

BIOPTICKÁ DIAGNOSTIKA GASTROINTESTINÁLNÝCH STROMÁLNÝCH NÁDOROV

Lukáš Plank

Ústav patologickej anatómie Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Martinskej fakultnej nemocnice, Martin

Gastrointestinálne stromálne tumory (GIST-y) sú najčastejšie mezenchýmové nádory gastrointestinálneho traktu. Sú zväčša imunohistochemicky pozitívne pri dôkaze antigénu CD117 a obyčajne vykazujú mutácie receptora tyrozínovej kinázy – génu c-KIT alebo PDGFRA. Cieľom predloženej práce je prehľadne sumarizovať súčasné poznatky o význame ich biptickej diagnostiky všeobecne a vo vzťahu k určeniu ich histologického typu, fenotypickým črtám a výsledkom genetických vyšetrení. Diskutuje sa o význame hodnotenia týchto parametrov z hľadiska diagnostického, diferenciálno-diagnostického, prognostického a prediktívneho.

Kľúčové slová: gastrointestinálny stromálny tumor, GIST, biptická diagnóza, prognostické a prediktívne parametre, mutácie receptora tyrozínovej kinázy, KIT, PDGFRA.

Kľúčové slová MeSH: nádory gastrointestinálne stromálne – diagnostika; biopsia; prognóza; receptory pre faktor odvodený od trombocytov; mutácia.

BIOPTIC DIAGNOSIS OF GASTROINTESTINAL STROMAL TUMORS

Gastrointestinal stromal tumors (GIST-s) are the most common mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract. They usually show immunohistochemical positivity of CD117 antigen and mutations of the tyrosin kinase receptor – c-KIT or PDGFRA gene. The objective of the paper is to summarize current informations on importance of their biopsy diagnosis, especially in relation to the determination of the GIST's histologic type, its phenotype and results of the mutational analyses. The importance of all these parameters for the diagnosis and differential diagnosis of GIST's, its prognosis and therapy is discussed.

Key words: gastrointestinal stromal tumor, GIST, biopsy diagnosis, prognostic and predictive parameters, tyrosin kinase receptor mutations, KIT, PDGFRA.

Key words MeSH: gastrointestinal stromal tumors – diagnosis; biopsy; prognosis; receptors, platelet derived growth factor; mutation.

Onkologie, 2007; 1 (2): 73–78

Úvod

Definícia nádoru typu gastrointestinálneho stromálneho tumoru (ďalej GIST) prešla, ako sme konštatovali aj v editoriale tohto čísla, značným vývojom. Menil sa aj význam tejto definície, od čisto onkologicko-klasifikačného a diagnostického až po význam na úrovni určovania prognosticko-prediktívnych parametrov. Kategória GIST zahŕňa nádory, ktoré boli pôvodne považované za nádory svalového alebo neuroektodermového pôvodu a klasifikované ako leiomyómy, epitelioidné leiomyómy či leiomyoblastómy, leiomyosarkómy, resp. schwannómy (či neskôr ako nádory gastrointestinálneho autonómneho nervového systému – tzv. GANT-y). Signifikančný posun v názoroch na definíciu GIST-u nastal po odčlenení pravých nádorov svalového a nervového pôvodu a po identifikácii intersticiálnej Cajalovej bunky, príp. prekursora podobného stromálnej kmeňovej bunky ako východiskovej bunky týchto nádorov, a to vplyvom poznatkov z oblasti ich genetiky. V súčasnosti je preto najpriateľnejšia nasledujúca **definícia GIST-ov:** je to skupina nádorov mezenchýmového pôvodu gastrointestinálneho traktu, ktoré vykazujú mutáciu génu receptora tyrozínovej kinázy c-KIT alebo rastového doštičkového faktora alfa (PDGFRA) a ktoré zahŕňajú nádory so širokým spektrom biologického potenciálu na všetkých miestach ich vzniku (1).

V onkologickej patológii je všeobecne akceptované, že základom hodnotenia nádorov je ich morfológický obraz. Mnohé z poznatkov makroskopickej a mikroskopickej morfológie týchto nádorov sú dôležité nielen pre proces ich biptickej diagnostiky, ale nachádzajú uplatnenie aj pri vyšetrení pacienta či pri sledovaní efektu liečby jeho nádorového ochorenia zobrazovacími vyšetřovacími metódami. Aj preto sme predložený text rozdelili na časť venovanú histomorfologickej analýze GIST-u, po ktorej nasleduje analogicky k postupu pri biptickom vyšetrení časť venovaná fenotypovej a genotypovej analýze buniek nádoru a následne stručné zhrnutie diferenciálno-diagnostických problémov. V ďalšej časti diskutujeme o biologickej povahe GIST-u, o prognostických a prediktívnych parametroch vyplývajúcich z biptickej analýzy a upozorňujeme na možné zmeny diskutovaných parametrov GIST-u u pacientov, ktorí boli liečení špecifickou terapiou blokady príslušných nádorových receptorov.

Morfologická analýza ako základ biptickej diagnostiky a diferenciálnej diagnostiky GIST-u

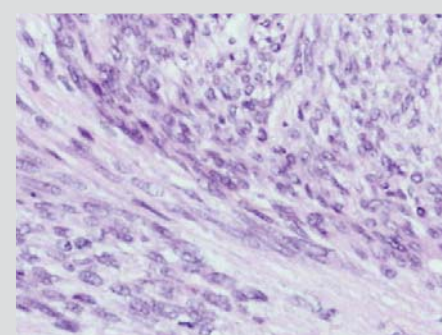
V oblasti morfológie GIST-ov sú klinicky významné nielen histomorfologické, ale aj niektoré makroskopické parametre. Makroskopický obraz

GIST-u a jeho rastové črty sú pomerne rôznorodé, čo súvisí s:

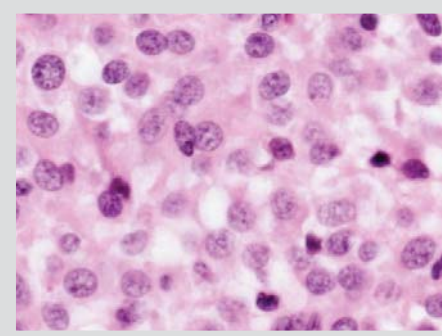
- dosiahnutou veľkosťou nádoru v čase jeho klinickej manifestácie a diagnózy,
- miestom jeho vzniku podľa postihu daného orgánu gastrointestinálneho traktu,
- miestom jeho vzniku podľa postihu konkrétnej vrstvy steny orgánu, resp. omenta či mezenteria,
- prípadnými sekundárnymi zmenami (krvácanie, nekróza, cystické zmeny a pod.), ktoré závisia aj od veľkosti a miesta vzniku nádoru, rýchlosti jeho rastu, alebo sú postterapeutické.

