



## Lymfatické mapování a koncept sentinelové lymfatické uzliny

Koncept lymfatického mapování s detekcí sentinelové lymfatické uzliny (sentinel lymph node, SLN) a jejím podrobným mikroskopickým vyšetřením je fenomén, který v posledních 15 letech ovlivnil diagnostiku některých zhoubných nádorů, radikalitu chirurgické léčby a indikace adjuvantní léčby, s přímým dopadem na morbiditu a kvalitu života pacientů.

Stav regionálních lymfatických uzlin je u většiny zhoubných nádorů nejdůležitějším prognostickým faktorem a rozhodujícím kritériem pro aplikaci adjuvantní terapie. Metastázy v regionálních lymfatických uzlinách má jen menší část pacientek indikovaných k radikální chirurgické léčbě, a proto představuje systematická lymfadenektomie pro většinu pacientek nadléčení a zbytečnou zátěž. Lymfadenektomie prodlužuje operační čas, délku anestezie a hospitalizaci, zvyšuje riziko závažných peroperačních poranění krevních a lymfatických cév, nervů a okolních orgánů, zvyšuje krátkodobou i dlouhodobou morbiditu. Chybění odebrané tukové lymfatické tkáně může hrát negativní roli v imunologické odpovědi organizmu na nádor.

Teprve v 80. letech 20. století začal být kladen větší důraz na diagnostiku nádoru v časných stádiích, neboť bylo prokázáno, že časná stadia nádorů jsou většinou vyléčitelná. Se zaváděním účinné adjuvantní léčby se objevily snahy o snížení morbidity pacientů snížením radikality chirurgické léčby, týkající se jak primárního nádoru, tak regionálních lymfatických uzlin. Regionální lymfadenektomie však zůstává u většiny solidních zhoubných nádorů součástí chirurgické léčby, a tím přetrvává i morbidita s touto chirurgickou léčbou spojená. Morbidita bývá snižována novými chirurgickými technikami, zkvalitňováním pooperační péče, zaváděním účinných antibiotik a krevních derivátů.

Koncept lymfatického mapování a SLN je založen na předpokladu, že SLN odráží stav všech regionálních lymfatických uzlin. V případě, že je SLN negativní, je vyloučeno lymfogenní šíření nádoru,

v případě pozitivivity SLN je lymfogenní šíření nádoru prokázáno. Pokud se koncept lymfatického mapování potvrdí v prospektivních randomizovaných studiích, bude možné prokázat, či vyloučit lymfogenní šíření nádoru podrobným histologickým vyšetřením SLN a na základě zjištění této skutečnosti bude možné doporučit sofistikovanější léčebný postup. V případě pozitivivity SLN přichází v úvahu provedení radikální operace se systematickou regionální lymfadenektomií, a nebo naopak odstoupení od radikální chirurgické léčby a doporučení primární léčby radiací. V případě negativivity SLN je možné snížit radikalitu chirurgické léčby primárního nádoru a neprovádět systematickou regionální lymfadenektomií.

Koncept lymfatického mapování obsahuje podrobnější histopatologické zpracování omezeného počtu lymfatických uzlin, které byly vizuálně či radionavigačně označeny jako sentinelové. Toto tzv. ultramikrostagingové zpracování SLN obsahuje sériové mnohoúrovňové histologické vyšetření každého bločku extenzivně zpracované lymfatické uzliny a využívá kromě klasického barvení hematoxylin eosinem také imunohistochemické metody, které pomocí protilátky barevně detekují specifické antigenní struktury nádoru. Tento způsob zpracování umožňuje detekci drobných ložisek nádorových buněk a zvyšuje záchyt lymfogenních metastáz.

Se změnou přístupu k onkologickým pacientům, kdy je kromě výsledků onkologické léčby kladen velký důraz na snižování morbidity pacientů a kvalitu jejich života, se mění i pohled na radikalitu chirurgické léčby. Systematická lymfadenektomie, dosud nezpochybnitelný standard léčby, je dnes vnímána jako výkon zvyšující morbiditu a jako taková má význam jen v případě průkazu lymfogenního šíření. U některých nádorů může být chirurgická léčba při prokázání lymfogenního šíření nahrazena léčbou radiací, což zamezí zvyšování morbidity kombinováním léčebných metod. Potenciální užitek z lymfatického mapování mohou mít pacienti nejen s pozitivitou uzlin, ale i s jejich negativitou, která je uchrání

před adjuvantní léčbou. Z nového pohledu je vnímán i problém falešné negativity a falešné pozitivity SLN. Falešná pozitivita SLN s následnou lymfadenektomií by dříve nebyla chápána jako pochybení, neboť lymfadenektomie je u karcinomu vulvy a děložního hrdla

standardem léčby, z nového pohledu by však byla pacientovi provedena zbytečně radikální operace s vystavením riziku zvýšené morbiditity vyplývající z radikální chirurgické léčby nebo kombinované léčby chirurgické a radiační.

## 14.1 Historie

V 17. století Valsalva prokázal, že se nádorové buňky mohou šířit z primárního nádoru lymfatickými cévami do lymfatických uzlin a vyvrátil původní Galénovu myšlenku, že karcinom je lokálním důsledkem systematického onemocnění tělesných tekutin a látek.

Studium lymfogenního šíření nádorových buněk z primárního nádoru bylo obtížné, neboť v klasických anatomických studiích na fixovaných kadaverózních preparátech bylo možno prokázat lymfatické uzliny a jejich vztah k okolním strukturám, ale nebylo možné prokázat tenké lymfatické cévy naplněné bezbarvou lymfatickou tekutinou. Do 19. století byly studie lymfatického aparátu omezeny na výzkumy prováděné na mrtvých tělech. Sappey v 19. století injikoval bezúspěšně do kadaverózních tkání různé látky ve snaze o zviditelnění lymfatického systému. První úspěchy ve znázornění lymfatického systému prokázaly až studie Hudacka a McMastera, kteří po aplikaci různých barviv do kůže dobrovolníků znázornili povrchová lymfatika kůže. V roce 1938 Gray zkoumal lymfatika mikroskopicky na čerstvě resekované tkáni, což mu umožnilo postulovat histologická kritéria lymfatických cév a uzlin. Vyslovil domněnku, že lymfatické šíření nádoru se děje embolizací nádorových buněk do lymfatické tekutiny proudící lymfatickými cévami, do kterých jsou jako filtr vmezeřeny lymfatické uzliny. Na tomto poznatku postavil začátkem 20. století Halsted model radikální chirurgické léčby solidních zhoubných nádorů, ve kterém byl nádor resekován s okolní tukově lymfatickou tkání. Tento radikální chirurgický postup měl za následek výraznou morbiditu pacientů.

Injekci radioaktivně značeného koloidu s cílem detekce lymfatických uzlin poprvé použil u člověka v roce 1953 Sherman a Ter-Pogossian. V roce 1980 fyziolog Starling popsal význam hydrostatického a osmotického tlaku v mízním systému a prokázal, že se lymfa po své cestě lymfatickými cévami vrací opět do krevního řečiště.

Prvním, kdo použil termín sentinelová neboli strážní uzlina, byl v roce 1960 Ernest Gould, který prováděl u karcinomu příušní žlázy peroperační histologické vyšetření konkrétní lymfatické uzliny a při její negativitě doporučoval odstoupení od syste-

matické regionální lymfadenektomie. Jeho prací se inspiroval paraguajský lékař Ramon Cabanas, který jako první v roce 1967 kombinoval lymfatické mapování s detekcí SLN. U pacientů s karcinomem penisu prováděl předoperační lymfoscintigrafii a prokázal, že v případě lymfogenního šíření je vždy pozitivní povrchová tříselná lymfatická uzlina. V roce 1970 postuloval doporučení, že systematická inguinofemorální lymfadenektomie, zatížená velkou morbiditou, je indikována jen při jejich pozitivitě. Jeho práce je považována za začátek nové éry moderního lymfatického mapování.

Koncept lymfatického mapování popularizoval Donald Morton, lékař specializující se na léčbu melanomu. Melanom trupu je častý nádor, který má ve své středové lokalizaci variabilní lymfatickou drenáž, jejíž lateralizace a směr šíření nejsou vždy jednoznačné. Jeho studie měla za úkol identifikovat konkrétní lymfatický bazén a prokázat lymfogenní šíření bez nutnosti provést systematickou lymfadenektomii všech možných regionálních oblastí. Ke znázornění lymfatické drenáže prováděl Morton předoperační lymfoscintigrafii s využitím koloidu zlata, která ukázala spádovou lymfatickou oblast a která se stala předmětem zájmu chirurga. Používal také peroperační lymfatické mapování s peritumorózní aplikací izosulfanové modři. Jeho práce z roku 1992 prokázala na souboru 237 pacientů možnost peroperačního lymfatického mapování, kdy SLN byla detekována ve 194 případech a falešná negativita byla zaznamenána pouze ve dvou případech. Práce se stala nejcitovanější prací v moderní chirurgické onkologii a vzbudila opětovný zájem o tuto techniku. Velké uplatnění našla tato technika u karcinomu mamy, a to z podobných důvodů, jako u melanomu. V 60. letech Bernard Fisher zpochybnil Halstedovu teorii postupného lymfogenního šíření a postuloval hypotézu, že karcinom mamy je systémové onemocnění od samého počátku s nutností aplikace systémové adjuvantní chemoterapie. Současně uznávaná teorie kombinuje hypotézu Halsteda a Fishera a je možné ji z velké části aplikovat i na zhoubné nádory vulvy, hrdla i těla děložního. Pravidla biologického chování solidních zhoubných nádorů shrnuje tabulka 14.1.

