

Úloha patológa v diagnostike nádorov z neznámeho primárneho ložiska

doc. MUDr. Karol Kajo, PhD.

Ústav patológie SZU a OÚSA, Bratislava

Metastatické nádory z neznámeho primárneho pôvodu (cancers of unknown primary – CUP) tvoria 3 – 5 % všetkých malígnych nádorov. Z hľadiska histogenézy a klinickej prezentácie CUP predstavujú heterogénnu skupinu nádorov, v ktorej sú najviac zastúpené adenokarcinómy. Kľúčovým momentom diagnostického algoritmu CUP je bioptické vyšetrenie, ktoré je viacstupňové. Na prvej úrovni ide o dôkaz histogenetického pôvodu nádoru, nasleduje jeho ďalšia subtypizácia a na tretej úrovni sa získavajú informácie zamerané na identifikáciu orgánového pôvodu primárneho nádoru. Zlatý štandard v bioptickej diagnostike CUP je imunohistochemická analýza. Pomocou nej je možné hodnotiť prítomnosť niektorých štrukturálnych bunkových proteínov, respektíve rôznych transkripčných faktorov a bunkových produktov. Imunohistochemické vyšetrenie je založené na stratégii algoritmov, pomocou ktorých sa stavia diagnóza na základe dôkazu alebo absencie expresie vybraných markerov na jednotlivých úrovniach algoritmu. Najvýznamnejšími diagnostickými markermi sú intermediárne filamentá, napríklad cytokeratíny a vimentín. Pomocou hodnotenia kombinácie vybraných typov cytokeratínov, napríklad CK7 a CK20, je možné v časti prípadov CUP identifikovať orgán vzniku primárneho nádoru. Menej sa využíva elektrónová mikroskopia, cytogenetika a prínosná môže byť aj molekulovo-genetická analýza CUP.

Diagnostika CUP je extrémne ťažká, pretože nejde o hodnotenie jedného nádoru, ale celého spektra histogeneticky a biologicky odlišných malígnych nádorov so značne rozdielnymi prognostickými charakteristikami a klinickou prezentáciou. Samotná bioptická diagnostika nie je schopná riešiť tento problém a patológ sa tak stáva závislým od dodatočných klinických informácií a výsledkov zobrazovacích metód.

Kľúčové slová: zhubný nádor, karcinóm, metastáza, neznámy pôvod, biopsia, imunohistochemia.

Role of pathologist in the diagnosis of cancer of unknown primary origin

Metastatic tumors of unknown primary origin (cancer of unknown primary – CUP) account for 3-5% of all malignant tumors. In terms of histogenesis and clinical presentation CUP is a heterogeneous group of tumors, in which adenocarcinomas predominate. The key moment of diagnostic algorithm of CUP is biopsy, with multistep evaluation. At the first level, histogenetic origin of the tumor is established, than followed by its further subtyping, and the third level is designed to obtain information identifying the organ site of the primary tumor. Gold standard in the diagnosis of CUP is immunohistochemical analysis, which is able to detect certain structural cell proteins, e.g. various transcription factors and cell products. Immunohistochemical examination is based on algorithms, building the diagnosis on evidence or absence of expression of selected markers at each level of the algorithm. The most important diagnostic markers are intermediate filaments, for example cytokeratins and vimentin. Using a combination of selected types of cytokeratins, for example CK7 and CK20, it is possible in some cases of CUP to identify the site of the primary tumor. Less frequently are used electron microscopy and cytogenetics, and some benefit can be also obtained by molecular analysis of CUP.

Diagnosing CUP is extremely difficult, because it is not only an evaluation of the single tumor entity, but comprises the whole spectrum of histogenetically and biologically diverse malignant tumors with significantly different prognostic and clinical characteristics. Examination of the biopsy is not able to solve this problem alone, and the pathologist becomes dependent on additional clinical information and results from the imaging studies.

Key words: cancer, carcinoma, metastasis, unknown primary, biopsy, immunohistochemistry.

Onkológia (Bratisl.), 2013; roč. 8(4): 210–215

Úvod

Nádor môže vzniknúť v ktoromkoľvek tkanive alebo orgáne ľudského organizmu. Vo väčšine prípadov je prvým krokom malígneho nádorového procesu prezentácia vo forme primárneho ložiska. V 10 – 15 % všetkých malígnych nádorov však dochádza najskôr k prezentácii vo forme regionálnych alebo vzdialených metastatických ložísk, pričom primárne ložisko ostáva skryté. Ide o malígny nádor neznámeho primárneho pôvodu alebo *Ca e loco ignoto* – angl. cancer of unknown primary – CUP (1). V polovici až v dvoch tretinách prípadov CUP sa primárne ložisko objasní až v priebehu ďalšieho vyšetro-

vania (2, 3). CUP je teda definovaný ako histologicky potvrdené metastatické ochorenie bez dôkazu primárneho ložiska po štandardnom diagnostickom vyšetrení (1, 4, 5). Medzi CUP patria jednak metastázy (MTS) nádorov s jasnou histogenézou (napríklad adenokarcinóm), ale neznámy primárnym miestom vzniku, ale aj MTS zle diferencovaných nádorov bez špecifických morfológických črt, t. j. nádorov so zotretými morfológickými charakteristikami a nejasnou histogenézou (napríklad epitelový verzus mezenchýmový pôvod) (6). Primárny nádor sa nemusí nájsť z niekoľkých vysvetliteľných príčin: a) je veľmi malý a rastie poma-

ly (mnohé z týchto nádorov majú menej ako 1 cm a zriedkavo sa tieto nádory nájdu niekoľko týždňov, respektíve mesiacov od stanovenia CUP), b) podľahne vystupňovanej regresii (fenomén známy pri testikulárnych nádoroch ako „burned-out primary“) alebo c) bol odstránený a „prehliadnutý“ pri predchádzajúcom zákroku za iným účelom (napríklad endometriálny karcinóm odstránený pri hysterektómii pre závažné infekčné ochorenie) (5, 7). Na druhej strane však CUP môže predstavovať samostatnú entitu so špecifickými genetickými a fenotypovými alteráciami, o biológii ktorých máme v súčasnosti limitované poznatky (8).

