



Lymph node metastases of papillary thyroid cancer in immunohistochemical and molecular examination – preliminary report

Krzysztof Kaczka¹, Izabela Wójcik², Maria Matejkowska³, Krzysztof Kuzdak¹, Lech Pomorski¹

¹ Department of Endocrinological and General Surgery, Medical University, Łódź, Poland

² Department of Molecular Pathology and Neuropathology, Medical University, Łódź, Poland

³ Department of Anatomy and Histopathology, Medical University, Łódź, Poland

Abstract

Background: Total thyroidectomy with lymphadenectomy is the most typical operation in a case of papillary thyroid cancer. Range of lymph node resection still remains a matter of controversy. In some publications treatment of lymph node metastases doesn't affect survival, so only selective lymph node resection is the extended enough operation. The others remark that, local relapse- the worst prognostic factor, appears the most often in the lymph nodes, so they suggest more aggressive treatment. To solve that problem we try to find more sensitive methods to examine lymph nodes.

Aim: To compare the results of detection lymph node metastases of papillary thyroid cancer by immunohistochemistry with the results of RT-PCR for thyroglobulin (Tg) mRNA.

Material and methods: Each of one hundred eighty four cervical lymph nodes obtained from 24 patients, operated in our Department was divided into 2 halves: one was used for conventional histopathology and immunohistochemistry, the other part was investigated by RT-PCR for Tg mRNA. Immunohistochemical staining for Tg was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded sections with anti-Tg antibodies.

Results: According to routine, histopathological examination 8 (33.5%) patients had involved lymph nodes. One hundred correspondence of the results of immunohistochemistry and histopathology was observed.

We obtained different results of examination of the lymph nodes in 6 (25%) patients. In four patients (16.7%) RT-PCR was more sensitive in detection of positive lymph nodes, in two patients (8.3%) it revealed less metastasized lymph nodes than immunohistochemistry. The remaining 18 patients didn't have any differences, fourteen (58.3%) of them had the negative lymph nodes and four (16.7%) had positive, the same lymph nodes in all examinations. Finally, according to RT-PCR 10 (41.7%) of the patients had metastasized lymph nodes.

Conclusion: Tg RT-PCR is a sensitive method of detection of papillary thyroid cancer cells and may help to detect the metastases of papillary thyroid cancer in regional lymph nodes.

(*Pol J Endocrinol* 2005; 2(56): 160-167)

Key words: papillary thyroid cancer, lymph node metastases, histopathology, immunohistochemistry, reverse transcriptase, polymerase chain reaction



Krzysztof Kaczka
Department of Endocrinological and General Surgery
Medical University of Łódź
Pabianicka 62, 93-513, Łódź, Poland
Phone: +48 42 6895171, fax +48 42 6895172
e-mail: krzysztof.kaczka@poczta.fm



Przerzuty raka brodawkowatego tarczycy (RBT) do regionalnych węzłów chłonnych w badaniu immunohistochemicznym i molekularnym – doniesienie wstępne

Krzysztof Kaczka¹, Izabela Wójcik², Maria Matejkowska³, Krzysztof Kuzdak¹, Lech Pomorski¹

¹ Klinika Chirurgii Endokrynologicznej i Ogólnej, Uniwersytet Medyczny, Łódź

² Zakład Patologii Molekularnej i Neuropatologii, Uniwersytet Medyczny, Łódź

³ Zakład Anatomii Patologicznej i Histopatologii, Uniwersytet Medyczny, Łódź

Streszczenie

Wstęp: Całkowita tyreoidektomia z limfadenektomią jest najczęściej wykonywaną operacją w przypadku RBT. Zakres resekcji węzłów chłonnych jest sprawą dyskusyjną. Według niektórych publikacji, przerzuty w węzłach chłonnych nie wpływają na przeżycia odległe, w związku z tym selektywna resekcja węzłów chłonnych jest wystarczającą operacją. Inni autorzy podkreślają, że wznowa miejscowa, najgorszy czynnik prognostyczny, pojawia się najczęściej w węzłach chłonnych, sugerując bardziej radykalny zabieg operacyjny. Aby rozwiązać ten problem próbujemy znaleźć, czulsze od histopatologii, metody oceny zajęcia węzłów chłonnych.

Cel pracy: Porównanie wyników wykrywania przerzutów RBT w węzłach chłonnych za pomocą badania immunohistochemicznego i badania RT-PCR mRNA dla tyreoglobuliny.

Materiał i metodyka: Każdy ze 184 węzłów chłonnych uzyskanych od 24 pacjentów operowanych przez jednego chirurga, z powodu RBT, podzielono na 2 części: jedną z nich zbadano za pomocą badania histopatologicznego i immunohistochemicznego, w drugiej poszukiwano mRNA dla tyreoglobuliny. W badaniu immunohistochemicznym wykorzystano specyficzne przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie.

Wyniki: W rutynowym badaniu histopatologicznym usuniętych w czasie operacji węzłów chłonnych stwierdzono obecność przerzutów RBT u 8 (33,3%) z 24 pacjentów. Zaobserwowano 100% zgodność wyników pomiędzy badaniem immunohistochemicznym i histopatologicznym. Dla immunohistochemii i RT-PCR odmienne wyniki uzyskano dla 6 (25%) osób. U 4

(16,7%) pacjentów badanie RT-PCR było bardziej czułe w wykrywaniu przerzutów, a u 2 (8,3%) pacjentów ujawniło ono mniej zajętych węzłów chłonnych niż immunohistochemia. U pozostałych 18 pacjentów nie obserwowano różnic w wynikach. Czternastu (58,3%) z nich nie miało przerzutów w węzłach chłonnych, 4 (16,7%) miało zajęte te same węzły chłonne we wszystkich badaniach. Ostatecznie w oparciu o RT-PCR uznano, że dodatkowo węzły chłonne ma 10 (41,7%) pacjentów.

