
PŮVODNÍ PRÁCE

Vyšetření sentinelových uzlin u karcinomu prsu pomocí rychlé peroperační biopsie a imunohistochemie v sériových řezech

Vážan P.¹, Velecký J.¹, Gatěk J.²

¹Biopstická a cytologická laboratoř, pracoviště Zlín

²Oddělení chirurgie, Nemocnice ATLAS a.s., Zlín

Souhrn

Jsou uváděny výsledky histologického vyšetření sentinelových lymfatických uzlin (SLN) u karcinomu prsu metodou rychlé peroperační biopsie ze zmrazených řezů. Popisujeme první zkušenosti ze souboru 77 pacientek, řešených v období březen 2005 – červenec 2006 záchovným resekcčním výkonem s peroperační biopsií axilárních sentinelových uzlin a v případech negativního nálezu pak následným zpracováním bloků v sériových řezech za použití imunohistochemie. Naším cílem bylo ověřit, jaké množství metastáz zachytíme v průběhu samotné peroperační biopsie (senzitivita) a jaký je poměr negativních nálezů s pozitivitou v následném sériovém zpracování k celkovému množství peroperačně negativních nálezů (falešná negativita). Získané výsledky jsou porovnány s recentně publikovanými pracemi. Krátce je diskutována náročnost a možnosti zvolené metody. V souboru 77 pacientek s karcinomem prsu bylo vyšetřeno celkem 193 SLN, medián 2,5 (rozmezí 1–7 uzlin). Po kompletním vyšetření byly sentinelové uzliny negativní ve 45 případech (58,4 %). Ve 32 případech bylo zjištěno metastatické postižení SLN (41,6 %), z toho peroperačně jsme zjistili metastázu ve 24 případech, to je 75%senzitivita. Specifita je přitom 100%. V 8 dalších případech byly zjištěny metastázy až v následném sériovém zpracování bez nebo s použitím imunohistochemie – falešná negativita 15,1%. Ve všech případech se jednalo o mikrometastázy, nebo izolované nádorové buňky (ITC) a buněčné klastry.

Klíčová slova: karcinom prsu – sentinelová uzlina – metastáza – peroperační biopsie

Summary

Assessment of Sentinel Nodes in Breast Cancer by Rapid Peroperative Biopsy and Immunohistochemistry in Serial Sectioning

Results of histological examinations of sentinel lymphatic nodes (SLN) obtained by rapid peroperative biopsy (RPB) are presented. Our first experience with 77 patients undergoing localized excision of axillary sentinel nodes is reported. Negative nodes were subsequently examined by means of immunohistochemistry of serial sectioned blocks. The aim of the study was to verify the percentage of identified metastases, and thus define the reliability of the RPB. At the same time we tried to determine the ratio of the negative biopsies of SLN, which were found positive subsequent to immunohistochemistry examination of serial sections, to the total amount of peroperative negative findings or a “false negativity”. Our results were compared with those recently published. Particular demands and possibilities of the method used are briefly discussed. In the group of 77 patients with breast cancer, the total number of 193 SLN were examined (average 2.5, in a patient ranging from 1 to 7). Out of all examined SLN, 45 patients (58.4%) were negative. Metastases were identified in 32 patients (41.6%). By rapid preoperative biopsy alone, metastases were found in 24%, which represents 75% sensitivity. The specificity was 100%. The following examination of serial sectioned specimens with or without immunohistochemistry showed 8 more patients with metastases, which represents the false negativity of 15.1%. The metastases found in all 8 patients were small micrometastases, isolated tumour cells or clusters of cells.

Key words: breast carcinoma– sentinel lymph node – metastasis - intraoperative frozen-section biopsy

Čes.-slov. Patol., 43, 2007, No. 1, p. 13–17

Rychlá peroperační biopsie je metodou volby v rámci základního histologického vyšetření sentinelové uzliny (SLN) a úspěšně se provádí od počátku zavedení metody do praxe. Hlavní výhodou je možnost rychlé detekce metastáz a tím možnost chirurgického řešení v jednom sezení s urychlením celé léčebné procedury bez potřeby dalších reoperací. Z hlediska pacientek je nezanebatelnou skutečností šetrnost zákroku s významně nižším množstvím pooperačních komplikací (3, 12).

