

# NOVOSTI V CITOPATOLOGIJI

Margareta Strojjan Fležar, Veronika Kloboves Prevodnik

Aspiracijska biopsija s tanko iglo (ABTI) je uveljavljena metoda za predoperativno opredelitev narave tumorjev in tumorjem podobnih sprememb, pri napredovanju rakave bolezni pa za oceno zasevkov (1). Na Onkološkem inštitutu jo uporabljamo v primarni diagnostični obdelavi bolnikov že 40 let. Osnovna opredelitev, ali gre za malignen ali benignen proces je zadoščala za odločitev o nadaljni diagnostični obdelavi ali zdravljenju. Sodobno zdravljenje pa zahteva natančnejšo opredelitev tumorja, kar nam v citopatologiji omogoča uporaba dodatnih tehnik. Najpomembnejša je opredelitev fenotipa in antigenskih značilnosti malignih neoplazem, kar vpliva na izbor terapije. Antigenske značilnosti opredelimo bodisi z imunocitokemičnimi barvanji na objektnih stekelcih, za natančnejšo opredelitev Nehodgkinovih limfomov pa uporabljamo imunofenotipizacijo limfatičnih celic s pretočnim citometrom. Obe tehniki smo na oddelku za citopatologijo priredili posebej za citopatološke vzorce in jih v zadnjem času pomembno izpopolnili predvsem v diagnostiki raka dojke in že omenjenih Nehodgkinovih limfomov.

## Rak dojke

Pri enem posegu dobimo v vzorcu ABTI karcinoma dojke povprečno 2 milijona celic. Za osnovni svetlobnomikroskopski pregled napravimo dva razmaza; enega fiksiramo s sušenjem na zraku in barvamo po Giemsi, drugega pa fiksiramo v Delaunayevem fiksativu in ga nato barvamo po Papanicolaou. Preostali celični material v igli in brizgi speremo v celični medij. Iz celične suspenzije po potrebi lahko napravimo s cetrifugiranjem na stekelca dodatne preparate – citospine (običajno do 12) – za imunocitokemična barvanja.

## Estrogenski in progesteronski receptorji

Prisotnost hormonskih receptorjev je pomemben napovedni dejavnik za oceno odziva na hormonsko zdravljenje in obdobja brez bolezni pri bolnicah z rakom dojke. Določanje hormonskega statusa raka dojke na tkivnih rezinah operativno odstranjenih tumorjev je uveljavljena metoda v histopatologiji. Predoperativno določanje hormonskih receptorjev na vzorcih ABTI je pomembno predvsem v primeru, ko bolnica ni sposobna za operacijo, ali pa potrebujemo oceno hormonskih receptorjev pred operacijo za načrtovanje zdravljenja.

Na oddelku za citopatologijo Onkološkega inštituta smo začeli uvajati imunocitokemično določanje hormonskih receptorjev na vzorcih ABTI raka dojke leta

2000 (2). Hormonske receptorje lahko imunocitokemično določamo na rutinsko pripravljenih razmazih ali pa na dodatno pripravljenih citospinih. V obeh primerih so preparati fiksirani po običajnem postopku, tj. v Delaunayevem fiksativu in pobarvani po Papanicolaou, za odkrivanje antigenov pa jih moramo pred imunocitokemičnim barvanjem obdelati z mikrovalovi. Ko smo primerjali izraženost hormonskih receptorjev na teh vzorcih z ustreznimi histološkimi vzorci istega tumorja, smo ugotovili, da je izraženost estrogenskih receptorjev na razmazih skladna v 92%, na citospinih pa v 94%. V zadnjem času smo tehniko izpopolnili, imunocitokemično določamo hormonske receptorje na citospinih, fiksiranih v metanolu. Takšen način priprave vzorca omogoča hiter izvid statusa hormonskih receptorjev, saj preparatov pred imunocitokemičnimi reakcijami ne barvamo po Papanicolaou, taki vzorci pa tudi ne potrebujejo predobdelave z mikrovalovi. Bistveno je, da je na tako pripravljenih vzorcih izraženost hormonskih receptorjev popolnoma skladna (100%) s histološkimi izvidi.

