

STRESZCZENIE

WPROWADZENIE: Biopsja cienkoigłowa (BC) jest szybką, tanią metodą w diagnostyce raka piersi (RP) oraz ognisk przerzutowych tego nowotworu. Skuteczność tej metody uzależniona jest od umiejętności personelu przeprowadzającego badanie i wymaga dużego doświadczenia w zakresie cytopatologii od patologa oceniającego preparaty. Z uwagi na swoje ograniczenia BC jest obecnie wypierana przez biopsję gruboigłową (BG) i biopsję wspomaganą podciśnieniem (BGWP) z diagnostyki pierwotnej guzów gruczołu piersiowego. Pozostaje jednak metodą z wyboru w diagnostyce trudnodostępnych ognisk przerzutowych. Zgodnie z obecnie obowiązującymi standardami międzynarodowymi (konsensus St.Gallen), amerykańskimi (ASCO), europejskimi (ESMO) i krajowymi (PTOK), zarówno materiał pochodzący z guza pierwotnego, jak i wznowa powinna być przebadana w celu ustalenia właściwego rozpoznania oraz oceny czynników prognostycznych i predykcyjnych. Zalecenia obejmują ustalenie rozpoznania histopatologicznego (wraz ze stopniem zróżnicowania) i zaawansowania nowotworu zgodnie z aktualną klasyfikacją WHO oraz ocenę obecności: receptorów estrogenowego (ER) i progesteronowego (PR), białka HER2 i intensywności proliferacji (Ki67). Na podstawie powyższych danych możliwe jest przypisanie konkretnego guza do jednego z czterech podtypów immunohistochemicznych (IH4), które są surogatem podtypów molekularnych RP, a następnie ustalenie optymalnego sposobu leczenia w dobie medycyny spersonalizowanej.

Złotym standardem w zakresie ustalania powyższych czynników jest badanie histopatologiczne możliwe do przeprowadzenia na materiale pooperacyjnym oraz pochodzącym z BG lub BGWP. Metody użyte w tej diagnostyce, aby były wiarygodne, muszą być zgodne z aktualnymi zaleceniami ASCO/CAP, aprobowanymi w Polsce przez Polskie Towarzystwo Patologów (PTP).

Brak jest obecnie jednoznacznych wytycznych dotyczących wykonywania badań immunohistochemicznych na materiale cytologicznym, a opisywane w literaturze medycznej metody znacznie się od siebie różnią i mogą prowadzić do uzyskania błędnych wyników, przekładających się na suboptymalne postępowanie terapeutyczne.

CELEM pracy było porównanie zgodności reakcji immunohistochemicznych uzyskanych w preparatach cytologicznych wykonanych przy użyciu cytowirówki, utrwalanych wcześniej w formalinie (F) lub utrwalaczu RED CELL RICH firmy Shandon (Cz) z reakcjami w preparatach tkankowych opracowanych stosownie do obowiązujących standardów. Na podstawie tak uzyskanych wyników analiza możliwości ustalenia właściwego IH4 oraz wnioskowanie co do wiarygodności przeprowadzania takich badań na materiale z BC uzyskanym z ognisk wtórnych RP.

MATERIAŁ cytologiczny (47 par próbek) pozyskano pomiędzy 5.09.2013 a 7.04.2014 w ramach Etapu Pogłębionej Diagnostyki Programu Profilaktyki Raka Piersi w Zakładzie Radiologii „Diagnostyk” w Zielonej Górze od pacjentek z rozpoznaniem radiologicznym BIRADS 4 lub 5. Porównawczy materiał histopatologiczny był w 37 (78,7%) przypadkach materiałem pooperacyjnym, a w 10 (21,3%) przypadkach pochodził z BG. Badania immunohistochemiczne przeprowadzono w Zakładzie Patomorfologii Szpitala Wojewódzkiego w Zielonej Górze i Zakładzie Patologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu.

