

Wstęp: Obecność przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych jest jednym z najważniejszych negatywnych czynników prognostycznych u chorych leczonych z powodu raka jelita grubego. Badania immunohistochemiczne poprawiły możliwości wykrycia w węzłach chłonnych mikroprzerzutów, a nawet pojedynczych komórek nowotworowych.

Cel pracy: Celem pracy było określenie, czy cytokeratin 20 (CK 20), cytokeratin AE1/AE3 (CK AE1/AE3), antygen błonowy nabłonka (ang. *epithelial membrane antigen* – EMA) i antygen rakowo-płodowy (ang. *carcinoembryonic antigen* – CEA) są markerami o jednakowej czułości, służącymi do oszacowania mikroprzerzutów w węzłach chłonnych u chorych operowanych z powodu raka jelita grubego.

Materiał i metody: Analizie immunohistochemicznej poddano wszystkie bloczki parafinowe węzłów chłonnych (570 węzłów) i guzów pochodzących od 50 chorych (w wieku 44–69 lat) z rakiem okrężnicy lub odbytnicy, leczonych w Centrum Onkologii w Bydgoszczy w latach 2003–2006. W żadnym z preparatów węzłów chłonnych w rutynowym barwieniu H+E nie stwierdzono przerzutów raka. Badania immunohistochemiczne wykonano metodą EnVision z wykorzystaniem monoklonalnych przeciwciał firmy Dako: CK AE1/AE3, CK 20, EMA, CEA.

Wyniki: Za pomocą metody immunohistochemicznej wykazano obecność mikroprzerzutów w 3 węzłach chłonnych pobranych od 2 pacjentów z rakiem odbytnicy, poddanych wstępnej radioterapii. Mikroprzerzuty stwierdzono na skrawkach pochodzących tylko z jednej głębokości węzła. Przerzutowe komórki nowotworowe w 3 ww. węzłach chłonnych wykazały pozytywne barwienie przeciwciałem CK AE1/AE3, natomiast negatywne na obecność CK 20, CEA, EMA.

Wnioski: Spośród markerów immunohistochemicznych najbardziej czuły dla wykrywania mikroprzerzutów okazał się CK AE1/AE3. Obecność mikroprzerzutów w skrawkach pochodzących tylko z jednej głębokości węzła wskazuje na konieczność seryjnego ich cięcia.

Słowa kluczowe: mikroprzerzut, węzeł chłonny, markery immunohistochemiczne, rak jelita grubego.

Ocena immunohistochemiczna markerów wykorzystanych do oszacowania mikroprzerzutów w węzłach chłonnych u chorych z rakiem jelita grubego

Immunohistochemical assessment of markers used for detection of lymph node micrometastases in patients with colorectal carcinoma

Hanna Andrusiewicz¹, Ewa Śrutek¹, Jarosław Jaroszek², Wojciech Zegarski²

¹Zakład Patologii Nowotworów, Centrum Onkologii im. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy

²Klinika Chirurgii Onkologicznej, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, UMK w Toruniu

Wstęp

Obecność przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych jest jednym z najważniejszych negatywnych czynników prognostycznych u chorych leczonych z powodu raka jelita grubego [1–7].

Wyróżnia się 2 rodzaje przerzutów komórek nowotworowych: mikroprzerzuty (<2 mm) i makroprzerzuty (>2 mm) [7]. Według *International Union Against Cancer* (IUAC) komórki nowotworowe, które mogą nie być dostrzeżone przez patologa oceniającego preparaty z węzłów chłonnych, barwionych rutynowo H+E, powinno nazywać się *izolowanymi komórkami nowotworowymi* (ITC).

Badania immunohistochemiczne poprawiły możliwości wykrycia w węzłach chłonnych mikroprzerzutów, a nawet pojedynczych komórek nowotworowych.

Uwaga wielu badaczy jest skupiona na węzłach *wartownikach*, które są analizowane pod kątem obecności przerzutowych komórek nowotworowych [8–10]. W niektórych doniesieniach zwraca się jednak uwagę, że ograniczenie analizy do węzłów *wartowników* nie może zastąpić sprawdzenia przez patologa wszystkich uzyskanych węzłów chłonnych [11]. Sugeruje się, że za pomocą badań immunohistochemicznych można wykryć jedną komórkę nowotworową pośród nawet 100 tys. limfocytów [7].

