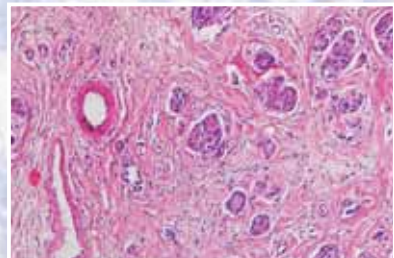
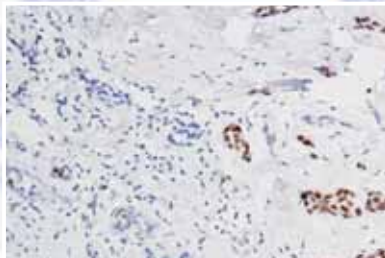
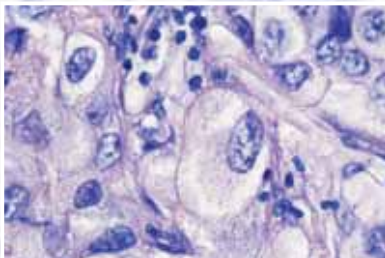


Společnost českých patologů

Doporučený postup pro histologické vyšetření karcinomu prsu

Ryška A., Nenutil R., Kolář Z.



Úvod

Biopstické vzorky prsu odebírané k určení či potvrzení diagnózy karcinomu prsu lze podle typu odběru rozdělit na:

A) **primárně diagnostické** (punkční biopsie, excisní biopsie), které slouží hlavně ke stanovení či ověření diagnózy. Naprostou převahu zde tvoří punkční biopsie (core-cut, core needle, tru cut). Excize jsou prováděny jen výjimečně (např. M. Paget, podezření na kožní infiltraci, ulcerované nádory).

B) **peroperační** (biopsie prováděné na zmražených vzorcích tkáně k předběžnému určení diagnózy a zjištění rozsahu léze), na jejichž základě se rozhoduje o rozsahu chirurgického výkonu. Peroperační biopsie jsou nevhodné k diagnostice ložisek nehmavných a pod 10 mm. V současné době je lze považovat spíše za nouzové řešení pro větší léze, které nebyly adekvátně diagnostikovány core needle biopsií

C) **definitivně diagnostické** (lumpektomie, kvadrantektomie, jednoduché mastektomie nebo radikální mastektomie). Jde o resekce celého prsu nebo jeho části zaujímající celou oblast léze nebo kvadrantu prsu, ve které se léze nachází.

Zpracování materiálu

Následující doporučení se týkají postupů popisu, zpracování a vyhodnocení tkáňových vzorků podle typu biopsie. Obsahují parametry nepodkročitelné (uvozeno "vždy" nebo "minimálně") a parametry považované za optimální (uvozeno "doporučeno").

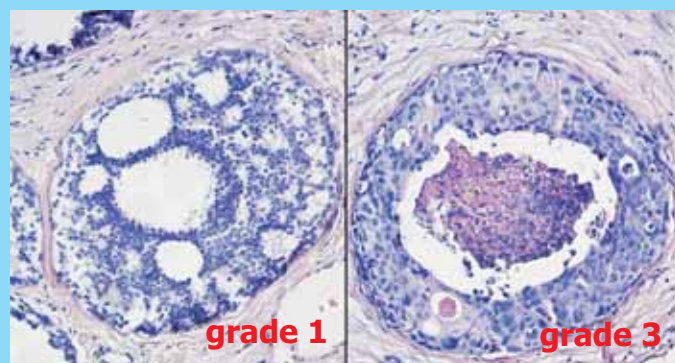
Obecná pravidla

Biologický materiál lze zpracovat po fixaci nebo v nefixovaném stavu. Okamžité zpracování umožňuje odběr pro speciální účely a zajišťuje optimální fixaci. Vcelku fixovaný materiál zase lépe zachovává anatomické poměry, zvl. vztah k resekčním okrajům. **Histopatologické vyšetření léze** za účelem její diagnostické klasifikace má podle současných poznatků absolutní prioritu před vyšetřením molekulárně-biologickým, mikrobiologickým či kryokonzervací v tkáňové bance. Odběr části tkáně pro tyto účely může provádět pouze erudovaný patolog a to jen za předpokladu, že odběr tkáně nepovede k ohrožení validity histopatologické klasifikace léze.