Materiał pozyskano od kobiet w wieku 50-69 lat (średnia 58,4, mediana 59 lat) z guzami ocenionymi radiologicznie (47/47 przypadków) o wielkości od 5 do 60mm (średnio 16,5, mediana 14mm) i patomorfologicznie (37z 47 przypadków) od 4 do 60mm (średnio 17,2, mediana 14mm). Charakterystyka histopatologiczna i immunohistochemiczna badanego materiału odzwierciedlała, w przybliżeniu wynikającym ze skali badania, charakterystykę materiału uzyskiwanego w dużej populacji.

METODY: BC wykonano pod kontrolą USG we współpracy ze specjalistą radiologiem. U każdej pacjentki dokonano 2-4 nakłucia igłą STERICAN BRAUN o średnicy 0,5mm (25G) i długości 40mm bez użycia aspiracji. Z tak pozyskanego materiału wykonano 2 rozmazy utrwalone natychmiast aerozolem CytoBio-Fix (BioOptica) i zabarwiono rutynowo hematoksyliną i eozyną (HE). Każdą z igieł przepłukano następnie w 1ml utrwalacza F lub Cz. Zawiesinę pozostawiono w temperaturze pokojowej przez okres 14-15 godzin. Po upływie tego czasu, po dokładnym wstrząśnięciu, materiał odwirowano w cytowirówce na szkiełka o podwyższonej adhezji i pokryto aerozolem CytoBio-Fix.

Materiał tkankowy opracowano zgodnie z obowiązującymi standardami.

Badania immunohistochemiczne (IH) przeprowadzono identycznymi metodami dla obu typów materiału wykorzystując aparaty PT Link i Autostainer Link 48 (DAKO) zgodnie z algorytmami producenta.

Przeprowadzono badanie: ER, PR, Ki67, p63, E-kadheryny oraz HER2 (HercepTest).

Materiał histologiczny oceniono w mikroskopie świetlnym, a cytologiczny zeskanowano w procedurze EFI z wykorzystaniem skanera OLYMPUS VS120 VIRTUAL MICROSCOPY SYSTEM i oceniono wirtualne preparaty. Materiał uznano za diagnostyczny przy obecności minimum 100 dobrze zachowanych komórek nowotworowych. Warunek ten spełniało po 271 (96,1%) z 282 preparatów F i Cz.

Statystyczną ocenę zgodności reakcji immunohistochemicznej w preparatach cytologicznych i preparatach tkankowych przeprowadzono na podstawie analizy współczynnika określającego odsetek zgodnych obserwacji (zgodność obserwacji oznacza, że dla próbki cytologicznej i tkankowej otrzymano według przyjętego kryterium taką samą reakcję immunohistochemiczną) w analizowanej próbce oraz współczynnika zgodności kappa. Ponadto, dla obu wykorzystanych współczynników wyznaczono przedziały ufności z poziomem ufności równym 95%.

WYNIKI: dla danych zbiorczych ze wszystkich przeprowadzonych eksperymentów uzyskano estymatę odsetka zgodnych obserwacji dla utrwalacza F wynoszącą 0,90 oraz przedział ufności 0,86-0,94 (dla poziomu ufności 0,95) i odpowiednio dla utrwalacza Cz odsetek zgodnych obserwacji wyniósł 0,93 i przedział ufności 0,89-0,96 (dla poziomu ufności 0,95).

Dla F fałszywie dodatni wynik badania immunocytochemicznego (ICC) uzyskano w 18 preparatach z 271, fałszywie ujemny w 7/271. W 1 (dotyczy oznaczenia HER2) wynik niejednoznaczny przy ujemnym w badaniu immunohistochemicznym (IHC) oraz 1 dodatni przy niejednoznacznym w IHC (w badaniu tym następnie stwierdzono obecność amplifikacji w badaniu FISH).