Materiał i metody

Osoby badane

Analizie retrospektywnej poddano wszystkie bloczki parafinowe węzłów chłonnych pochodzących od 50 chorych z rakiem okrężnicy lub odbytnicy, leczonych w Centrum Onkologii w Bydgoszczy w latach 2003–2006. Pacjenci z rakiem odbytnicy zostali poddani wstępnej radioterapii. W żadnym z preparatów węzłów chłonnych w rutynowym barwieniu H+E nie stwierdzono przerzutów raka. Do sprawdzenia wiarygodności zastosowanych barwień, guzy badanej grupy pacjentów zostały poddane analizie immunohistochemicznej. Średnia wieku pacjentów wyniosła 59 lat (44–69 lat); średnia liczba uzyskanych węzłów to 11 (7–15). Łącznie uzyskano 570 węzłów, które stanowiły przedmiot badań.

Background: Identification of lymph node metastasis is one of the most important indicators of poor prognosis in patients with colorectal carcinoma. Immunohistochemical techniques have improved possibilities of detection of micrometastases or even of isolated tumour cells in lymph nodes.

Aim of study: The aim of this study was to determine whether cytokeratin 20 (CK20), cytokeratin AE1/AE3 (CK AE1/AE3), epithelial membrane antigen (EMA) and carcinoembryonic antigen (CEA) are markers of equal sensitivity to detect micrometastases in lymph nodes of colorectal carcinoma.

Material and methods: Immunohistochemical analysis was made on all 570 formalin-fixed, paraffin-embedded lymph nodes and tumours from 50 consecutive patients (at the age from 44 to 69) with colon or rectum carcinoma. They had undergone radical resection in the Centre of Oncology in Bydgoszcz in 2003-2006. In no patients were lymph node metastases detected by routine haematoxylin-eosin staining. Immunohistochemical examination was done by EnVision method using monoclonal antibodies CK AE1/AE3, CK 20, EMA and CEA produced by Dako.

Results: Immunohistochemical method detected micrometastatic disease in three lymph nodes from two patients. Noticeable micrometastases were found in sections from only one depth of lymph nodes. All micrometastatic tumour cells showed positive staining with antibody CK AE1/AE3 and negative with CK 20, EMA and CEA.

Conclusions: From among immunohistochemical markers the most sensitive for micrometastases detection was anti-cytokeratin antibody CK AE1/AE3. Identification of lymph node micrometastases in sections from only one depth indicates them to be a serial cut.

Key words: micrometastasis, lymph node, immunohistochemical markers, colorectal carcinoma.

Immunohistochemia

Z każdego bloczka parafinowego wężła chłonnego cięto z dwóch głębokości po 2 skrawki grubości 5 µm. Były one nakładane na szkiełka podstawowe adhezyjne po 2 na każdym. Następnie podlegały standardowej procedurze umieszczenia w termostacie komorowym w temperaturze 60°C przez 2 godz. Potem były odparafinowywane w ksylenie i uwadniane w alkoholach o malejącym stężeniu. Aktywność endogennej peroksydazy hamowano 1-procentowym roztworem nadtlenu wodoru przez 10 min. Badania wykonano za pomocą metody EnVision z wykorzystaniem monoclonalnych przeciwciał firmy Dako: CK AE1/AE3 (M3515, 1:100), CK 20 (M7019, 1:200), CEA (M7072, 1:200), EMA (M0613, 1:500). Inkubacja z przeciwciałami trwała 30 min. W przypadku CK AE1/AE3, CK 20, CEA determinanty antygenowe odkrywano enzymatycznie 0,1% roztworem pepsyny przez 10 min. Natomiast przeciwciało EMA nie wymagało odślaniania determinant. Do wizualizacji użyto odczynnika EnVision+HRP (Dako, K4001) – 30 min. Chromogenem była diaminobenzzydina (Dako, K3468). Jądra komórkowe zostały podbarwione hematoksyliną. Na koniec preparaty odwodniono w szeregu alkoholi o wzrastającym stężeniu i prześwietlono w ksylenie.

