

# Klinický pohľad na histopatologickú diagnostiku metastáz v krčných lymfatických uzlinách

MUDr. Patrik Štefanička, PhD.<sup>1</sup>, MUDr. Matúš Valach<sup>2</sup>, prof. MUDr. Milan Profant, CSc.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>1. ORL klinika LFUK, SZU, FNsP Bratislava

<sup>2</sup>Alfa medical patológia, s.r.o., Bratislava

Súčasne dostupné predoperačné klinické metódy alebo zobrazovacie techniky nie sú schopné detekovať mikrometastázy, preto incidencia klinicky alebo rádiologicky okultných metastáz ostáva naďalej významná. S uplatňovaním sa nových, senzitívnejších metód ako je imunohistochemia a molekulárna analýza, ale aj so sériovými rezmi lymfatických uzlín, sa zlepšuje aj detekcia okultných metastáz. Subklinické metastázy, okultné metastázy alebo mikrometastázy možno odlíšiť od subpatologických metastáz alebo okultných mikrometastáz, ktoré možno detekovať imunohistochemicky alebo molekulárnymi technikami. S postupne sa zvyšujúcou významnosťou nálezu mikrometastáz, ale aj izolovaných nádorových buniek, ako klinicky závažných prognostických ukazovateľov, by sa mali vytvoriť kritériá u vybraných pacientov pre agresívnejšiu alebo adjuvantnú liečbu.

**Kľúčové slová:** uzlinové metastázy, mikrometastázy, okultné mikrometastázy, izolované nádorové bunky, karcinómy hlavy a krku.

## Clinical sight of the histopathological diagnosis of cervical lymph nodes metastases

The currently available preoperative clinical or imaging methods are unable to detect micrometastases, therefore the incidence of clinical or radiological occult metastases remains a significant. More sensitive techniques, such as immunohistochemistry, molecular analysis, and also serial sectioning of lymph nodes, can improve the detection of occult metastases. Subclinical metastases, occult metastases, or occult micrometastases can be distinguished from subpathological metastases or occult micrometastases, it can be detected by immunohistochemistry or molecular analysis. The presence of micrometastases and also isolated tumor cells has improving clinical and prognostic implications, therefore arise the need to create the criteria for aggressive or adjuvant treatment for selected patients.

**Key words:** lymph node metastasis, micrometastasis, occult micrometastasis, isolated tumor cells, head and neck cancer.

Onkológia (Bratisl.), 2009; roč. 4 (4): 218–220

## Úvod

Krčné metastázy sú najvýznamnejší samostatný nepriaznivý prognostický faktor pri skvamocelulárnych karcinómoch hlavy a krku. Je preto dôležité diagnostikovať metastázy v lymfatických uzlinách čo najpresnejšie, no včasná diagnostika ešte subklinických metastáz je problematická (1, 2). Súčasne dostupné predoperačné klinické metódy alebo zobrazovacie techniky nie sú schopné detekovať mikrometastázy, preto incidencia klinicky alebo rádiologicky okultných metastáz ostáva naďalej významná (2, 3).

Lymfatická uzlina s mikrometastázou sa nemusí prejavovať v zmene tvaru, makroskopickej morfológii alebo v konzistencii. Ani chirurg preto nemôže palpačne rozlíšiť, či je uzlina pozitívna. Tiež negatívne peroperačné histologické vyšetrenie nemôže s určitou vylúčiť okultnú metastázu, zvlášť keď je problém identifikovať správnu uzlinu na toto vyšetrenie (4, 5).

Zlatým štandardom v diagnostike okultných metastáz je rutinné histopatologické vyšetrenie vzoriek z krčného disekátu, no aj to sa už v súčasnosti považuje za nedokonalé. Negatívne histopatologické vyšetrenie uzlín

pomocou svetelnej mikroskopie nemusí byť v skutočnosti bez okultných metastáz, ktoré môžu byť lokalizované v inej úrovni lymfatickej uzliny, alebo môžu byť dokonca prehliadnuté histopatológom. Niektoré tumorové depozity sú také malé, že priestor ktorý zaberajú, je pod prahom, v ktorom ich obvyklým histopatologickým vyšetrením nemožno rozoznať od okolitého normálneho tkaniva (3, 6). Pri rutinnom histopatologickom vyšetrení sa vykonávajú iba jeden alebo dva rezy lymfatickou uzlinou, zatiaľ čo väčšia časť môže zostať nevyšetrená, čím stúpa pravdepodobnosť prehliadnutia mikrometastáz (6, 7, 8).