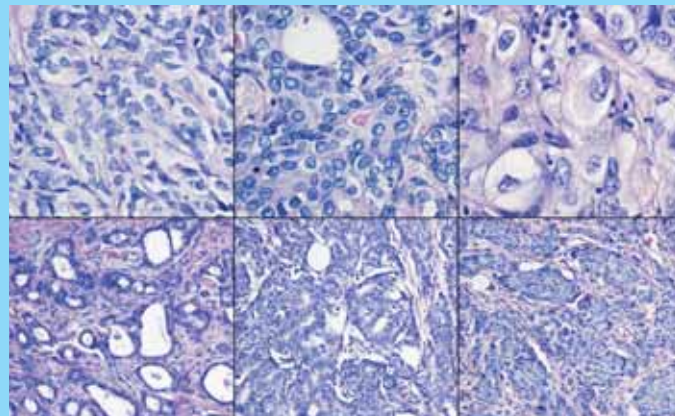
Fixace musí být vždy prováděna neutrálním formalínem, je třeba vyžadovat okamžité vložení vzorku do fixačního roztoku; je nutno dbát na dostatečný nadbytek fixační tekutiny a adekvátní čas fixace (nejméně 6 hod., nepřesáhnout výrazně 24 hod).

Vyhodnocení vždy zahrnuje histotypizaci léze, tam kde to umožňuje velikost resp. reprezentativnost vzorku dále "grading", "staging" léze (pT). Histopatologický "typing" i "grading" je prováděn dle recentní verze klasifikace WHO, histopatologický "staging" dle posledního vydání TNM klasifikace.

Pokud to velikost vzorku umožní, je vhodné stanovení odhadu procentuálního zastoupení in-situ složky a vyjádření k angioinvazi vždy (a to i negativní)



DCIS low a high grade
Duktální karcinom in situ (DCIS) - srovnání dobře (grade 1 - vlevo) a níže (grade 3 - vpravo) diferencovaného nádoru. Hlavním kritériem jsou jaderné charakteristiky - velikost a pleomorfie jader.



Grading - morfologická kritéria
Při stanovení stupně diferenciacie karcinomu prsu hrají vedle mitotické aktivity roli zejména pleomorfie jader (horní polovina obrázku - zleva nízká, středná, vysoká) a tvorba žilzových struktur (dolní polovina obrázku - zleva nad 80%, mezi 10 a 80%, méně než 10%).

alespoň z HE řezů; je možno použít imunohistochemický průkaz krevních a lymfatických endotelií. U resekčních výkonů je nezbytné stanovení vzdálenosti nádoru od resekční linie s uvedením, zda se jedná o invazivní nebo neinvazivní (in situ) komponentu nádoru. **Určení prediktivních a prognostických parametrů - "rating"** (stanovení ER, PR a c-erbB-2) je nutné provádět vždy v případě nově diagnostikovaného invazivního karcinomu. Záleží na dohodě s klinikem, zda je rating prováděn v punkční biopsii nebo až v definitivním materiálu z resekčního výkonu.

V případě že se jedná o nádor po neoadjuvantní léčbě, je nutné vyjádření ke stupni regrese. Doporučujeme některou ze semikvantitativních klasifikací regrese, např. podle Chevaliera nebo Mandarda.

Specifika zpracování a hodnocení různých typů vzorků

Punkční biopsie silnou jehlou včetně vakuové mammotomie.