Materiál a metody

Ve sledovaném období březen 2005 až červenec 2006 bylo na chirurgickém oddělení Nemocnice ATLAS a.s. Zlín řešeno zachovným resekčním výkonem nebo mastektomií pro karcinom prsu celkem 95 pacientek splňujících kritéria časného karcinomu stadia pT1-pT2 s klinicky negativními axilárními uzlinami. Z toho 77 pacientek podstoupilo resekční výkon s peroperačním vyšetřením sentinelové lymfatické uzliny. U všech pacientek byl před operací z core-cut biopsie diagnostikován invazivní karcinom mléčné žlázy. Zbýlých 18 pacientek bylo řešeno resekčním výkonem nebo mastektomií bez peroperační biopsie sentinelové uzliny. 16 pacientek mělo negativní uzliny, 2 pacientky měly pozitivní nález metastáz v sentinelových uzlinách. Kromě uvedených byly vyřazeny pacientky po neoadjuvantní chemoterapii, s většími či multicentrickými nádory a in situ karcinomy. Klinická a patologická charakteristika souboru je uvedena v tabulce 1.

Makroskopické hodnocení materiálu

Po přijetí nefixovaného materiálu a změření sentinelových uzlin (SLN) s identifikací hilu jsou zhotoveny jejich podélnou disekcí v rovině hilu plátky tloušťky 2–3 mm. Uzliny jsou takto zpracovány kompletně, je provedena otisková cytologie a vzorky jsou uloženy na ploténky ke zmrazení.

Histologické zpracování

Používáme standardní metodu zmrazených řezů barvených hematoxylin-eozinem. Z každého vzorku jsou ve zmrazovacím mikrotomu sériově zhotoveny 2–3 řezy tloušťky 10 µm. Po odečtení preparátů jsou použité tkáňové bločky standardně dofixovány ve formaldehydu. Při negativním peroperačním histologickým nálezem jsou vzorky zpracovány sériovými řezy po 50 µm ve 3 úrov-

Tab.1. Klinická a patologická charakteristika souboru 77 invazivních karcinomů prsu

Charakteristika	Počet
Průměrný věk-roků (rozmezí)	58,6 (25–85)
Průměrná velikost nádoru v mm (rozmezí)	15,05 (5–33)
Velikost nádoru v mm - stadium	
< 5 - T1a	5
5–10 - T1b	19
10–20 - T1c	40
20–50 - T2	13
Typ nádoru	
DIC	59 (76,6 %)
LIC	8 (10,4 %)
TC	6 (7,8 %)
MC	4 (5,2 %)
Stupeň diference- grade	
G1	22
G2	36
G3	19
Lymfangioinvaze	
přítomna	19 (24,7 %)
nepřítomna	58 (75,3 %)
Zpracováno: peroperačně na zmrzlo sériovými řezy + imunohistochemicky	77 (100,0 %)
u peroperačně negativních nálezů	53 (68,8 %)

DIC – invazivní ductální karcinom

LIC – invazivní lobulární karcinom

TC – tubulární karcinom

MC – medulární karcinom

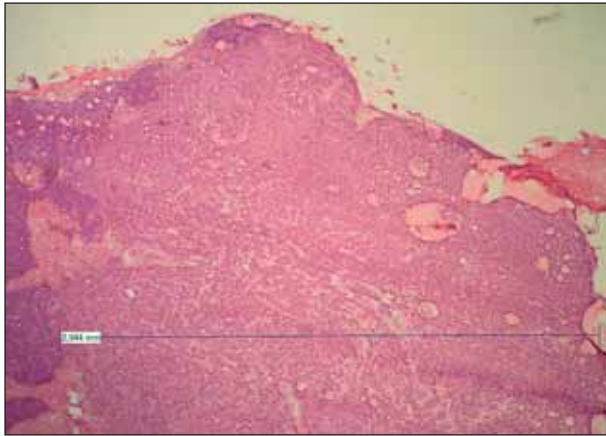
ních, barvenými jedenkrát hematoxylin-eozinem a dvakrát imunohistochemicky protilátkou proti cytokeratinu AE1/AE3 (DAKO). Zbýlé vzorky jsou poté kompletně dořezány v intervalu 150–200 µm a obarveny hematoxylin-eozinem.