Klinicko-patologické charakteristiky CUP

CUP tvorí približne 3 – 5 % všetkých malígnych diagnóz a patrí medzi 10 najčastejších malígnych nádorov s vysokou mortalitou (1, 4, 8 – 10). CUP sa vyskytujú najmä u mužov a postihujú prevažne dospelých (deti predstavujú menej ako 1 %), pričom medián veku v čase prezentácie sa pohybuje v rozpätí 65 – 90 rokov (11). Z hľadiska klasifikácie a klinickej prezentácie sú CUP veľmi heterogénnou skupinou nádorových ochorení, ktoré sa klinicky prejavujú včasnou disemináciou, nepredvídateľným a agresívnym biologickým správaním. Väčšina veľkých štúdií potvrdila, že najčastejšími primárnymi nádormi, ktoré sa počiatočne prezentujú ako CUP, sú karcinómy pľúc a pankreasu, po ktorých nasledujú karcinómy hrubého čreva, prsníka a prostaty (3, 5). Najčastejšími miestami metastázovania sú pečeň, pľúca, kosti, mozog, krčné, inguinálne a axilárne LU a aj peritoneálna a pleurálna seróza dutina (3). Pri pitve sa odhalí pôvod približne 50 – 75 % CUP, a to najmä v pľúcach (17 – 27 %), v pankrease (20 – 26 %), v pečeni a biliárnom trakte (3 – 11 %), v obličkách a v nadobličkách (4 – 8 %), v hrubom čreve a v konečníku (4 – 10 %), v genitálnom trakte (7 %), v žalúdku (3 – 8 %) a v prsníku (2 %) (11, 12). Naproti tomu doterajšie štúdie génovej expresie poukázali najčastejší pôvod CUP v prsníku, hrubom čreve, žlčových cestách a v močovom systéme (1). Charakter šírenia CUP v čase diagnózy môže napomôcť pri hľadaní primárneho ložiska. Pľúcne MTS sú dvakrát častejšie pri primárnych nádoroch nad bránicou, napríklad v prsníku, a MTS v pečeni signalizujú skôr pôvod nádorového procesu pod bránicou, napríklad v pankrease, gastrointestinálnom trakte a ďalších brušných orgánoch (5).

Prognóza pacientov s CUP je všeobecne zlá, s mediánom prežívania len 4 – 12 mesiacov. Približne polovica prípadov prežije 1 rok a asi 10 % je nažive 5 rokov od stanovenia diagnózy (9, 10). Len 15 – 20 % pacientov s CUP má priaznivý priebeh ochorenia s diferencovanými alebo chemosenzitívnymi nádormi. Ostatné prípady sa vyznačujú vysoko agresívnym potenciálom s nepredvídateľným metastatickým šírením. V týchto prípadoch ide zvyčajne o nádory, ktoré sú refraktérne na liečbu štandardnou chemoterapiou (1, 8). Nepriaznivými prognostickými faktormi pri CUP sú viscerálne MTS adenokarcinómu (napríklad do pečene), malígne ascites pri nepapilárnych nádoroch, početné MTS do mozgu alebo pľúc a pleury, postihnutie nadobličiek, viacpočetné systémové kostné MTS, skvamózne karcinómy v oblasti brušnej dutiny a panvy (1, 8, 11). Na druhej

strane, prípady s lepšou prognózou sú obyčajne zle diferencované karcinómy distribuované v stredovej línii („midline“), skvamózne karcinómy postihujúce krčné a inguinálne LU, izolované MTS v LU, zle diferencované neuroendokrinné (NE) karcinómy (napríklad z Merkelových buniek), malé a resekovateľné nádory, viscerálne MTS s kolonickým imunoprofilom (CK7-/CK20+/CDX2+) a u žien sú to papilárne adenokarcinómy v peritoneálnej dutine a adenokarcinómy postihujúce len axilárne LU (1, 2, 8, 10, 11).

Klasifikácia CUP

Liečba nádorov je nastavená podľa orgánu alebo tkaniva, v ktorom nádor vznikol. Preto je jednou z najdôležitejších požiadaviek pri CUP identifikácia primárneho ložiska a klasifikácia týchto nádorov na základe histogenézy a orgánovej lokalizácie (13). Inými slovami, klasifikácia nádorov je založená na rozdieloch medzi rôznymi nádormi a na spoločných charakteristikách, ktoré majú s normálnymi tkanivami, z ktorých vznikajú (3). CUP sa na základe histopatologických charakteristík rozdeľujú na: a) **adenokarcinómy** (dobré a stredne diferencované) – predstavujú približne 50 – 60 % všetkých CUP; b) **zle diferencované karcinómy** – tvoria okolo 30 % CUP, v tejto skupine sú aj zle diferencované adenokarcinómy; c) **skvamózne karcinómy** – zastupujú približne 5 – 15 % všetkých CUP; d) **neuroendokrinné (NE) tumory**, ktoré sú rozdelené na dobre diferencované NE tumory a zle diferencované NE karcinómy a tvoria približne 4 %; e) **ostatné, respektíve nediferencované neoplazmy** – sem patria bližšie nešpecifikované karcinómy, malígne lymfómy, nádory zo zárodočných buniek, melanómy a sarkómy (asi 5 %) (1, 3, 4, 7, 9, 10, 11). Z nich až 35 – 65 % tvoria non-Hodgkinove lymfómy, pre ktoré je efektívna cytostatická liečba (7). Z uvedeného prehľadu je zreteľné, že adenokarcinómy spolu so zle diferencovanými karcinómami tvoria približne 90 % CUP (3), a preto si tieto skupiny nádorov zasluhujú zvýšenú pozornosť.