Popis vždy zahrnuje počet punkčních válečků. Při zpracování do parafinových bloků válečky orientovat v podélné ose a případně zabezpečit proti ztrátě. Vždy zpracování veškerého materiálu. Z důvodu zhmoždění je u nádorů někdy obtížné a nepřesné stanovení "grade", nutný je průkaz a popis kalcifikací (možno použít RTG). Není-li vzorek podle mínění patologa reprezentativní z hlediska zastížení rentgenologicky popisované léze, je nutno to výslovně uvést.

Rating je možné provést i v punkční biopsii, ale přesnějšího výsledku je jednoznačně možné dosáhnout až z definitivního vzorku. Proto je doporučeno stanovení provádět jen ve výjimečných případech (např. před zahájením neoadjuvantní chemoterapie).

Excizní biopsie

Popis: Velikost nejméně v jednom (největším) rozměru. Barva, konzistence, viditelné ložiskové změny.

Excize obsahující kůži nutno orientovat tak, aby řezy byly vedeny kolmo na kožní povrch.

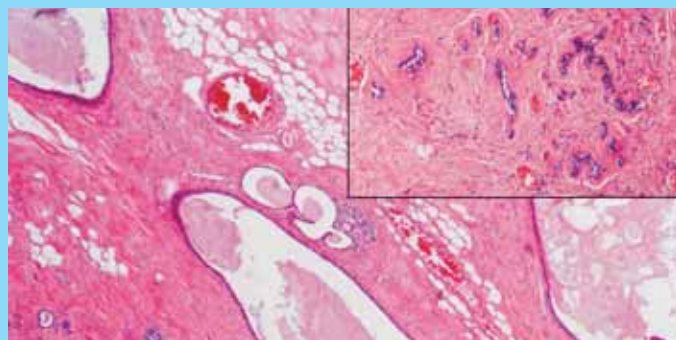
Počet bloků: u malých diagnostických excizi vždy zpracování veškerého materiálu, jinak viz lumpektomie. Staging léze (pTNM) je možné provést jen tehdy, pokud je léze kompletně odstraněna a je jasný vztah k okolním strukturám.

Lumpektomie a kvadrantektomie

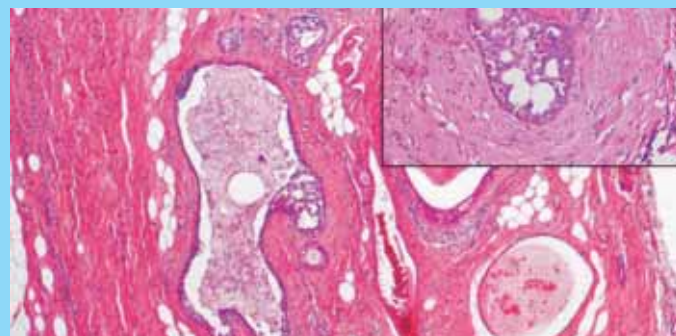
Popis: Zaznamenává se celkový tvar, velikost a charakter vzorku (tukový, fibrózní). Pokud je přítomna makroskopicky patrná léze, popisuje se její tvar, konzistence, velikost (minimálně v největším rozměru, doporučeny tři rozměry), vzdálenost od okrajů exstirpátu (minimálně od nejbližšího resekčního okraje, doporučeno popsat všechny okraje menší než 10 mm). V případě opakované (zajišťovací) resekce pro pozitivní okraje nebo resekce po předchozí mammotomii je nutné podrobněji popsat dutinu po předchozí primární biopsii, včetně rozměrů a charakteru indurované oblasti kolem dutiny, velikosti vlastní dutiny, jejího obsahu a tloušťky stěny.

Zpracování: Celý vzorek s výjimkou kůže je nutné označit tuší a sériově prokrajovat ve směru kolmém ke kůži. V případě, že je tumor nehmatný (klinicky pod 5 mm), je předpokládána pouze in situ komponenta nebo u zajišťovacích resekátů, doporučuje se přikrojení po fixaci.