V prospektivni študiji, ki smo jo izvedli na Onkološkem inštitutu in je zajela 209 bolnic z rakom dojke, smo določili hormonske receptorje na vzorcih ABTI pred operacijo. Na osnovi citološko določenih hormonskih receptorjev je hormonsko terapijo kot prvo zdravljenje lokalno omejenega raka dojke v obdobju od julija 2002 do aprila 2004 prejelo 49 bolnic. Srednje opazovalno obdobje je bilo 8,3 mesece (razpon 1,8–8,8 mesecev). Srednja starost bolnic je bila 80,5 let (razpon 65,8–95,8 let). Pri 24 bolnicah (49%) je bila v opazovanem obdobju dosežena stagnacija bolezni, pri 13 (26,5%) delni odgovor, pri 8 (16,5%) popoln odgovor. Pri 4 bolnicah (8%) je prišlo do progressa bolezni. Zaradi razširjenega raka dojke je v istem obdobju prejelo hormonsko terapijo na osnovi citološko določenih hormonskih receptorjev 22 bolnic. Srednje opazovalno obdobje je bilo 7,9 mesecev (razpon 1,4–17,5 mesecev). Srednja starost bolnic je bila 68,4 let (razpon 53,4–85,7 let). Lokalizacije metastaz so bile pri 5 bolnicah (23%) v mehkih tkivih, pri 10 (45,5%) v kosteh in mehkih tkivih, pri 7 (32%) pa v visceralnih organih +/- mehkih tkivih ali kosteh. Pri 11 (50%) bolnicah je bila v opazovanem obdobju dosežena stagnacija bolezni, pri 3 (13,6%) pa delni odgovor. Pri 8 bolnicah (36%) je bolezen ob hormonski terapiji napredovala. Srednji čas do progressa bolezni je bil 10 mesecev. Raziskava je potrdila, da bolnice z rakom dojke lahko dobijo hormonsko terapijo na podlagi citološko določenih hormonskih receptorjev.

### **MIB-1 (Ki-67)**

Proliferacijsko aktivnost tumorja ugotavljamo s protitelesi proti jedrnemu antigenu proteinu Ki-67, ki je prisoten v vseh aktivnih fazah celičnega ciklusa (fazi G1, S, G2 in mitoz), zato je odličen označevalec za določanje ravnega deleža v izbrani celični populaciji.

Delež Ki-67 pozitivnih celic je povezan s kliničnim potekom bolezni. Pri raku dojke je neodvisni dejavnik za napoved preživetja bolnic in ponovitve bolezni, nekatere študije poročajo, da napoveduje tudi odgovor na zdravljenje. Morda bo določanje izraženosti Ki-67 (npr. z MIB-1) pred zdravljenjem v prihodnosti

postalo pomembno za oceno agresivnosti tumorja in za izbor primernega zdravljenja (3).

Proliferacijsko aktivnost tumorja lahko opredelimo z imunocitokemičnim barvanjem s protitelesi MIB-1, ki se vežejo na protein Ki-67. V citopatologiji v ta namen uporabimo citospin, fiksiran v metanolu (4). Ugotovili smo, da je izražena Ki-67 na citopatoloških vzorcih primerljiva s histološkimi, kar pomeni da ga lahko zanesljivo določimo že pred operacijo na vzorcih ABTI.

## **HER-2**

Imunocitokemično lahko iz vzorcev ABTI določamo tudi Her-2 (c-erb-B2) onkoprotein (p185). Pomemben je ne le za napovedovanje poteka bolezni, ampak predvsem odgovora na imunsko zdravljenje s trastuzumabom (Hercepti-nom®), tj. protitelesom proti Her-2 proteinu, pri bolnicah z metastatskim rakom dojke.

HER-2 je transmembranski glikoprotein in ugotovili smo, da so za imunocitokemično določanje najprimernejši citospini, fiksirani v metanolu. Težave pri imunocitokemičnem določanju in ocenjevanju reakcij HER-2 na citoloških vzorcih so podobne kot na histoloških. Zaradi visoke občutljivosti tako imunocitokemičnih kot imunohistokemičnih reakcij odkrijemo protein tudi na celicah brez pomnoženega gena, kar otežuje zanesljivost ocene izražnosti Her-2.