Podle návrhu nového stagingu lymfatických uzlin, 6. vydání American Joint Committee on Cancer, platné od 1.ledna 2003 (8), zjištěné metastázy rozlišujeme jako:

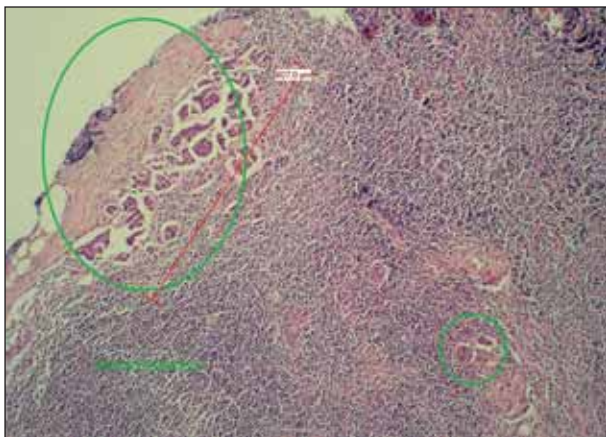
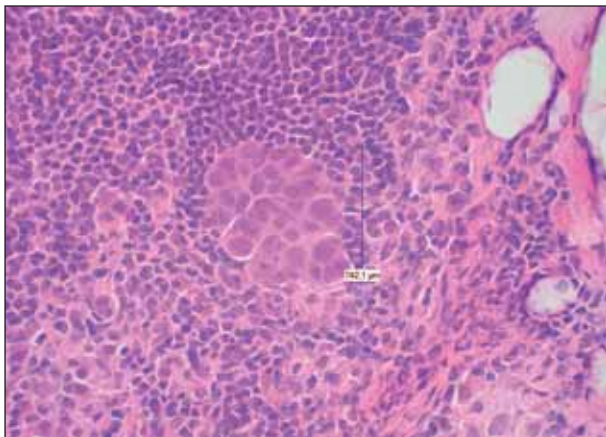
- makrometastázy >2 mm – pN1,
- mikrometastázy 0,2 mm až 2mm – pN1mi,
- izolované nádorové buňky (ITC) a buněčné klastry < 0,2mm – pN0 (i+)(sn).

Výsledky

V souboru 77 pacientek operovaných zachovným resekčním výkonem pro invazivní karcinom prsu s biopsií sentinelové uzliny jsme celkem zpracovali 193 axilárních sentinelových uzlin (průměr 2,5 uzliny na případ) metodou rychlé peroperační biopsie. Uzliny byly hodnoceny buď jako pozitivní s nálezem makro- či mikrometastázy karcinomu, nebo jako negativní. Peroperačně negativní uzliny byly následně zpracovány kompletně v sériových řezech s definitivním průkazem negativity nebo nálezem tzv. okultní metastázy (6, 30). Peroperač-

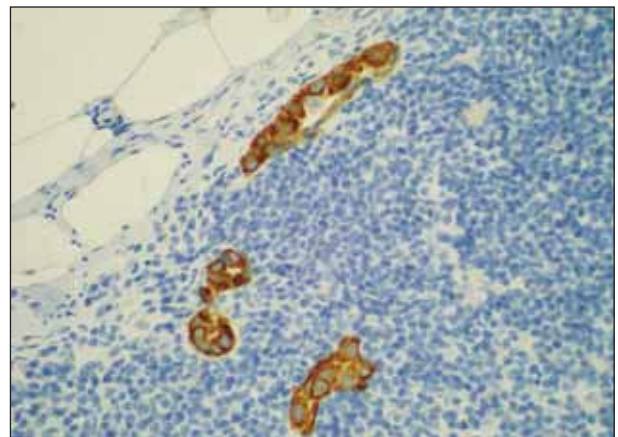
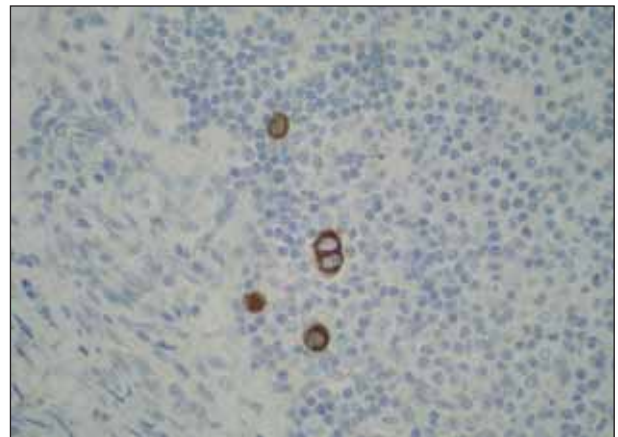