## Imunohistochemické vyšetrenie a molekulárna analýza

S uplatňovaním nových senzitívnejších metód ako je imunohistochemia a molekulárna analýza, ale aj so sériovými rezmi lymfatických uzlín sa zlepšuje detekcia okultných metastáz (1, 2, 6, 9). Pri imunohistochemickom vyšetrení sa využíva označovanie niektorých celulózných komponentov, ktoré sú prítomné v bunkách skvamocelulárneho karcinómu, ale chýbajú v lymfocytoch a makrofágoch, ktoré obsa-

huje normálna lymfatická uzlina. Najčastejšie sa využíva farbenie na cytokeratíny (8). Sú to intermediálne filamenty, ktoré sú časťou cytoskeletu epiteliálnej bunky (10). Pri vyšetrení možno rozlíšiť metastatické bunky (cytokeratín pozitívnych) od benígnych buniek (cytokeratín negatívnych). Tu treba myslieť aj na epiteliálne inklúzie v lymfatických uzlinách, ktoré môžu byť príčinou falošnej pozitivity. Molekulárnou analýzou sa rozlišujú nádorové bunky od benígnych na základe ich genetického zloženia. Identifikujú sa onkogény a tumor supresorické gény. Z techník na identifikáciu onkogénov a tumor supresorických génov sa najčastejšie využíva polymerázová reťazová reakcia (PCR) s reverznou transkriptázou (RT-PCR). Vďaka vysokej senzitivite možno touto technikou rozoznať jednu metastatickú bunku skrytú vo veľkom množstve benígnych buniek v lymfatickej uzline (8).

Diagnostikovaný počet mikrometastáz závisí od skúsenosti histopatológa, od zvolenej techniky, ale aj od počtu vyšetrených lymfatických uzlín a od počtu rezov každej vyšetrenej lymfatickej uzliny (7, 11). Vo viacerých štúdiách autori prezentujú, že detailnejším vyšetrením

lymfatických uzlín sa zvyšuje počet zistených mikrometastáz v materiáli krčných disekátov pôvodne klasifikovaných ako pN0, od 8 % až do 40 % (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19).

Zvyšujúca sa presnosť detekcie nádorových depozitov v lymfatických uzlinách, preklasifikovanie pôvodných pN0 nálezov, by nemalo význam bez priameho dopadu na liečbu a prognózu pacienta. V súčasnosti je už vo viacerých prácach dokázaný prognostický význam prítomnosti mikrometastáz (16, 17, 18, 20, 21).

Hamakawa et al. (15) porovnávali 7 pacientov s karcinómami hlavy a krku preklasifikovaných z pN0 na pN+ po zistení mikrometastáz so zostávajúcou skupinou 37 pacientov pN0. Štyria pacienti s mikrometastázami zomreli v dôsledku recidívy alebo vzdialených metastáz, čo bol štatisticky významný rozdiel oproti skupine pN0 pacientov ( $p = 0,02$ ).

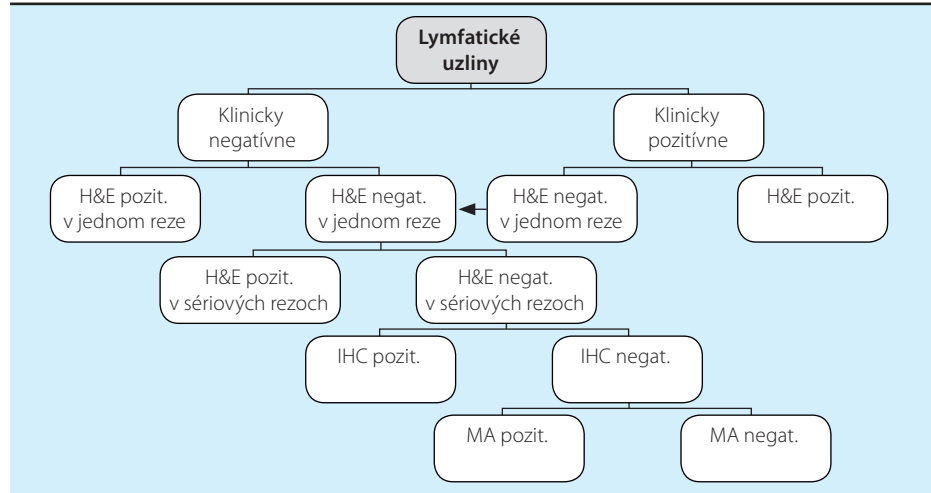
Viacpočetné mikrometastázy, lokalizácia mikrometastáz lymfatických uzlín v nižších oblastiach krku u pacientov s karcinómami dutiny ústnej svedčia pre nepriaznivú prognózu a u týchto pacientov. Yamazaki et al. odporúčajú pooperačnú adjuvantnú liečbu (18).