Natančneje kot z imunocitokemičnimi barvanji bi lahko status Her-2 določili z metodo fluorescentne in situ hibridizacije (FISH), kjer analiziramo število kopij gena Her-2. Metoda je na oddelku za patologijo OI že v vsakodnevni uporabi (5). Glede na podatke v literaturi je tehnična izvedba FISH na vzorcih ABTI enostavnejša kot v histologiji. Poleg tega imamo v vzorcih ABTI za analizo na voljo ohranjene cele celice oz. jedra, kar je prav gotovo prednost pri kvantifikaciji (štetju/oceni) signalov v primerjavi s kvantifikacijo na tkivnih rezinah, kjer oceno moti veliko število prerezanih in prekritih celic oz. jeder (6). Obetamo si, da bomo določanje HER-2 z metodo FISH kmalu lahko uvedli tudi na vzorcih ABTI, saj bo pomembno izboljšalo kakovost informacije o Her-2.

## **Prva bezgavka**

V kirurškem zdravljenju raka dojke se je uveljavila biopsija prve (varovalne) bezgavke, ki napoveduje prisotnost zasevkov v pazdušnih bezgavkah. Glede na izvid biopsije prve bezgavke se kirurg odloči, ali je potrebno izprazniti pazduho oz. ali pazdušne bezgavke lahko ohrani (7).

Za oceno zasevkov v prvi bezgavki med operacijo smo na OI vpeljali metodo preslikave odtisa prve bezgavke (8). Patolog izolirano bezgavko prereže po daljši osi, rezne ploskve pa 2-4 krat odtisne na objektno stekelce. Preparate takoj obarvamo s Hemacolorjem in pregledamo pod svetlobnim mikroskopom. Negativni ali pozitivni odgovor takoj sporočimo v operacijsko dvorano. Sumljive vzorce obravnavamo kot negativne, zato je v takih primerih odločitev o izpraznitvi pazduhe odvisna od končnega histološkega izvida, ki ga kirurg dobi šele po operaciji, približno v 24 urah.

Izsledki zadnje analize ocene uspešnosti odkrivanja zasevkov v prvi bezgavki med operacijo z metodo preiskave odtisa bezgavke, ki je zajela 413 bolnic z rakom dojke (od junija 2001 do septembra 2003), ki so imele klinično negativne bezgavke, kažejo, da je metoda visoko specifična (99.2%), vendar ima nizko občutljivost (54.7%). Če upoštevamo pri izračunu občutljivosti le makrometastaze (zasevki > od 2 mm) v prvi bezgavki, pa je občutljivost 77%. Kakšni so vzroki, da ne najdemo zasevkov v odtisih prve bezgavke? Deloma krivdo lahko pripišemo tehnično slabim ali nereprezentativnim odtisom. Pri makrometastazah se zasevki pod kapsulo često slabo odtisnejo, ugotovili pa smo tudi, da zelo kohezivne skupine karcinomskih celic lahko v odtisu pustijo na mestu zasevka prazen prostor. Mikrometastaze (zasevki velikosti 0.2-2 mm) so še bolj kočljive, saj smo jih našli in prepoznali v odtisih le izjemoma. Ostaja vprašanje, koliko karcinomskih celic, ki so posamično raztresene med limfatičnimi, ne prepoznamo. Odgovor bi dalo imunocitokemično barvanje na citokeratin, ki označuje epitelijske celice. Ker dodatno barvanje zaenkrat traja skoraj eno uro, še ni primerno za intraoperativno uporabo. Dejstvo pa je, da dokončnega pomena mikrometastaz in predvsem izoliranih karcinomskih celic v pazdušnih bezgavkah za potek bolezni še ne poznamo.

S citopatološkim pregledom odtisa prve bezgavke lahko na enostaven in hiter način ocenimo negativne bezgavke in bolnicam prihranimo nepotrebno izpraznitev pazduhe. Po drugi strani pa najdemo 77% makrometastaz med operacijo. Tem bolnicam prihranimo ponovno operacijo, saj v tem primeru kirurg izprazni pazduho že pri prvi operaciji.

## **Nehodgkinovi limfomi**

Imunofenotipizacija s pretočnim citometrom je pomembna dodatna metoda, ki smo jo začeli uporabljati v rutinski, citološki diagnostiki Nehodgkinovih limfomov (NHL) namesto imunocitokemičnih reakcij v začetku leta 2000. Zanesljivost citološke diagnoze NHL se je z uporabo imunofenotipizacije s pretočnim citometrom povečala.

