

Metoda oceny histopatologicznej

W grupie 81 chorych przebadano 99 węzłów wartowników oznaczonych w obrębie dołu pachowego. Dla oceny cytologicznej węzły przekrawano w sposób opisany powyżej. Biopsję odciskową z węzła wykonywano poprzez odcisnięcie przekrojonej powierzchni z każdej połówki bezpośrednio na szkiełko podstawowe. Z każdego węzła wykonano w ten sposób dwa badania cytologiczne. Materiał z odcisniętego węzła był następnie utrwalany w 95% etanolu i wybarwiany za pomocą hematoksyliny i

eozyiny. Następnie obie połówki węzła były konserwowane w 10% roztworze zbuforowanej formaliny w celu wykonania w terminie późniejszym rutynowego badania histopatologicznego zarówno barwnikowego jak i immunohistochemicznego z użyciem cytokeratyny.

Materiał cytologiczny z biopsji odciskowej był oceniany w mikroskopie świetlnym przez jednego, doświadczonego patologa (G.G). Wynik badania był negatywny gdy były widoczne komórki raka lub ujemny, gdy patolog ich nie stwierdził. Ostateczny wynik badania histopatologicznego (weryfikującego badanie cytologiczne) był dostępny w czasie 10-14 dni od zabiegu.

Wyniki

W grupie 81 chorych węzeł wartownik (od 1 do 3) zidentyfikowano u wszystkich chorych kwalifikowanych do tej metody po uzyskaniu pozytywnego wyniku limfoscintygrafii (wizualizacja SNs i wyznaczenie jego rzutu na skórę).

Biopsja odciskowa wykazała obecność przerzutów u 13 chorych. U 11 z nich wielkość ogniska przerzutowego była większa niż 2 mm (makroprzerzut), zaś u pozostałych dwóch poniżej 2 mm (mikroprzerzut).

Rutynowe badanie histopatologiczne pooperacyjne całego węzła chłonnego wykazało obecność mikroprzerzutów u następujących 2 chorych, u których wynik biopsji odciskowej był ujemny (wyniki fałszywie ujemne).

W pozostałych przypadkach dokładne badanie histopatologiczne potwierdziło obecność przerzutów raka piersi (brak wyników fałszywie ujemnych). Na podstawie uzyskanych wyników skuteczność ogólna metody biopsji odciskowej oceniono na 86,7%, zaś czułość na 100%.

Ze względu na fakt, że wyniki fałszywie ujemne obejmowały jedynie mikroprzerzuty, dokonano oceny skuteczności i czułości metody w zakresie oceny makroprzerzutów. W tym przypadku parametry te wynosiły odpowiednio 100% i 100%.

Dyskusja

Śródoperacyjna ocena przerzutów do węzłów chłonnych w raku piersi poprzez badanie węzła wartownika jest stosowana coraz częściej (1-12). Jej wartością jest możliwość wykonania jednocześnie limfadenektomii bez potrzeby oczekiwania na wynik standardowego badania histopatologicznego (4,7,9).

Do metod stosowanych w identyfikacji przerzutów w SN należy przedstawione w naszej pracy badanie cytologiczne uzyskane z biopsji odciskowej z obu przeciętych połówek węzła. Czułość tej metody zależy z jednej strony od wiarygodności identyfikacji węzła wartownika (9), z drugiej zaś od wiarygodności samego badania cytologicznego. Czułość ta wynosi 78% - 99% i jest związana z metodologią i dokładnością oceny węzła w warunkach badania śródoperacyjnego (1,2,4-6,9-11).

Wszyscy pacjenci przedstawieni w naszej pracy byli kwalifikowani do śródoperacyjnej oceny węzła wartownika jedynie wówczas, gdy był on uwidoczniony i oznaczony w badaniu limfoscintygraficznym. Pozwoliło to na uniknięcie niepewności co do wiarygodności samej metody oznaczania SN i wpłynięcia na ostateczne wyniki badania śródoperacyjnego, co zaobserwował Ravichandran stosując jedynie metodę barwnikową (9). Aihara (10), wykonując badanie w grupie chorych ocenianych metodą barwnikową obserwował 1,8% wyników fałszywie dodatnich.

W metodologii badania zastosowaliśmy inny sposób przekrawania węzła chłonnego dla uzyskania powierzchni do odcisku na szkiełku podstawowym. Węzeł był przekrawany nie w jego najszerszym

miejscu jak podają inni autorzy (2,4,5) ale wzdłuż wnikającego do węzła naczynia chłonnego co pozwala na uzyskanie dostępu do warstwy podtorebkowej tej okolicy.