Wyniki

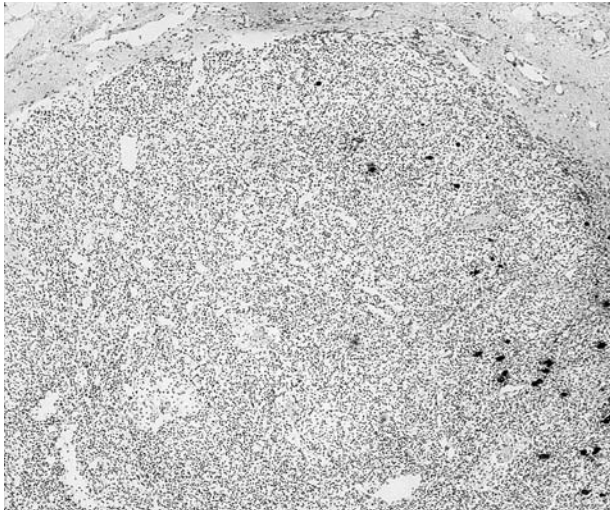
Za pomocą metody immunohistochemicznej wykazano obecność mikroprzerzutów w 3 węzłach chłonnych pobranych od 2 pacjentów z rakiem odbytnicy, poddanych wstępnej radioterapii. Mikroprzerzuty stwierdzono na skrawkach pochodzących tylko z jednej głębokości wężła. W rutynowym barwieniu H+E nie zostały one dostrzeżone przez patologa. Przerzutowe komórki nowotworowe w trzech ww. węzłach chłonnych wykazały pozytywne barwienie przeciwciałem CK AE1/AE3 (ryc. 1 i 2.), natomiast negatywne na obecność CK 20, CEA, EMA. Autorzy niniejszej pracy określili te przypadki jako grupę pacjentów z mikroprzerzutami. Spośród 50 pacjentów u 2 (4%) wykazano pozytywne barwienie koktajlem cytokeratyn CK AE1/AE3. Stwierdzono je w 3 (0,53%) z 570 węzłów chłonnych. Pozostali pacjenci zostali określani jako grupa bez mikroprzerzutów do regionalnych węzłów chłonnych.

Dyskusja

Barwienia immunohistochemiczne były wykorzystywane do identyfikacji mikroprzerzutów w różnych nowotworach złośliwych [12–15]. W tym celu używano wielu przeciwciał monoclonalnych i poliklonalnych. Autorzy niniejszej pracy w badaniach posłużyli się 4 przeciwciałami monoclonalnymi: CK AE1/AE3, CEA, CK20, EMA. Pierwsze i ostatnie przeciwciało są użytecznymi narzędziami do identyfikacji szerokiego przekroju nowotworów nabłonkowych. Natomiast CEA i CK20 są szczególnie przydatne do klasyfikowania raków pochodzących głównie z przewodu pokarmowego. Pozytywne barwienie z ich wykorzystaniem obserwowano we wszystkich guzach pochodzących od 50 pacjentów z rakiem okrężnicy lub odbytnicy po radioterapii przedoperacyjnej. Mikroprzerzuty zidentyfikowane w węzłach chłonnych wykazały pozytywną reakcję wyłącznie z anti-CK AE1/AE3. Określenie najbardziej czułych markerów służących do wykrywania mikroprzerzutów może stanowić fundament do właściwego planowania postoperacyjnej terapii pacjentów, u których stwierdzono ich obecność. Dotychczasowe badania nie określają jednak jasno wpływu ich wykrycia na planowanie chemioterapii adjuwantowej i przeżycie pacjentów. Część badaczy nie wykazała różnicy w przeżyciu między pacjentami z mikroprzerzutami a tymi bez ich obecności [16, 17]. Inni demonstrowali znaczną przewagę przeżycia pacjentów bez stwierdzonych mikroprzerzutów [3, 18]. Sprecyzowanie roli mikroprzerzutów, izolowanych komórek nowotworowych wymaga dalszych badań, szczególnie na poziomie molekularnym, w różnych typach nowotworów.

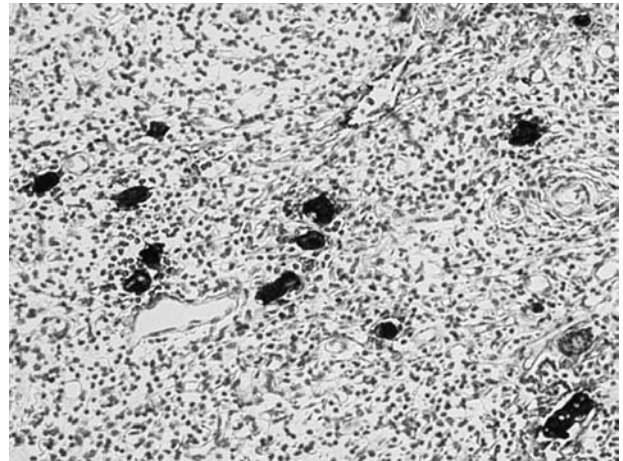
Podsumowanie

W opisanych powyżej badaniach:
1. Wykazano obecność mikroprzerzutów, co potwierdza znaczenie metod immunohistochemicznych w ich oszacowaniu.