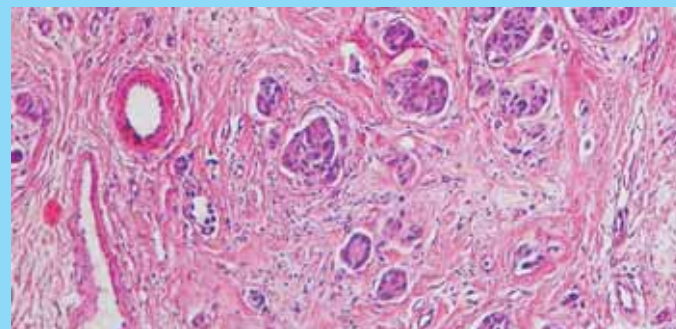
Pokud je patrná dutina po předchozí biopsii, je nutné



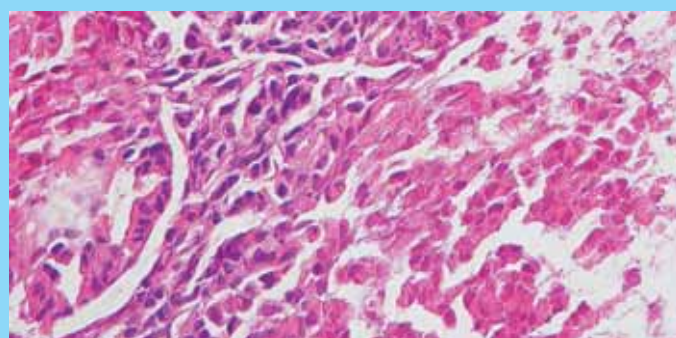
Chevalier 1 - kompletní patologická remise karcinomu prsu po neoadjuvantní chemoterapii. Patrná je pouze fibróza a atrofie žlázy s dilatací vývodů a regresivní změny terminálních duktulolobulárních jednotek (detail)



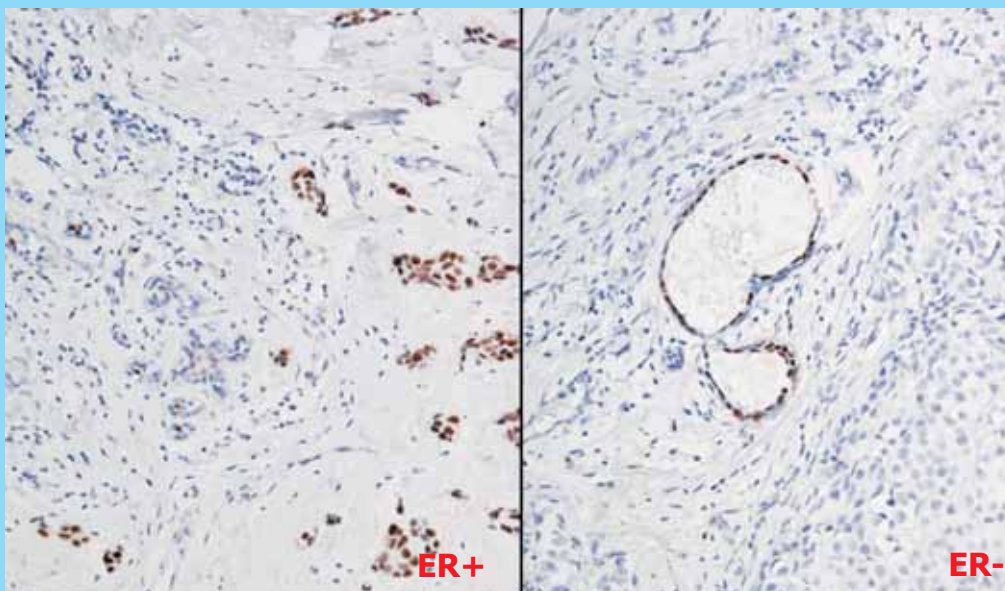
Chevalier 2 - takřka totální vymizení nádoru po neoadjuvantní léčbě. Perzistují pouze ojedinelé skupiny buněk in situ (detail)



Chevalier 3 - partiální odpověď na neoadjuvantní léčbu - přetrvává i invazivní komponenta nádoru, ten je však zřetelně regresivně změněný (přítomna bývá fibróza, kalcifikace, nekrózy).