Následující studie, hlavně u melanomu a karcinomu mamy, potvrdily původní Mortonovy závěry. Více než 4000 publikovaných studií potvrdilo vysokou senzitivitu, specifitu a negativní prediktivní hodnotu lymfatického mapování (93 %, 100 %, 96 %). Zhruba polovina pacientek měla v těchto studiích pozitivní pouze SLN. Metoda lymfatického mapování se postupně rozšiřovala na další solidní nádory a bylo prokázáno, že po náležitém zacvičení je tato metoda plně reprodukovatelná. Čtyři roky po publikaci Mortonovy studie použil poprvé Levenback lymfatické mapování u pacientek s karcinomem vulvy a za další tři roky publikoval Echt studii s lymfatickým mapováním děložního hrdla.

## 14.2 Lymfatický systém

Lymfatický systém je komplikovaná multifunkční síť lymfatických cév a lymfatických uzlin, která pomáhá udržovat intersticiální a intravaskulární rovnováhu, zbavuje organismus různých cizích částic a hraje zásadní roli při odpovědi organismu na přítomnost infekce a nádorových buněk. Lymfatický systém se skládá z lymfatických cév, které vstřebávají látky obsažené v tkáňovém moku mezibuněčného prostoru, do kterého je přiváděna krev arterioly a odváděna přes kapilární řečiště do venózního systému.

### 14.2.1 Lymfa a lymfatické cévy

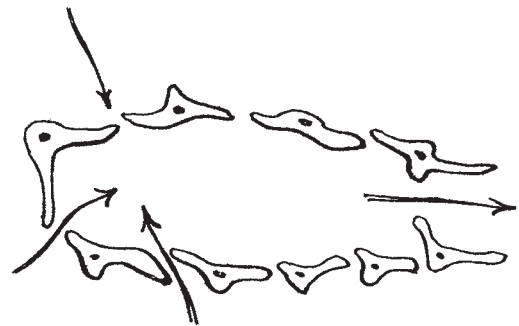
Lymfatické cévy se kromě kostní dřeně, centrálního nervového systému, jaterních lobulů a sleziny nacházejí v každém orgánu. Periferní začátky lymfatických cév představují lymfatické kapiláry, *vasa lymphocapillaria*, které začínají v mezibuněčných štěrbinách vaziva tkání, vzájemně anastomozují a vytvářejí síť mizních kapilár, *rete lymphocapillare*. Kapilární síť se spojuje do větších lymfatických cév, *vasa lymphatica*, jejichž dalším spojováním vznikají lymfatické kmene, *trunci lymphatici*. Lymfatické cévy různých řádů jsou znázorněny na obrázcích 14.1, 14.2 a 14.3.

Stěna lymfatických kapilár je tvořena jedinou vrstvou endoteliálních buněk, jejichž vnější strana má drobné výběžky zasahující do okolního vaziva. Interendoteliální prostory jsou poměrně velké a umožňují průnik tekutiny a částic v ní obsažených, včetně nádorových buněk, z tkáňového moku mezibuněčného prostoru do lymfy. Průnik těchto látek a částic do lymfatických závisí na mnoha faktorech, jako

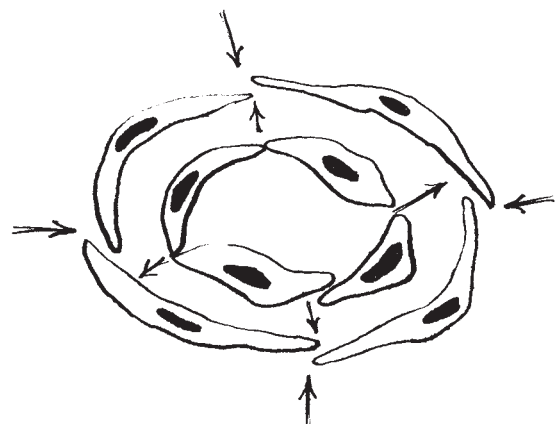
**Tab. 14.1** Charakteristika solidních nádorů s ohledem na lymfatické mapování

ve stadiu operabilního nádoru se většinou nejedná o systémové onemocnění
časná chirurgická léčba primárního nádoru může zabránit vzniku vzdálených metastáz
postižení lymfatických uzlin není vždy spojeno se vzdálenými metastázami
lymfatické uzliny nejsou dostatečnou překážkou průniku nádorových buněk
lymfogenní šíření obvykle předchází vzdálené metastázy
vzdálené metastázy vznikají hematogenním šířením nádoru

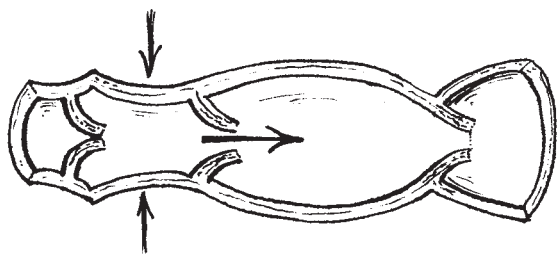
je hydrostatický a osmotický tlak, schopnost difuze, rychlost proudění a chemotaxe. Průnik ovlivňují také vnitřní kontraktilní mechanizmy a neurohormonální transmittery. Při zvýšení intralymfatického tlaku se



**Obr. 14.1** *Vasa lymphocapillaria*



**Obr. 14.2** *Vasa lymphatica*

Obr. 14.3 *Truncus lymphaticus*

mezibuněčné prostory uzavírají, vytvářejí mikrochlopenní aparát a tím je znemožněn návrat tekutiny a částic zpět. Tento buněčný mikrochlopenní aparát reguluje transport mezi intersticiálním a lymfatickým systémem na periferii lymfatického systému. Terminální lymfatické kapiláry ústí v lymfatické cévy, jejichž stěna je tvořena kromě řady endoteliálních buněk také buňkami svalovými, které společně s chlopenním aparátem, podobným jako u venózního systému, umožňují jednosměrný tok lymfy do lymfatických uzlin. Vážně-li však za patologických stavů, například z důvodu nádorové infiltrace uzliny, průtok lymfy uzlinou, lymfatická céva se pod překážkou rozšíří, chlopně ztratí svou usměrňovací funkci a vytváří se retrográdní tok a kolaterální oběh. Tím lze vysvětlit atypické lymfogenní šíření nádoru.

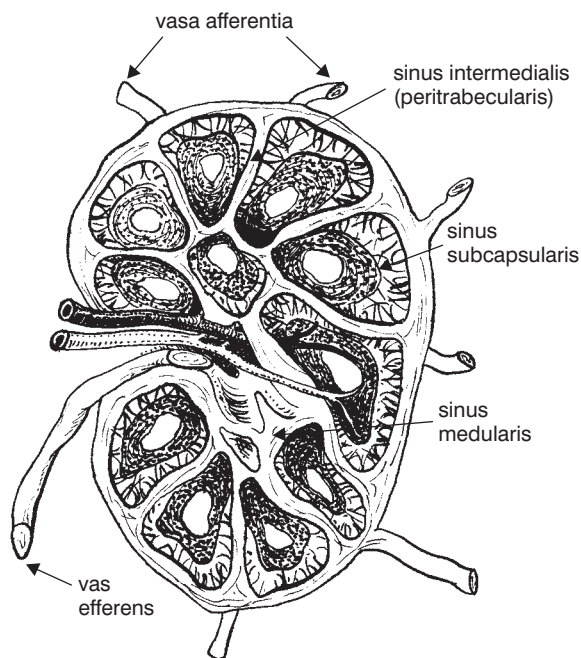
Organismus vyprodukuje denně 2–4 litry bezbarvé lymfatické tekutiny, jejíž složení se mění, ale všeobecně lze říci, že většina buněk je tvořena malými lymfocyty a většina bílkovin jsou plazmatické proteiny.

Pro klinické využití lymfatického mapování je důležité, jak rychle proudí lymfa cévami. Studie používající k lymfatickému mapování dynamickou scintigrafii prokázaly, že rychlost proudění se liší podle anatomické lokalizace, nejpomalejší je na hlavě a šíjí a nejrychlejší na dolních končetinách, což pravděpodobně souvisí se svalovým aparátem. Rychlejší proud je také v terminálním řečišti v úrovni uzlin druhého a třetího řádu. Velikost částic ovlivňuje spíše rychlost průniku z intersticiální tekutiny a prostup lymfatickými uzlinami než samotné proudění v lymfatických cévách. Zánětlivý proces v okolí nádoru může průnik urychlit z důvodu zánětem akcelerovaného cévního proudění.