Nádory malých rozmerov sa môžu prejavíť ako submukózne, intramurálne alebo subserózne útvary s rôznym stupňom exofytického rastu, napr. smerom do lúmenu s tvorbou intraluminálnych polypoidných lézií. Nádory väčších rozmerov vytvárajú väčšie uzlovité štruktúry, ktoré sú neraz akoby prilepené k stene dutého orgánu GIT-u a infiltrujú túto stenu do rôznej hĺbky. Makroskopický vzhľad niektorých väčších GIST-ov pripomína presýpacie hodiny, keď menšia časť nádoru leží vo vnútri a väčšia časť mimo postihnutého orgánu (1, 2). GIST-y často vyzerajú byť zapuzdrené, avšak či ide o pravé puzdro bez známok invázie, alebo pseudokapsulárnu a nádorom infiltrovanú štruktúru, to preukáže až histologické vyšetrenie. Tento fakt je dôležitý pre zvažovanie chirurgic-

Obrázok 1. Vretenobunkový GIST.



Obrázok 2. Epiteloidno-bunkový GIST.



kého prístupu. Rovnako až histologické vyšetrenie definitívne zhodnotí stupeň infiltrácie mukozálnych štruktúr, alebo stupeň infiltrácie tukového spojiva mezenteria, omenta a pod.

Histopatologický obraz GIST-u je variabilný a doteraz sa v ňom rozlišovali dva, resp. **tri hlavné histopatologické typy**: vretenobunkový, ktorý je najčastejší (až 70 % všetkých – obrázok 1), epiteloidno-bunkový (cca 20 % všetkých – obrázok 2) a zmiešaný (cca 10 %). Napriek variabilite histologický obraz umožňuje skúsenému biopsikovi s vysokou mierou istoty dospieť k správnej diagnóze a tú následne „len“ potvrdiť imunohistochemickým vyšetrením (2). Na druhej strane je histologický obraz GIST-u nezriedka klamlivo nenápadný, čo môže viesť k nesprávnemu odhadu rizika malignity. Tzv. typické histologické črty malígnych nádorov ako sú bunkové atypie a viacjadrovosť buniek, totiž neraz chýbajú. Bývajú častejšie a výraznejšie prítomné v epiteloidno-bunkovom type (3), ale len malá časť prípadov vykazuje nápadný cytologický pleomorfizmus (4).

Nádory s vretenobunkovou morfológiou vykazujú storiformné či fascikulárne radenie buniek s rôznym stupňom palisádového usporiadania jadier. Bunky majú len úzky lem svetloeoziophilnej cytoplazmy a jadrá oválneho tvaru. Pomerne často sa v rôznej blízkosti od jadra bunky smerom k jej periférii nachádzajú „perinukleárne“ opticky prázdne vakuoly (fenomén pôvodne považovaný za špecifický pre leiomyomatózne proliferácie /4/). V epiteloidno-bunkovom type sú nádorové bunky okrúhle, majú väčšiu a bohatšiu eozinofilnú alebo „vodojasnú“ cytoplazmu. Ich jadrá sú relatívne uniformné a obyčajne

Tabuľka 1. Prehľad možnej pozitívnej expresie antigénu CD117 v biopsickom materiáli.

normálne tkanivá a bunky v GIT-e	Cajalove intersticiálne bunky, mastocyty
nádorové lézie	nádory (leukémie a sarkómy) granulocytového a mastocytového radu, angiomyolipóm, synoviálny sarkóm (menšia časť prípadov), germinálne nádory, Ewingov sarkóm/PNET, svetlobunkový sarkóm, epitelioidný sarkóm, rabdomyosarkóm, metanefrický adenokarcóm.
nenádorové lézie	intraabdominálne a mezenterické fibromatózy, sklerotizujúca mezenteritída.

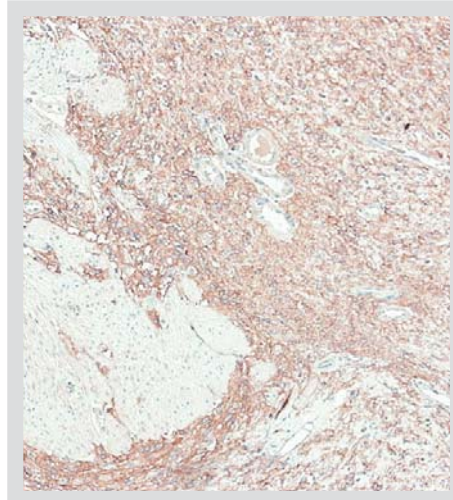
okrúhleho až oválneho tvaru. V tomto type nádoru sa vyskytuje buď difúzne usporiadanie buniek, alebo bunky sú usporiadané organoidne až alveolárne a obraz môže byť pripomínať spektrum neuroendokrinných nádorov (3). V zmiešanom type sa vedľa seba nachádzajú zóny jednej, resp. druhej morfológie s nepravidelným prelínaním, menej často je hranica oboch zón ostrá a bez prechodu. Zvláštnosťou histologického obrazu malej časti prípadov je nápadná extrémna vakuolizácia buniek až so vzhľadom typu pečatného prsteňa, pričom obsah vakuol je PAS-negatívny.