Wniosek RT-PCR dla Tg mRNA jest czułą metodą wykrywania komórek raka tarczycy i może pomóc w określeniu obecności przerzutów raka brodawkowatego tarczycy w regionalnych węzłach chłonnych.

(*Endokrynol Pol* 2005; 2(56): 160-167)

Słowa kluczowe: rak brodawkowaty tarczycy, węzły chłonne, przerzuty, badanie histopatologiczne, badanie immunohistochemiczne, metoda odwrotnej transkrypcji, łańcuchowa reakcja polimeryzacji



Krzysztof Kaczka
Klinika Chirurgii Endokrynologicznej i Ogólnej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Pabianicka 62
93-513 Łódź, Polska
tel. +48 42 6895171, fax +48 42 6895172
e-mail: krzysztof.kaczka@poczta.fm

Praca finansowana z grantu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi,
grant numer 502-11-016

Wstęp

Mimo dobrego rokowania rak brodawkowaty tarczycy stosunkowo często daje przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych oraz rzadziej przerzuty odległe. Odsetek zajętych węzłów chłonnych może wynosić nawet od 31% do 86% w przypadku węzłów przedziału I (przestrzeń pomiędzy szyjnymi pęczkami naczyniowo-nerwowymi), w przypadku jednoimiennych przedziałów II lub III (bocznie od szyjnych pęczków naczyniowo-nerwowych) od 32% do 68%, w przypadku przeciwległych przedziałów II

lub III od 12 do 24%, w przypadku przedziału IV (śródpierście górne) od 3 do 20% [1]. Znaczenie kliniczne przerzutów w węzłach chłonnych jest przedmiotem licznych kontrowersji. Niektórzy wykazują, że jest to niekorzystny czynnik prognostyczny, pogarszający przeżycia odległe [1-8], w innych pracach przedstawiono wyniki, które sugerują, że obecność przerzutów w węzłach chłonnych nie ma znaczenia rokowniczego [9, 10, 11].

Kontrowersje dotyczą nie tylko znaczenia obecności przerzutów ale także zakresu przepro-

wadzonego zabiegu operacyjnego. Część chirurgów opowiada się za jedynie selektywnym usuwaniem regionalnych węzłów chłonnych (nazewnictwo wg Robbins i wsp. 1991) [12]. Zalecają oni przeprowadzenie limfadenektomii jedynie w tych przypadkach, w których regionalne węzły chłonne zostały ocenione jako N₁. Ocenę tą można przeprowadzić na podstawie: przedoperacyjnego badania klinicznego, badań obrazowych (USG szyi, CT, BACC, biopsja chirurgiczna), makroskopowego i ewentualnie mikroskopowego badania śródoperacyjnego. Zwolennicy selektywnej limfadenektomii uzasadniają swoje stanowisko następującymi argumentami:

- obecność przerzutów w węzłach chłonnych nie pogarsza rokowania ani nie skraca przeżyć odległych [9, 10, 11];
- przerzuty w węzłach chłonnych mogą zostać zniszczone podczas leczenia uzupełniającego ¹³¹I [13];
- przerzuty w węzłach chłonnych często nie ujawniają się klinicznie [13];
- w przypadku wznowy lokoregionalnej można przeprowadzić kolejny zabieg operacyjny, podczas którego zostaną usunięte przerzutowo zmienione węzły [14, 15].

Zwolennicy bardziej agresywnego postępowania proponują wykonać radykalną, zmodyfikowaną resekcję węzłów chłonnych, podczas której wszystkie węzły chłonne, bez względu na stopień podejrzenia obecności przerzutu, zostaną usunięte. Przedstawiają oni liczne argumenty sugerujące wybór takiego postępowania:

- przerzuty w regionalnych węzłach chłonnych są zjawiskiem częstym, zwłaszcza w przypadku raka brodawkowatego [1];
- najnowsze prace mówią o negatywnym wpływie obecności przerzutów w węzłach chłonnych na wyniki leczenia i przeżycia odległe [1-8];
- przerzuty w regionalnych węzłach chłonnych są najczęstszym miejscem wznowy raka tarczycy, która w znaczny sposób pogarsza rokowanie [14, 16, 17];
- w przypadku wznowy węzłowej trudniej jest przeprowadzić zabieg radykalny onkologicznie, u 25% chorych możliwe jest wykonanie jedynie zabiegu paliatywnego [17];
- przeprowadzenie zabiegu usunięcia węzłów, w których doszło do wznowy jest trudniejsze technicznie, bardziej obciążające chorego i obarczone większą możliwością wystąpienia powikłań [17];
- przerzuty w węzłach chłonnych często są nie jodochwytnie lub zbyt mała aktywność zgromadzonego jodu radioaktywnego w przerzutowo zmienionym węzle chłonnym nie wywołuje efektu letalnego [13, 14, 15, 18, 19];
- uzyskuje się korzystniejsze wyniki leczenia

uzupełniającego ¹³¹I po usunięciu ognisk raka w regionalnych węzłach chłonnych [17].