Podobnie jak wielu innych autorów (1,5,6,11-13) badanie nasze wykazało znaczącą różnicę w ocenie mikroprzerzutów w stosunku do makroprzerzutów. Czułość metody w ocenie przerzutów większych aniżeli 2 mm wynosiła w naszym materiale, 100 %, podczas gdy mikroprzerzuty wykryto śródoperacyjnie jedynie u połowy pacjentów.

Różnice w identyfikacji mikroprzerzutów w ocenie śródoperacyjnej nie wydają się być zależne od metody badania (biopsja odciskowa czy badanie ze skrawków mrożonych (frozen section) gdy oceny dokonujemy badając jedynie ograniczoną ilość preparatów (2,5,9). Poprawę wyników, zwłaszcza w ocenie mikroprzerzutów, można uzyskać wykonując badanie całego węzła uzyskując preparaty ze skrawków mrożonych cięte co 50 μm (7,14) przy udziale patologa mającego doświadczenie w ocenie materiału cytologicznego (5). Jednak możliwość wykonania tak dokładnego badania jest w większości ośrodków niedostępne i niemożliwe z powodu kosztów. Wspominając ten aspekt należy zauważyć, że badanie cytologiczne z biopsji odciskowej jest 3-krotnie tańsze aniżeli badanie ze skrawków mrożonych, nie wspominając o śródoperacyjnym dokładnym badaniu całego węzła (5).

Problem, który należy rozważyć wykonując badanie śródoperacyjnie węzła wartownika dotyczy wiarygodności metody oraz jego wpływu na postępowanie terapeutyczne, zarówno doraźne jak i ostateczne. W naszym materiale biopsja odciskowa była całkowicie wiarygodna w ocenie makroprzerzutów, co jest zgodne z obserwacjami innych autorów (5,9,11). Podobne wyniki dotyczą także oceny śródoperacyjnej metodą skrawków mrożonych (12). Problemem pozostaje kwestia oceny przerzutów mniejszych niż 2 mm (mikroprzerzuty). W naszym badaniu 50% mikroprzerzutów nie zostało wykrytych śródoperacyjnie: ich obecność wykazało rutynowe dokładne badanie całego węzła. Wyniki fałszywie ujemne dotyczące mikroprzerzutów są powszechne w rutynowo wykonywanym badaniu śródoperacyjnym. Nie powodują one jednak podjęcia nieadekwatnej do stopnia zaawansowania choroby decyzji terapeutycznej a jedynie ją odsuwają w czasie (7). Czynnikiem, który ma negatywny wpływ na racjonalne postępowanie są wyniki fałszywie dodatnie. Większość cytowanych autorów (1-7, 9), a także wyniki naszej pracy wskazują, że występują one niezwykle rzadko. Dotyczą one zazwyczaj przypadków, gdzie badanie śródoperacyjnie jest wykonywane metodą immunohistochemiczną, a nie badaniem z wykorzystaniem hematoksyliny i eozyny (10, 11), na co wskazuje też w swojej pracy Turner (15) i Rao (16).

Problemem, który należy podnieść mówiąc o wynikach fałszywie ujemnych jest wiarygodność samej metody oceny węzła wartownika. W tym aspekcie jest konieczne zwrócenie uwagi na metodologię identyfikacji węzła wartownika, szczególnie gdy stanowi ona jedyną diagnostykę stanu regionalnych węzłów chłonnych. W naszej pracy wykorzystaliśmy zarówno doświadczenie związane z miejscem podania znacznika (17) jak i zastosowania różnej wielkości cząstek nośnika (radiotracer) (18). Kwalifikacja chorych do diagnostyki węzłów chłonnych metodą biopsji węzła wartownika po uzyskaniu wizualizacji węzła w badaniu limfoscyntygraficznym pozwoliła uniknąć sytuacji oceny WW jedynie metodą barwnikową. Ta ostatnia może spowodować znaczną ilość wyników fałszywie ujemnych (9), co, przy ocenie jedynie węzła wartownika, może mieć wpływ na wystąpienie tzw wznowy węzłowej.

Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników uważamy, że śródoperacyjna ocena stanu regionalnych węzłów chłonnych metodą badania cytologicznego z biopsji odciskowej ocenianego metodą barwnikową jest wiarygodna, pewna i bezpieczna dla chorego poprzez brak wyników fałszywie dodatnich. Ilość wyników fałszywie ujemnych, szczególnie w zakresie mikroprzerzutów, przy prawidłowym badaniu rutynowym całego węzła zarówno metodą barwnikową jak i immunohistochemiczną, nie ma wpływu na racjonalne podejście do sposobu leczenia a jedynie może je w niewielu przypadkach opóźnić do czasu uzyskania

wyniku badania ostatecznego. Warunkiem, na jaki należy zwrócić szczególną uwagę, jest metodologia oceny samego węzła wartownika, gdyż nawet najdokładniejsze badanie fałszywego węzła wartownika nie uchroni chorego przed „wznową” w obrębie regionalnego układu chłonnego.