Obr. 1. Peroperačně zachycená makrometastáza karcinomu v SLN (H&E, zvětšení 100krát)



Obr. 2. a 3. Peroperačně zachycené mikrometastázy karcinomu v SLN (H&E, zvětšení 400krát, resp. 100krát)

dech, to je 75% senzitivita (specifická je 100%). Z celkového počtu 13 případů makrometastáz byly všechny zjištěny peroperačně, to je 100% senzitivita. V 19 pozitivních případech se jednalo o mikrometastázy nebo ITC a buněčné klastry, z toho peroperačně jich bylo zjištěno 11 (57,9 %). Ve zbylých 8 případech byly zjištěny okultní metastázy charakteru malých mikrometastáz (do 1 mm), ITC a buněčných klastrů až po následném definitivním zpracování uzlin (42,1 %). Výsledkem je falešná negativita 15,1% ze všech 53 peroperačně negativních nálezů. Ve 30 pozitivních případech byla provedena následná kompletní axilární disekce lymfatických uzlin (2 případy z jiných důvodů dále neřešeny). Po zpracování ne-sentinelových axilár-



Obr. 4. a 5. ITC a klastry nádorových buněk zachycené v následných sériových řezech, barvených imunohistochemicky (cyokeratin AE1/AE3 zvětšení 400krát, resp. 100krát)

ní imunohistochemické vyšetření k diagnostice submikrometastáz (do 0,2mm) prozatím neprovádíme z technických důvodů, kdy je kromě vhodné protilátky potřeba extenzivního zpracování SLN, kde je doporučeno její použití pouze v diferenciálně diagnostických případech a nikoli paušálně (26). Metastatické postižení sentinelových uzlin bylo zjištěno celkem u 32 pacientek (41,6 %), z toho peroperačně jsme zjistili metastázy ve 24 přípa-

ních uzlin klasickou metodou jsme zjistili další metastázy u 8 pacientek.

Diskuse

Od března 2005 vyšetřujeme axilární sentinelové uzliny (SLN) metodou peroperační biopsie, kte-

Tab. 2. Porovnání výsledků peroperačního vyšetření SLN standardní metodou podle autorů

Soubor	n	meta (%)	FS	HE+IHC	
Motomura, 2000 (13)	101	25 (24,7)	13 (52,0 %)	12/88	(13,6 %)
Fortunato, 2004 (5)	236	77 (32,6)	52 (68,0 %)	25/184	(13,6 %)
Khalifa, 2004 (11)	96	21 (22,0)	18 (86,0 %)	3/78	(4,0 %)
Naik, 2004 (15)	4008	1342 (33,5)	777 (57,8 %)	565/3231	(17,5 %)
Wada, 2004 (28)	569	159 (28,0)	133 (83,5 %)	26/436	(6,0 %)
Grabau, 2005 (7)	272	84 (31,0)	61 (73,0 %)	23/211	(10,9 %)
Schrenk, 2005 (19)	2326	795(34,0)	513 (64,5 %)	282/1813	(15,6 %)
Vážan, 2006	77	32 (41,6)	24 (75 %)	8/53	(15,1 %)

n – počet případů v souboru

meta (%) – celkový počet zjištěných metastáz

FS - počet pozitivních peroperačních nálezů (% – poměr k celkovému počtu metastáz)