N0 krčný nález môže byť klinicky negatívny, rádiologicky negatívny, patologicky negatívny. Patologicky N0 krčný nález môže byť negatívny pri konvenčnom histopatologickom vyšetrení (pN0, hematoxylin-eozín), pri imunohistochemickom vyšetrení (pN0, imunohistochemicky) alebo pri vyšetrení molekulárnou analýzou (pN0, molekulárna analýza). Pri negatívnom konvenčnom histopatologickom vyšetrení môže byť imunohistochemicky pozitívny (pN1, imunohistochemicky), no môže byť tiež negatívny pri oboch technikách, ale pozitívny molekulárnou analýzou (pN1, molekulárna analýza) (7, 9). Imunohistochemia a molekulárna analýza sú teda schopné preklasifikovať N nález z negatívneho (detekovaný konvenčným histopatologickým vyšetrením) na pozitívny. Tabuľka 1 ukazuje algoritmus detekcie mikrometastáz podľa rozličných patologických metód.

### Subklinické metastázy, subpatologické metastázy

Subklinické metastázy (okultné metastázy alebo mikrometastázy) bývajú zvyčajne diagnostikované rutinným histopatologickým vyšetrením. V diagnostikovaní štádia choroby však treba rátať aj s možnosťou výskytu subpatologických metastáz (okultných mikrometastáz), ktoré možno detekovať imunohistochemicky alebo molekulárnymi technikami (tabuľka 2). Za mikrometastázu sa považuje nádorový

**Tabuľka 1.** Algoritmus v detekcii mikrometastáz (7). H&E- hematoxylin a eosin, IHC- imunohistochemia, MA- molekulárna analýza.



**Tabuľka 2.** Diagnostika metastáz a INB v regionálnych lymfatických uzlinách (2).

#### Metastázy

*Klinické metastázy – detekované:*

- palpačne, inšpekciou
- zobrazovacími vyšetreniami

*Subklinické metastázy, označované ako okultné metastázy – detekované:*

- morfológickými metódami (rutinné histopatologické vyšetrenie) s alebo bez sériových rezov

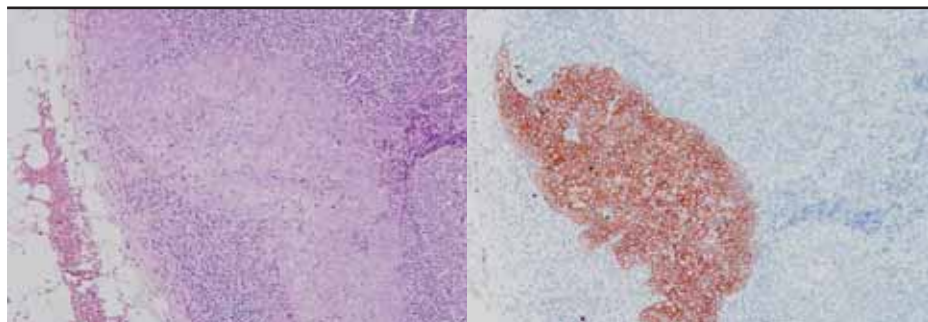
*Subpatologické metastázy, označované ako okultné mikrometastázy – detekované:*

- morfológickými metódami (imunohistochemicky, napr. na cytokeratíny) s alebo bez sériových rezov
- nemorfológickými metódami (molekulárne metódy)