W chwili obecnej usunięte śródoperacyjnie węzły chłonne są oceniane jedynie w rutynowym, pooperacyjnym badaniu histopatologicznym. Wobec istnienia tak licznych kontrowersji co do znaczenia obecności przerzutów w węzłach chłonnych, istnieje potrzeba poszukiwania nowych metod diagnostycznych, wspomagających a być może w przyszłości zastępujących klasyczne badanie histopatologiczne. W przypadku innych nowotworów złośliwych (np. rak jelita grubego, rak sutka, czerniak, rak prostaty) do oceny obecności przerzutów w węzłach chłonnych używano badań immunohistochemicznych i molekularnych z zużyciem techniki odwrotnej transkrypcji łańcuchowej reakcji polimerazy (RT-PCR) [20-28]. Uzyskane wyniki są obiecujące – w większości prac metody te okazały się bardziej czułe i swoiste niż klasyczne badanie histopatologiczne [20-28].

Fakty te zachęcają do przeprowadzenia podobnych badań w przypadku raka brodawkowatego tarczycy. Być może uda się za pomocą metod molekularnych lub immunohistochemicznych wyodrębnić grupę chorych, która odniosłaby korzyści z bardziej agresywnego leczenia uzupełniającego.

Komórki zróżnicowanego raka tarczycy zachowują zdolność do produkcji tyreoglobuliny. Dlatego też poszukiwanie mRNA dla Tg w węzłach chłonnych wydaje się właściwą metodą wykrywania obecności w nich przerzutów raka brodawkowatego tarczycy w regionalnych węzłach chłonnych. Za wyborem tego markera przemawia także opisany fakt wcześniejszego wykorzystania metody RT-PCR ukierunkowanej na wykrywanie Tg mRNA w materiale uzyskanym z biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej węzłów chłonnych. W tych badaniach tyreoglobulina okazała się markerem o odpowiedniej swoistości i wystarczającej czułości. [29]. Pobrane węzły chłonne są również badane immunohistochemicznie. Do takiego postępowania zachęcają wcześniejsze prace podkreślające wartość badań immunohistochemicznych w diagnostyce raka tarczycy [30, 31, 32]. Spośród możliwych do oznaczenia markerów (tyreoglobulina, vimentyna, cytokeratyna, S-100, EMA, ceruloplazmina) do naszych badań wykorzystaliśmy tyreoglobulinę. Dzięki temu poszukując w badaniu molekularnym mRNA dla tyreoglobuliny a w badaniu immunohistochemicznym tyreoglobuliny wykluczaliśmy możliwość wystąpienia błędów wynikających z różnej ekspresji poszczególnych markerów.

Pacjenci i metodyka

Do badania włączono 24 pacjentów (19 kobiet i 5 mężczyzn, wiek od 19-61 średnia wieku 44,9)

z rozpoznaniem przedoperacyjnie lub śródoperacyjnie rakiem brodawkowatym tarczycy. U żadnego z pacjentów przed zabiegiem nie wykryto wola guzowatego toksycznego i nie leczono za pomocą jodu promieniotwórczego ^{131}I . Wszyscy chorzy wyrazili świadomą zgodę na badanie. Na przeprowadzenie badania uzyskano akceptację Komisji Etyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

U chorych wykonano całkowitą tyreoidektomię z limfadenektomią centralną oraz zmodyfikowane, boczne jedno- lub wielopolowe wycięcie układu chłonnego szyi zgodnie z wytycznymi Polskiego Towarzystwa Chirurgicznego i Polskiego Towarzystwa Endokrynologicznego, zamieszczonymi w konsensusie osiągniętym podczas Konferencji „Rak Tarczycy Szczyrk 2000” [33].

Wielkość guza u operowanych chorych wynosiła: poniżej 1 cm u 10 (41,7%) pacjentów a powyżej 1 cm u 14 (58,3%) pacjentów. U żadnego z chorych nie stwierdzono makroskopowo lub mikroskopowo naciekania torebki gruczołu.

Natychmiast po usunięciu preparaty pobranych węzłów chłonnych przekazano do Zakładu Anatomii Patologicznej Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. M. Kopernika w Łodzi. Tam każdy uzyskany węzeł chłonny został podzielony za pomocą jałowego skalpela chirurgicznego na dwie równoważne części. Jedna część uzyskanego materiału została wykorzystana do przeprowadzenia badania histopatologicznego i immunohistochemicznego. Drugą zanurzono w ciekłym azocie a następnie przechowywano w temperaturze $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ celem wykonania badania RT-PCR. Wielkość badanych węzłów chłonnych wahała się od 0,3 do 2,6 cm. Węzły o wielkości mniejszej niż 0,3 cm poddano jedynie badaniu histopatologicznemu ze względu na brak możliwości uzyskania odpowiedniego materiału do wszystkich badań.