Medzi bunkami všetkých troch hlavných histologických typov býva rôzny podiel eozinofilnej medzibunkovej hmoty. V časti prípadov sa objavujú eozinofilné PAS-pozitívne akumuláty extracelulárnych kolagénových vlákien nazývané aj skenoidné fibrily. Majú buď amorfny „hyalínový“, alebo zreteľne fibrilárny vzhľad, ich uloženie sú buď okrúhle, globulárne, alebo viac asymetrické a pretiahnutého tvaru. Bývajú častejšie v GIST-och tenkého čreva, vyskytujú sa aj v nádoroch hrubého čreva, ale nie rekta (1, 4). Na „pozadí“ nádoru môžu byť vyznačené myxoidné a iné regresívne zmeny, cystické regresívne zmeny, krvácania a v časti prípadov je prítomná stromálna lymfoidná malobunková reakcia. V niektorých GIST-och, najmä s mutovaným PDGFRA, býva nápadná prímies početných mastocytov (2). Mitotická aktivita, ktorej hodnotenie sa používa na zaradenie do príslušného stupňa rizika malígneho správania (pozri nižšie), nie je priamo závislá na histologickom obraze. To všetko vyúsťovalo do doteraz akceptovaného stanoviska, že triedenie GIST-ov podľa histomorfologických typov nie je priamo prognostický významné (4). Aj posledná z konsenzuálnych konferencií o manažovaní GIST-ov (5) konštatovala, že význam histopatologickej klasifikácie týchto nádorov je výzvou pre ďalšie výskumy. Len recentne sa objavili prvé novšie údaje, ktoré naznačujú, že klasifikácia podľa histologických typov by mohla prispieť odhadnúť biologické vlastnosti ochorenia – preto sme ich zaradili do časti venovanej určovaniu stupňa malignity GIST-ov.

Fenotypová analýza ako súčasť biopsickej diagnostiky a diferenciálnej diagnostiky GIST-u

Fenotypová analýza buniek GIST-u je nedeľiteľnou súčasťou biopsickej diagnostiky GIST-u.

Obrázok 3. Pozitívna expresia antigénu CD117 v GIST-e (negatívne sú úseky pôvodnej svaloviny).



Najdôležitejším fenotypovým znakom GIST-u je expresia antigénu CD117 (obrázok 3). Keďže sa zdalo, že súvisí s aktiváciou receptora c-KIT-u, tak sa predpokladalo, že každý GIST by mal byť pozitívny (6). Neskôr sa ukázalo, že existujú CD 117 negatívne GIST-y a naopak, že existujú prípady CD117 pozitívne bez súčasnej mutácie c-KIT-u. Zmenil sa aj význam detekcie expresie CD117. V súčasnosti je už viac-menej akceptované, že dôkaz fenotypovej expresie nepostačuje a že pri rozhodovaní o indikovaní cielennej terapie je žiaduca analýza génových mutácií. Napriek tomu dôkaz pozitivity CD117 je „zlatým štandardom“ biopsickej diagnostiky GIST-ov (2), pričom najmä v rámci diferenciálno-diagnostických úvah netreba zabúdať na pozitivitu antigénu CD117 v normálnych bunkách GIT-u a v iných nádorových a nenádorových léziách v brušnej dutine (pozri tabuľku 1). Patológ, ale aj klinik by si mal byť ďalej vedomý toho, že expresia CD117 v tkanive nádoru závisí aj od zvolenej protilátky, imunohistochemickej metódy a natrávenia parafínových rezov (3). Aj preto sme v rámci tvorby národného projektu diagnostiky GIST-ov zjednotili metodiku imunohistochemického dôkazu expresie antigénu CD117 v biopsickej vyšetrenom materiáli.

Z pohľadu biopsickej diagnostiky GIST-ov a odlíšenia im podobných procesov sa osvedčila fenotypová analýza buniek nádoru panelom protilátok na dôkaz CD117, CD34, markerov svalovej a prípadne neuroektodermovej diferenciácie a niektorých ďalších znakov. Analýzy väčších súborov prípadov pre-

ukázali nasledujúce výsledky: cca 95 % prípadov GIST-ov je pozitívnych pri imunohistochemickom dôkaze antigénu CD117, v 80 % sa zisťuje expresia BCL-2 proteínu a v 60 – 70 % CD34 antigénu. Expresia pozitivity CD34 býva častejšie vyznačená v GIST-och pažeráka a kolorektálnej oblasti (4). Ostatné znaky potenciálnej hladkosvalovej či neuroektodermovej diferenciácie buniek sú vyznačené rôzne: cca 40 – 50 % prípadov je pozitívnych pri dôkaze svalovo-špecifického aktínu, 30 – 40 % hladkosvalového aktínu, 5 – 10 % S-100 proteínu a len malý počet prípadov (približne 5 %) pri dôkaze dezminu, podobne aj caldesmónu (2, 3, 4). Expresia svalovo-špecifických znakov býva častejšie vyznačená pri vretenobunkovej morfológii GIST-u a v nádoroch tenkého čreva.

V praxi sa za najdôležitejšie považuje kombinovaný dôkaz expresie CD34 a CD117 (6). Stupeň expresie týchto znakov nemusí byť v celom nádore rovnaký ani kvalitatívne, ani kvantitatívne a výnimkou nie sú ani prípady s parciálne vyznačenou pozitivitou. Skúsenosti s hodnotením pozitivity antigénu CD117 v GIST-och poukazujú na jej nasledovnú variabilitu (4):

- a) v takmer 90 % pozitívnych prípadov je difúzna cytoplazmatická a objavuje sa v celej mase nádoru, pričom takmer v 1/2 týchto prípadov vykazuje akcentáciu pozitivity do perinukleárnej oblasti (tzv. bodovitá pozitivita viazaná na oblasť Golgiho aparátu) a v malej časti prípadov je len perinukleárna,
- b) v približne 5 – 20 % prípadov je fokálne vyznačená len v časti nádorových buniek a v ostatných chýba (tzv. fokálna pozitivita). Tento moment je rizikový pre hodnotenie endoskopicky získaných parciálnych vzoriek nádoru. Z uvedených dôvodov je dôležité prijať v každom diagnostickom centre určitú hranicu (percento pozitívnych buniek) ako „kriteriálny“ základ potvrdenia diagnózy. Pri analýze recidivujúcich nádorov a porovnávaní nálezov v metastáze či v lokálnej recidíve netreba zabúdať na fakt, že v priebehu liečby nádoru imatinibom sa môžu objaviť zmeny fenotypovej expresie (7, pozri aj nižšie).