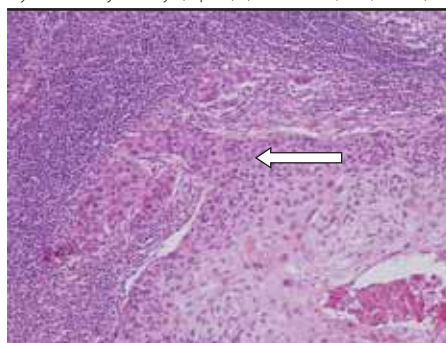
#### Izolované nádorové bunky – detekované:

- morfológickými metódami (imunohistochemicky, napr. na cytokeratíny) s alebo bez sériových rezov
- nemorfológickými metódami (molekulárne metódy, prietoková cytometria)

**Obrázok 1.** Mikrometastáza v lymfatickej uzline lokalizovaná subkapsulárne, nádorový depozit do 2 mm so známami extravazácie, penetrácie cez stenu lymfatického sinusu. Vľavo farbenie hematoxylin – eosin (HE, 100x), vpravo po imunohistochemickom vyšetrení s cytokeratínmi (AE 1/3, 100x).



**Obrázok 2.** Znaky infiltrácie mikrometastázy cez stenu lymfatického sinusu do tkaniva lymfatickej uzliny (šípka) (mikromts, HE, 100x).



**Obrázok 3.** Chobotovito sa šíriaca cystická metastáza v tkanive lymfatickej uzliny, dezmozplastická stromálna reakcia okolia (šípka) (HE, 40x).



depozit nepresahujúci 2 mm v najväčšom rozmere (2, 9, 23). Väčšinou sú mikrometastázy lokalizované v subkapsulárnych sínusoch lymfatickej uzliny, zriedkavejšie v jej centre (1, 3, 13, 15) (obrázok 1). Pravdepodobne väčšina mikrometastáz v lymfatických uzlinách sa vyvinie do manifestnej choroby, pokiaľ pacient neabsolvuje náležitú liečbu (3, 5).

Mikrometastázy treba odlíšiť od nálezu izolovaných nádorových buniek (INB). Vznik metastázy je komplexný proces a iba malé percento cirkulujúcich nádorových buniek prežije a vytvára metastatické ložisko. Metastáza sa objaví, ak dôjde k implantácii nádorových buniek v určitom orgáne (lymfatickej uzline). Následne dochádza k extravazácii, proliferácii a často k stromálnej reakcii (obrázok 2, 3). Preto

je diagnostika mikrometastáz možná iba histopatologickým vyšetrením (tabuľka 3) (22).

Izolované nádorové bunky sú jednotlivé bunky nádoru alebo malé zhluky buniek nie väčšie ako 0,2 mm v najväčšom rozmere, ktoré sa obvykle detekujú imunohistochemicky alebo molekulárnymi metódami (obrázok 4). INB nevykazujú typickú metastatickú aktivitu (napríklad proliferáciu alebo stromálnu reakciu) alebo inváziu cez cievnú stenu alebo stenu lymfatického sínusu (22, 23). Nezávislý prognostický význam prítomnosti INB v regionálnych lymfatických uzlinách v súčasnosti ešte nie je dokázaný, ale je aj ťažko zhodnotiteľný (22). Pre budúce vyhodnocovanie prognostického významu, možnosti porovnávania liečebných výsledkov, musí byť nález INB dokumentovaný

podľa rovnakých kritérií. Preto Hermanek et al. navrhli začlenenie mikrometastáz a izolovaných nádorových buniek v regionálnych lymfatických uzlinách do TNM klasifikácie zhubných nádorov (tabuľka 4) (22).

## Záver

V histopatologickej diagnostike metastáz v krčných lymfatických uzlinách sa možno stretnúť s viacerými úskaliaми. Jedným z nich je diagnostika okultného metastatického postihnutia lymfatických uzlín. Skúsenosti histopatológa, zvolená technika, počet vyšetrených lymfatických uzlín, počet rezov cez vyšetrenú lymfatickú uzlinu, to všetko sú dôležité faktory ovplyvňujúce výsledný počet diagnostikovaných mikrometastáz. Sériové alebo semisériové rezy cez lymfatickú uzlinu zvyšujú presnosť diagnostiky okultných metastáz, no veľmi nízky interval rezov je spojený s výraznou časovou aj finančnou náročnosťou, pričom diagnostický prínos nemusí byť adekvátny vynaloženej námaha. Vzhľadom na to sa javí ako optimálny interval rezov 1 mm. Pri tomto intervale by mala byť diagnostika mikrometastáz dostatočne presná, tak ako aj klasifikácia pN nálezu. Uplatňovanie imunohistochemického vyšetrenia predovšetkým s farbením na cytokeratíny podľa viacerých autorov prispieva k zlepšeniu diagnostiky mikrometastáz. Využitie molekulárnej diagnostiky v tejto oblasti u nás doposiaľ nie je štandardne uplatňované.