Bioptická diagnostika CUP

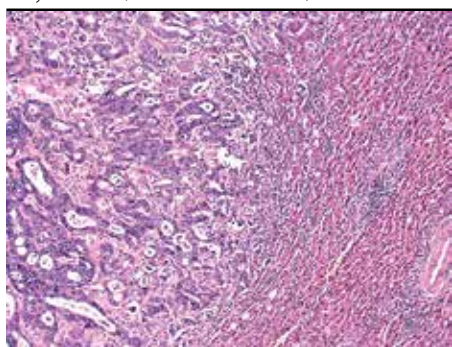
Diagnostika CUP je veľmi ťažká a pripomína skladanie zložitého obrázka, ktorého jednotlivé časti predstavujú informácie získané v priebehu diagnostického procesu. Riešenie CUP si jednoznačne vyžaduje multidisciplinárny prístup (14). Jedným z kľúčových momentov diagnostického algoritmu CUP je bioptické vyšetrenie, pričom biopsia môže byť odobratá v rôznom štádiu vyšetrovacieho procesu (3). Patológovi sa zašle vzorka nádorového tkaniva (zvyčajne

ako punkčná biopsia alebo probatórna excízia, menej často ako orgánový resekát) spolu s informáciami získanými v prebiopтической fáze. Množstvo a správnosť týchto údajov môžu značne ovplyvniť rozhodovanie v priebehu biopického vyšetrenia. Už všeobecné údaje, ako sú vek, pohlavie a lokalita metastatického ložiska, vytvárajú prvotný pohľad na vyšetrovaný nádor (14). Napríklad, u starších mužov s charakteristickou distribúciou MTS do skeletu môže ísť o propagáciu karcinómu prostaty, ktorý tvorí približne 3 % CUP (5). V prípadoch s väčšími resektami je navyše možnosť získania ďalších cenných makroskopických charakteristík (konzistencia, charakter reznej plochy, kolorit a pod.), ktoré je možné využiť v následnom diferenciálno-diagnostickom procese (14).

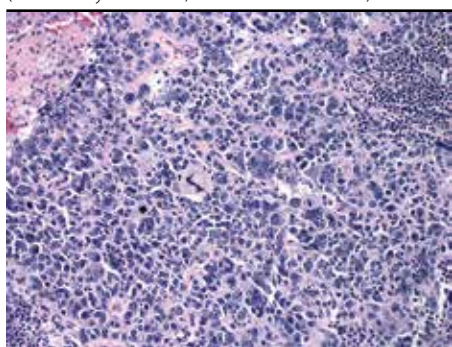
■ Histomorfologické vyšetrenie CUP

Biopické vyšetrenie je založené najmä na hodnotení histomorfologických znakov, ktoré sú dané cytologickými a mikroarchitektonickými charakteristikami. Adenokarcinómy si zachovávajú aspoň rudimentárnu tvorbu žľazových štruktúr (obrázok 1) a produkciu hlienových substancií, ktoré je možné dokázať špeciálnymi farbeniami (PAS, mucikarmín, Alcianová modrá, a pod.). Skvamózne karcinómy tvoria bunky s hojnou eozinofilnou cytoplazmou, môžu vykazovať rohovenie a v prevažnej časti si zachovávajú medzibunkové adhézie vo forme mostíkov. Dobre diferencované NE tumory sa prezentujú tvorbou rozetovitých formácií s uniformnými jadrami a špeciálnym chromatinom charakteru „salt-and-pepper“. Mnohé z metastatických nádorov vykazujú mikroskopické črty sugestívne pre určité miesta (orgány) vzniku, napríklad tvorba folikulových formácií vyplnených koloidom alebo papilárnych štruktúr svedčí pre primárny nádor v štítnej žľaze. Výskyt extenzívnych nekroz v MTS, tzv. „dirty necrosis“, je spojený s kolorektálnym adenokarcinómom (obrázok 2). MTS zložené z buniek tvaru pečatného prsteňa najčastejšie pochádzajú z karcinómov žalúdka alebo ďalších častí gastrointestinálneho traktu. Svetlobunkové karcinómy majú charakteristický pôvod v obličke alebo v ženskom genitálnom systéme. Sarkomatoidné typy karcinómov najčastejšie vznikajú v pľúcach a obličkách a bifázické nádory sú typické pre gynekologický trakt a pľúca. Pri „sarkomatózne“ vyzerajúcich nádoroch treba veľmi starostlivo (napríklad imunohistochemickým vyšetrením cytokeratínov) vylúčiť alebo potvrdiť aj možný metaplastický karcinóm z prsníka alebo ženského genitálneho traktu. Sú však aj neoplazmy, ktorých morfológický charakter sice umožňuje stanovenie

Obrázok 1. Metastáza adenokarcinómu (ľavá časť obrázka) v pečeni. Nádor je zložený z nepravidielných glandulárnych štruktúr (Hematoxylin-eozín; zväčšenie 100-krát)



Obrázok 3. Metastáza nediferencovanej neoplazmy v lymfatickej uzline. Prítomný bunkový pleomorfizmus a zvýšená mitotická aktivita (Hematoxylin-eozín; zväčšenie 200-krát)

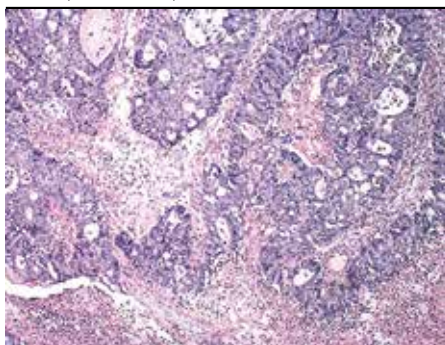


diagnózy, ale určenie exaktného pôvodu lézie je ťažké, napríklad MTS skvamózneho karcinómu v LU krku svedčí pre primárny nádor v rozsiahlej oblasti hlavy a krku. Iné metastatické ložiská zas vykazujú identické morfológické črty nádorov, ktoré sa primárne môžu vyskytovať v rôznych orgánoch, napr. adenoidne cystický karcinóm môže primárne vzniknúť v slinných žľazách, pľúcach, prsníku, koži a v slzných žľazách. Maligné melanómy sú histomorfologické chameleóny, ktoré môžu vykazovať tak epiteloidné, ako aj sarkomatoidné črty a môžu metastázovať do akéhokoľvek orgánu. Určenie miesta vzniku malígneho melanómu je niekedy takmer nemožné, napríklad pri kompletnej regresii pôvodného ložiska (14).