Chevalier 4 - v případě chybění odpovědi nádoru na neoadjuvantní chemoterapii nacházíme tumor bez známek regresivních změn, případně jen s fokálními nekrózami.



Imunohistochemické stanovení exprese hormonálních receptorů - vlevo pozitivní, vpravo negativní. Struktury normální prsní žlázy slouží vždy jako pozitivní vnitřní kontrola.

ji vždy důkladně vyšetřit, doporučuje se odebírat ze stěny dutiny alespoň 4 bloky, a to z oblastí s největším podezřením na nádor. Pokud nelze odebrat až 4 bloky pro malé rozměry dutiny, zpracuje se celá.

Počet bloků: Makroskopicky nezřetelné léze (doporučuje se RTG vyšetření lamel vzorku a při odběru se řídit RTG nálezem): minimálně 2-3 bloky na 1cm suspektních fibrózních ložisek nebo největšího rozměru exstirpátu, je-li tukový. Viditelná ložiska do 10 mm kompletní zablokování, 10-40 mm: minimálně 2 bloky na 1cm největšího rozměru ložiska, nad 40mm - 8-10 bloků. U vícečetných nádorů standardním způsobem vyšetřit největší ložisko, ostatní možno redukovat až na 1-2 bloky na ložisko. Dále vždy 1-2 bloky z oblasti mimo viditelnou lézi. Vždy je nutno materiál vyšetřit tak, aby byl jednoznačně patrný vztah nádoru k resekčním okrajům. U makroskopicky dobře viditelné léze: 1 blok orientovaný kolmo na okraj z každého okraje, který je makroskopicky bližší než 10mm, ideálně i s částí tumoru. U makroskopicky nezřetelné léze: 1-2 bloky z každého okraje, nejlépe tangenciálně orientované ("shaved margins").

Mastektomie

Popis: Zahrnuje údaje orientačně o typu a velikosti vzorku (eventuálně s udáním tří rozměrů), kůže (edém, volná pohyblivost nebo fixace kůže nad ložiskem, přítomnost kožních retrakcí, ulcerací, jizev, ran), o volné pohyblivosti nebo fixaci spodinové fascie pod ložiskem, případně o adhezi (části) pectorálního svalu ke spodině, vzhledu bradavky, okrajích resekátu. Dále po prokrájení je nutné zaznamenat lokalizaci, tvar, barvu, konzistenci a velikost suspektních ložisek.

Zpracování: Spodní část resekátu zahrnující fasciální okraj by měla být označena tuší, laterální okraje značíme v případě blízkosti tumoru. Pozornost je třeba věnovat axilárnímu pólu resekátu, kde mohou být uloženy 1-2 lymfatické uzliny, které by měly být identifikovány a vyšetřeny. V případě, že je tumor blízko pod kůží a je suspekce na infiltraci kůže, vyšetřit tumor v kontinuitě s kůží. Současně by mělo být provedeno i vyšetření bradavky. Pokud neexistuje podezření na Pagetovu chorobu, stačí jeden příčný řez přes vrchol bradavky a přilehlou část dvorce. V opačném případě se prokrajuje sériově celá bradavka v intervalu asi 2-3 mm. U pacientek po neoadjuvantní chemoterapii, kde není nádor makroskopicky patrný, je nezbytné vyšetřit všechny tužší vazivové partie z oblasti, kde byl původně přítomen nádor.

Počet bloků z makroskopicky viditelné léze: viz lumpektomie. Počet bloků z okrajů: viz lumpektomie.