## 14.2.2 Lymfatické uzliny

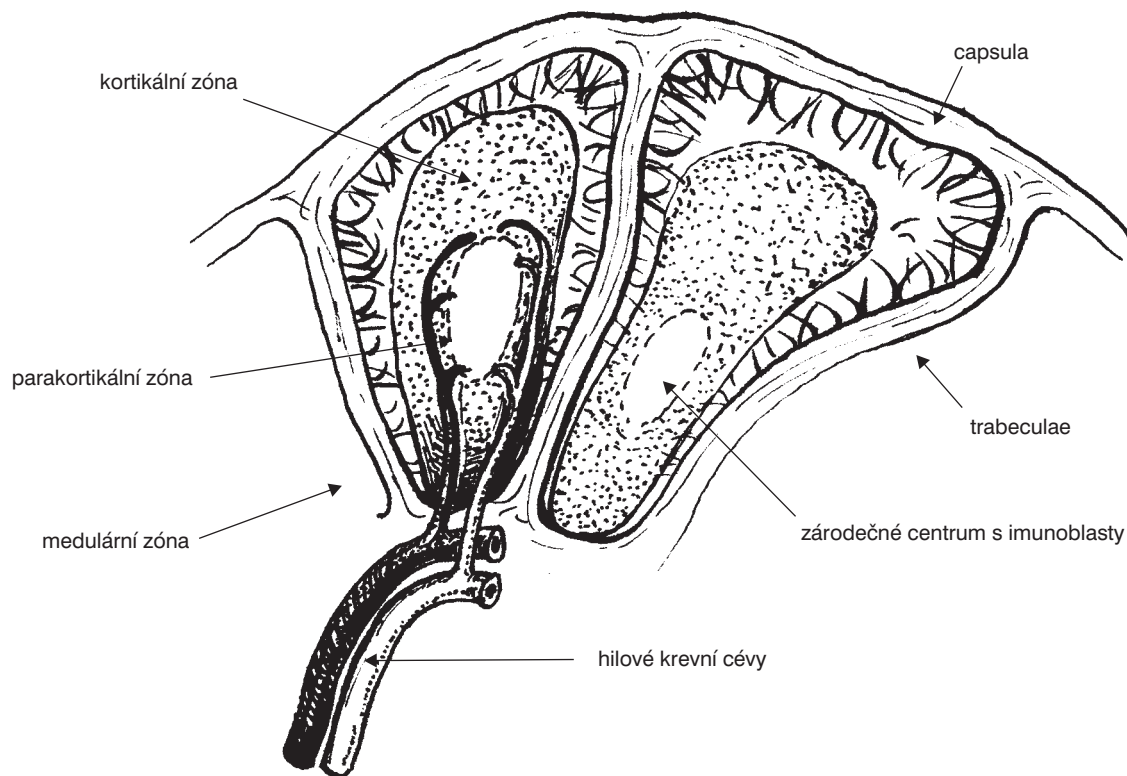
Součástí lymfatického systému jsou lymfatické uzliny, které slouží jako filtr částic lymfatické tekutiny,

antigenů a případných nádorových buněk, současně je to primární místo antigenního rozpoznávání vlastního organismu cizích částic. Lymfatické uzliny, většinou ledvinovitého tvaru, bělorůžové barvy, mají velikost od 1 mm do 30 mm a jsou uloženy v tukové vazivové tkáni jednotlivě nebo ve skupinách. Lymfatická uzlina je znázorněna na obrázku 14.4.

Obr. 14.4 *Lymfatická uzlina*

Lymfa vstupuje do uzliny několika aferentními lymfatickými cévami, *vasa afferentia* na konvexní straně lymfatické uzliny a v místě konkávního hilu uzlinu opouští většinou jediná *vas efferens*, která vede do další nadřazené uzliny nebo do většího lymfatického kmene. Lymfatická uzlina je rozdělena z pouzdra vycházejícími vazivovými trávci na neúplně uzavřené oddíly, v nichž retikulární síť, složená z buněk a vláken, vytváří další prostory. Retikulární prostory vyplněné lymfocyty vytvářejí lymfatické uzlíky, *folliculi lymphatici*, které jsou lokalizovány na periferii uzliny. Prázdné retikulární prostory, ve kterých proudí lymfa, se nazývají sinusy uzliny. Podle rozložení sinusů lze rozlišit subkapsulární sinusy, systém dutin mezi pouzdem uzliny a vlastní lymfatickou tkání uzliny, do kterého ústí aferentní lymfatické cévy, dále peritrabekulární (intermediární) sinusy, běžící podél trávců do medulárních sinusů a dále do oblasti hilu uzliny do terminálního sinusu, ze kterého vychází eferentní lymfatická céva. Systém sinusů s retikulární sítí zpomaluje tok





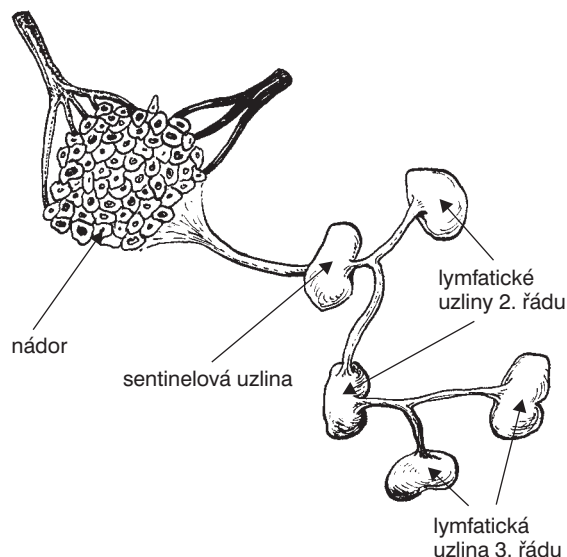
Obr. 14.5 Průřez lymfatickou uzlinou

lymfy, usnadňuje kontakt cizorodých částic s makrofágy a usnadňuje fagocytózu. Na řezu uzlinou jsou pod vazivovým pouzdrém tři vrstvy – kůra, parakortikální oblast a dřeň. Průřez lymfatickou uzlinou je znázorněn na obrázku 14.5.

Lymfatické cévy a uzliny určité anatomické oblasti formují její lymfatické povodí neboli lymfatický bazén. Lymfatické povodí s lymfatickými uzlinami je znázorněno na obrázku 14.6.

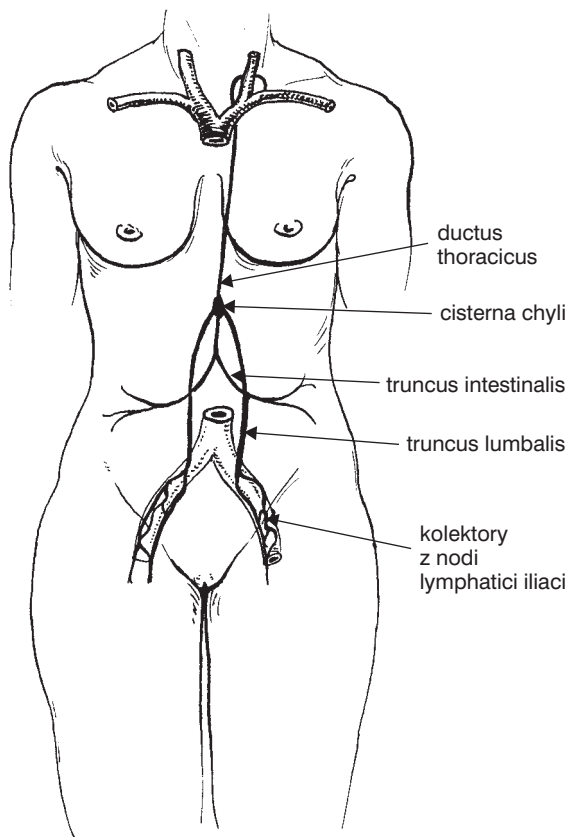
Všechny lymfatické cévy dolních končetin a páneve vytvářejí velké lymfatické kmeney ústící do torakálního ductu, který vstupuje do venózního řečiště v místě spojení levé subklavikulární a jugulární vény. Z tohoto důvodu jsou levé supraklavikulární lymfatické uzliny možným místem metastáz gynekologických zhoubných nádorů. Hlavní lymfatické kmeney jsou znázorněny na obrázku 14.7.

Pokud lymfatická uzlina rozpozná cizí antigen, spustí se kaskáda dějů, které aktivují B lymfocyty a T lymfocyty s produkcí protilátek a cytotoxinů, uzlina se zvětšuje a stává se klinicky zjištělnou. Šíření nádorových buněk lymfatickými cestami se liší podle typu nádoru a anatomické lokalizace. Karcinomy vulvy, hrdla a těla děložního metastázuji lymfogenně



Obr. 14.6 Lymfatické povodí s lymfatickými uzlinami

často a lymfogení šíření s pozitivitou lymfatických uzlin je významným rizikovým prognostickým faktorem.



**Obr. 14.7** *Hlavní lymfatické kmeny*

Ještě před lymfatickým mapováním byly zkoumány imunologické charakteristiky lymfatických uzlin. Zjistilo se, že lymfatické uzliny blíže nádoru vykazují účinkem z nádoru uvolňovaných imunosupresivních působků menší imunitní odpověď na imunitní stimulaci než uzliny vzdálenější. Studie Al-

manda z roku 2000 prokázala, že jedna z příčin vzniku lymfatických metastáz je snížení počtu a špatná funkce dendritických buněk. Studie Essnera z roku 2002 prokázala rozdíl v těchto parametrech mezi SLN a nesentinelovými uzlinami a postulovala názor, že SLN jsou místem prvních metastáz nejen z důvodů anatomických a fyziologických, ale také z důvodů imunologických.