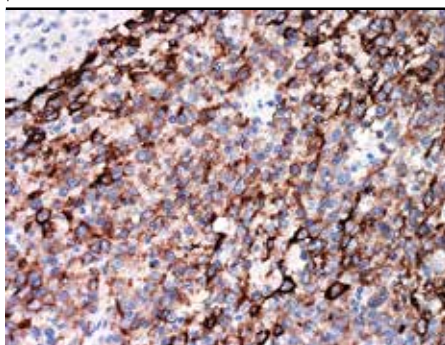
■ Imunohistochemické vyšetrenie CUP

Po úvodnom zhodnotení morfológického obrazu v štandardnom farbení hematoxylinom-eozínom sa okrem prípadných uvedených špeciálnych farbení volí vyšetrenie expresie vybraných imunohistochemických (IHC) markerov. Pomáhajú identifikovať histogenetický pôvod a bližšie lokalizovať primárny nádor. Ide o stratégiu založenú na postupných krokoch, t. j. algoritme, kde sa konečný výsledok získa na základe kombinácie pozitívnych a negatívnych výsledkov na jednotlivých úrovniach diagnostického algoritmu (1, 3). V súčasnosti je IHC analýza

Obrázok 2. Metastáza adenokarcinómu hrubého čreva v koži. Prítomné rozsiahle nekrózy (Hematoxylin-eozín; zväčšenie 100-krát)



Obrázok 4. Dôkaz cytokeratínu (AE1/AE3) v nádorových bunkách potvrdzuje epitelový pôvod nádoru



zlatý štandard v diagnostike CUP a zároveň je cenovo najefektívnejší nástroj pri identifikácii primárneho nádoru (1). IHC je však len pomocná, doplnujúca metóda k svetelnej mikroskopii. Základná podstata IHC je identifikácia niektorých štrukturálnych bunkových komponentov, enzýmov, hormónových receptorov, hormónov, onkofetálnych proteínov a iných substancií, ktoré sú charakteristické pre niektoré bunkové typy v zdravom adultnom či fetálnom tkanive alebo sú prejavom neoplastickej transformácie. IHC diagnostika CUP je zvyčajne viacstupňová. Na prvej úrovni ide o dôkaz histogenetického pôvodu nádoru, nasleduje jeho ďalšia subtypizácia a na tretej úrovni sa získavajú informácie zamerané na identifikáciu orgánového pôvodu primárneho nádoru (15).

■ Prvý stupeň IHC algoritmu – určenie histogenetického pôvodu MTS

Základná otázka, na ktorú musí patológ zodpovedať, je určenie histopatologického typu nádoru. Prvým stupňom IHC algoritmu je teda stanovenie histogenetického pôvodu metastázy, t. j. či ide o MTS karcinómu, malígneho melanómu, prezentáciu malígneho lymfómu, nádoru zo zárodočných buniek alebo sarkómu. Treba si uvedomiť, že histomorfologické črty v metastatickom tkanive nie sú také patognomické ako v primárnom ložisku alebo v zdravom tkanive (1). Vo svetelnej mikroskopii je patológ schopný charakterizovať bunkovú morfológiu a nádorový

diferenciáciu (napríklad MTS karcinómu v LU), avšak len na základe týchto charakteristík nie je obyčajne možné definitívne diagnostické rozhodnutie. Mnohokrát nasleduje diferenciálno-diagnostická rozvaha založená na vylúčení ostatných typov histomorfologicky bližšie nešpecifikovaných, respektíve nediferencovaných nádorov, ako sú lymfómy, melanómy a sarkómy – obrázok 3 a 4 (3). Na to slúži IHC analýza postavená na zhodnotení panelu viacerých sledovaných markerov, ktoré sú vybrané podľa diferenciálnej diagnostiky danej lézie. Pritom sa predpokladá, že metastatický nádor bude exprimovať rovnaké antigény ako primárny nádor. Do panelu sú vybrané nielen ukazovatele, ktoré sú očakávané ako pozitívne, ale aj markery, ktorých negatívita môže pomôcť pri výslednom rozhodovaní. Takouto vylučovacou metódou sa zužuje diagnostické spektrum (3). Základné histogenetické typy nádorov a IHC markery na ich diagnostiku sú uvedené v tabuľke 1. Všeobecne povedané, základnými markermi epitelovej diferenciácie sú cytokeratíny (CK) a epitelový membránový antigén (EMA), a teda tieto dva markery budú exprimované vo väčšine karcinómov. Pre mezenchýmový pôvod lézie svedčí expresia vimentínu, ktorý dopĺňa dôkaz ďalších markerov podľa rôznych diferenciačných línií nádoru. Za ukazovateľ neuroektodermovej diferenciácie sa považuje S100 proteín, ktorý predstavuje hlavný IHC znak malígneho melanómu. Detekcia LCA podporuje hematopoetický pôvod a bude prítomná pri lymfoproliferatívnych, respektíve leukemických neoplastických léziách. Expresia diagnostických markerov však môže byť v metastatickom ložisku redukovaná, môže dochádzať k prekryvaniu expresie niektorých markerov medzi rôznymi nádormi a navyše je nutné počítať aj s výskytom atypickej alebo aberantnej expresie. Všetky tieto faktory je potrebné racionálne zhodnotiť, pretože by mohli viesť k nesprávnej diagnóze. Výsledok IHC analýzy je tak závislý nielen od spracovania vzoriek a technických podmienok, ale aj od interpretácie a skúseností hodnotiaceho patológa. Príkladom môže byť expresia CK v niektorých typoch sarkómov, napríklad v epiteloidnom sarkóme, dezmoplastickom malom okružlobunkovom tumore či synoviálnom sarkóme. Na druhej strane je skupina karcinómov, ktoré koexprimujú vimentín s CK, napríklad karcinómy z obličkových buniek (renal cell carcinoma – RCC), endometriálne karcinómy, serózne karcinómy ovária, a pod. Ani EMA nie je pozitívny len v karcinómoch, ale jeho expresia bola zaznamenaná aj v niektorých lymfómoch (ALK – pozitívny anaplastický veľkobunkový