HE+IHC – počet metastáz zachycených v následném sériovém zpracování (% – poměr k celkovému počtu peroperačně negativních uzlin)

rá je preferovaná v řadě pracovišť. Poskytuje rychlé informace o stavu uzlin (SLN status), kdy pozitivní nález metastázy vede k dokončení chirurgické intervence v jednom sezení s provedením kompletní axilární disekce. Praktické provedení metody a její hodnocení má ve světě srovnatelné standardní parametry (2, 7, 11, 13, 16, 19, 28). Podobnou metodou dosažené výsledky se však mohou, nikoli řádově, lišit, jak je uvedeno v tabulce 2. Jedním z významných důvodů odlišných výsledků je pravděpodobně rozdíl ve velikosti souborů. Dva největší soubory (16,19) mají velmi podobné výsledky v poměru zachycených metastáz a jen mírně rozdílné v množství peroperačně pozitivních uzlin. Menší soubory vykazují v těchto sledovaných parametrech nápadnější rozptýl (autor, 11, 28). Dalším důvodem mohou být parametry pro výběr souboru; v našem případě nezáměrnou selektivitu, kdy část pacientek splňujících kritéria nepodstoupila peroperační vyšetření sentinelové uzliny. Také samotná metoda nese jisté riziko odlišných výsledků, kdy nelze vyloučit technickou chybu nebo únik na úrovni submikrometastázy SLN. Tento problém je od vzniku metody řešen v řadě prací, které prokazují vyšší procentuální výskyt okultních metastáz při extenzivnějším vyšetřování uzlin s použitím imunohistochemie v různém rozsahu (6,14,19). Klinický význam čím dál rozsáhlejšího vyšetřování je ovšem sporný při nepřiměřeně rostoucích finančních nákladech (4,29). Také vzhledem k dobrým dosavadním výsledkům follow-up pacientek po prodělané operaci SLN bez exenterace axily (9, 16) se část pracovišť včetně nás přiklání k časově a finančně dostupné metodě zpracování SLN s použitím imunohistochemie v několika sériových řezech. V pracích italských autorů Veronesiho a kol. a Vialeho a kol. (22, 23, 25) je rozpracována metoda kompletního peroperačního vyšetření SLN v sériových řezech po 50 µm s použitím peroperační imunohistochemie s nízkým počtem falešně negativních případů (4,5 %). Tato extenzivní peroperační metoda však není vhodná pro rutinní klinickou praxi, a proto ji neprovádíme. Naše výsledky uvedené v tabulce 2 odpovídají recentně publikovaným pracím.

Výsledkem naší práce je potvrzení vysoké senzitivity peroperační biopsie pro záchyt metastáz sentinelových uzlin u karcinomu prsu, která činí v našem souboru 75 %. Potvrdili jsme uváděnou až 100% senzitivitu při záchytu makrometastáz a větších mikrometastáz (1–2 mm). Potvrzena je rovněž logická nižší senzitivita pro záchyt malých mikrometastáz (< 1mm), která činila 57,9 %. V 8 případech byly zachyceny okultní mikrometastázy či ITC při následném zpracování uzlin v sériových řezech s použitím imunohistochemie. 15,1% falešnou negativitou jsme v souladu s výsledky jiných autorů. Nejblíže našim výsledkům jsou Perez a kol.(18), kteří mají senzitivitu peroperační biopsie 78%, pro záchyt makrometastáz 100%. Turner a kol. (21) uvádějí vysokou 98% senzitivitu pro záchyt makrometastáz rutinní peroperační biopsií, pro záchyt mikrometastáz a ITC však jen 28%. Brogi a kol. (1) mají senzitivitu peroperační biopsie 59%, pro makrometastázy 96%, mikrometastázy 27%. Na základě ověřené 100% specifity metodu hodnotíme jako velmi bezpečnou, v žádném případě jsme nezaznamenali falešně pozitivní nález. Celkově vyšší procento metastáz (41,6 %) proti publikovaným hodnotám (viz tab. 2) vysvětlujeme nezáměrnou selektivitou souboru, kdy pro jinak odpovídající kritéria bylo z 95 pacientek vyřazeno 18, které z jiných organizačně technických důvodů nepodstoupily peroperační vyšetření sentinelové uzliny. Proti práci Motomury a kol. (13) vnímáme peroperační otiskovou cytologii jako pomocnou metodu a v souladu s publikacemi Brogiho a kol. a Moriho a kol. (1,15) považujeme biopsii za nadřazenou. V našem souboru byly výsledky obou metod vždy shodné v případě makrometastáz, případ s pozitivní otiskovou cytologií a negativní biopsií jsme nezaznamenali. K porovnání rizika postižení ne-sentinelových axilárních uzlin je v pracích Nose a kol.(17) a Vialeho a kol.(27) prevalence metastáz v ne-sentinelových axilárních uzlinách 23,6%, resp. 39,4%, přičemž je konstatován význam velikosti metastázy sentinelové uzliny jako rizikového faktoru metastazování do ne-sentinelových axilárních uzlin.