Lymfatické cévy nejsou při operaci viditelné a jejich porušení nemá pro organizmus větší následky, neboť existuje rozsáhlá síť lymfatických cév a bohatý kolaterální oběh.

Lymfatické uzliny se liší svou velikostí a konzistencí, jen některé jsou peroperačně rozeznatelné a hodnotitelné. Z chirurgického pohledu je zajímavé, že počet uzlin v histopatologickém popisu u stejných radikálních operací provedených týměž chirurgem kolísá, přitom je počet uzlin důležitým ukazatelem radikality chirurgické léčby nejen pro chirurga samotného, ale i pro radioterapeuta a onkology při zvažování adjuvantní léčby. Není to způsobeno anatomickými rozdíly u jednotlivců, ale spíše schopností a snahou patologa makroskopicky rozlišit lymfatickou tkáň od tkáně tukové. Častým jevem je, že počet získaných uzlin u obézních pacientek je vyšší než u pacientek štíhlých. Vysvětlením jsou lipomatózní změny uzlin, které uzliny zvětšují, a ty pak nemohou ujmout pozornosti při makroskopickém zpracování.

Nejčastějšími komplikacemi extenzivní systematické lymfadenektomie jsou lymfokély, vyžadující v případech podezření na progresi nemoci nebo způsobující-li pacientce potíže chirurgickou intervencí. Další závažnou komplikací jsou lymfedémy dolních končetin, jejichž incidence stoupá s radikality chirurgické léčby a kombinací chirurgické léčby s léčbou radiační.

## 14.3 Metody detekce SLN

Metody detekce SLN lze rozdělit podle použité detekční látky na metody využívající značení barvivem a na metody využívající značení radiokoloidem, podle načasování v diagnosticko-terapeutickém plánu je možné rozdělit detekční metody na předoperační a peroperační. Předoperační detekcí je dynamická nebo statická scintigrafie, peroperační detekcí je vizuální nebo gama záření detekující metoda. Jako detekční látka může být použito modré barvivo nebo radioaktivně značený koloid.

### 14.3.1 Metoda využívající barvivo

U lymfatického mapování byla použita různá barviva, jako metylenová modř, cyalum, fluorescein, patentní modř a izosulfanová modř. Metylenová modř se neukázala vhodná, neboť při intradermální aplikaci měla malý průnik do lymfatických cév a rychle zbarvovala okolní tkáň. Cyalum je fluorescenční barvivo, které umožňuje identifikaci lymfatických cév, ale ve velké míře proniká do intersticiálního prostoru a způsobuje fluorescenci pozadí. Vyžaduje také hodnocení v zatemněné místnosti. Fluorescein proniká do lymfatic-

kých uzlin, kromě toho však ve větší míře difunduje do okolí a znesnadňuje identifikaci uzlin. Studie prokázaly, že nejvhodnějším barvivem je patentní modř a **izosulfanová modř**, což je izomer **patentní modři**. Zhruba polovina izosulfanové modři je slabě vázána na bílkoviny séra, rychle je transportována lymfaticky a neproniká do okolní tkáně. Izosulfanová modř (LYMPHAZURIN) je využívána hlavně v USA, patentní modř (BLEU PATENTÉ V 2,5%, Guebert, Francie nebo PATENTBLAU V BYC, Guden Německo) hlavně v Evropě a v Austrálii. Barevná detekční látka a používané injekční stříkačky a jehly jsou znázorněny na obrázku 14.8.



Obr. 14.8 Aplikace lymfotropního barviva

Barvivo je aplikováno intradermálně nebo submukózně do lůžka nádoru, ne do nádorové tkáně, ze čtyř vpichů spinální jehlou šířky 25 gauge. Aplikace barviva do hlubších vrstev může způsobit negativitu značení, neboť barvivo může být vychytáno hlubokými lymfatickými cévami, které mají přímé spojení do venózního systému. Aplikace barviva se provádí těsně před chirurgickým výkonem, protože průnik barviva lymfaticky je velice rychlý. Masáž v místě aplikace může napomoci vstřebávání barviva do lymfatických uzlin. Průnik barviva do SLN je závislý na lokalizaci primárního nádoru a jeho velikosti, vzdálenosti k SLN a přítomnosti zánětlivé reakce v okolí nádoru. V případě nádoru děložního hrdla a nádoru vulvy je čas průniku barviva od nádoru k SLN kratší než 5 minut. Izosulfanová a patentní modř zbarví SLN po dobu 30–45 minut. V případě lymfatického mapování u karcinomu děložního hrdla provádíme aplikaci barviva až v anestezii po vizualizaci dutiny břišní, u lymfatického mapování zhoubného nádoru vulvy po přípravě operačního pole. Během operace identifikuje chirurg SLN sledováním postupného šíření barviva od nádoru k první uzlině. Lymfatické mapo-

vání používající barviva je rychlá a laciná metoda, nevyžadující žádné zvláštní přístroje ani zázemí. Zkušenosti ukazují, že doba učení detekci SLN při použití samotného barviva je delší než při kombinaci metod, neboť doba možné detekce SLN při užití barviva je časově omezená a poměrně krátká.

**Nežádoucí účinky** aplikace barviva jsou vzácné a nepřesahují celkově 1 %. Po dobu 24 hodin od aplikace má pacient šedavý kolorit kůže a moč bývá modře nebo nazelenale zbarvená.

Hepatobiliární systém je primárním místem exkrece barviva, a proto při jeho nedostatečnosti mohou komplikace nastat častěji. Urtikální exantém, jako hypersenzitivní reakce I. typu, je způsoben aktivací buněčných vazoaktivních mediátorů po rozpadu žírných buněk, v důsledku navázání antigenů barviva a IgE na povrch žírných buněk, což vede ke zvýšení cévní permeability a úniku tekutiny a bílkovin do superficiální dermis. Podobným mechanismem vznikají alergické reakce, projevující se otokem podkoží a pruritem. Anafylaktické reakce, které byly popsány kazuisticky, jsou nejzávažnější možnou komplikací, s možností kardiopulmonálního selhávání a dalšími celkovými příznaky. Dalším systémovým projevem, vznikajícím po aplikaci barviva, je akutní přechodné nebo prolongované snížení kyslíkové saturace měřené pulzní oxymetrií. Bylo však prokázáno, že se jedná o artefakt vyplývající z charakteristiky a způsobu měření pulzní oxymetrie. Pulzní oxymetrie stanovuje koncentraci kyslíku měřením světelné absorbance dvou vlnových délek 660 nm a 940 nm. Modré barvivo s vlnovou délkou 646 nm interferuje při měření s oxyhemoglobinem a vydává falešný signál přístroji. Falešnou pozitivitu lze peroperačně prokázat vyšetřením arteriální krve.

### 14.3.2 Metoda využívající radiokoloid

Radiokoloid je radioaktivní látkou značený koloidní roztok, který emituje radioaktivní částice, jež mohou být zachyceny a snímány na dynamických nebo statických skenech.

Podmínkou lymfatického mapování s aplikací radioaktivních částic je při provádění lymfoscintigrafie zázemí pracoviště nukleární medicíny a možnost použití ruční kolimační gama sondy při peroperační detekci. Výhodou této metody je možnost detekce SLN v méně častých anatomických lokalizacích a snížení falešné negativy při nedostatečném průniku barviva do lymfatických uzlin.

Ideální koloid musí mít schopnost průniku do periferních lymfatických uzlin a schopnost dlouhodobější retence

radioaktivní látky v SLN. Nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím tyto schopnosti je velikost částic. Částice velikosti 1–2 nm pronikají přímo do venózního řečiště, částice velikosti 5–25 nm unikají z lymfatických mezibuněčnými mezerami, které měří v průměru 10–25 nm a lymfatické cévy se dále nešíří. Částice do 75 nm mohou vstupovat do lymfatických cév pinocytózou, částice velikosti 500–2000 nm zůstávají nevstřebány v místě aplikace.

Prvním techniciem značeným koloidem byl nefiltrovaný koloid síry s velikostí částic 50–2000 nm, který vykazoval nízkou clearance z místa vpichu, proto byl připraven filtrovaný koloid s částicemi 100–400 nm, který pronikal do lymfatických cév průměrně za 11 minut a v SLN se zadržoval déle než 24 hodin. Dalším důležitým parametrem ovlivňujícím úspěšnost detekce SLN je rychlost proudu lymfy, která je nejvíce ovlivněna anatomickou lokalizací nádoru. Nejrychlejší je šíření na dolní končetině (10 cm/min) a nejpomalejší na hlavě a šíji (1,5 cm/min). U gynekologických malignit nebyly dosud tyto parametry studovány, ale z praxe je známo, že scintigraficky lze SLN znázornit již za 30 minut. Po průniku koloidu do lymfatických cév se částice šíří jednosměrně od místa aplikace k první uzlině, neboť chlopně nedovolí zpětný návrat koloidu lymfatickému uzlu.