lymfóm) a v sarkómoch (synoviálny sarkóm). S100 proteín je okrem malígnych melanómov prítomný aj v nádoroch z buniek obalov periférnych nervov a z chrupavky, chordoidných tumoroch, nádoroch z Langerhansových buniek, a dokonca aj v niektorých karcinómoch, napríklad prsníka (1). Preto je pre malígne melanómy špecifickejší marker HMB-45. Tento sa však exprimuje aj vo svetlobunkových sarkómoch a v tzv. PEC-ómoch (nádorov z perivaskulárnych epitelioidných buniek) (1). Uvedené príklady len svedčia o limitáciách IHC, ktorých si musí byť vedomý hodnotiaci patológ. Treba si uvedomiť, že IHC nemusí vždy poskytnúť jednoznačnú odpoveď v diferenciálnej diagnostike CUP a bez adekvátnej komunikácie s onkológom, respektíve bez zváženia ostatných vyšetrení je často diagnostika týchto nádorov komplikovaná a niekedy prakticky nemožná.

Vzhľadom na to, že pri CUP sú najčastejšie epiteloové neoplazmy, nasledujúce kroky budú zamerané na ich bližšiu charakterizáciu.

■ Druhý stupeň IHC algoritmu – subtypizácia karcinómov

Ak sa potvrdí epiteloový pôvod metastatického nádoru, ďalší krok je subtypizácia karcinómov. Pri nej sa využíva detekcia hlavných IHC markerov, ktorá sa dopĺňa dôkazom ďalších biomarkerov, ako sú uvedené v tabuľke 2. Na tejto úrovni je dôležité diferencovať aj nádory zo zárodočných buniek a mezoteliómy. Na bližšiu špecifikáciu nádorov zo zárodočných buniek sa využíva panel placéntarnej alkalické fosfatázy (PLAP) a CD117 (seminóm), ľudského choriogonadotropínu – hCG (choriokarcinóm), alfa-feto-proteínu a glypican 3 (nádor zo žltkového vaku), CD30 (embryonálny karcinóm), prípadne OCT-4. Pri diferenciálnej diagnostike MTS adenokarcinómu od mezoteliómu sa využíva širší panel markerov. Z nich kalretinín, CK5/6, trombomodulín a N-cadherin sú špecifickejšie pre mezotelióm a na druhej strane expresia MOC31, TTF1 a CD15/LeuM1 je špecifickejšia pre adenokarcinóm (16).

■ Tretí stupeň IHC algoritmu – určenie primárneho orgánového pôvodu MTS adenokarcinómu

Ako už bolo spomenuté, adenokarcinómy sú najčastejšia kategória CUP. Na základe samotných histomorfologických charakteristík patológ nie je vo väčšine prípadov schopný poukázať na orgánový pôvod adenokarcinómu. S cieľom bližšej orgánovej špecifikácie sa vypracovalo niekoľko algoritmov (4, 6, 17, 18), ktoré dosahujú senzitivitu 80,3 % a špecifickosť 97,3 % (4). Pomocou týchto algoritmov je možné klasifikovať lokalitu až v 65,3 – 88 % prípadov CUP (4, 17, 18). Niektoré pre-

Tabuľka 1. Základný diagnostický panel na určenie histogenézy nádoru

NÁDOR podľa histogenézy	Hlavný IHC biomarker	Ostatné IHC biomarkery
Karcinóm	Cytokeratíny	EMA
Melanóm	S100	HMB45, Melan A
Lymfóm/leukémia	CD45 (LCA)	CD20, CD3, CD138, CD30 a pod.
Sarkóm	Vimentin	dezmin, aktín, c-kit, S100 a pod.

Vysvetlivky: IHC – imunohistochemický; EMA – epiteloový membránový antigén; LCA – spoločný leukocytárny antigén. Upravené podľa 3, 6, 10, 11.

Tabuľka 2. Diagnostický panel na určenie subtypu karcinómu, respektíve príbuzných nádorov

TYP	Hlavné IHC biomarkery	Ostatné biomarkery
Adenokarcinóm	CK7, CK20	viď algoritmus 1
Skvamózny karcinóm	CK5, p63	negativita CK7 a CK20
Urotelový karcinóm	CK7, CK20	uropodlakín, p63, trombomodulín
Hepatocelulárny karcinóm	Hepatocyty paraffín 1, pCEA	CD10, CD13, AFP
Karcinóm z obličkových buniek	koexpresia CK a vimentínu, RCC	CD10, PAX 2, PAX 8
Karcinóm štítnej žľazy	TTF1, tyreoglobulín	
Neuroendokrinný karcinóm	Chromogranín A, synaptofyzín	CD56, PGP9.5, NSE
Nádory zo zárodočných buniek	PLAP, OCT4	hCG, AFP, CD117, CD30, glypican 3
Mezotelióm	kalretinín, CK5/6	Trombomodulín, N-cadherin, mezotelin, WT1, D2-40

Vysvetlivky: IHC – imunohistochemický; EMA – epiteloový membránový antigén; CK – cytokeratín; pCEA – polyklónová protilátka proti karcinoembryonálnemu antigénu; TTF1 – „thyroid transcription factor 1“; NSE – neurón špecifická enoláza; AFP – alfa fetoproteín; RCC – renal cell carcinoma antigén; PLAP – placéntarna alkalická fosfatáza; hCG – ľudský choriogonadotropín; WT – Wilmsov tumor. Upravené podľa 3, 10, 11.