Dla Cz fałszywie dodatni wynik badania immunocytochemicznego (ICC) uzyskano w 17 preparatach z 271, fałszywie ujemny w 2/271. W 1 (dotyczy oznaczenia HER2)

wynik dodatni przy niejednoznaczym w IHC (w badaniu tym następnie stwierdzono obecność amplifikacji w badaniu FISH).

Dla ER zgodność wynosiła: przy użyciu F (oceniono 46 z 47 preparatów, tj. 97,9%) 0,96 (0,85-0,99) oraz kappa 0,81 (0,55-1,0), a przy użyciu Cz (46/47) odpowiednio 0,98 (0,88-1,0) i 0,90 (0,70-1,0).

Dla PR zgodność wynosiła: przy użyciu F (oceniono 45 z 47 preparatów tj. 95,7%) 0,89 (0,76-0,96) oraz kappa 0,69 (0,44-0,94), a przy użyciu Cz (45/47) odpowiednio 0,95 (0,85-0,99) i 0,88 (0,72-1,0).

Dla HER2 zgodność wynosiła: przy użyciu F (oceniono 43 z 47 preparatów tj. 91,5%) 0,95 (0,85-0,99) , a przy użyciu Cz (43/47) odpowiednio 0,95 (0,84-0,99).

Dla Ki67 zgodność wynosiła: przy użyciu F (oceniono 42 z 47 preparatów tj. 89,4%) 0,81 (0,66-0,91) oraz kappa 0,53 (0,24-0,82), a przy użyciu Cz (47/47 tj. 100%) odpowiednio 0,85 (0,72-0,94) i 0,68 (0,46-0,90).

Dla p63 zgodność wynosiła: przy użyciu F (oceniono 46 z 47 preparatów, tj. 97,9%) 0,80 (BCI 0,66-0,91) oraz kappa 0,32 (0,0-0,72), a przy użyciu Cz (43/47, tj.91,5%) odpowiednio 0,84 (0,69-0,93) i 0,39 (0,0-0,80).

Dla E-kadheryny zgodność wynosiła: przy użyciu F (oceniono 47 z 47 preparatów, tj.100%) 1,0 (0,92-1,0) oraz kappa 1,0 (1,0-1,0), a przy użyciu Cz (47/47) odpowiednio 1,0 (0,92-1,0) i 1,0 (1,0-1,0).

Dla IH4 zgodność wynosiła: przy użyciu F (oceniono 38 z 47 preparatów, tj. 80,1%) 0,81 (0,66-0,92), a przy użyciu Cz (40/47, tj. 85,1%) odpowiednio 0,90 (0,76-0,97).

WNIOSKI: w przeprowadzonym prospektywnym badaniu uzyskano doskonałą zgodność pomiędzy badaniem cytologicznym i histopatologicznym dla oznaczenia białka E-kadheryny, bardzo dobrą zgodność oznaczenia ER, PR i HER2, średnią lub niską zgodność oznaczenia Ki67 i p63. Analiza wyników badań pozwoliła na prawidłową kwalifikację IH4 znakomitej większości przypadków. Wyniki fałszywie ujemne i fałszywie dodatnie wynikały głównie z heterogennego charakteru raka piersi oraz powszechnie znanej wady BC tj. braku możliwości oceny pochodzenia komórek nowotworowych ze zmian przedinwazyjnych. Nieco lepsze wyniki uzyskano przy użyciu

utrwalacza RED CELL RICH firmy Shandon niż formaliny (brak istotności statystycznej). W przypadku pobierania BC ze zmian przerzutowych, w których wszystkie komórki nowotworowe pochodzą z guza o charakterze inwazyjnym uniknie się części fałszywych wyników, dlatego zaproponowaną metodę należy uznać za wydolną i wiarygodną. Z uwagi na przeprowadzenie badania na niewielkiej grupie pacjentek konieczne jest potwierdzenie uzyskanych wyników na większej próbie.

SŁOWA KLUCZOWE: rak piersi, biopsja cienkoigłowa, receptor estrogenowy, receptor progesteronowy, HER2, utrwalanie, immunohistochemia.