Radiokoloid je nanokoloid značený generátorovým radionuklidem  $^{99m}\text{Tc}$ , což je čistý gama zářič s energií 140 keV a s poločasem rozpadu 6 hodin.

Při aplikaci radiokoloidu lze použít dvoudenní protokol značení SLN s aplikací radiofarmaka 14–19 hodin před operací, nebo jednodenní protokol s aplikací radiofarmaka 1–2 hodiny před operací. Aplikace se provádí stejným způsobem jako při aplikaci barviva, ze čtyř vpichů do lůžka tumoru spinální jehlou šířky 25 gauge v dávce 50 MBq. Při aplikaci radiokoloidu je zapotřebí dodržovat hygienická opatření pro práci s radioaktivními látkami. Při aplikaci je nutno používat ochranné prostředky, brýle, rukavice a zástěru, které jsou, společně s použitými vyšetřovacími nástroji a spotřebním materiálem, odeslány na pracoviště nukleární medicíny k dekontaminaci.

Způsob aplikace radiokoloidu je znázorněn na obrázku 14.9.

Z radiofarmak jsou v současnosti ke klinickému použití k dispozici tři přípravky s rozdílnou velikostí částic, NANOCOLL ( $^{99m}\text{Tc}$  značený nanokoloid lidského sérového albuminu firmy Nycomed Amersham Sorin Saluggia, Itálie), NANOCIS ( $^{99m}\text{Tc}$  nanokoloid rhenium sulfid firmy Cis bio international Gif-sur-Yvette, Cedex, Francie) a SENTISCINT ( $^{99m}\text{Tc}$  značený koloid sérového lidského albuminu



**Obr. 14.9** Způsob aplikace radiokoloidu

firmy FJC National Research Institute for Radiobiology and Radiohygiene, Budapešť, Maďarsko).

Optimálním způsobem detekce SLN je kombinovaná technika s využitím předoperační lymfoscintigrafie a peroperační detekce SLN měřením radioaktivity ruční kolimační gama sondou a vizualizací zbarvené lymfatické uzliny s jejími aferentními lymfatickými uzly. Detekce SLN pomocí radiokoloidu představuje základní metodu, která umožňuje objektivní kontrolu a dokumentaci výsledků, vizuální detekce SLN je vhodným doplňkem, snižujícím procento selhání metody a počet falešně negativních uzlin.

Podmínky pro provádění kombinovaného lymfatického mapování jsou uvedeny v tabulce 14.2

**Tab. 14.2** Podmínky pro kombinované lymfatické mapování

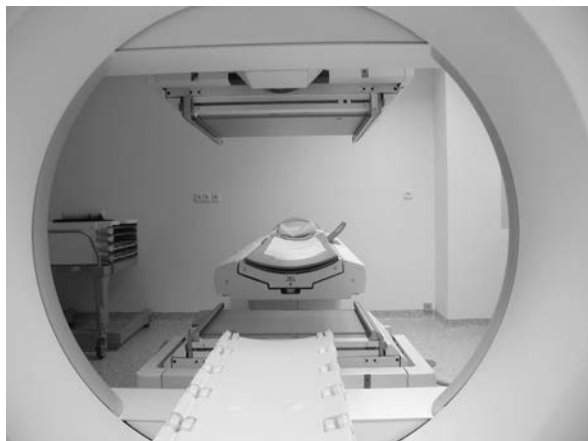
multidisciplinární tým chirurga, lékaře nukleární medicíny a patologa
možnost aplikace radiokoloidu a provedení lymfoscintigrafie
možnost peroperační detekce SLN ruční gama sondou
ultramikrostagingové zpracování SLN
přesná dokumentace metody, kontrola a vyhodnocování výsledků metody



### 14.3.3 Předoperační detekce SLN

Lymfoscintigrafie, poprvé provedená v roce 1953, je neinvazivní, bezpečná a dobře reprodukovatelná metoda, zobrazující regionální lymfatický systém.

Lymfoscintigram znázorní SLN v blízkosti nádoru bez znázornění okolních struktur a operatérovi poskytne informace o počtu, lateralizaci a anatomické lokalizaci SLN. Lokalizace SLN v blízkosti kožního povrchu je lékařem nukleární medicíny znázorněna na kůži křížkem a je vodítkem pro chirurga, kde SLN hledat. V případě značení pánevních uzlin má toto značení pro velkou vzdálenost od povrchu menší význam. Doba průniku radiofarmaka do SLN závisí hlavně na velikosti částic; čím menší částice jsou, tím rychlejší je znázornění uzliny. Uzliny jsou znázorněny většinou za 20 minut, ale pro kvalitní scintigram je vhodná doba 2 hodiny. Hlavním využitím lymfoscintigrafie je situace, kdy je možná různá lymfatická drenáž do různých lymfatických bazénů, jako jsou nádory trupu nebo i vnitřních kvadrantů prsu. V případě, že je SLN lokalizovaná v těsné blízkosti primárního nádoru, nemusí být SLN na scintigramu detekována a scintigram je falešně negativní. Gama-kamera je zobrazena na obrázku 14.10.

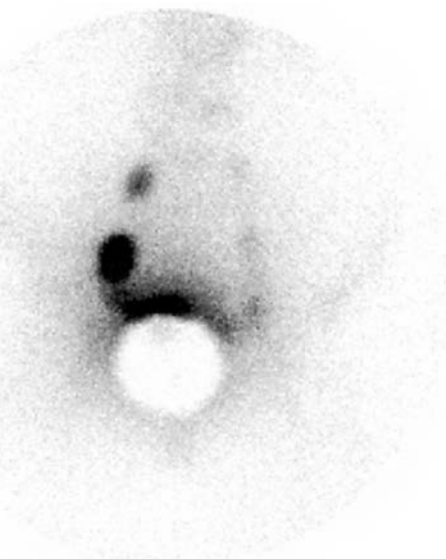


**Obr. 14.10** Gama kamera používaná k předoperační detekci SLN

Dynamická scintigrafie se provádí ihned po aplikaci radioindikátoru a po pokrytí místa vpichu olověnými destičkami k usnadnění scintigrafického průkazu SLN. Hodnocení deseti skenů za minutu v délce 20 minut umožňuje sledování postupného šíření radiokoloidu lymfatiky.

Statická lymfoscintigrafie se provádí za 0,5–2 hodiny po dobu 5–10 minut, s cíleným zaměřením detektoru na vyšetřovanou lymfatickou oblast v poloze přední, zadní, eventuálně boční, aby byla zachycena i menší a méně názorná SLN. Lymfoscintigrafie pro-

kazuje různorodost anatomické lokalizace SLN dané oblasti. Na obrázku 14.11 je zobrazen scintigram s detekovanými SLN a naznačenými lymfatickými uzlinami vyšších řádů.



**Obr. 14.11** Scintigram lymfatických uzlin

### 14.3.4 Peroperační detekce SLN

Na operačním sále v celkové anestezii jsou, po otevření dutiny břišní nebo po přípravě operačního pole v oblasti třísel aplikovány do lůžka nádoru 4 ml patentní modři. SLN jsou identifikovány vizuálně sledováním lymfatických cév od nádoru k první lymfatické uzlině a měřením radioaktivity uzlin ruční kolimační gama sondou. Ruční gama sonda je složena ze dvou částí, ručního senzoru tvořeného krystalem citlivým na gama záření se zesilovačem signálu a čtecí jednotkou. Přesnost detektoru v sondě je dána poměrem mezi počtem fotonů vstupujícím do sondy a počtem detekovaných fotonů. To je ovlivněno charakteristikou krystalu, jeho plochou a silou na jedné straně a velikostí záření na straně druhé. Existují různé druhy detekčních sond, nejčastěji je používán polovodivý detektor, využívající kadmium teluridový nebo zinkový krystal. Výhodou tohoto typu je lepší energetické rozlišení fotonů s rozdílnou energií. Radioaktivní rozpad je náhodný proces, proto se při měření radioaktivity objevují různé hodnoty. Senzitivita se může zvýšit rozšířením energetického pole a snížením kolimace a ochrany. Peroperační gama sonda je vytvořena pro přímé kontaktní snímání a musí mít zajištěnu dostatečnou ochranu vzadu a na bocích, aby se mohli snímat přesně určitou anatomickou lokalizaci. Sondy musí mít kolimaci detektoru; čím

je kolimátor delší a snímací otvor menší, tím přesněji lze radioaktivitu místa vyhodnotit. Existuje řada způsobů měření radioaktivity SLN, většinou jako 6–10násobek hodnoty pozadí operačního pole nebo jako desetina hodnoty radioaktivity primárního nádoru, ale žádný způsob neslouží jako standard.

K radionavigaci jsou v současnosti v České republice používány gama sondy pro laparotomickou i laparoskopickou operativu, gama sonda NEO 2000 firmy Neoprobe Corporation Dublin, Ohio, USA, gama sonda EUROPROBE firmy Euromedical, Le Chesnay, Francie, C Trak, Care Vise Medical Products Corporation, Morgan Hill, USA.

Ruční gama sondy používané k peroperační detekci SLN jsou zobrazeny na obrázku 14.12.