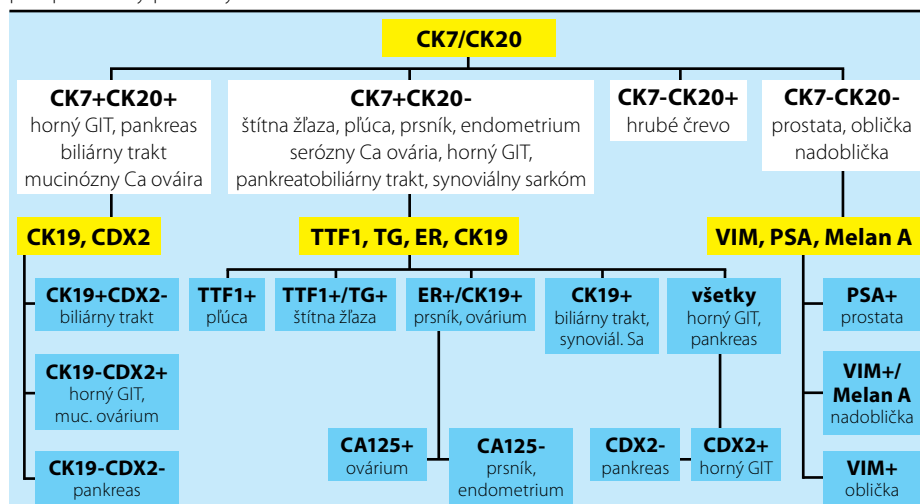
Tabuľka 3. Kombinácia CK7 a CK20 a percentuálne zastúpenie imunofenotypov v jednotlivých orgánoch (spracované a upravené podľa 3)

Primárny orgán	CK7+CK20+	CK7+CK20-	CK7-CK20+	CK7-CK20-
Pažerák	81	12	0	6
Ovário-mucinózný	74	23	3	0
Urotel	61	21	4	14
Pankreas	55	36	4	4
Žalúdok	48	25	20	6
Žlčové cesty	33	62	5	0
Endometrium	9	92	0	0
Slinná žľaza	0	100	0	0
Ovário-nemucinózný	6	91	0	3
Prsník	6	86	1	6
Plúca	9	85	0	6
Hrubé črevo	11	1	79	9
Oblička	0	9	0	91
Prostata	1	9	11	79

hladové zdroje však uvádzajú, že jedno primárne miesto je určené pomocou IHC len v 35 – 40 % CUP (15). Výsledky nedávnej metaanalýzy ukázali, že senzitivita IHC vyšetrenia je približne 82 % pri nádoroch s potvrdenými primárnymi aj metastatickými ložiskami, avšak len 66 % pri samotných MTS. To svedčí o tom, že metastatické nádory je omnoho ťažšie klasifikovať ako primárne nádory pomocou IHC (19). Pritom sa ukázalo, že na identifikáciu primárneho pôvodu je omnoho lepšie využiť panel viacerých vybraných ukazovateľov

ako vyšetrenie len jedného markera (8). Základom takmer každého panelu na identifikáciu primárneho orgánu je sledovanie vzájomnej expresie CK7 a CK20. Na obrázku 5 je schéma kombinácií expresie CK7 a CK20 s poukázaním na možný pôvod nádorového tkaniva (8). Na prvej úrovni sú vyselektované štyri základné skupiny možných primárnych orgánov podľa vzájomnej expresie CK7 a CK20. V druhej úrovni sa využívajú niektoré ďalšie markery typu intermediárnych filament (vimentín), tkanivovo-špecifických markerov

Obrázok 5. Imunohistochemický diagnostický algoritmus na identifikáciu orgánu, v ktorom je predpokladaný primárny nádor



(prostatický špecifický antigén – PSA), transkripčných faktorov TTF1 a CDX2, ako aj hormónových receptorov (estrogénový receptor – ER, progesterónový receptor – PR) a hormónu (tyreoglobulín) na ďalšiu identifikáciu primárneho orgánu. Jedným z najznámejších fenotypov je CK7-/CK20+/CDX2+, ktorý je označovaný ako „colon cancer profile CUP“ (8). Pre orgánový pôvod NE nádorov môže posloužiť okrem IHC markerov NE diferenciácie identifikácia niektorých transkripčných faktorov, ako sú TTF1, CDX2 a PDX1. Expresia prvého z nich svedčí najskôr pre pôvod nádoru z oblasti pľúc alebo štítnej žľazy, pozitivita CDX2 podporuje gastrointestinálny pôvod a PDX1 svedčí pre pôvod v pankrease (3). Niektoré NE nádory, ako napríklad karcinóm z Merkelových buniek, vykazujú charakteristickú expresiu CK20 pri negatívite CK7, ktorá sa využíva aj na diferencovanie od MTS malobunkových karcinómov pľúc (tieto majú inverzný imunofenotyp CK7+/CK20-). Serózne karcinómy vaječníka sú charakteristické expresiou WT1 (proteín Wilmského tumoru) a pre ich detekciu sa využíva aj marker CA125, ktorý býva exprimovaný aj v časti mucinózných karcinómov ovária a karcinómoch pankreasu (3). Pri niektorých orgánoch boli zaznamenané viaceré kombinácie CK7 a CK20 (tabuľka 3), čo je potrebné zohľadniť pri riešení CUP (13). Na potvrdenie prsníkového pôvodu sú okrem už spomenutých hormónových receptorov užitočnými ukazovateľmi GCDPF-15 („Gross Cystic Disease Fluid Protein-15“) a mammaglobín a pri pôvode z urotelových buniek je to najmä uroplakin III. Niektoré markery, ktoré sú exprimované v histogeneticky odlišných tkanivách, ako napríklad alfa-inhibín, ktorý býva pozitívny v sex-cord stromálnych nádoroch vaječníka a Melan A exprimovaný v malígnych melanómoch, sú dokázateľné aj v adrenokortikálnych karcinómoch (1).