Badanie histopatologiczne i immunohistochemiczne

Do badania histopatologicznego i immunohistochemicznego materiał został utrwalony w roztworze 10% formaliny, a następnie poddany standardowej procedurze histopatologicznej (alkohol, ksylen, parafina) celem wykonania bloczków parafinowych. Następnie bloczki zostały pocięte na preparaty grubości ok. $4\text{ }\mu\text{m}$ na mikrotomie firmy Leica (model SM 2000R). Do procedury histopatologicznej preparaty zostały wybarwione hematoksyliną i eozyną. Do procedury immunohistochemicznej uzyskane na mikrotomie preparaty zostały nałożone na szkiełka (Super Frost Plus) o specjalnie elektrostatycznie przygotowanej powierzchni w celu ich lepszego przylegania. Potem preparaty zostały umieszczone w cieplarni w temp. $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 15 minut. W celu usunięcia pozostałej parafiny preparaty były płukane: 3 razy w ksylenie przez 5 minut, 2 razy w alkoholu absolutnym przez 5 minut, 2 razy w alkoholu etylowym o stężeniu

96% przez 5 minut. Następnie w celu uwodnienia preparatów zostały one umieszczone trzykrotnie w wodzie destylowanej na 10 minut. Następnie został na nie nakropiony odczynnik z przeciwciałami przeciwko tyreoglobulinie (Dako, Polska) na okres 10 minut. Potem preparaty były płukane w roztworze TBS (Dako, Polska) (50 mM Tris-HCl , 150 mM NaCl , $\text{pH } 7,6$) przez 15 minut. Po płukaniu na wycinki został nakropiony na czas 30 minut polimer wizualizujący EnVision (firma Dako) zawierający jako enzym wskaźnikowy fosfatazę alkaliczną. Następnie wycinki były jeszcze raz płukane w roztworze TBS przez 15 minut i poddane barwieniu chromogenem FAST RED, który reagując z enzymem wskaźnikowym (fosfataza alkaliczna) uwidacznia poszukiwany antygen (tyreoglobulinę) w postaci czerwonego produktu reakcji. W celu lepszego jego uwidocznienia przeprowadzono krótkotrwałe płukanie w wodzie destylowanej, następnie w roztworze amoniaku, a następnie jeszcze raz w wodzie destylowanej przez 10 minut. Do zamknięcia preparatów użyto wodnego medium Faramount (firma Dako).

Badanie histopatologiczne i immunohistochemiczne przeprowadzono w Zakładzie Anatomii Patologicznej Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. M. Kopernika (kierownik Zakładu dr n. med. M. Matejkowska)

Badanie molekularne

Materiał z tego samego węzła chłonnego w celu przeprowadzenia badania molekularnego został zamrożony w ciekłym azocie i przechowywany do czasu przeprowadzenia badań w temp. $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Do badania transkrypcji genu kodującego tyreoglobulinę zastosowana została metoda odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy (RT-PCR). W celu izolacji całkowitego RNA używane były zestawy Total RNA Prep. Plus (A&A Biotechnology, Polska), stosowane zgodnie z protokołem producenta. Metoda izolowania wykorzystywała jako podstawowe odczynniki fenol i izotiocyjanin guanidyny.

W celu otrzymania cDNA w procesie katalizowanym przez odwrotną transkryptazę całkowity komórkowy RNA w ilości ok. $1\text{--}2\text{ }\mu\text{g}$ poddany został reakcji w końcowej objętości $30\text{ }\mu\text{l}$ przy użyciu startera $1,5\text{ }\mu\text{g}$ oligo(dT) $_{12-18}$ (Clontech Lab., USA) oraz przy udziale 100 U odwrotnej transkryptazy MMLV (GIBCO BRL, USA) i w obecności inhibitora Rnazy jakim jest 10 U Rnasin (Promega, USA). Synteza cDNA prowadzona była przez 90 minut przy $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Reakcja PCR prowadzona była w objętości końcowej równej $20\text{ }\mu\text{l}$, która zawiera: $2\text{ }\mu\text{l}$ produktu RT, 50 mM KCl , 10 mM TRIS-HCl ($\text{pH } 10$ w $25\text{ }^{\circ}\text{C}$), $50\text{ }\mu\text{M}$ czterech dNTPs (po $12,5\text{ }\mu\text{M}$ każdego), $0,25\text{ }\mu\text{M}$ odpowiednich starterów, $1,5\text{ mM MgCl}_2$ oraz $0,5\text{ U}$ Tag polimerazy (Promega, USA). Amplifikacja w termocyklerze Perkin Elmer

2400 obejmowała 30 cykli i przebiegała według schematu: denaturacja 94 °C 1 min., annealing 58 °C 1min. oraz elongacja 72 °C, 1min. Sekwencje starterowe dla genu TG- sens: 5'TGT GAG CTG CAG AGG GAA ACG GCC3', antysens: 5' ata CAC CTC CAT CCC CTC CTC TGC GTC CAC ACA3'; długość produktu amplifikacji 348 pz. Kontrole izolacji RNA i reakcji odwrotnej transkrypcji były prowadzone przy użyciu starterów dla B-aktyny (sens: 5' GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA3', antysens: 5'CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC3'; długość produktu amplifikacji 548 pz). Po zakończeniu reakcji otrzymane produkty były poddawane elektroforezie w 2% żelu agarozowym, wybarwiane bromkiem etydyny i oceniane w analizatorze komputerowym systemu Image GelDoc100 firmy BioRad przy zastosowaniu programu Molecular Analyst. Zastosowana metodyka jest modyfikacją oryginalnej metody opracowanej przez Gubałę i wsp. [29].

Badanie molekularne było przeprowadzone w Zakładzie Patologii Molekularnej i Neuropatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (kierownik prof. dr hab. P. Liberski).