Axilární disekce

Popis: Je třeba zaznamenat počet a v případě nápadných odchylek i velikost, barvu a konzistenci nalezených lymfatických uzlin. Pokud je axilární obsah chirurgem kompletně odebrán, pohybuje se počet nalezených lymfatických uzlin okolo 10-25.

Zpracování: Každá z nalezených lymfatických uzlin má být vyšetřena v separátním bloku (1 blok z každé uzliny). Pro zviditelnění uzlin v tukové tkáni lze použít speciální fixativa s kyselinu octovou (Bouin, Carnoy, Methacarn); je však třeba upozornit, že použití těchto fixativ znemožní provedení vyšetření FISH na těchto vzorcích (má význam u vzorků z metastatického nádoru, který může mít jiný fenotyp než primární nádor).

Zásadní je zjištění počtu lymfatických uzlin s metastázou karcinomu a zjištění poměru negativních a pozitivních uzlin. Dále by měl být zaznamenán maximální průměr metastázy a případná extenze nádoru za pouzdro uzliny. Pokud je nalezeno méně než 10 uzlin a je vyloučeno, že by chirurg provedl jen tzv. nízkou disekci, mělo by se v archivovaném zbytkovém materiálu pátrat po zbývajících uzlinách. V případě nálezu metastázy je vhodné alespoň u jedné uzliny provést vyšetření hormonálních receptorů a HER-2/neu, protože metastatické ložisko může mít díky klonální selekci jiný fenotyp než primární ložisko nádoru.

Pravidla pro histopatologický "rating"

Povinností je vždy vyšetřit expresi hormonálních receptorů (estrogenových (ER) a progesteronových (PR)) a status HER-2/neu (c-erbB-2) u všech invazivních karcinomů. Hormonální receptory u in situ lézí (DCIS a LCIS) je doporučeno vyšetřit v těch případech, kde onkolog uvažuje o hormonální terapii nádoru.

Jiné prognostické či prediktivní znaky je doporučeno vyšetřovat jen na výslovnou žádost klinika. Patologicko-anatomická pracoviště, která provedou první diagnózu invazivního karcinomu prsu, jsou zodpovědná za zajištění imunohistochemického vyšetření ER, PR i HER-2/neu. V případě, že pracoviště nemá patřičné technické vybavení či zkušenosti s imunohistochemickou technikou, požádá některé z jiných technicky a metodicky adekvátně vybavených pracovišť o provedení patřičných vyšetření.

Provádění imunohistochemie i FISH na vzorcích fixovaných či zpracovaných nestandardním způsobem se nedoporučuje, neboť může být zatíženo značnými artefakty, případně nemusí být vůbec proveditelné. Výsledek může být ovlivněn rovněž prodlouženou fixací ve formalínu, případně u objemných vcelku fixovaných resektátů autolýzou.

Vyšetření hormonálních receptorů

Imunohistochemické vyšetření ER a PR má být prováděno na formalínem fixovaných a do parafínu zalitých tkáňových vzorcích všech invazivních karcinomů prsu a jejich recidiv. Při stanovení negativního výsledku vyšetření receptorů je nutné vždy přihlídnout k vnitřní pozitivní kontrole v řezu (vývodové epitelie), pokud je přítomna. Jestliže je vnitřní kontrola rovněž negativní, mělo by vyšetření být opakováno s agresivnějším demaskováním antigenu či z jiného bloku; v případě opakovaně negativního výsledku i ve vnitřní kontrole hodnoceno jako neinterpretovatelné (tedy ne jako negativní).

Při vyhodnocení je třeba vždy uvádět % pozitivních jader. V případě, že po dohodě s kliniky je použit i jiný skórovací systém, například jednoduché H-skóre (% pozitivních jader x intenzita barvení vyjádřena subjektivně 3 stupni, 1 - slabá, 2 - střední, 3- silná) apod., je nutno vždy uvést rozsah škály možných hodnot výsledného skóre. Práh positivity ER a PR se doporučuje stanovit na 5 % pozitivních jader nádorových buněk. Do výsledků se doporučuje zaznamenat použitou protilátku (zdroj, u monoklonálních i klon).