Okrem týchto, viac-menej rutinne, vo všetkých zainteresovaných špecializovaných diagnostických centrách, používaných markerov existujú aj ďalšie menej dostupné a neraz len experimentálne overené fenotypové znaky GIST-ov. Medzi ne patrí reakcia s protilátkou proti PDGFRA (ktorá je pozitívna v GIST-och s mutáciou rovnomeného génu), dôkaz proteínu DOG1 („discovered on GIST-1“ – proteín na 11 chromozóme v mieste CCND1-EMS1 a exprimovaný v GIST-och s mutáciou tak c-KIT-u ako aj PDGFRA) a protilátka PKC-theta (proteínová kináza C – τ – /2/).

Záverom tejto state treba upozorniť aj na ojedinelé prípady GIST-ov s „konfúznou“ expresiou

Tabuľka 2. Stručný prehľad možných mutácií receptora tyrozínovej kinázy a ďalších prídavných genetických zmien v nádoroch typu GIST (upravené podľa Dauma a spol., 2006 a Miettinen a Lasotu, 2006).

skupinové zaradenie	identifikácia	frekvencia
mutácie c-KIT-u	mutácia exónu 11 (delécie, bodové mutácie, duplikácie) mutácia exónu 9 (duplikácie) mutácia exónu 13 mutácia exónu 17	až 60 % všetkých GIST-ov 15 – 20 % všetkých zriedkavé (do pribl. 4 % všetkých GIST-ov) zriedkavé (menej ako 1 % všetkých GIST-ov)
mutácie PDGFRA	mutácie exónu 18 mutácie exónu 12 mutácie exónu 14	80 % všetkých PDGFRA mutácií zriedkavé zriedkavé
iné genetické zmeny	zmeny supresorových génov na ramienku 14. a 22. chromozómu	pri asociácii s neurofibromatózou
sekundárne mutácie získané počas liečby imatinibom	imatinib-rezistentné mutácie tyrozínovej kinázy (TK1 a TK2) buď v oblasti c-KIT alebo PDGFRA	pri vzniku rezistencie na imatinib u pacientov s prvotnou terapeuticky navodenou remisiou a následnom rozvoji metastáz

Tabuľka 3. Prehľad nádorových a nenádorových proliferácií, ktoré môžu imitovať obraz GIST-u.

proliferácie podľa pôvodu a biologickej povahy	diagnostický typ lézie
mezenchýmové nádory	leiomyóm, hemangiopericytóm, solitárny fibrózny tumor, leiomyosarkóm, angiosarkóm, nediferencovaný liposarkóm, synoviálny sarkóm, malígny fibrózny histiocytóm, myxofibrosarkóm, fibrosarkóm, nádory folikulových dendritických buniek, extrauterínny endometriálny stromálny sarkóm a i. sarkómy
neuroektodermové nádory	schwanóm, glomus tumor, zhubný nádor buniek obalov periférnych nervov (MPNST), malígny melanóm, PEC-óm, PNET/Ewingov sarkóm
neuroendokrinné nádory	karcinoidy, NET-y pankreatických ostrovčekov
mezotelové nádory	malígny mezotelióm
epitelové nádory	sarkomatooidný karcinóm
nenádorové (pseudonádorové) proliferácie	zápalový pseudotumor – zápalový myofibroblastický tumor, zápalový fibroidný tumor žalúdka, intraabdominálne a mezenterálne fibromatózy, proliferatívna myozitída a fasciitída, retroperitoneálne fibróza, sklerotizujúca mezenteritída

antigénov iných bunkových radov, čo môže viesť k problémom diagnostiky a diferenciálnej diagnostiky. Sem patria napr. prípady GIST-u s expresiou pozitivity cytokeratínových filament (8), prípadne iných antigénov. Takéto prípady si vyžadujú podporiť diagnózu vyšetrením príslušných mutácií receptorov tyrozínovej kinázy (c-kit-u alebo PGFR-a).

Analýza génových mutácií c-KIT-u a PDGFRA ako súčasť biopptickej diagnostiky a diferenciálnej diagnostiky GIST-u

Súčasťou súčasnej diagnostiky GIST-ov sa stali už aj genetické analýzy dôkazu mutácií c-KIT-u alebo PDGFRA, prípadne aj ďalších genetických zmien. Kým pri familiárnom type GIST-u vznikajú dedične viazané mutácie identifikovateľné v ľubovoľnej bunke pacienta, vrátane krvných buniek, tak pri častejších sporadických typoch možno tieto mutácie identifikovať len v tkanive samotného nádoru. O to viac stúpa význam zaistenia možnosti analýzy príslušných mutácií patológom pri bioptickom vyšetrení GIST-u. Ako ukazujú publikované výsledky (napr. 1, 2) a aj naša vlastná skúsenosť v rámci národného

programu detekcie GIST-ov v SR (9, 10), aj formalíno-fixované a v parafíne zaliate tkanivo umožňujú pri náležitom postupe izoláciu nádorovej DNA a následnú genetickú analýzu.

Cieľom predloženého textu nie je dôkladná deskripcia jednotlivých možných mutácií c-KIT-u a PDGFRA, prípadne ďalších genetických zmien v nádorových bunkách GIST-u, rovnako ani funkčného účinku príslušnej mutácie. V tabuľke 2 uvádzame súhrn možných mutácií receptora tyrozínovej kinázy a prípadných ďalších prídavných genetických zmien. Tu len považujeme za vhodné dodať, že v prípade sporadických GIST-ov sú jednotlivé mutácie c-KIT-u alebo PDGFRA tzv. exkluzívne, t. j. v jednom nádore sa vyskytuje obvyčajne len mutácia jedného z týchto dvoch súčastí receptora tyrozínovej kinázy. V budúcnosti možno očakávať odpoveď na otázku, či aj výsledky genotypovej analýzy, podobne výsledky analýzy histomorfologickej a fenotypovej sú závislé od miesta primárneho vzniku nádoru. Dnes sa zdá, že niektoré mutácie sa vyskytujú častejšie v typickej „konfigurácii“ – napr. mutácie exónu 9 c-KIT-u sú častejšie v tých tenkočrevných GIST-och, ktoré vykazujú vyššie riziko malignity, alebo že mutácie

PDGFRA sú častejšie v žalúdočných GIST-och s epiteloide bunkovou morfológiou (1). Detailné informácie o molekulárnej biológii a genetike GIST-ov aj vo vzťahu ku klinickým variantom GIST-u ako súčasti niektorých klinických syndrémov (Carneyove trias, syndróm Carneya-Stratakisa, neurofibromatóza 1. typu, familiárny GIST a GIST detského veku) a ich klinickej prezentácii možno nájsť v špecializovanej literatúre a v niektorých prehľadných článkoch (napr. 1, 2).