Wyniki

Obecność przerzutów raka brodawkowego tarczycy określano za pomocą trzech metod w 184 węzłach chłonnych (od 3 do 15 węzłów na pacjenta, średnio 7,7 węzła). Wielkość badanych węzłów wahała się od 0,3 do 2,6 cm. W rutynowych badaniu histopatologicznym stwierdzono przerzuty RBT w węzłach chłonnych u 8 (33,3%) z 24 chorych. Zaobserwowano 100% zgodność wyników pomiędzy histopatologią a badaniem immunohistochemicznym. Nie stwierdzono takiej zgodności wyników pomiędzy badaniem molekularnym a immunohistochemią – u 6 (25%) pacjentów uzyskano różne wyniki. Pozostali pacjenci mieli takie same wyniki we wszystkich trzech badaniach. Czternastu (58,3%) z nich nie miało przerzutów w węzłach chłonnych, 4 (16,7%) miało zajęte te same węzły chłonne we wszystkich badaniach.

Według histopatologii ze wszystkich 184 węzłów 28 (15,2%) było przerzutowo zmienionych, zostały one znalezione u 8 (33,3%) pacjentów (tabela 1). Dziesięć (35,7%) z tych 28 węzłów było zlokalizowanych w przedziale środkowym szyi (przedział I), pozostałe 18 (64,3%) w przedziałach bocznych szyi (przedziały II i III) (tabela 2). Nie stwierdzono przerzutowo zmienionych węzłów w śródpiersiu górnym (przedział IV). Dodatni wynik RT-PCR uzyskano z 34 (18,5%) węzłów pochodzących od 10 (41,7%) pacjentów. Jedenaście (32,4%) z nich było zlokalizowanych w przedziale środkowym szyi, 22 (64,7%) w przedziałach bocznych szyi a 1 (2,9%) w śródpiersiu górnym (tabela 3). Wśród 10 pacjentów z dodatnimi wynikami RT-PCR czterech

miało dodatnie wyniki badania immunohistochemicznego i molekularnego z tych samych węzłów (pacjenci oznaczeni jako 5.KW, 8.MW, 11.AA, 23.ŚM w tabeli 1). Według RT-PCR pacjent 16.SM miał jeden dodatni węzeł chłonny w przedziale środkowym szyi i 4 w przedziale bocznym lewym. W badaniu histopatologicznym i immunohistochemicznym nie wykryto przerzutów w tych węzłach chłonnych.

U pacjenta 18.EB w badaniu molekularnym uzyskano dodatni wynik z dwóch węzłów więcej niż w badaniu immunohistochemicznym. Ponadto u dwóch innych pacjentów (10.KF i 14.KZ) stwierdzono dodatni wynik RT-PCR z jednego węzła chłonnego więcej od każdego pacjenta niż w badaniu histopatologicznym. U tych pacjentów w badaniu immunohistochemicznym znaleziono tyreoglobulinę w makrofagach fizjologicznie obecnych w węzłach chłonnych, nie znaleziono natomiast komórek nowotworowych. Przypuszczamy że dodatni wynik RT-PCR uzyskano dzięki tej „fizjologicznej” tyreoglobulinie i traktujemy go jako fałszywie dodatni. Jest interesujące, że u innego chorego – 11.CZ patomorfolog również wykrył immunohistochemicznie tyreoglobulinę obecną w makrofagach w dwóch węzłach chłonnych jednakże wynik Tg mRNA RT-PCR dla tych węzłów był ujemny.

U dwóch naszych pacjentów (15.EM i 21.SW) badanie molekularne było mniej czułe niż badanie immunohistochemiczne. Wg badania histopatologicznego i immunohistochemicznego pacjent 15.EM miał 5 dodatnich węzłów chłonnych, a pacjent 21.SW 3 dodatnie węzły chłonne. Dodatni wynik RT-PCR uzyskano jedynie w 3 węzłach pochodzących od pacjenta 15.EM i 2 od pacjenta 21.SW.

Dyskusja

Wznowa lokoregionalna, obok obecności przerzutów odległych, jest najgorszym czynnikiem prognostycznym w przypadku raka brodawkowego tarczycy [14, 16, 17]. Może ona wystąpić nawet jeśli węzły chłonne badane jedynie w klasycznym badaniu histopatologicznym są wolne od przerzutów nowotworowych. Być może wznowa w takim przypadku jest spowodowana mikroprzerzutami w węzłach chłonnych, które są niewykrywalne w rutynowym badaniu histopatologicznym. Klasyczne badanie histopatologiczne ma ograniczoną wartość ponieważ jedynie jeden lub dwa skrawki z każdego węzła są oceniane. Ponadto znalezienie pojedynczych lub niewielkich zgrupowań komórek nowotworowych w preparacie może być trudne dla histopatologa.