Ďalšie možnosti v biopctikej diagnostike CUP

■ Elektronová mikroskopia (ELMI)

S rozvojom IHC poklesol záujem o ultraštruktúrne vyšetrenie. Napriek tomu, ako už bolo spomenuté, nie všetky CUP je možné identifikovať pomocou IHC. ELMI si zachovala svoj význam vo vybraných prípadoch, napríklad pri detekcii denzných cytoplazmatických granúl, ktoré poukazujú na NE pôvod alebo melanozómov typických pre melanocytárny pôvod. ELMI môže pomôcť aj pri identifikácii štruktúr charakteristických pre svalový pôvod (aktínové filamenta) a Weibeleho-Paladeho teliesok svedčiacich pre endotelový pôvod. Identifikácia mikrovilov intestinálneho typu s mikrofilamentmi, povrchového glykokalyxu a glykokalikálnych teliesok zriedkavo napomáha v diagnostike kolo- rektálnych adenokarcinómov. Veľmi sa mikrovily sú typické pre karcinómy vaječníka a dôkaz luminálnych štruktúr, mikrovilov a cytoplazmatických lamelárnych teliesok zas potvrdzuje adenokarcinóm pľúcneho pôvodu (1, 10). Hojné cytoplazmatické glykogénové častice a tukové kvapôčky sa vyskytujú vo svetlobunkových RCC, myelinómy v bronchioloalveolárnych karcinómoch (20) a prítomnosť dezmozómov a tonofilamentov je charakteristická pre skvamózne karcinómy (5).

■ Analýza cytogenetických abnormalít

Jednou z metód na hodnotenie cytogenetických abnormalít je fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH), ktorá sa využíva pri dôkaze početných translokácií najmä mäkkotkanivových sarkómov, napríklad t(11;22)(q24;q12) v periférnych neuroektodermálnych tumoroch a Ewingovom sarkóme, t(11;22)(p13;q12) v dezmozplastickom malo- okružobunkovom nádore, t(X;18)(p11;q11) v synoviálnom sarkóme, t(12;22)(q13;q12) v my-

xoidnom liposarkóme, t(3;13)(p36;q14) v alveolárnom rabdomyosarkóme (1, 10). V epitelových nádoroch bola zaznamenaná špecifická translokácia na Xp11.2 (TFE3) v zriedkavom subtypu RCC, translokácia MYB prítomná v časti adenoidne cystických karcinómov a delécia 3p pri malobunkovom karcinóme pľúc (1, 10). Analýza špecifických cytogenetických abnormalít môže byť nápomocná pri hodnotení nediferencovaných nádorov u mladých pacientov. Ide napríklad o identifikáciu izochromozómu i(12p) v zle diferencovaných nádoroch v LU lokalizovaných v strednej časti tela, ktorá svedčí pre pôvod zo zárodočných buniek (1).

■ Molekulová diagnostika zameraná na génovú expresiu

Každé tkanivo a orgán ľudského tela (prsník, pľúca, prostata) plní odlišnú biologickú funkciu, a preto vykazuje rozdielnú úroveň expresie špecifických génov. Individuálny vzor expresie génov sa nazýva „signatúra“ a táto je špecifická pre dané tkanivo. Nádory si zachovávajú tendenciu expresie génov tkaniva, z ktorého vznikli, a preto vyšetrenie profilu génovej expresie môže poskytnúť dodatočné informácie o pôvode nádorového tkaniva (13). Ide o testy založené na metodike RT-PCR alebo „mikroarrayov“, ktoré sú schopné analýzy aj na materiáli fixovanom vo formalíne a zaliatom do parafínu. Presnosť týchto testov na identifikáciu tkanivového pôvodu sa pohybuje od 33 – 93 % (1, 11) a súhlasná korelácia s IHC detekciou primárneho pôvodu dosahuje až 94 % (11). Na identifikáciu primárneho ložiska na analýze génovej expresie sa vyvinulo niekoľko metód. Talantov et al. (21) a Varadhachary et al. (26) predstavili metódu založenú na RT-PCR, pomocou ktorej hodnotili stav 10 génových signatúr a potvrdili tkanivový pôvod nádoru v 61 % prípadov (5). Ďalšou podobnou metódou je CancerTYPE ID®. Táto metóda je založená na analýze 92 génov pomocou qRT-PCR, má 83 % senzitivitu a dokáže identifikovať 39 typov nádorov s 82 % presnosťou (3, 8). Jediným testom, ktorý bol doteraz schválený FDA (Food and Drug Administration), je 1550-génový test založený na makroarrayi – „Pathwork Tissue of Origin Test“ (Pathwork Diagnostics, Redwood City, CA, USA). Pomocou tohto testu je možné identifikovať 15 tkanivových typov s viac ako 90 % presnosťou (1). V Európe bol využívaný mikroarrayový 1900-génový test – CupPrint (Agendia, BV, Amsterdam, Holandsko), ktorý bol schopný identifikovať 9 tkanivových typov s 83 % presnosťou určenia pôvodu tkaniva (1). Nevýhodami týchto testov je, že každý z nich bol študovaný na rôznych typoch nádorového tkaniva a s veľkým

rozsahom identifikovaných typov, respektíve subtypov nádorov – 15 – 54 typov/subtypov (8). Analýza génovej expresie sa zatiaľ nestala štandardnou metódou pri diagnostike CUP, pretože chýbajú jasné odporúčenia a sú limitované údaje o validácii týchto metód. Navyše nie sú rozsiahlejšie dôkazy o lepších výsledkoch prežívania pacientov, ktorým bola na základe týchto testov podaná primárne špecifická liečba (1). Samozrejme, jedným z hlavných limitov je ich cena, ktorá je niekoľkonásobne vyššia v porovnaní s IHC – približne 3 000 – 4 000 dolárov verzus 100 – 200 dolárov (3) a nutnosť zaslania tkaniva do laboratória v USA, keďže komerčne dostupné in vitro kity, ktoré by si mohlo kúpiť lokálne genetické laboratórium, zatiaľ nie sú ponúkané.