Diferenciálna diagnostika – odlišenie GIST-u podobných nádorových a nenádorových lézií

Diferenciálno-diagnostická úvaha pri bioptickej diagnostike GIST-ov musí prihliadať na pomerne širokú variabilitu možného histologického obrazu GIST-u a fenotypovej expresie jeho buniek. Zahŕňa tak široké spektrum najmä mezenchýmových a neuroektodermových, sčasti aj neuroendokrinných nádorov, menej nádorov epitelovej povahy, resp. aj niektoré pseudonádorové a nenádorové proliferatívne procesy. Nie je cieľom tejto časti in extenso vyčerpáť celú v podstate „len“ pre patológa dôležitú problematiku histopatologickej diferenciálnej diagnostiky. Preto sme v tabuľke 3 sumarizovali tie neoplastické a non-neoplastické jednotky, ktorých morfológia môže spôsobovať v praktickej diagnostike najčastejšie diferenciálno-diagnostické problémy. Tie môže spôsobovať jednak podobnosť morfológie v tabuľke sumarizovaných lézií a GIST-ov, rovnako však aj prípadná expresia pozitivity antigénu CD117. Spoľahlivá diferenciálna diagnostika sa opiera o dôkladnú analýzu najmä morfológie nádoru a fenotypu nádorových buniek, v problematických prípadoch aj o genetickú analýzu nádoru. Vzhľadom na relatívnu zriedkavosť GIST-ov môžu byť skúsenosti miestneho patológa-bioptika s ich diagnostikou limitované. Aj tento fakt je jedným z dôvodov pre centralizáciu bioptickej diagnostiky GIST-ov, resp. pre implementáciu mechanizmov „druhého (centrálneho) hodnotenia“ týchto nádorov. V Slovenskej republike bol uvedený tento proces do praxe k 1. 1. 2005 (10).

Biologické vlastnosti GIST-u: benígny verus malígny GIST a určenie stupňa malignity pri bioptickom vyšetrení

Súčasnou bioptického vyšetrenia nádorovej lézie je nielen určenie typu nádoru, ale aj identifikácia tých jeho vlastností, ktoré majú prognostickú a prediktívnu výpovednú hodnotu. Podľa toho sa nádory delia rozdeľujú na benígne verus malígne, prípadne semimalígne či s neistým biologickým správaním, pričom za rozhodujúce sa považuje zhodnotenie viacerých faktorov bioptického vyšetrenia. Sú to najmä

Tabuľka 4. Určovanie rizika malígneho biologického správania gastrointestinálnych stromálnych nádorov podľa Fletchera a spol. (2002).

najväčší rozmer nádoru (cm)	počet mitóz na 50 tzv. veľkých zorných polí	riziko malígneho správania (stupeň)
menej ako 2 cm	menej ako 5 mitóz	veľmi nízke riziko
2 – 5 cm	menej ako 5 mitóz	nízke riziko
menej ako 5 cm 5 – 10 cm	6 – 10 mitóz menej ako 5 mitóz	stredné riziko
viac ako 5 cm viac ako 10 cm každá veľkosť	viac ako 5 každý počet mitóz viac ako 10 mitóz	vysoké riziko

Tabuľka 5. Určovanie rizika malígneho biologického správania gastrointestinálnych stromálnych nádorov podľa Miettinen a Lasotu (2006).

	parametre nádoru I.	parametre nádoru II.	riziko malígneho správania (%)*	riziko malígneho správania (%)*
skupina	najväčší rozmer nádoru (cm)	počet mitóz na 50 tzv. veľkých zorných polí	pre GIST-y žalúdka	pre GIST-y tenkého čreva
1	menej ako 2 cm	menej ako 5 mitóz	0 – veľmi nízke, (ak vôbec)	0 – veľmi nízke, (ak vôbec)
2	2 – 5 cm	menej ako 5 mitóz	1.9 – nízke	4.3 – nízke
3a	5 – 10 cm	menej ako 5 mitóz	3.6 – nízke	24 – stredné
3b	viac ako 10 cm	menej ako 5 mitóz	12 – stredné	52 – vysoké
4	menej ako 2 cm	viac ako 5 mitóz	0 – nízke**	50 – vysoké**
5	2 – 5 cm	viac ako 5 mitóz	16 – stredné	73 – vysoké
6a	5 – 10 cm	viac ako 5 mitóz	55 – vysoké	85 – vysoké
6b	viac ako 10 cm	viac ako 5 mitóz	86 – vysoké	90 – vysoké

*Riziko je vyjadrené v % prípadov na základe dlhodobého sledovania pacientov s progredujúcim ochorením
**V týchto skupinách bol analyzovaný nízky počet prípadov, ktorý je nedostatočný pre spoľahlivú predikciu malígneho potenciálu.

spôsob rastu, diferenciácia, resp. stupeň anaplázie nádorových buniek, ich proliferačná (resp. mitotická) aktivita, invazivita (aj do ciev krvných a lymfatických), schopnosť zakladať metastázy a pod.

V posledných rokoch však tento prístup podlieha zmenám, lebo niektoré, najmä mezenchýmové, nádory považované za benígne vykazujú pri dostatočne dlhodobom sledovaní istý potenciál recidívy alebo metastatického rozsevu (11). Tak vznikla otázka, či namiesto rozlišovania benígnych a malígnych nádorov nie je vhodnejšie identifikovať stupne *relatívneho rizika potenciálu malígneho správania*. Na čele týchto trendov stojí práve kategória GIST-ov, pri hodnotení ktorých sa diskutuje, či vôbec (snáď s výnimkou nádorov menších ako 1 cm /4/) existujú pravé benígne varianty týchto nádorov bez rizika recidívy či neskorého metastázovania. Pôvodne sa preto rozlišovali dva stupne rizika „agresívneho klinického správania“: GIST-y s nízkym, resp. s vysokým stupňom uvedeného rizika (12). Prítom bola a aj podnes ostáva otvorená otázka vhodnosti jednotlivých kritérií pre uvedený prístup – zvažovali sa rôzne parametre, ako napr. invázia sliznice, nekroza nádoru a vysoká bunečnosť, avšak niektoré z nich boli len ťažko reprodukovateľné (1, 4, 5).