Przypuszcza się, że rozsiew limfopochodny w przypadku RBT odgrywa ważniejszą rolę niż rozsiew krwiopochodny. Pojęcie węzła wartowniczego w przypadku raka tarczycy nie jest tak jedno-

Tabela 1

Wyniki wykrywania przerzutów raka brodawkowego tarczycy za pomocą histopatologicznego i immunohistochemicznego oraz Tg mRNA dla tyreoglobuliny

Pacjent	Wiek/płeć	Liczba węzłów chłonnych	H/I	Tg RT-PCR
1.SJ	35/m	15	0/15	0/15
2.BS	31/k	3	0/3	0/3
3.MD	52/k	3	0/3	0/3
4.AJ	51/k	4	0/4	0/4
5.KW	61/m	14	5/14	5/14
6.AS	52/k	7	0/7	0/7
7.MS	57/k	6	0/6	0/6
8.MM	35/k	11	5/11	5/11
9.SS	45/m	5	0/5	0/5
10.KF	54/k	8	1/8	2/8
11.CZ	37/k	4	0/4	0/4
12.RK	58/k	12	0/12	0/12
13.AA	60/k	10	3/10	3/10
14.KZ	44/m	12	0/12	1/12
15.EM	57/m	10	5/10	3/10
16.SM	43/k	12	0/12	5/12
17.KK	47/k	7	0/7	0/7
18.EB	19/k	9	3/9	5/9
19.WS	55/k	5	0/5	0/5
20.KJ	48/k	4	0/4	0/4
21.SW	54/k	5	3/5	2/5
22.ŁK	34/k	4	0/4	0/4
23.ŚM	50/k	6	3/6	3/6
24.SB	62/k	9	0/9	0/9
Wynik		184	28/166	34/166

Tabela 2

Lokalizacja przerzutowo zmienionych węzłów chłonnych w badaniu histopatologicznym i immunohistochemicznym

Pacjent	Przedział		
	Środkowy szyi (I)	Boczne szyi (II lub III)	Śródpiersie górne(IV)
5.KW	4/10	1/4	0
8.MM	5/11	0	0
10.KF	1/1	0	0
13.AA	0	3/10	0
15.EM	0	5/10	0
18.EB	0	3/9	0
21.SW	0	3/5	0
23.SM	0	3/6	0

Tabela 3

Lokalizacja przerzutowo zmienionych węzłów chłonnych w badaniu molekularnym

Pacjent	Przedział		
	Środkowy szyi (I)	Boczne szyi (II lub III)	Śródpiersie górne(IV)
5.KW	4/10	1/4	0
8.MM	5/11	0	0
10.KF	1/1	1/7	0
13.AA	0	3/10	0
14.KZ	0	0	1/9
15.EM	0	3/10	0
16.SM	1/2	4/9	0
18.EB	0	5/9	0
21.SW	0	2/5	0
23.SM	0	3/6	0

znaczne jak w czerniaku złośliwym czy raku sutka. Prace z ostatnich lat nie potwierdziły obecności jednego wzorca rozprzestrzeniania się przerzutów w węzłach chłonnych szyi dla raka tarczycy. Fakty te zachęciły nas do poszukiwania innych poza histopatologią metod oceny węzłów chłonnych.

Burt i Goudie wprowadzili nową technikę – badanie immunohistochemiczne – pozwalającą

wykryć komórki raka tarczycy [30]. W ich pracy tyreoglobulina została uwidoczniła we wszystkich przypadkach raka zróżnicowanego tarczycy, w 1 na 20 przypadków raka anaplastycznego tarczycy i żadnym przypadku innych badanych guzów. Pisani i wsp. potwierdził znaczną wartość badania immunohistochemicznego w wykrywaniu komórek raka tarczycy w węzłach chłonnych szyi

[31, 32]. W celu bardziej precyzyjnego określania obecności przerzutów w węzłach chłonnych wprowadzane są także w użycie techniki diagnostyki molekularnej. Charakteryzują się one dużą czułością i możliwością oceny komórek nie tylko z jednego czy dwóch skrawków poszczególnych węzłów chłonnych. Technika odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimeryzacji została z sukcesem zastosowana do wykrywania mikroprzerzutów wielu nowotworów złośliwych takich jak: rak żołądka, rak jelita grubego, rak gruczołu krokowego, rak sutka, czerniak złośliwy [20-28]. W przypadku raka jelita grubego znalezienie mikroprzerzutów za pomocą badania molekularnego, w histopatologicznie ujemnych węzłach chłonnych, było czynnikiem wskazującym na możliwość wystąpienia wznowy węzłowej i potrzebę bardziej agresywnego leczenia. Liefers i wsp., używając techniki RT-PCR dla CEA podzielił pacjentów z histopatologicznie ujemnymi węzłami na dwie grupy. Pięcioletnie przeżycie dla grupy chorych z wolnymi, także w badaniu molekularnym węzłami chłonnymi, wynosiło 91%, podczas gdy w grupie chorych z dodatnim wynikiem RT-PCR tylko 50% [20].

W naszym badaniu zastosowaliśmy do oceny obecności przerzutów raka brodawkowatego tarczycy w węzłach chłonnych, oprócz badania histopatologicznego, badanie immunohistochemiczne i technikę RT-PCR. Do naszych badań jako marker wybraliśmy tyreoglobulinę. Jest to jedna z najbardziej swoistych dla tarczycy substancji, obecna jedynie w normalnej tkance gruczołu i komórkach nowotworowych wywodzących się z komórek pęcherzykowych tarczycy. Inne, poza peroksydazą tarczycową czy symporterem sodowo-jodowym, nie są tak charakterystyczne dla tarczycy. Dla przykładu, CK-20 stosowana przez Weber i wsp. występuje także fizjologicznie w komórkach nabłonka żołądkowo-jelitowego czy urothelium [16].

U 18 (75%) z 24 włączonych do badania pacjentów uzyskano takie same wyniki obecności przerzutów w węzłach chłonnych. Czternastu z nich miało węzły wolne od przerzutów. U czterech innych wykryto przerzuty w tych samych węzłach chłonnych za pomocą badania immunohistochemicznego i RT-PCR.