Piśmiennictwo

1. Bochner M., Farshid G., Dodd T., Kollias J., Gill G.: Intraoperative imprint cytologic assessment of the sentinel node for early breast cancer. *World J Surg* 2003;27:430-432;
2. Perez N., Vidal-Sicart S., Zanon G., Velasco M., Santamaria G., Palacin A., Campo E., Cardesa A., Fernandez P.: A practical approach to intraoperastive evaluation of sentinel lymph node biopsy in breast carcinoma and review of the current methods. *Ann Surg Oncol* 2005;12:313-321;
3. D’Errico A., Grassigli A., Gruppioni E., Fiorentino M., Corti B., Gabusi E., Morselli-Labate A., Grigioni W.: Through intraoperative analysis of breast sentinel lymph node biopses: histologic and immunohistochemical findings. *Surgery* 2004;135:248-254;
4. Lambah P., McIntyre M., Chetty U., Dixon J.: Imprint cytology of axillary lymph nodes as an intraoperative diagnostic tool. *Eur J Surg Oncol* 2002;29:224-228;
5. Creager A., Geisinger K., Perrier N., Shen P., Shaw J., Young P., Case D., Levine E.: Intraoperative imprint cytologic evaluation of sentinel lymph nodes for lobular carcinoma of the breast. *Ann Surg* 2004;239:61-65;
6. Baitchev G., Gortchev G., Todorova A.: Intraoperative sentinel lymph node examination by imprint cytology during breast surgery. *Curr Med Res Opinion* 2002;18:185-187;
7. Bochner M., Kollias J., Gill G., Farshid G., Dodd T.: Implication of intraoperative sentinel node imprint cytology for consent in the SNAC trial. *ANZ J Surg* 2004;74:105-107;
8. Celebioglu F., Sylvan M., Perbeck L., Bergkvist L., Frisell J.: Intraoperative sentinel lymph node examination by frozen section, immunohistochemistry and imprint cytology during breast surgery – a prospective study. *Eur J Cancer* 2006;42:617-620;
9. Ravichandran D., Kocjan G., Falzon M., Ball R., Ralphs D.: Imprint cytology of the sentinel lymph node in the assessment of axillary node status in breast carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2004;30:238-242;
10. Aihara T., Munakata S., Morino H., Takatsuka Y.: Comparison of frozen section and touch imprint cytology for evaluation of sentinel lymph node metastasis in breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2004;11:747-750;
11. Pogacnik A., Klopčič U., Grazio-Frković S., Zgajnar J., Hocevar M., Vidergar-Krajč B.: The reliability and accuracy of intraoperative imprint cytology of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Cytopathology* 2005;16:71-76;
12. Weiser M., Montgomery L., Susnik B., Tan L., Borgen P., Cody III H.: Is routine intraoperative frozen-section examination of sentinel lymph nodes in breast cancer worthwhile? *Ann Surg Oncol* 2000;7:651-655;
13. Menes T., Tartter P., Mizrahi H., Smith S., Estabrook A.: Touch preparation or frozen section for intraoperative detection of sentinel lymph node metastases from breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2003;10:1166-170;
14. Veronesi U., Paganelli G., Viale G., Luini A., Zurrada S, Galimberti V, Intra M, Veronesi P, Robertson C, Maisonneuve P, Renne G, De Cicco C, De Lucia F, Gennari R.: *N Engl J Med* 2003;349:546-553;
15. Turner R.: Histopathologic assessment of the sentinel lymph node in breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2001;8:56-59;
16. Rao R., Taylor J., Palmer J., Jennings W.: Breast cancer pseudometastasis in a sentinel lymph node with cytokeratin-positive debris. *Breast J* 2005;11:134-137;
17. Jastrzebski T., Kopacz A., Lass P.: Comparison of peritumoral and subareolar injection of Tc99m sulphur colloid and blue-dye for detection of the sentinel lymph node in breast cancer. *Nucl Med Rev Cent East Eur.* 2002;5:159-61;
18. Jastrzebski T., Lass P., Swierblewski M., Wydra D., Drucis K., Kruszewski W., Gulida G., Kopacz

A.: The influence of radioisotope vehicle on breast sentinel node detection. Eur J Surg Oncol. 2006;