Prognostický význam mikrometastáz v regionálnych lymfatických uzlinách už dokazujú viacerí autori, detekcia izolovaných nádorových buniek zatiaľ neprinesla benefit v plánovaní liečby pacienta. Význam detailnejšej diagnostiky mikrometastáz a klasifikácie pN nálezu spočíva v presnejšom určení štádia choroby, adekvátnejšej indikácii adjuvantnej liečby, aj k lepšej možnosti porovnateľnosti výsledkov liečby.

## Literatúra u autora

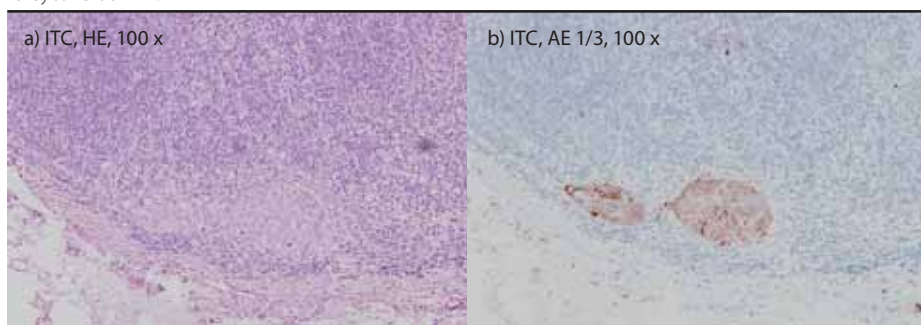
### MUDr. Patrik Štefanička, PhD.

I. ORL klinika LFUK, FNsP a SZU Bratislava  
Antolská 11, 851 07 Bratislava  
patrikstefanicka@yahoo.com

**Tabuľka 3.** Izolované nádorové bunky verus mikrometastázy (22).

	Izolované nádorové bunky (INB)	Mikrometastázy (okultné metastázy)
<b>Rozmer</b>	Jednotlivé nádorové bunky alebo malé zhluky ( $\leq 0,2$ mm)	$\leq 2$ mm v najväčšom rozmere
<b>Kontakt s cieovou alebo stenou lymfatického sínusu</b>	NIE	ÁNO
<b>Extravazácia (invázia a penetrácia cievy alebo steny lymfatického sínusu)</b>	NIE	ÁNO
<b>Extravaskulárna (extrasinusoidálna) stromálna reakcia</b>	NIE	obvyčajne ÁNO
<b>Extravaskulárna (extrasinusoidálna) proliferácia nádorových buniek</b>	NIE	ÁNO

**Obrázok 4.** Izolované nádorové bunky v lymfatickej uzline lokalizované subkapsulárne, zhluk nádorových buniek do 0,2mm, bez vykazovania metastatickej aktivity- extravazácie, proliferácie, dezmozplázie. Vľavo farbenie hematoxylin – eosin, vpravo po imunohistochemickom vyšetrení s cytokeratínmi.



**Tabuľka 4.** Klasifikácia izolovaných nádorových buniek v regionálnych lymfatických uzlinách (22).

pN0 bez mts v regionálnych lymfatických uzlinách, bez vyšetrenia INB

pN0(i-) bez mts v regionálnych lymfatických uzlinách histologicky, negatívne morfológické vyšetrenie pre INB

pN0(i+) bez mts v regionálnych lymfatických uzlinách histologicky, pozitívne morfológické vyšetrenie pre INB

pN0(mol-) bez mts v regionálnych lymfatických uzlinách histologicky, negatívne nemorfológické vyšetrenie pre INB

pN0(mol+) bez mts v regionálnych lymfatických uzlinách histologicky, pozitívne nemorfológické vyšetrenie pre INB

pN1(mi)/pN2(mi) – mikrometastáza v regionálnych lymfatických uzlinách histologicky