W badaniu RT-PCR rozpoznano 9 (4,9%) węzłów, które były ujemne wg badania histopatologicznego i immunohistochemicznego. Pięć z nich pochodziło od tego samego chorego. U innego chorego wykryto za pomocą RT-PCR przerzuty w dwóch węzłach chłonnych, które wg histopatologii były ujemne. Uważamy, że ci dwaj chorzy wymagają dokładniejszej kontroli w opiece ambulatoryjnej aby ocenić kliniczne znaczenie dodatnich wyników RT-PCR przy ujemnych wynikach badań histopatologicznych i immunohistochemicznych.

Dwóch innych chorych miało wg badania molekularnego po jednym przerzutowo zmienionym węzle chłonnym więcej niż w badaniu histopatologicznym. Jednakże badanie immunohistochemiczne ujawniło obecność tyreoglobuliny w makrofagach znajdujących się w węzłach chłonnych. Sądzymy, że dodatni wynik RT-PCR uzyskano dzięki tyreoglobulinie pochodzącej z makrofagów, a nie z komórek nowotworach. Zjawisko to zostało już wcześniej opisane przez Venkatramana i wsp. [34].

Przypuszczamy, że moglibyśmy uzyskać więcej dodatnich wyników z badania RT-PCR przy ujemnych wynikach histopatologicznych poprzez zastosowanie większej liczby cykli PCR. Jednakże nie zrobiliśmy tego w naszym badaniu ponieważ obawiamy się uzyskania wyników fałszywie dodatnich spowodowanych nieuprawnioną transkrypcją. Bojunga i wsp. oraz Aust i wsp. udowodnili, że ekspresja mRNA dla tyreoglobuliny jest swoista dla komórek tarczycy przy 30 cyklach PCR, natomiast zwiększenie liczby cykli PCR do 40 powoduje, że ekspresja mRNA dla tyreoglobuliny jest niespecyficzna [35, 36].

U dwóch osób za pomocą RT-PCR wykryto mniej przerzutowo zmienionych węzłów chłonnych niż w badaniu histopatologicznym i immunohistochemicznym. Podobnie jak Weber i wsp. znajdujemy jedno wyjaśnienie dla tych fałszywie ujemnych wyników. Przypuszczamy, że tylko jedna część węzła chłonnego była zajęta przez komórki nowotworowe, druga natomiast wolna od komórek raka została wykorzystana do badania molekularnego. Z powodu małej wielkości badanych węzłów chłonnych nie można uzyskać odpowiedniej ilości materiału do przeprowadzenia badania histopatologicznego z obu części węzła chłonnego co zweryfikowałoby naszą hipotezę.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że technika RT-PCR dla Tg mRNA jest czułą metodą wykrywania komórek raka brodawkowatego tarczycy i może pomóc w określeniu obecności przerzutów raka brodawkowatego tarczycy w regionalnych węzłach chłonnych. Jednakże brak badań na większej liczbie chorych oraz fakt występowania przerzutów u znacznego, dochodzącego nawet do 86% odsetka pacjentów powoduje, że metoda w chwili obecnej nie wpłynie na zmianę techniki operacyjnej, sugerując wykonanie elektywnej resekcji węzłów chłonnych również w obu przedziałach bocznych szyi, zarówno po stronie guza jak i przeciwnej.

Piśmiennictwo

1. Dralle H, Gimm O. Lymph node in thyroid carcinoma. *Chirurg* 1996; 67: 788-806.
2. Beasley NJ, Lee J, Eski S, Walfish P, Witterick I, Freeman JL. Impact of nodal metastases on prognosis in patients with well-differentiated thyroid cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 128: 825-828.