**Obr. 14.12** Ruční gama sonda používaná k peroperační detekci SLN



**Obr. 14.13** Radionavigační chirurgie

Tyto sondy jsou vloženy do sterilního průhledného obalu a umožňují kontaktní detekci radioaktivity v lymfatické uzlině zachycením vysokého počtu impulzů za sekundu v porovnání s okolím. V terminologii lymfatického mapování se takovými uzlinám říká „hot“ (horké) uzliny. Radionuklid může být aplikován za dodržení bezpečnostních opatření přímo na operačním sále nebo může být využita přetrvávající radioaktivita z aplikace koloidu před lymfoscintigrafií. Způsob vyhledávání SLN při radionavigační chirurgii je znázorněn na obrázku 14.13.

## 14.4 Radiohygienická bezpečnost lymfatického mapování

Při lymfatickém mapování jsou dvě oblasti, které je nutno brát v úvahu, a to je **bezpečnost pro pacienta a bezpečnost pro operační tým**. Určující pro radiační dávku, které je vystaven pacient, je stupeň vymizení radioaktivity z místa aplikace a z lymfatických uzlin. Únik koloidu z intersticiálního prostoru je velmi pomalý, proto nejvyšší dávka radiace je v místě aplikace, menší dávka je v lymfatických uzlinách a ještě menší v retikuloendoteliálním systému, přes který proudí částice do krevního řečiště. I v případě, že by nedošlo k šíření koloidu z místa aplikace, byla by maximální absorbovaná dávka 0,45 Gy při aplikaci 5 MBq v 1 ml distribučního objemu. Tato dávka je

pod prahem dávky pro deterministické radiační efekty. Na velikost dávky pro operační tým má vliv také vzdálenost od zdroje, neboť dávka se snižuje se čtvercem vzdálenosti. Měření prokázala, že velikost dávky, které je operační tým vystaven, je pod povolenou hranicí dávek.

Vzhledem k aplikaci nízké aktivity čistého gama radionuklidu s krátkým poločasem rozpadu je radiační riziko při radiačně navigované chirurgii velmi nízké. Radiační dávka pro pracovníky během operačních výkonů je hluboce pod stanoveným limitem, což je 1 mSv za rok. Z těchto důvodů není vhodné používat při radionavigační chirurgii pro operační tým ter-

**Tab. 14.3** Základní radiohygienické zásady

při aplikaci radiokoloidu používat ochranné pomůcky, rukavice, brýle a gumové zástěry
vložit všechny použité nástroje a předměty do zvláštních igelitových sáčků a uložit je minimálně na dva dny do vymírací místnosti
používat pinzety při peroperační manipulaci s „hot pozitivními“ uzlinami
při podezření na mimořádnou kontaminaci osob či prostředí kontaktovat technicko-fyzikálního úsek pracoviště nukleární medicíny

mín radiační expozice. Pro překročení bezpečnostních limitů by musel chirurg operovat více než 2000 hodin, instrumentárka by musela asistovat více než 30 000 hodin a patolog by musel pracovat s radiokoloidem označeným materiálem více než 14 000 hodin. Pro minimalizaci radiačního rizika je nutno dodržovat radiohygienické zásady. Základní hygienické zásady při používání radioaktivně značených látek jsou uvedeny v tabulce 14.3.

## 14.5 Selhání lymfatického mapování

Selhání lymfatického mapování a detekce SLN může způsobit mnoho faktorů. Parciální nebo kompletní neprůchodnost lymfatických cév způsobená metastatickým procesem může snížit, nebo zcela znemožnit šíření lymfy a způsobit nezobrazení SLN, nebo vytvořit arteficiální kolaterální oběh původně nedrénující danou oblast. Lymfatickou drenáž může ovlivnit předchozí radikální chirurgická léčba, radioterapie nebo trauma poškozující lymfatické cévy. Také předchází parciální nebo nedostatečná excize primárního nádoru může způsobit vznik aberantních lymfatických cév a snížit úspěšnost detekce SLN. Nejdůležitějším faktorem pro úspěšnost lymfatického mapování je zkušenost chirurga, vyžadující určitou průpravu a způsob aplikace detekované látky do místa primárního nádoru.

Pro gynekologické onkology neexistuje zvláštní doporučená doba učení techniky lymfatického mapování. Essner a Morton při studiích lymfatického mapování u melanomu a karcinomu prsu uvádějí jako minimum pro zvládnutí techniky lymfatického mapování 15 operací, optimálně však 50 operací. Je jasné, že přesnost metody stoupá a falešná negativita klesá s prohlubujícími se zkušenostmi. Velice důležitý je způsob aplikace značené látky, kterou by měl aplikovat pouze zacvičený člen onkogynekologického týmu. Detekující látka musí být aplikována do lůžka nádoru velice pomalu, nesmí být aplikována do nádorové tkáně, k urychlení drenáže je možné využít

masírování infiltrovaného místa. Správná lokální aplikace látky je *conditio sine qua non*, bez které nejsou moderní přístroje ani zkušený chirurg nic platní.

Jako každá diagnostická metoda, i lymfatické mapování s detekcí SLN má svá omezení a nesprávné interpretace výsledků. Falešnou negativitu lze prokázat dvěma způsoby, exstirpaci SLN s ultramikrostagingovým zpracováním a následnou systematickou lymfadenektomií nebo vyhodnocením všech recidiv nemoci s revizí všech negativních lymfatických uzlin. Recidiva nemoci může nastat z více důvodů, než je falešně negativní vyhodnocení SLN. Příčiny falešné negativy jsou uvedeny v tabulce 14.4.

Snížení frekvence falešné negativy lze docílit výběrem pacientek. K lymfatickému mapování by neměly být indikovány pacientky s objemným nádorem, u kterých je obtížné aplikovat detekční látku do lůžka nádoru a u kterých je velká pravděpodobnost objemného metastatického postižení lymfatických uzlin s vytvořením kolaterálního oběhu. Od určité velikosti může být metastatické postižení lymfatických uzlin detekováno předoperačně zobrazovacími metodami a pacientky mohou být z lymfatického mapování vyřazeny. Při vizuální detekci SLN je hodnoceno zbarvení uzliny s vizualizací aferentních lymfatických cév, v případě použití radiokoloidu je po vyjmutí uzliny proměřeno operační pole a v případě přetrvávající zvýšené radioaktivity je pátráno po další SLN.

Při histopatologickém zpracování může falešná negativita nastat při zvolení příliš velkých vzdáleností mezi jednotlivými úrovněmi krájení nebo při nevyužití imunohistochemických metod. V obou případech může dojít k nezachycení nebo přehlédnutí mikrometastázy. Patolog nemusí zachytit metastatické postižení uzliny i v případech, kdy je odebraná uzlina mechanicky poškozena nebo dekortikována.

**Tab. 14.4** Příčiny falešné negativy SLN

detekce nesprávné SLN
nedetekování nádorem infiltrované SLN při vytvoření kolaterálního oběhu
nedetekování všech SLN daného lymfatického bazénu
chyba v histopatologickém zpracování SLN

Prevenčí je šetrnost odběru uzliny na straně chirurga, ultrastagingové mikroskopické vyšetření a užití standardních metod přikrajování na straně patologa.

Detekce, exstirpace a vyšetření SLN vyžaduje spolupráci všech členů týmu jak na úrovni klinické, tak i na úrovni histopatologické.

## 14.6 Histologické vyšetření lymfatických uzlin

Koncept lymfatického mapování dovoluje patologovi soustředit svou pozornost na omezený počet lymfatických uzlin, u kterých je vysoká pravděpodobnost přítomnosti metastáz. Koncept SLN umožňuje patologovi, s vysokou prediktivní hodnotou, intenzivní zpracování lymfatické uzliny s cílem zachycení mikrometastatického postižení, což není možné z důvodů časových a ekonomických provést u všech odebraných lymfatických uzlin.

Hlavním úkolem pro patologa při vyšetření SLN je průkaz nebo vyloučení nádorových buněk v uzlině. Falešná negativita histologického vyšetření SLN může mít pro pacienta závažné klinické důsledky. Na základě falešné negativity není indikována systematická regionální lymfadenektomie ani léčba radiační, ponechané metastaticky změněné lymfatické uzliny mohou vyústit v neléčitelnou progresi nemoci. Z tohoto důvodu musí být vyšetření prováděno pečlivěji a podrobněji než běžné zpracování lymfatických uzlin barvených hematoxylinem-eozinem. Zpracování SLN je většinou prováděno pooperačně a v případě pozitivitu SLN, pokud nebyla provedena systematická lymfadenektomie, je nutné její provedení ve druhé době. SLN není hodnocena jen v jednom nebo dvou řezech, ale je sériově prokrájena v několika úrovních a kromě barvení hematoxylinem-eozinem jsou využívány imunohistochemické metody. Toto ultramikrostagingové zpracování SLN zvyšuje diagnostiku lymfogenního šíření proti klasickému zpracování lymfatických uzlin až o 20 %.