Vyšetření HER-2/neu

Vyšetření se hodnotí vždy pouze v invazivním karcinomu; v případě, že nádor sestává z invazivní i neinvazivní složky, in situ komponenta se nehodnotí. U pacientek, kde není k dispozici vzorek primárního nádoru s invazivní komponentou, je nutné provést vyšetření metastázy nebo lokální recidivy.

Stanovení HER-2/neu je třeba provádět a interpretovat ve vzájemném kontextu histologického, imunohistochemického a hybridizačního vyšetření kvalifikovaným histopatologem, zejména za účelem objektivního rozlišení struktur invazivního a neinvazivního karcinomu.

Hodnocení je prováděno buď na úrovni proteinu (imunohistochemicky), nebo na úrovni DNA (in situ hybridizací).

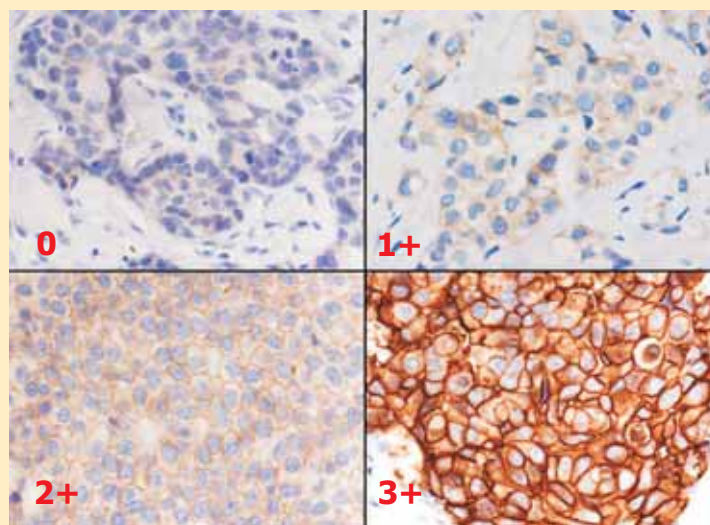
Imunohistochemické vyšetření slouží k určení overexprese proteinu HER-2/neu. U většiny případů koreluje overexprese proteinu s amplifikací genu HER-2/neu; její stanovení se provádí pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH), méně vhodně pomocí chromogenní in situ hybridizace (CISH) či in situ hybridizace s impregnací stříbrem (SISH).

K léčbě trastuzumabem (Herceptin®) či lapatinibem (Tyverb®) jsou indikovány pacientky, které jsou imunohistochemicky silně pozitivní (3+) a/nebo FISH pozitivní.

Při hodnocení imunohistochemie se používá skóre založené na membránové pozitivitě (0 až 3+); stupně 0 a 1+ se považují za negativní výsledek, výsledek 2+ je slabě pozitivní (hraniční) a musí být vždy doplněn FISH vyšetřením. Výsledek 3+ je silně (jednoznačně) pozitivní.

Do výsledků se doporučuje zaznamenat užitou protilátku (zdroj, u monoklonálních i klon).

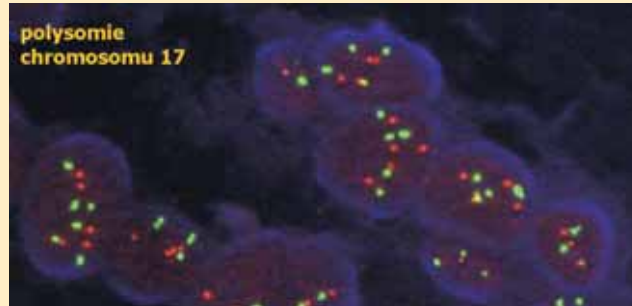
V ČR existuje shoda mezi Společností českých patologů, Českou onkologickou společností a zdravotními pojišťovnami, že všechny případy, kde výsledek imunohistochemického vyšetření HER-2/neu je 2+ nebo 3+, budou opakovaně vyšetřeny na některém ze specializovaných referenčních pracovišť doporučených Společností českých patologů (viz níže). Imunohistochemické vyšetření a vyšetření FISH je v těchto laboratořích