Ryc. 1. Węzeł chłonny – barwienie anti-CK AE1/AE3 na obecność przerzutowych komórek nowotworowych (powiększenie 40 ×)

Fig. 1. Lymph node with anti-CK AE1/AE3 antibody staining for detection micrometastases (original magnification, 40 ×)



Ryc. 2. Węzeł chłonny – barwienie anti-CK AE1/AE3 na obecność przerzutowych komórek nowotworowych (powiększenie 200×)

Fig. 2. Lymph node with anti-CK AE1/AE3 antibody staining for detection micrometastases (original magnification, 200×)

2. Spośród ocenianych markerów najbardziej czuły dla wykrywania mikroprzerzutów okazał się koktajl cytokeratyn CK AE1/AE3.
3. Stwierdzono obecność mikroprzerzutu w skrawkach pochodzących z jednej z dwóch głębokości węzła, co wskazuje na konieczność seryjnego cięcia węzłów.

Piśmiennictwo

1. O'Dwyer ST, Haboubi NY, Johnson JS, Gardy R. Detection of lymph node metastases in colorectal carcinoma. *Colorectal Dis* 2001; 3: 288-94.
2. Denq H, Shu XI, Zhen HY, et al. Prognostic significance of lymph node micrometastases in colorectal cancer. *Ai Zheng* 2003; 22: 762-6.
3. Bukholm IR, Bondi J, Wiik P, et al. Presence of isolated tumour cells in mesenteric lymph nodes predicts poor prognosis in patients with stage II colon cancer. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 862-6.
4. Okuyama T, Oya M, Ishikawa H. Budding as a risk factor for lymph node metastasis in pT1 or pT2 well-differentiated colorectal adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 628-34.
5. Wood TF, Nora DT, Morton DL, et al. One hundred consecutive cases of sentinel lymph node mapping in early colorectal carcinoma: detection of missed micrometastases. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 322-30.
6. Choi HJ, Choi YY, Hong SH. Incidence and prognostic implications of isolated tumor cells in lymph nodes from patients with Dukes B colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 750-6.
7. Natarajan S, Xu F, Gilchrist K, Weber SM. Cytokeratin is a superior marker for detection of micrometastatic biliary tract carcinoma. *J Surg Res* 2005; 125: 9-15.
8. Murawa D, Filas V, Breborowicz J, et al. Evaluation of the sentinel node biopsy in colorectal carcinoma including the results of immunohistochemical examination. *Acta Chir Belg* 2007; 107: 45-8.
9. Bembenek A, Schneider U, Gretsches S, et al. Detection of lymph node micrometastases and isolated tumor cells in sentinel and nonsentinel lymph nodes of colon cancer patients. *World J Surg* 2005; 29: 1172-5.
10. Forte A, Leonetti G, Bosco M, et al. The clinical significance of lymph node micrometastases and of concept of sentinel lymph node. *G Chir* 2006; 27: 277-80.
11. Liberale G, Lasser P, Sabourin JC, et al. Sentinel lymph nodes of colorectal carcinoma: reappraisal of 123 cases. *Gastroenterol Clin Biol* 2007; 31: 281-5.

12. Starska K, Łukomski M, Józefowicz-Korczyńska M, Lewy-Trenda I. Cytokeratin antigen expression in lymph nodes – prognostic significance of clinical features of the primary tumor and lymph nodes in the presence of micrometastases in laryngeal carcinoma. *Przeegl Lek* 2006; 63: 748-51.
13. Cserni G. Axillary sentinel lymph node micrometastases with extracapsular extension: a distinct pattern of breast cancer metastasis? *J Clin Pathol* 2007 Apr 27 [Epub ahead of print].
14. Matsuyama J, Doki Y, Yasuda T, et al. The effect of neoadjuvant chemotherapy on lymph node micrometastases in squamous cell carcinomas of the thoracic esophagus. *Surgery* 2007; 141: 570-80.
15. Niikura H, Okamoto S, Yoshinaga K, Nagase S, Takano T, Ito K, Yaegashi N. Detection of micrometastases in the sentinel lymph nodes of patients with endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2007; 105: 683-6.
16. Ozmen V, Cabioglu N. Sentinel lymph node biopsy for breast cancer: current controversies. *Breast J* 2006; 12 (5 Suppl 2): S134-42.
17. García-Sáenz JA, Sáenz MC, González L, et al. Significance of the immunohistochemical detection of lymph node micrometastases in stage II colorectal carcinoma. *Clin Transl Oncol* 2006; 8: 676-80.
18. Shimoyama M, Yamazaki T, Suda T, Hatakeyama K. Prognostic significance of lateral lymph node micrometastases in lower rectal cancer. *Dis Col Rectum* 2003; 46: 333-9.

Adres do korespondencji

mgr **Hanna Andrusiewicz**
lek. **Ewa Śrutek**
Zakład Patologii Nowotworów
Centrum Onkologii im. F. Łukaszczyka
ul. Romanowskiej 2
85-796 Bydgoszcz
tel. +48 52 374 33 37
e-mail: ewa.zpn@wp.pl