V současnosti neexistuje standardní metodologický postup zpracování SLN, který by byl všeobecně přijat jako optimální postup detekce metastatického postižení lymfatických uzlin, zvláště na úrovni mikrometastáz a izolovaných nádorových buněk. Je však jasné, že detekce mikrometastáz je umožněna použitím imunohistochemických metod a víceúrovňovým sériovým prokrajováním SLN. Studie Spanknebelové z roku 2005 prokázala pozitivitu SLN při ultramikrostagingovém vyšetření SLN u melanomů v 61 %, z čehož pouze 20 % pacientů s pozitivními SLN bylo diagnostikováno standardním histopatologickým vyšetřením bez použití ultramikrostagingu. Při ultramikrostagingovém zpracování byla pozitivita SLN prokázána při vyhodnocení první úrovně pouze v 19 % případů, v 50 % při vyhodnocení čtyř

úrovní, v 75 % při vyhodnocení deseti úrovní, v 90 % při vyhodnocení patnácti úrovní a ve 100 % při vyhodnocení dvaceti úrovní. Pokud byly jednotlivé vyšetřovací metody použity izolovaně, nedokázaly ani v případě víceúrovňového zpracování SLN zachytit všechna metastatická ložiska, která byla často vícečetná a různě lokalizovaná. K podobným závěrům dospěly i další studie. Tyto výsledky jsou v ostrém rozporu s tvrzením, že mikrometastázy jsou obvykle zachyceny v prvních úrovních zpracování SLN. Senzitivita záchytu metastatického postižení je závislá na velikosti shluku nádorových buněk, zatímco hematoxylinové-eozinové barvení je schopno zachytit středně velká ložiska, pro detekci menších ložisek a izolovaných nádorových buněk je zapotřebí imunohistochemického vyšetření. Vyšetření hematoxylinem-eozinem však zůstává nezbytné pro přesné morfologické potvrzení nádorových buněk detekovaných imunohistochemicky. Topografie mikrometastatických ložisek se liší ve velikosti, lokalizaci a počtu a často tvoří nesouvisející drobná ložiska.

### 14.6.1 Pooperační vyšetření lymfatických uzlin

Klasické zpracování lymfatické uzliny spočívá v rozpůlení uzliny zbarvené tukového pouzdra, zalití obou půlek do parafínu a přípravu jednoho preparátu z každého bločku. Pokud je uzlina malá, zalévá se do parafínu celá. V praxi to znamená, že z deseti uzlin je připraveno průměrně 15 preparátů. Z pohledu patologa mají všechny uzliny stejnou pravděpodobnost, že mohou obsahovat metastázy.

### 14.6.2 Peroperační vyšetření SLN

Peroperační rychlé vyšetření ze zmrzlého řezu je prováděno hematoxylin-eozinovým barvením a je nutno počítat s 20–30% falešnou negativitou. Použití imunohistochemických metod by vedlo k výraznému prodloužení operačního času čekáním na výsledky vyšetření, které by vyžadovalo několik hodin. Peroperační vyšetření má své výhody i nevýhody. Výhodou je možnost provedení systematické regionální



lymfadenektomie v jedné době, nebo odstoupení od chirurgické léčby v případě positivity SLN. Nevýhodou je možnost falešné negativity nezachycením mikrometastázy při nemožnosti využití imunohistochemických metod a ztráta materiálu v důsledku způsobu zpracování uzliny. Pravděpodobnost postižení lymfatických uzlin druhé etáže závisí na velikosti ložisek v SLN.

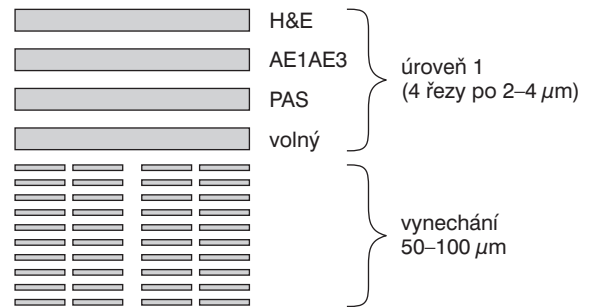
Otisková cytologie vnitřního povrchu rozpuštěné uzliny může peroperačně i pooperačně po nabarvení podle Maye-Grunwalda-Giemse prokázat nádorové buňky. Sensitivita této metody je udávána v literatuře v rozmezí 60–80 %.

### 14.6.3 Pooperační vyšetření SLN

Exstirpovaná tukově lymfatická tkáň, která je tvořena různým podílem tukového vaziva a lymfatické tkáně, je po vyjmutí rozpreparována a izolovaná lymfatická uzlina je po opětovném přeměření radioaktivity a označení podle anatomické lokalizace a způsobu detekce vložena do fixačního roztoku. Materiál je s podrobně vyplněnou průvodkou odeslán na oddělení patologie, kde je uložen v případě použití radionavigační chirurgie na dva dny v samostatné místnosti, ve které dojde k vymizení reziduální radioaktivity. Poté je proveden popis materiálu, který obsahuje rozměry celé excize a rozměry, konzistenci a barvu izolovaných lymfatických uzlin. Makropopis obsahuje počet a lokalizaci jednotlivých uzlin, velikosti uzliny ve třech rovinách v milimetrech. Do protokolu je zaznamenána barva řezu uzliny a případné morfologické změny. U SLN menších než 5 mm je možné uzlinu zalít do parafinu celou, při velikosti 6–10 mm je vhodné uzlinu rozpůlit a při velikosti nad 11 mm se doporučuje uzlinu nařezat ostrou žiletkou ve 2mm širokých plátech, paralelně v dlouhé ose směrem od konvexity k hilu uzliny. Zvláštní pozornost je věnována tomu, aby zůstal zachován průřez celou uzlinou, hlavně pak průřez oblastí pouzdra a oblastí subkapsulární. Počet získaných tkáňových bločků je závislý na velikosti uzliny. Předpokládá se, že nádorové buňky se uchycují subkapsulárně kontralaterálně od hilu uzliny. Z tohoto důvodu je vhodné připravit bločky tangenciálně v podélné ose od kapsuly směrem k hilu a po zalití do parafinu začínat řezy od pouzdra uzliny. Takto připravené části uzliny jsou vloženy do kazety a po označení identifikačním bi-optickým číslem následuje proces zpracování ve tkáňovém automatu. Tkáňové vzorky jsou postupně odvodňovány ve vzestupné řadě alkoholů, projasňo-

vány v xyleny a prosycovány v parafinu. Parafinem prosycené části uzlin jsou zality do parafinu a poté se na rotačním mikrotomu krájí parafinové řezy. Uzlina je postupně v různých úrovních prokrájena v 5  $\mu$ m tenkých řezech, které jsou zachycovány ve vodní lázni a pokládány na podložní sklíčka, která jsou čistá v případech barvení hematoxylinem-eozinem, nebo potažená etoxysilanem v případě řezů připravovaných k imunohistochemickému vyšetření.

Vzhledem k tomu, že z průměrné uzliny je možno připravit několik stovek řezů a tím enormně časově i ekonomicky zatížit laboratoř, je nutno najít určitý kompromis, který by zajišťoval dostatečnou senzitivitu metody pro průkaz mikrometastáz a zároveň by byl časově a ekonomicky únosný. Schéma histologického zpracování SLN je znázorněno na obrázku 14.14.



Obr. 14.14 Schéma histologického zpracování SLN

SLN je nutno zpracovat v opakovaných úrovních krájení, přičemž jedna úroveň krájení obsahuje tři po sobě jdoucí 5 $\mu$ m silné řezy, z nichž první se barví hematoxylinem-eozinem, druhý imunohistochemicky a třetí barvením PAS nebo alcianovou modří, případně se ponechává čtvrtý nenabarvený řez pro případ nutnosti doplnění vyšetření. Následuje vynechání určitého úseku uzliny, která se nezpracovává, a poté přichází další úroveň krájení. Vzdálenost mezi jednotlivými úrovněmi krájení by neměla být větší než 200  $\mu$ m, aby bylo možné zachytit mikrometastázu, jejíž nejmenší rozměr byl stanoven právě na 200  $\mu$ m. Důležité je při stanovení těchto pravidel zpracovat každý jednotlivý bloček připravený ze SLN v opakovaných úrovních, v optimálním případě zpracovat uzlinu celou. Samozřejmě, že tento způsob zpracování není nutno dodržet při zjevné makroskopické metastáze.

#### 14.6.4 Imunohistochemické metody zpracování SLN

Imunohistochemické metody jsou velice přínosné v diagnostice mikrometastáz v lymfatických uzlinách a v detekci pouhých shluků nádorových buněk, které dokáží identifikovat barevným znázorněním specifických nádorových proteinů. K detekci nádorových buněk jsou využívány různé protilátky v závislosti na typu nádoru. U dlaždicobuněčných nádorů je vhodná protilátka AE1/AE3, u adenokarcinomů je vhodná protilátka CAM5.2. Imunohistochemické vyšetření se provádí standardní dvoukrokovou metodikou v automatu DAKO Autostainer s protilátkou proti cytokeratinu v ředění 1 : 50.