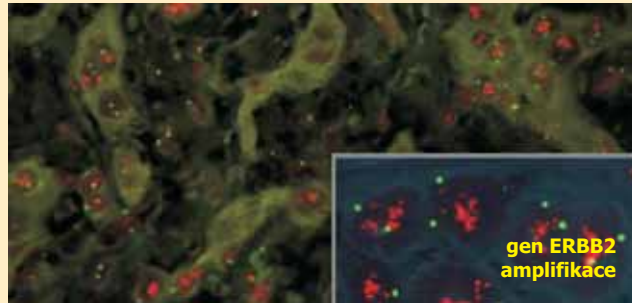
Stupně exprese proteinu HER-2/neu při imunohistochemickém vyšetření certifikovaným kitem - typické obrazy exprese 0, 1+, 2+ a 3+.



Při vyšetření amplifikace genu HER2 pomocí FISH slouží centromerická oblast 17. chromozomu jako referenční hodnota počtu chromozomů. Pokud není amplifikace přítomna, nepřevyšuje počet signálů HER2 (červené) v jednotlivých buňkách počet centromerických signálů (zelené) více než 1,8krát.



V případě polysomie chromozomu 17 je zvýšen nejen počet červených signálů genu HER2, ale také počet červených centromerických signálů - poměr mezi však zůstává obdobný, jako u normálních buněk.



V případech silné amplifikace genu HER2 je počet červených signálů někdy tak vysoký, že dochází k jejich splyvání ve formě objemných shluků. Vnitřní kontrolou je normální (tj. 2 kopie) počet zelených centromerických signálů.

prováděno pomocí certifikovaných kitů a postupů. Důvodem je extrémní nákladnost biologické léčby a zajištění dostatečně vysoké spolehlivosti výsledků vyšetření.

Seznam specializovaných laboratoří sloužících jako referenční pracoviště pro vyšetření HER2 (stav leden 2009)

- Ústav patologie 1. LF UK a VFN, Praha
- Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FNM, Praha Motol
- Fingerlandův ústav patologie LF UK a FN, Hradec Králové
- Referenční laboratoř pro stanovení c-erb-B2 LF UP, Olomouc
- Patologicko-anatomické oddělení MOÚ, Brno
- Bioptická laboratoř, Plzeň

Literatura

Tavassoli A, Devilee P (edits): Tumours of the Breast and Female Genital Organs. WHO Classification of Tumours, Pathology & Genetics. IARC Press, Lyon 2003.

Lester SC: Manual of Surgical Pathology. Churchill Livingstone, New York 2001. Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology: Recommendation for the Reporting of Breast Carcinoma. Am J Clin Pathol (1995) 104: 614-619.

Henson DE, Oberman HA, Hutter RVP: Practice Protocol for the Examination of Specimen Removed from Patients with Cancer of the Breast. A Publication of the Cancer Committee, College of American Pathologists. Arch Pathol Lab Med (1997) 121: 27-33.

Podhola M, Urminská H: Kombinované radiologické a mikroskopické vyšetření nehmavných lézí prsu s mikrokalcifikacemi. Česk Patol (2004) 40: 12-17.

Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, et al. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Cancer (1994) 73: 2680-6.

Chevallier B, Roche H, Olivier JP, Chollet P, Hurteloup P: Inflammatory breast cancer. Pilot study of intensive induction chemotherapy (FEC-HD) results in a high histologic response rate. Am J Clin Oncol (1993) 16: 223-8.

Webové odkazy

- Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology: www.adasp.org
- College of American Pathologists: www.cap.org
- Společnost českých patologů ČLS JEP www.patologie.info