Závěr

Ve výběrovém souboru 77 pacientek s karcinomem prsu jsme ověřili vysokou senzitivitu a spolehlivost rychlé peroperační diagnostiky metastatického postižení axilárních sentinelových lymfatických uzlin. Metoda je v praxi dobře dostupná a proveditelná pro odpovídajícím způsobem vybavenou laboratoř a vhodná pro patologa vyškoleného v běžné peroperační diagnostice. Je metodou volby v rámci histologického vyšetření sentinelových lymfatických uzlin u karcinomu prsu. Poskytuje rychlou a vysoce senzitivní informaci o stavu uzlin a umožňuje dokončení chirurgického zákroku v jednom sezení. Po zhodnocení výsledků lze metodu hodnotit jako klinicky aplikovatelnou s malým rizikem falešně negativních nálezů.

Literatura

1. Brogi, E., Torres-Matundan, E., Tan, L.K., Cody, HS3rd.: The results of frozen section, touch preparation, and cytological smear are comparable for intraoperative examination of sentinel lymph nodes: a study in 133 breast cancer patients. *Ann Surg Oncol*, 12, 2005, s. 173–180.
2. 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*, 42, 2006, s. 617–620.
3. Cserni, G.: Axillary staging of breast cancer and the sentinel node. *J Clin Pathol*, 53, 2000, s. 733–741.
4. Cserni, G.: Evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Histopathology*, 46, 2005, s. 697–706.
5. Fortunato, L., Amini, M., Farina, M. et al.: Intraoperative examination of sentinel nodes in breast cancer: is the glass half full or half empty? *Ann Surg Oncol*, 11, 2004, s. 1005–10.
6. Fréneaux, P., Nos, C., Vincent-Salomon, A. et al.: Histological detection of minimal metastatic involvement in axillary sentinel nodes: a rational basis for a sensitive methodology usable in daily practice. *Modern Pathology*, 15, 2002, s. 641–646.
7. Grabau, D.A., Rank, F., Triis, E.: Intraoperative frozen section examination of axillary sentinel lymph nodes in breast cancer. *APMIS*, 113, 2005, s. 7–12.
8. Greene FL, Page DL, Fleming ID et al.: *AJCC Cancer staging manual*, 6th ed. New York: Springer, 2002.
9. Guenther, J.M., Hansen, N.M., DiFronzo, L.A. et al.: Axillary dissection is not required for all patients with breast cancer and positive sentinel nodes. *Arch Surg*, 138, 2003, s. 52–56.
10. Hermanek, P., Hutter, R., Sobin, L.H., Wittekind, C.H.: Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer*, 86, 1999, s. 2668–2673.
11. Khalifa, K., Pereira, B., Thomas, V.A., Mokbel, K.: The accuracy of intraoperative frozen section analysis of the sentinel lymph nodes during breast cancer surgery. *Int J Fertil Womens Med*, 49, 2004, s. 208–211.
12. Mansell, R.E., Fallowfield, R., Kissin, M. et al.: Randomized multicenter trial of sentinel node biopsy versus standard axillary treatment in operable breast cancer: the ALMANAC Trial. *J Natl Cancer Inst*, 98, 2006, s. 599–609.
13. Motomura, K., Inaji, H., Komoike, Y. et al.: Intraoperative sentinel lymph node examination by imprint cyto-

logy and frozen sectioning during breast surgery. *Brit J of Surg*, 87, 2000, s. 597–601.