Postupne sa ukázalo, že za rozhodujúce možno považovať dve kritériá, a to *veľkosť nádoru* a *stupeň proliferačnej aktivity* jeho buniek (4). Parameter

veľkosti nádoru možno posúdiť makroskopicky pri excidovaní resekovaného nádoru, alebo pomocou zobrazovacích metód. Pri hodnotení proliferačnej aktivity sa analyzovalo určenie mitotického indexu, hodnotenie proliferačnej frakcie imunohistochemicky (dôkaz proliferačného nukleárneho antigénu a antigénu Ki-67) alebo prietokovo-cytometricky, či hodnotenie aneuploidie nádorových buniek (3). Vývoj názorov vyvrcholil na konsenzuálnej konferencii o GIST-och v apríli 2001 (4), keď sa dohodlo identifikovať pri bioptickom vyšetrení GIST-u *štyri stupne rizika malígneho biologického správania*:

- veľmi nízke,
- nízke,
- stredné a
- vysoké riziko (tabuľka 4).

Každý stupeň je definovaný kombináciou dvoch parametrov – najväčšieho rozmeru nádoru v cm a mitotickej aktivity nádoru. Veľkosť určuje patológ zmeraním nádoru po doručení resekátu nádoru, pričom optimálne je určenie veľkosti v nefixovanom tkanive. Po fixácii vzhľadom na istý stupeň zvrátenia tkaniva sa získavajú rozmery o niečo menšie. Biologicky najvýznamnejšia sa zdá byť hranica veľkosti do 2 cm, pri väčších nádoroch sú to rozmery do 5, do 10 cm, resp. viac. Ak ide o biopsiu endoskopicky získaných častí nekompletného nádoru, keď nemožno priamo zmerať veľkosť nádoru, tak ako náhradný parameter

možno použiť veľkosť nádoru určenú zobrazovacími metódami. Mitotická aktivita nádoru sa určuje v 50 tzv. veľkých zorných poliach (pri objektíve so zväčšením 40 x). Parameter mitotickej aktivity nádoru používa ako hranice počty mitóz do 5, 6 – 10 a viac ako 10 v 50 veľkých zorných poliach.

Opísaný konsenzuálny prístup je celosvetovo akceptovaný a používaný aj v našej praxi, do budúcnosti bude zrejme musieť zohľadniť aj rozdiely medzi biologickým správaním GIST-ov podľa miesta ich vzniku. Už v čase konania konsenzuálnej konferencie bolo empiricky známe, že GIST-y ezofagu, tenkého čreva a rekta majú horšiu prognózu, než napr. žalúdočné (3, 4). Aj keď v tom čase presné údaje ešte neboli k dispozícii, tak už vtedy sa predpokladalo, že *anatomická lokalizácia je nezávislým prognostickým faktorom* (nezávislým na veku pacienta, veľkosti nádoru a jeho mitotickej aktivite). Presnejšie závery ponúkla recentne zverejnená retrospektívna evaluácia 1 684 GIST-ov žalúdka a tenkého čreva pacientov neliečených imatinibom (1). V nej bola štatisticky dokázaná signifikantne horšia prognóza GIST-ov tenkočrevných v porovnaní so žalúdočnými. Preto pri zachovaní použitia identických parametrov veľkosti a mitotickej aktivity bol navrhnutý modifikovaný prístup hodnotenia GIST-ov žalúdka a tenkého čreva (tabuľka 5.). V ňom sa vyjadruje riziko malígneho správania GIST-u ako matematicky vyjadrený percentuálny podiel pacientov s týmto rizikom vnútri danej skupiny, pričom sa zachovali existujúce už akceptované stupne rizika – veľmi nízke, nízke, stredné a vysoké riziko. Kritériá tohto recentného návrhu sú „prísnejšie“ pre tenkočrevné GIST-y, ktorých riziko malignity je vo väčšine podskupín pacientov vyššie, než v prípade GIST-u žalúdka. Tak napr. v zásade každý GIST tenkého čreva s mitotickou aktivitou vyššou než 5 mitóz na 50 veľkých zorných polí je považovaný za vysokorizikový bez ohľadu na rozmer nádoru.

V tejto súvislosti vznikla otázka, či ako kritérium predikcie malígneho správania nemožno použiť typizáciu nádoru, keďže toto kritérium používame v onkologickej diagnostike a praxi pri väčšine zhubných nádorov. Doteraz prevládala názor, že zatriedenie GIST-u do skupín podľa histologických typov (pozri vyššie) nie je prognosticky významné. Správnejšie je asi konštatovať, že nebolo identifikované pre GIST-y jednotlivých orgánov GIT-u a ani pre extragastrointestinálne varianty (4, 13). Najnovšie sa však objavujú správy o tom, že prebiehajúce analýzy väčších súborov môžu viesť k zmene nazerania na význam histologickej typizácie GIST-ov. Tak podľa nedávno publikovanej veľkej retrospektívnej série prípadov Miettinen a Lasota (1) upozornili na potrebu takéhoto rozdiel-

neho hodnotenia aj morfológie GIST-ov žalúdka, tenkého čreva a iných lokalizácií:

- pre žalúdočné, pri akceptácii dvoch hlavných histologických typov, navrhli rozlišovať až 8 histologických podtypov GIST-ov žalúdka: štyri patria do spektra vretenobunkového (sklerotizujúci, palisádovaný, hypercelulárny a sarkomatooidný) a štyri do spektra epitelooidno-bunkového (sklerotizujúci, s dyskoheziívnymi črtami, hypercelulárny a sarkomatooidný),
- naproti tomu GIST-y tenkého čreva sú obvyčajne vretenobunkové a až v 50 % obsahujú skenoidné štruktúry údajne spojené so štatisticky lepšou prognózou. Menej časté sú epitelooidné, ktoré sú údajne prognosticky nepriaznivejšie. Navyše, títo autori vytýčili otázku, či epitelooidná morfológia nie je skôr markerom progresie nádoru než jeho samostatným histologickým typom,
- napokon GIST-y ostatných lokalizácií ako napr. apendixu, rektálne a extra-gastrointestinálne GIST-y omenta a mezenteria sú tiež prevažne vretenobunkové. Omentálne môžu byť aj epitelooidno-bunkové a morfológicky pripomínať spektrum epitelooidných žalúdočných foriem. V rektálnej lokalizácii sú epitelooidné formy zriedkavé, pričom bývajú, podobne ako žalúdočné, mitoticky málo aktívne a preto klinicky skôr indolentné. Naproti tomu malígne formy rektálnych nádorov morfológicky zodpovedajú vretenobunkovej forme a môžu pripomínať vzhľad leiomyosarkómu. Značná podobnosť morfológie extra-gastrointestinálnych foriem s nádormi žalúdka a tenkého čreva vedie k hypotéze, či omentálne a mezenterické GIST-y nie sú odvodené od týchto orgánových foriem GISTov v tom zmysle, že počas ich vývoja sa z neznámej príčiny „odštiepia“ od steny GIT-u.

Opísané recentné poznatky tak môžu zmeniť doterajšie nazeranie na histomorfológiu GIST-ov. V súlade s poznatkami o nádoroch inej genézy je viac než plauzibilné prijať stanovisko, že identifikácia sarkomatooidnej vretenobunkovej formy by mohla byť signálom vyššieho stupňa malignity. Naopak kontroverzejší by bol význam identifikácie epitelooidnej formy. Tá by mala byť spojená s nižším stupňom malignity pri výskyte v žalúdočnom, rektálnom a extragastrointestinálnom nádore, kým tá istá morfológia pri lokalizácii nádoru v tenkom čreve by mohla signalizovať skôr agresívnejší priebeh ochorenia. Je viac než zjavné, že tieto stanoviská vyžadujú overenie ich reprodukovateľnosti v ďalších štúdiách.

Okrem uvedených parametrov veľkosti nádoru a jeho mitotickej aktivity, ako aj typu sa diskutuje o možnosti využitia ďalších parametrov nádoru, hodnotenie ktorých je alebo sa stáva súčasťou bi-

optickej analýzy. Napríklad sa zdá byť plauzibilný názor, podľa ktorého jediným „absolútnym kritériom“ malignity je šírenie nádoru za hranice jeho vzniku v čase diagnózy (6). Z toho vyplýva záver, že známky infiltrácie serózneho povrchu nádoru, rovnako ako aj nález infiltrácie do mäkkých tkanív a nervových štruktúr omenta, či peritonea by sa mali považovať za negatívne prognostické znaky. To isté platí pre dôkaz metastatického rozsevu GIST-u po peritoneu, či pre dôkaz orgánovej, metastázy nádoru, napr. do pečene.

Všetky opísané parametre možno spoľahlivo hodnotiť v prípade chirurgickej resekcie celého nádoru, ale zväčša len limitovane alebo neúplne či nedokonale v endoskopicky získaných vzorkách, resp. endoskopicky neúplne odstránenom nádore.

V súčasnosti možno očakávať zverejnenie ďalších analýz retrospektívneho hodnotenia veľkých súborov pacientov a do budúcnosti ďalšie úpravy existujúcich gradingových systémov.

Zmeny morfológických, fenotypových a genotypových parametrov buniek GIST-u po terapii látkami, ktoré blokujú receptory tyrozínovej kinázy

Na rozdiel od údajov nukleárnej medicíny nie je zatiaľ v patológii k dispozícii dostatočný počet údajov, ktoré by umožnili formulovať spoľahlivú výpoveď o prípadných zmenách nádorových buniek pacientov liečených touto špecifickou terapiou. Nedávno bola publikovaná séria 3 pacientov s metastatickým GIST-om, ktorí boli po dobu minimálne jedného roka liečení imatinibom (7). Počas liečby všetky tieto nádory vykázali zmenu morfológie z vretenobunkovej na epitelooidnú až pseudopapilárno-epitelooidnú, zmenu fenotypu v zmysle takmer úplnej straty expresie CD117 antigénu, pričom v dvoch z nich došlo aj k strate expresie antigénu CD34 a v jednom k vzostupu expresie desmínu. Tieto zmeny môžu pripomínať črty fenotypového „vzrievania“ nádorových buniek v zmysle od stromálnych mezenchýmových buniek smerom k lepšie diferencovaným. Naproti tomu genotyp týchto prípadov ostal nezmenený, tak pred ako aj počas liečby bola potvrdená identická izoforma mutácie exónu 11.

U časti pacientov liečených imatinibom vzniká po období terapeuticky navodenej remisie recidíva a metastatický rozsev, pri ktorom sa zisťuje vznik rezistencie na imatinib (pozri aj tabuľka 5), čo sa stáva indikáciou na aplikáciu ďalšej špecificky cielej liečby (1, 15, 16).

Znalosť týchto postterapeutických zmien je pre hodnotiaceho patológa-bioptika významná aj z pohľadu diferenciálnej diagnostiky recidivujúcich a metastázujúcich prípadov liečených pacientov. Možno

očakávať, že zhodnotenie ďalších väčších súborov prinesie viac informácií o tejto problematike.

Záverečné zhrnutie klinického významu určenia stupňa rizika malígneho správania a mutačných analýz u pacientov s GIST-om

Moderná onkológia a onkologická patológia už plne akceptovali názor, podľa ktorého žiadny GIST nemožno považovať za pravý „benígny“ nádor. Aj v skupine pacientov s GIST-om zo skupiny s malým rizikom malígneho správania sa totiž môžu po dostatočne dlhom období sledovania pacientov (až do 20 rokov) vyskytnúť prinajmenej lokálne recidívy (12). Pri sledovaní pacientov do 5 rokov od primárnej diagnózy sa recidívy objavujú v približne 40 – 50 % prípadov, ak sa interval sledovania predĺži do 10 rokov, tak sa tento počet výrazne zvyšuje (4, 13). Pritom približne u 30 % pacientov s GIST-om sa už v čase primárnej diagnózy prejavujú známky vysokého malígneho potenciálu a progresia týchto nádorov má charakteristický priebeh: recidíva v mieste resekcie, intraabdominálny rozsev (po seróznom povrchu) a vznik pečenečných metastáz. Naproti tomu metastázy do lymfatických uzlín, prípadne extraabdominálny rozsev sú zriedkavé a vyskytujú sa až v pokročilých fázach ochorenia (3).