Analýza génovej expresie však má svoje opodstatnenie vo vysokorizikových prípadoch s CUP, najmä s viscerálnymi metastázami (diferencovanie profilu kolonického karcinómu) alebo s kostnými metastázami (na diferencovanie renálneho alebo prostatického profilu) (11).

Záver

Diagnostika CUP je extrémne ťažká, pretože nejde o jedno nádorové ochorenie, ale o klinicko-patologický syndróm so širokým spektrom nádorov a klinických prezentácií. Preto si riešenie problematiky CUP vyžaduje intenzívnu klinicko-patologickú spoluprácu (14, 15). Biopťické vyšetrenie je prevažne založené na interpretácii morfológických znakov a IHC identifikácii vybraných markerov, ale samotné nedokáže odhaliť pôvod mnohých nádorov bez znalosti výsledkov klinických vyšetrení a nálezov zobrazovacích metód. Všetky poskytnuté informácie spolu s morfológickými charakteristikami pomáhajú vybrať spomínané algoritmy a mnohokrát vedú k efektívnejšiemu dosiahnutiu cieľa,

ktorým je správna diagnóza vystihujúca typizáciu, subtypizáciu a identifikáciu primárneho nádoru (3).

Podakovanie

Autor vyjadruje vďaka Lige proti rakovine za podporu Projektov Tkanivovej nádorovej biobanky a FISH diagnostiky na ÚP SZU a OÚSA a MUDr. Kataríne Machálekovej, PhD., za podnetné pripomienky pri tvorbe tejto práce.

Literatúra

1. Batistatou A, Pentheroudakis G, Pavlidis N. Cancer of unknown primary site: the pathologist's point of view. *TJOP* 2013; 00: 1-8.
2. Matsubara N, Mukai H, Nagai S, et al. Review of primary unknown cancer: cases referred to the National Cancer Center Hospital East. *Int J Clin Oncol* 2010; 15: 578-582.
3. Oien KA, Dennis JL. Diagnostic work-up of carcinoma of unknown primary: from immunohistochemistry to molecular profiling. *Ann Oncol* 2012; 23(Suppl 10): x271-x277.
4. Hashimoto K, Sasajima Y, Amdo M, et al. Immunohistochemical profile for unknown primary adenocarcinoma. *PLoS ONE* 2012; 7 (1): e31181. doi:10.1371/journal.pone.0031181.
5. National Cancer Institute: PDQ® Carcinoma of Unknown Primary Treatment. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Date last modified <07/03/2013>. Available at: <<http://cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/unknownprimary/Health-Professional>>. Accessed July 3, 2013.
6. Hawes D, Shi SR, Dabbs DJ, et al. Immunohistochemistry. In: Weidner N, Cote RJ, Suster S, Weiss LM. *Modern Surgical Pathology*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2009: 48-70.
7. Greco FA, Hainsworth JD. Cancer of unknown primary site. In DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 9th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2011: 2033-2051.
8. Stella MG, Senetta R, Cassenti A, et al. Cancers of unknown primary origin: current perspectives and future therapeutic strategies. *J Transl Med* 2012; 10: 12. Available from: <<http://www.translational-medicine.com/content/10/1/12>>. Accessed June 25, 2013.
9. Fizazi K, Greco FA, Pavlidis N, et al. Cancers of unknown primary site: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2011; 22, Suppl 6: vi64-vi68.

10. Pavlidis N, Fizazi K. Cancer of unknown primary (CUP). *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 54: 243-250.
11. Pavlidis N, Pentheroudakis G. Cancer of unknown primary site. *Lancet* 2012; 379: 1428-1435.
12. Pentheroudakis G, Goulinopoulos V, Pavlidis N. Switching benchmarks in cancer of unknown primary: from autopsy to microarray. *Eur J Cancer* 2007; 43(14): 2026-2036.
13. National Collaborating Centre for Cancer. *Diagnosis and management of metastatic malignant disease of unknown primary origin*. NICE Full Guideline, London: 2010: 122.
14. Marchevsky AM, Gupta R, Balzer B. Diagnosis of metastatic neoplasms. A clinicopathologic and morphologic approach. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134: 194-206.
15. Greco FA, Oien K, Erlander M, et al. Cancer of unknown primary: progress in the search for improved and rapid diagnosis leading toward superior patient outcomes. *Ann Oncol* 2012; 23(2): 298-304.
16. Pleura. Last revised <02/08/2011>. Available at: <<http://www.pathologyoutlines.com/pleura.html#mesovsaden>>. Accessed July 10, 2013.
17. Dennis JL, Hvidsten TR, Wit EC, et al. Markers of adenocarcinoma characteristic of the site of origin: development of a diagnostic algorithm. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3766-3772.
18. Park SY, Kim BH, Kim JH, et al. Panels of immunohistochemical markers help determine primary sites of metastatic adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 1561-1567.
19. Anderson GG, Weiss LM. Determining tissue of origin for metastatic cancers: meta-analysis and literature review of immunohistochemistry performance. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010; 18: 3-8.
20. Erlandson RA. Role of elektron microscopy in modern diagnostic surgical pathology. In: Weidner N, Cote RJ, Suster S, Weiss LM. *Modern Surgical Pathology*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2009: 71-84.
21. Talantov D, Baden J, Jatke T, et al. A quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay to identify metastatic carcinoma tissue of origin. *J Mol Diagn* 2006; 8(3): 320-329.
22. Varadhachary GR, Talantov D, Raber MN, et al. Molecular profiling of carcinoma of unknown primary and correlation with clinical evaluation. *J Clin Oncol* 2008; 26(27): 4442-4448.

doc. MUDr. Karol Kajo, PhD.
Ústav patológie SZU a OÚSA
Heydukova 10, 812 50 Bratislava
kkajo@ousa.sk