14. Motomura, K., Komoike, Y., Inaji, H. et al.: Multiple sectioning and immunohistochemical staining of sentinel nodes in patients with breast cancer. *British Journal of Surgery*, 89, 2002, s. 1032–1034.
15. Mori, M., Tada, K., Ikenaga, M. et al.: Frozen section is superior to imprint cytology for the intra-operative assessment of sentinel lymph node metastasis in Stage I breast cancer patients. *World J Surg Oncol*, 17, 2006, s. 26.
16. Naik, A.M., Fey, J., Cody, H.S. et al.: The risk of axillary relapse after sentinel lymph node biopsy for breast cancer is comparable with that of axillary lymph node dissection. *Ann of Surg*, 240, 2004, s. 462–471.
17. Nos, C., Gardiny-MacKean, C., Fréneaux, P. et al.: Prediction of tumour involvement in remaining axillary lymph nodes when the sentinel node in a woman with breast cancer contains metastases. *Brit J of Surg*, 90, 2003, s. 1354–1360.
18. Perez, N., Vidal-Sicard, S., Zanon, G. et al.: A practical approach to intraoperative evaluation of sentinel lymph node biopsy in breast carcinoma and review of the current methods. *Am Surg Oncol*, 12, 2005, s. 313–321.
19. Schrenk, P., Konstantinuk, P., Wölfl, S. et al.: Intraoperative frozen section examination of the sentinel lymph node in breast cancer. *Rozhl chir*, 84, 2005, s. 217–222.
20. Turner, R.R., Ollila, D.W., Stern, S., Giuliano, A.E.: Optimal histopathologic examination of the sentinel lymph node for breast carcinoma staging. *Am J Surg Pathol*, 23, 1999, s. 263–267.
21. Turner, R.R., Hansen, N.M., Stern, S., Giuliano, A.E.: Intraoperative examination of the sentinel lymph node for breast carcinoma staging. *Am J Clin Pathol*, 112, 1999, s. 627–634.
22. Veronesi, U., Paganelli, G., Viale, G. et al.: Sentinel lymph node biopsy and axillary dissection in breast cancer: results in a large series. *JNCI*, 91, 1999, s. 668–673.
23. Veronesi, U., Zurrida, S., Mazzarol, G., Viale, G.: Extensive frozen section examination of axillary sentinel nodes to determine selective axillary dissection. *World J Surg*, 25, 2001, s. 806–808.
24. Veronesi, U., Galimberti, V., Mariani, L. et al.: Sentinel node biopsy in breast cancer: early results in 953 patients with negative sentinel node biopsy and no axillary dissection. *Europ J Cancer*, 41, 2005, s. 231–237.
25. Viale, G., Bosari, S., Mazzarol, G. et al.: Intraoperative examination of axillary sentinel lymph nodes in breast carcinoma patients. *Cancer*, 85, 1999, s. 2433–8.
26. Viale, G., Maiorano, E., Mazzarol, G. et al.: Histologic detection and clinical implication of micrometastases in axillary sentinel lymph nodes for patients with breast carcinoma. *Cancer*, 92, 2001, s. 1378–1384.
27. Viale, G., Maiorano, E., Pruneri, G. et al.: Predicting the risk for additional axillary metastases in patients with breast carcinoma and positive sentinel lymph node biopsy. *Ann of Surg*, 241, 2005, s. 319–326.
28. Wada, N., Imoto, S., Hasebe, T., Ochiai, A., Ebihara, S., Moriyama, N.: Evaluation of intraoperative frozen section diagnosis of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Jpn J clin Oncol*, 34, 2004, s. 113–117.
29. Weaver, D.L.: Sentinel lymph node metastases and breast carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 27, 2003, s. 842–845.
30. Weaver, D.L.: Assessing the significance of occult micrometastases in axillary lymph nodes from breast cancer patients. *Breast J*, 12, 2006, s. 291–293.

MUDr. Petr Vázan
Bioptická a cytologická laboratoř
U Lomu 5
760 01 Zlín
tel.: 577 008 732
e-mail: petrvaзан@seznam.cz