#### 14.6.5 Molekulárněbiologické metody zpracování SLN

Nejpřesnější možností průkazu jednotlivých nádorových buněk je amplifikace mRNA, která je exprimována nádorovými buňkami. Pomocí reverzní transkriptázy polymerázovou řetězovou reakcí (RT-PCR), je možno prokázat jedinou nádorovou buňku mezi  $10^7$  normálních buněk. Žádná studie zatím nesrovnala výsledky získané při využití molekulárněbiologických metod s výsledky vzorků využívajících imunohistochemické metody. Možností by bylo vy-

užít nezpracovanou tkáň mezi jednotlivými úrovněmi krájení na RT-PCR. Velkým problémem je kontaminace vzorku a nutnost histopatologické kontroly vzorků, u nichž byly molekulárněbiologickými metodami detekovány nádorové buňky. Dalším problémem je, že studie prokazují přítomnost nádorových protilátek v krvi a lymfatických uzlinách i u zdravých jedinců. S možností využití velice citlivých molekulárně biologických metod vyvstává otázka, kdy považovat přítomnost nádorových buněk v uzlině za metastázu, neboť jsou často zachyceny pouze shluky nádorových buněk. Z biologického hlediska se nemusí jednat nutně o metastázu, ale o mechanicky uvolněnou buňku, která neunikne imunologické kontrole a nemá šanci na přežití. Při užití RT-PCR může nastat také situace, kdy je identifikována pouze signální molekula, takže pozitivní výsledek vyšetření neznamená ani přítomnost celé nádorové buňky, nýbrž jen jejího fragmentu. Van Trappen používal PCR metody k průkazu cytokeratinu 19 u lymfatických uzlin získaných při radikální hysterektomii. Neprováděl lymfatické mapování, ale bylo zřejmé, že pozitivita cytokeratinu 19 korelovala s místy nejčastější lokalizace SLN. Cytokeratin 19 byl pozitivní ve 44 % případů uzlin, které byly vyhodnoceny jako negativní. Jaký je klinický význam prokázaných izolovaných nádorových buněk, není v současnosti jasné, stejně jako není jasné, jaký je prognostický význam mikrometastáz. Zatím se jeví jako přínosné využití těchto metod u melanomu.

### 14.7 Klinický a prognostický význam konceptu lymfatického mapování

Výsledkem konceptu lymfatického mapování a ultramikrostagingového zpracování SLN je schopnost diagnostiky metastáz menších než 2 mm, které byly nazvány mikrometastázami a definovány v AJCC staging systému v roce 2002 jako metastázy větší než 0,2 mm a menší než 2 mm s označením N1(mi). Další novou kategorií lymfogenního metastatického postižení jsou izolované nádorové buňky s klasifikací pN0.

Do TNM klasifikace z roku 2002 byla zahrnuta schémata pro hodnocení SLN a izolovaných nádorových buněk v regionálních lymfatických uzlinách. V případě, že byl pro detekci lymfogenního šíření použit koncept SLN a byly detekovány pouze mikrometastázy, označí se tato skutečnost pN1(mi) (sn). Izolované nádorové buňky jsou shluky nádorových buněk, většinou diagnostikované imunohistochemic-

kými nebo molekulárně biologickými metodami, jež musí být potvrzeny klasickým barvením. Předpokládá se, že tyto buňky nemají metastatickou aktivitu a v histopatologickém stagingu jsou označovány jako N0 v regionálních uzlinách, respektive M0 ve vzdálených lokalizacích. Podle metody detekce lze označit jejich přítomnost při využití imunohistochemických metod jako N0(i+) (sn) nebo N0(mol+) (sn) v případě použití molekulárně biologických metod. Přestože v současnosti existují ultramikrostagingové techniky využívající mnohostupňové prokrajování uzliny a imunohistochemické vyšetření a ještě podrobnější molekulárně biologické metody RT-PCR, umožňující detekci jednotlivých nádorových buněk, současná klasifikace zhoubných novotvarů definuje metastatické postižení pouze po histologickém vyšetření hematoxylinem-eozinem.

V současnosti se pro mikrometastázy a izolované nádorové buňky hledá prognostický význam a klinický výstup, v budoucnu bude zapotřebí definovat, podobně jak se stalo u melanomu v AJCC klasifikaci z roku 2002, prognostický význam počtu postižených uzlin, a to jak na úrovni mikrometastáz, tak i na úrovni makrometastáz. Biologický význam minimálního metastatického postižení SLN nebyl dosud definován, recentní retrospektivní studie Carlsona a Mortona naznačují, že rozsah metastatického postižení lymfatické uzliny diagnostikovaný při ultramikrostagingovém vyšetření a počet uzlin s metastázami je významným prognostickým faktorem ovlivňujícím výsledky léčby. Je jasné, že prognostický význam mikrometastáz, tedy ložisek od 0,2 mm do 2 mm je jiný než přítomnost makrometastázy, tento

rozdíl však není standardně upraven v odlišném způsobu další léčby či dispenzarizace. Většinou je na pacientku s detekovanou mikrometastázou nahlíženo stejně jako na pacientku s makrometastázou a v obou případech je doporučena adjuvantní léčba.

Až do doby, kdy budou k dispozici validní data, je při sestavování léčebného plánu vhodné pohlížet na pacientky s mikrometastázami jako na pacientky s prokázaným lymfogenním šířením a řadit je do skupiny středního rizika pro recidivu nemoci. Při zvažování adjuvantní léčby je nutno pacientku podrobně informovat o současném stavu vědění, o riziku podhodnocení nebo nadhodnocení nemoci a o nežádoucích účincích kombinované chirurgické a radiační léčby. Část tohoto rizika by na sebe měla převzít upřednostněním dalšího postupu sama pacientka.

## Literatura

- Almand B, Resser JR, Lindman B, et al. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1755–1766.
- Borovanský L, et al. *Soustavná anatomie člověka. Díl II.* Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1967; s. 717–734.
- Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer* 1977; 39: 456–466.
- Cody HS. *Sentinel Lymph Node Biopsy.* London: Martin Dunitz Ltd, 2002.
- Cochran AJ, Huang RR, Guo J, et al. Current practise and future directions in pathology and laboratory evaluation of the sentinel node. *Ann Surg Oncol* 2001; 8(suppl): 13–17.
- Cochran AJ. The pathologist's role in sentinel lymph node evaluation. *Semin Nucl Med* 2000, 30: 11–17.
- Cserni G. Histopathologic examination of the sentinel lymph nodes. *Breast J* 2006; 12(Suppl.2): 152–156.
- Čihák R. *Anatomie 3.* Praha: Grada Publishing, 1997; s. 170–202.
- DiSaia PJ., Creasman WT. *Clinical Gynecologic Oncology.* 6<sup>th</sup> ed. St. Luis: 2002; s. 53–13.
- Essner R, Kojima M. Dendritic cell function in sentinel nodes. *Oncology* 2002; 16 (suppl 1): 27–31.
- Fisher B, Fisher ER. The interrelationship of hematogenous and lymphatic tumor cell dissemination. *Surg Gynecol Obstet* 1966; 122: 791–798.
- Gershenson DM, McGuire WP, Quinn MA, Thomas G. *Gynecologic Cancer – Controversies in Management.* Philadelphia: Elsevier Ltd., 2004.
- Gould EA, Winship T, Philbin PH, et al. Observations on a sentinel node in cancer of the parotid. *Cancer* 1960; 13: 77–78.
- Gray J. The relation of lymphatic vessels to the spread of cancer. *Br J Surg* 1938; 6: 462–495.
- Hudack S, McMaster P. The lymphatic participation in human cutaneous phenomena. *J Exp Med* 1933; 57: 751–774.
- Levenback C, Morris M, Burke TW, et al. Groin dissection practices among gynecologic oncologists treating early vulvar cancer. *Gynecol Oncol* 1996; 62: 73–77.
- Levenback C, Van der Zee A, Coleman R. *Clinical Lymphatic Mapping in Gynecologic Cancers.* London: Taylor and Francis, 2004.
- Morton DL, Wen DR, Wong JH, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992; 127: 392–399.
- Schauer AJ, Becker W, Reiser M, Possinger K. *The Sentinel Lymph Node Concept.* Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2005.
- Sobotta R. *Atlas of Human Anatomy 2.* Munich: Urban & Schwarzenberg, 1987.
- Spanknebel K, Coit DG, Bieligg SC, et al. Characterization of micrometastatic disease in melanoma sentinel lymph nodes by enhanced pathology. *Am J Surg Pathol* 2005; 3: 305–317.
- Van Trappen P, Gyselman VG, Lowe DG, et al. Molecular quantification and mapping of lymph-node micrometastases in cervical cancer. *Lancet* 2001; 357(9249): 15–20.

## Seznam obrázků na CD

- 14.1 *Vasa lymphocapillaria*
- 14.2 *Vasa lymphatica*
- 14.3 *Truncus lymphaticus*
- 14.4 *Lymfatická uzlina*
- 14.5 *Průřez lymfatickou uzlinou*
- 14.6 *Lymfatické povodí s lymfatickými uzlinami*
- 14.7 *Hlavní lymfatické kmeny*
- 14.8 *Způsob aplikace lymfotropního barviva*
- 14.9 *Způsob aplikace radiokoloidu*
- 14.10 *Gama kamera používaná k předoperační detekci SLN*
- 14.11 *Scintigram lymfatických uzlin*
- 14.12 *Ruční gama sonda používaná k peroperační detekci SLN*
- 14.13 *Radionavigační chirurgie*
- 14.15 *Schéma histologického zpracování SLN*