## **Imunofenotipizacija s pretočnim citometrom**

Zaradi velike morfološke in biološke variabilnosti reaktivnih in neoplastičnih obolenj bezgavk je diagnostika bolezni bezgavk zelo zahtevna in težavna. Zato samo s konvencionalno mikroskopsko analizo citoloških in histoloških vzorcev velikokrat ne moremo ločiti med reaktivnimi in neoplastičnimi boleznimi bezgavk, še težje pa zanesljivo opredelimo vrsto limfoma (9). Za diagnozo NHL je tako v sodobnem histopatološkem in citopatološkem diagnostičnem postopku nujna uporaba dodatnih metod. V zadnji klasifikaciji tumorjev krvotvornega in limfoidnega sistema Svetovne zdravstvene organizacije, je posebej poudarjeno, da je za opredelitev tipa limfoma poleg kliničnih, morfoloških, molekularnih in citogenetskih kriterijev izjemnega pomena imunofenotip limfomskih celic (10-12). Opredelimo ga lahko z imunocitokemično metodo ali z imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom. Z razvojem novih monoklonalnih

protiteles, tehnik za odkrivanje antigenskih determinant in ojačitev signala imunocitokemične reakcije je imunocitokemija v histopatologiji postala standardna metoda za določanje imunofenotipa limfomskih celic. Žal pa s to metodo v citopatologiji pogosto ni možno zanesljivo ločiti med reaktivnimi in neoplastičnimi boleznimi bezgavk, še težje pa je zanesljivo opredeliti imunofenotip limfomskih celic. Zato so v nekaterih citopatoloških laboratorijih po svetu namesto imunocitokemije začeli uporabljati imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom (13,14).

Tudi na Onkološkem inštitutu v Ljubljani je bila citopatološka diagnostika bolezni bezgavk kljub uporabi imunocitokemičnih reakcij nezadovoljiva, saj diferenciacija med reaktivnimi in malignimi limfocitnimi proliferacijami pogosto ni bila možna.

Zato smo leta 1998 napravili pilotni preizkus v katerega smo vključili 34 bolnikov z limfadenopatijo, da bi ugotovili s katero dodatno metodo, imunocitokemijo ali imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom, lahko bolj zanesljivo opredelimo reaktivne in neoplastične limfocitne proliferacije bezgavk. Iz vzorca ABTI bezgavke smo pri vseh bolnikih poskušali opredeliti limfadenopatijo z imunocitokemičnimi reakcijami in vzporedno tudi s pretočnim citometrom. Korelacija med rezultati, katere smo dobili z obema metodama je bila dobra, vendar smo z imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom dobili več podatkov o fenotipu tumorskih celic in hkrati bolj zanesljivo ugotovili prevladujoči klon limfomskih celic (15). Pilotni preizkus je pokazal, da se je senzitivnost citopatološke preiskave v citopatološki diagnostiki NHL z uporabo imunofenotipizacije s pretočnim citometrom povečala iz 0.93 na 1.00.

Vzorci za imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom smo najprej pripravljali po standardnem protokolu, ki se v hematologiji uporablja za imunofenotipizacijo periferne krvi in kostnega mozga. Zelo hitro smo ugotovili, da zaradi majhne celularnosti citoloških vzorcev in izgube celic med pripravo vzorcev s to metodo običajno ne moremo dobiti dovolj informacij za zanesljivo diagnozo. Zaradi tega smo izdelali svoj protokol. Spremenili smo pripravo vzorcev, način merjenja s pretočnim citometrom in analizo dobljenih rezultatov.

Primerjava standardnega in našega, izboljšanega protokola za imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom je pokazala, da je naš protokol veliko boljši, saj za uspešno imunofenotipizacijo potrebujemo precej manj celic. Za minimalno informacijo o celični liniji in klonalnosti limfatičnih celic potrebujemo le 3 epruvete z vzorcem in za vsako epruveto le  $0,15 \times 10^6$  celic, kar je 7 krat manj kot če bi uporabljali standardni protokol.