Správnosť záverov konsenzuálnej konferencie a tam určeného postupu pri stanovení rizika malígneho správania (4), ktorý sme vyššie diskutovali, bola opakovane verifikovaná, keď sa napr. v retrospektívnej štúdii 200 prípadov chirurgicky resekovaného GIST-u dokázalo, že 5-ročné prežívanie pacientov s nádorom menším ako 5 cm bolo cca 60 % a s nádorom väčším než 10 cm cca 20 % (14). V dohľadnej dobe možno očakávať aj verifikáciu tiež vyššie uvedených návrhov Miettinen a Lasotu (1) pre prog-

nostickú predpoveď ochorenia pacientov s GIST-om žalúdka, resp. tenkého čreva, rovnako aj zverejnenie výsledkov veľkých v súčasnosti analyzovaných súborov, najmä amerických klinických štúdií.

Všetky tieto postupy zahŕňajúce zhodnotenie rizika malígneho správania tak majú významnú prognostickú výpovednú hodnotu. Naproti tomu mutačné analýzy majú hodnotu prediktívnu, keď zohrávajú nemalú úlohu pri voľbe cieľenej terapie a predpovede jej úspechu, resp. eventuálnej rezistencie na blokátory receptora tyrozínovej kinázy. Tak napr. sa ukazuje, že pri mutácii v exóne 11 a 9 c-KIT-u a v exóne 12 PGFRA možno očakávať dobrú odpoveď pri liečbe imatinibom, zatiaľ čo mutácie exónu 17 c-KIT-u a exónu 18 PDGFRA vedú zrejme k primárnej rezistencii.

Význam ostatných sa analyzuje, keď napr. pri mutáciách exónu 13 a 17 sa dosahuje minimálne stabilizácia ochorenia (2, 15). Podobné očakávania vyplývajú z prvých údajov o sekundárnych mutáciách kinázy u pacientov po špecifickej cieľenej liečbe, ktoré poukazujú na rôznorodosť molekulových mechanizmov zodpovedajúcich tak za primárnu, ako aj sekundárnu rezistenciu na imatinib (16).

prof. MUDr. Lukáš Plank, CSc.

Ústav patologickéj anatómie JLF UK a MFN

Kollárova 2, 036 01 Martin

e-mail: plank@jfmmed.uniba.sk

Literatúra

- Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors. Review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. Arch. Pathol. Lab. Med., 2006, 130: 1466–1478.
- Daum O, Vaněček T, Šima R, Michal M. Gastrointestinální stromální tumor: současný pohled. Klin. Onkol., 2006, 19 (4), s. 203–211.
- Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC. Biology of gastrointestinal tumors. J. Clin. Oncol. 22, 18, 2004, s. 3813–3825.
- Fletcher CDM, Berman JJ, Corless Chr, et al. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors – a consensus approach. Hum. Pathol. 33, 5, 2002, s. 459–465.
- Blay J-Y, Bonvalot S, Casali P, et al. Consensus meeting for the management of gastrointestinal stromal tumors. Report of the GIST Consensus Conference of 20 – 21 March 2004, under the auspices of ESMO. Annals Oncol. 16, 4, 2005, s. 566–578.
- Strickland L, Letson D, Muro-Cacho. Gastrointestinal stromal tumors. Cancer Control 2001, 8 (3): 252–261.
- Pauwel P, Debiec-Rychter M, Stul M, De Wever I, Van Oosterom AT, Sciot R. Changing phenotype of gastrointestinal stromal tumours under imatinib mesylate treatment: a potential diagnostic pitfall. Histopathology 2005, 47 (1): 41–47.
- Rossi G, Sartori G, Valli R, Bertolini F, Bigiani N, Schirosi L, Cavazza A, Luppi G. The value of c-kit mutational analysis in a cytokeratin positive gastrointestinal stromal tumour. J. Clin. Pathol. 2005, 58 (9): 991–993.
- Plank L. Úloha a možnosti patológa v onkológii. Onkológia (Bratisl.), 2006, 1 (1): 33–38.
- Plank L. Celoštátny program biopickéj diagnostiky gastrointestinálnych stromálnych tumorov v Slovenskej republike. Gastroenterológia 2007, in press.
- Fletcher CDM. An updated based on the new WHO classification. In: Update in Pathology 2005, Zborník 20. kongresu Európskej spoločnosti patológov, Paríž, 3. – 8. september 2005, s. 434–437.
- Franquemont DW. Differentiation and risk assessment of gastrointestinal stromal tumors. Am. J. Clin. Pathol., 1995, 103: 41–47.
- Reith JD, Goldblum JR, Lyles RH, Weiss Sh. Extragastric (soft tissue) stromal tumors: An analysis of 48 cases with emphasis on histologic predictors of outcome. Mod. Pathol. 2000, 13 (5): 577–585.
- DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, et al. Two hundred gastrointestinal stromal tumors: Recurrence patterns and prognostic factors for survival. Ann. Surg., 2000, 213: 51–58.
- Agaram NP, Besmer P, Wong GC, Guo T, Socci ND, Maki RG, DeSantis D, Brennan MF, Singer S, DeMatteo RP, Antonescu CR. Pathologic and molecular heterogeneity in imatinib-stable or imatinib-responsive gastrointestinal stromal tumors. Clin. Cancer Res., 2007, 13 (1): 170–181.
- Heinrich MC, Corless ChrL, Blanke CD, Demetri GD, Joensuu H, Roberts PJ, Eisenberg BL, von Mehren M, Fletcher ChrDM, Sandau K, McDougall K, Ou W, Chen Ch-J, Fletcher JA. Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. J. Clin. Oncol., 2006, 24 (29): 4764–4774.