3. McHenry CR, Rosen IB, Walfish PG. Prospective management of nodal metastases in differentiated thyroid cancer. *American Journal of Surgery* 1991; 162: 353-356.
4. Noguchi S, Murakami N. The value of lymph-node dissection in patients with differentiated thyroid cancer. *Surg Clin North Am* 1987; 67: 251-261.
5. Mussacchio MJ, Kim AW, Vijungco JD, Prinz RA. Greater local recurrence occurs with berry picking than neck dissection in thyroid cancer. *The American Surgeon* 2003; 69: 191-197.
6. Sivanandan R, Soo KC. Pattern of cervical lymph node metastases from papillary carcinoma of the thyroid. *British Journal of Surgery* 2001; 88: 1241-1244.
7. Kobayashi T, Asakawa H, Komoike Y, Tamaki Y, Monden M. Characteristics and prognostic factors in patients with differentiated thyroid cancer who underwent a total or subtotal thyroidectomy: surgical approach for high-risk patients. *Surgery Today* 1999; 29: 200-203.
8. Noguchi S, Murakami N, Yamashita H, Toda M, Kawamoto H. Papillary thyroid carcinoma: modified radical neck dissection improves prognosis. *Archives of Surgery* 1998; 133: 276-280.
9. Bhattacharyya N. A population-based analysis of survival factors in differentiated and medullary thyroid carcinoma. *Otolaryngology- Head and Neck Surgery* 2003; 128: 115-123.
10. Steinhilber T, Klupp J, Rayes N, Ulrich F, Jonas S, Graf KJ, Neuhaus P. Prognostic factors in patients with differentiated thyroid carcinoma. *European Journal of Surgery* 2000; 166: 29-33.
11. Ward LS, Souza SL. The impact of nodal metastases on prognosis of well-differentiated thyroid cancer suggests the practice of prophylactic neck dissection. *Arch. Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 9: 495-496.
12. Robbins KT, Medini JE, Wolfe GT, Levine PA, Sessions RR. Standardizing neck dissection terminology. *Archives of Otolaryngology- Head and Neck Surgery* 1991; 117: 601-605.
13. Jarzab B. Leczenie raka tarczycy. *Endokrynologia Polska*. 1995; 46: Suppl. 1: 25-35.
14. Cady B, Rossi R. An expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma. *Surgery* 1988; 104: 947-953.
15. Rossi R, Cady B, Silverman M, Wood MS, Horner T. Current results of conservative surgery for differentiated thyroid carcinoma. *World Journal of Surgery* 1986; 10: 621-622.
16. Weber T, Amann K, Weckauf H, Lacroix J (2002) Detection of disseminated medullary thyroid carcinoma cells in cervical lymph nodes by cytokeratin-20 reverse transcription-polymerase chain reaction. *World Journal of Surgery* 2002; 26: 148-152.
17. Pomorski L. Operacje układu chłonnego szyi w zróżnicowanym raku tarczycy – limfadenektomia wybiórcza czy rutynowa. *Wiadomości Lekarskie* 54, suplement 1: 198-204.
18. Suwiński R, Gawkowska-Suwińska M. Radiobiology of radioiodine treatment for thyroid cancer. *Wiadomości Lekarskie* 2001; 54 Suplement 1: 266-277.
19. Wheldon TE, O'Donoghue JA. The radiobiology of targeted radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 1990; 58: 1-28.
20. Liefers GJ, Cleton-Jansen AM, van de Velde CJ, Hermans J, van Krieken JH, Tollenar RA. Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. *NEJM* 1998; 339: 223-228.
21. Weitz J, Kienle P, Lacroix J, Willeke F, Benner A, Lehnert T. Dissemination of tumor cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 1998; 4: 343-348.
22. Weitz J, Kienle P, Magener A, Koch M. Detection of disseminated colorectal cancer cells in lymph nodes, blood and bone marrow. *Clinical Cancer Research* 1999; 5: 1830-1836.
23. Futamura M, Takagi Y, Koumura H, Kida H, Tanemura H. Spread of colorectal cancer micrometastases in regional lymph nodes by reactions for carcinoembryonic antigen and cytokeratin-20. *Journal of Surgical Oncology* 1998; 68: 34-40.
24. Gunn J, McCall JL, Yun K, Wright PA. Detection of micrometastases in colorectal cancer patients by K19 and K20 reverse transcription polymerase chain reaction. *Laboratory Investigation* 1996; 75: 611-616.
25. Lukyanchuk VV, Friess H, Kleff J, Osinky SP, Ayuni E, Candinas D, Roggo A. Detection of circulating tumor cells by cytokeratin-20 and prosatate stem cell antigen RT-PCR in blood of patients with gastrointestinal cancers. *Anticancer Research* 2003; 3: 2711-2716.
26. Peley G, Toth J, Csuka, Sinkovics I, Farkas E, Kovacs I. Immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction on sentinel lymph nodes can improve the accuracy of nodal staging in breast cancer patients. *Int Journal Biol Markers* 2001; 16: 227-232.
27. Wascher RA, Bostick PJ, Huynh KT, Turner R, Qi K, Giuliano AE. Detection of MAGE-A3 in breast cancer patients' sentinel lymph nodes. *British Journal of Cancer* 2001; 85: 1340-1346.
28. Deguchi T, Doi T, Ehara H et al. Detection of micrometastatic prostate cancer in lymph nodes by reverse transcriptase – polymerase chain reaction. *Cancer Research* 1993; 53: 5350-5354.
29. Gubała E, Handkiewicz-Junak D, Zeman M i wsp. Metoda RT-PCR dla tyreoglobuliny w wykrywaniu przerzutów nowotworowych do węzłów chłonnych w przebiegu zróżnicowanych raków tarczycy. *Wiadomości Lekarskie* 2001; 54: supl. 1: 349-356.
30. Burt A, Goudie RB. Diagnosis of primary thyroid carcinoma by immunohistological demonstration of thyroglobulin. *Histopathology* 1979; 3: 279-286.
31. Pisani T, Vecchione A, Sinopoli NT et al. Cytological and immunohistochemical analysis of laterocervical lymph nodes in patients with previous thyroid carcinoma. *Anticancer Research* 1999; 19: 3527-3530.
32. Pisani T, Caponetti R, Drusco A et al. Value of immunohistochemistry in the diagnosis of laterocervical masses in patients with a previous history of thyroid carcinoma. *Minerva-Endocrinol* 1997; 22: 99-102.
33. Konferencja „Rak tarczycy” Szczyrk 2000; materiały zjazdowe.
34. Venkatraman L, Maxwell P, McGluggage WG. Thyroglobulin immunoreactivity in lymph node histiocytes: a potential diagnostic pitfall 2001; 54: 314-316.
35. Bojunga J, Röddiger S, Stanisch M. et al. Molecular detection of thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of patients with thyroid disease by RT-PCR. *British Journal of Cancer* 2000; 82: 1650-1655.
36. Aust G, Crisp M, Bosenberg E. et al. Transcription of thyroid autoantigens in non-expressing tissues. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1998; 106: 319-323.