Ker z ABTI bezgavk v povprečju dobimo  $3,2 \times 10^6$  celic, iz vzorcev izlivov pa še precej več, lahko z našim izboljšanim protokolom za imunofenotipizacijo s pretočnim citometrom v povprečju določimo 16 različnih antigenskih lastnosti celic. To nam običajno zadošča, da zanesljivo opredelimo celično linijo, klonalnost in zadosti antigenskih lastnosti neoplastičnih limfatičnih celic, da zanesljivo diagnosticiramo in klasificiramo NHL.

Z retrogradno analizo, kjer smo primerjali rezultate imunofenotipizacije s pretočnim citometrom, katere smo dobili s standardno metodo ( $N=141$ ) in z našo

izboljšano metodo (N=261) smo ugotovili, da se je senzitivnost citopatološke diagnoze NHL z uporabo naše modificirane metode povečala iz 0,92 na 0,98 in specifičnost iz 0,94 na 0,95.

Menimo, da je imunofenotipizacija s pretočnim citometrom nujno potrebna dodatna metoda, ki nam v citopatologiji omogoča zanesljivo diferenciacijo med reaktivnimi in neoplastičnimi limfocitnimi proliferacijami in klasifikacijo NHL.

## Literatura

1. Us Krašovec M. Aspiracijska biopsija v onkologiji. *Onkologija* 1998; 2: 9-10.
2. Srebotnik Kirbiš I. Določanje estrogenskih receptorjev v vzorcih aspiracijskih biopsij raka dojke. *Onkologija* 2003; 8: 15-7.
3. Scholzen T. The Ki-67 protein; from the known to unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182: 311-22.
4. Srebotnik Kirbiš I, Strojčan Fležar M, Us Krašovec M. MIB-1 immunostaining on cytological samples: a protocol without antigen retrieval. *Cytopathology* 2004; 15: 1-6.
5. Drev P, Golouh R. Določanje onkogenega Her-2 pri karcinomu dojke. *Onkologija* 2002; 6: 14-6.
6. Bofin AM, Ytterhus B, Hagmar BM. TOP2A in HER-2 gene amplification in fine needle aspirates from breast carcinomas. *Cytopathology* 2003; 14: 314-9.
7. Snoj M. Kirurgija varovalne bezgavke. *Onkologija* 1998; 2: 46-7.
8. Žgajnar J, Frković Grazio S, Bešič N, Hočevnar M, Vidregar Kralj B, Gerljevič A. Low sensitivity of the touch imprint cytology of the sentinel lymph node in breast cancer patients – results of a large series. *J Surg Oncol* 2004; 85: 82-6.
9. Frable WJ, Kardos TF. Fine needle aspiration biopsy: applications in the diagnosis of lymphoproliferative diseases. *Am J Surg Pathol* 1988; 12 (Suppl 1): 62-72.
10. Harris NL, Jaffe ES, Stein H et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the international lymphoma study group. *Blood* 1994; 84: 1361-92.
11. Jančar J. Progress in the classification of myeloid and lymphoid neoplasms. From REAL to WHO concept. *Adv Clin Pathol* 2000; 4: 59-76.
12. Gascoyne RD. Establishing the diagnosis of lymphoma: from initial biopsy to clinical staging. *Oncology* 1998; 12 (10 (Suppl 8): 11-6.
13. Simsir A, Fetsch P, Stetler-Stevenson, Abati A. Immunophenotypic analysis of non-Hodgkin lymphomas in cytologic specimens: a correlative study of immunocytochemical and flow cytometric techniques. *Diagn Cytopathol* 1999; 20: 278-84.
14. Liu K, Stern RC, Rogers RT, Dodd LG, Mann KP. Diagnosis of haematopoietic processes by fine-needle aspiration in conjunction with flow cytometry: a review of 127 cases. *Diagn Cytopathol* 2001; 24: 1-10.
15. Kloboves Prevodnik V, Pogačnik A, Us Krašovec M, Petrič J, Ihan A, Golouh R, Srebotnik Kirbiš I. Can ancillary methods improve the reliability of fine needle aspi-

ration biopsy (FNAB) in preoperative diagnosis of non-Hodgkin lymphomas (NHL)?  
Final programme and abstracts.10<sup>th</sup> meeting of European Association for Haematopathology, London 2000: P-10.