

## VYUŽITÍ VAKUOVÉ BIOPSIE (MAMOTOMIE) K ODBĚRŮM VZORKŮ Z MALIGNÍCH NÁDORŮ MIMO MLÉČNOU ŽLÁZU

### VACUUM BIOPSY APPLICATION IN MALIGN TUMORS OUTSIDE OF THE BREAST

BARTOŇKOVÁ H.<sup>1</sup>, HANÁK L.<sup>2</sup>, ŽALOUŠÍK J.<sup>3</sup>, SCHNEIDEROVÁ M.<sup>1</sup>, STANDARA M.<sup>1</sup>, KOSTEČKA A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO, RADIOLOGICKÉ ODDĚLENÍ

<sup>2</sup> MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO, ZÁKLADNA EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE

<sup>3</sup> MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO, ODD. ONKOLOGICKÉ CHIRURGIE

**Souhrn:** Vakuová biopsie je poměrně nová diagnostická metoda, která byla určena k diagnostice z mléčné žlázy. Umožňuje opakované vakuované (nasávané) odběry vzorků tkáně mléčné žlázy k jejímu kvalitnímu histologickému posouzení.

Naše sdělení se zabývá možností využití vakuové biopsie i v oblastech mimo mléčnou žlázu. Přístroj jsme použili k odběrům vícečetných vzorků z tumorů k jejich dalšímu zpracovávání a testování.

**Klíčová slova:** vakuová biopsie (mamotomie), vzorky z tumorů, chemorezistence.

**Summary:** Vacuum biopsy is a relatively new diagnostic method intended for diagnosis in the mammary gland. It enables repetitive breast tissue sampling for efficient histological diagnosis.

Our paper deals with potential benefits of vacuum biopsy in applications outside of the breast. The device has been used for extraction of multiple tumor specimens for further processing and tests.

**Key Words:** vacuum biopsy (mamotome), tumor samples, chemoresistance.

#### Úvod

Vakuová biopsie (mamotomie) je relativně nová bioptická metoda. Byla vyvinuta pro intervenční odběrové výkony v ženské prsní žláze.

Proti klasickým bioptickým metodám (core-cut biopsie) má několik odlišností, které poskytují nové možnosti a výhody metody. Základním rozdílem je použití podtlaku (vakua), které „nasaje“ tkáň do výřezu jehly před odběrem, teprve potom dojde k automatickému odřezání tkáně mamotomickými nožem. I při pevně fixované pozici jehly (MG nebo MR navádění) je tak možné nejen odebrat vzorek větší, ale odebrat tkáň i z větší vzdálenosti než jen z bezprostřední blízkosti hrotu jehly.

Vakuová biopsie využívá jehel 14G, 11G a 8G. Nejen větší kalibr, ale i speciální tvar jehel umožňuje odběr většího vzorku, než při klasické core-cut biopsii. Objem mamotomického vzorku z jehly 14G je o 10 % větší než u klasické core biptické jehly 14G, při velikosti vakuové jehly 11G je dokonce 8x větší než z konvenční biopsie o velikosti jehly 14 G. Standardně se využívají mamotomické jehly středního rozměru, tedy 11G, zatímco u klasické core-cut biopsie jsou standardní 14 a 16 G jehly.

Výhodou proti klasické biopsii je automatické vysunutí vzorku po odběru vnitřkem jehly ven k odebrání - jehla zůstává stále zavedena v místě odběru. Odběrový výřez jehly lze natáčet v rozsahu 360 stupňů do libovolné (požadované) pozice. Při jediném zavedení jehly tak lze odebrat libovolný počet vzorků. Tkáň v oblasti punkčního kanálu tak není traumatizována opakovanými inzercemi jehly do místa odběru - na rozdíl od core-

cut biopsie, kde po každém odběru vzorku musí jehla ven i se vzorkem a k novému odběru musí být znovu zavedena.

Při absolutní větší velikosti jednoho vzorku a možnosti odebrat několika násobně větší počet vzorků tak získáme výrazně větší množství tkáně k histologickému zpracování (klasická core-cut biopsie 3 - 6 vzorků, vakuová biopsie 6 - 25 i více vzorků).

Vakuová biopsie při tom zůstává miniinvasivní odběrovou technikou prováděnou v lokální anestezii. Místo odběru lze navádět pod ultrazvukovou (UZ), mamografickou (MG), MR (magnetická rezonance) i CT kontrolou (komputerová tomografie).

Pro výkony v mléčné žláze se nejčastěji používá navádění pod MG, přesněji stereotaktickou (STX) kontrolou nebo UZ cílení. Metoda STX vyžaduje pevné umístění mamotomické jehly do držáku a počítačově zpracovávané navádění do místa odběru. Výhodou UZ navádění je možnost „hand held“ techniky: vyšetřující drží mamotomickou jehlu v ruce a sám zavádí jehlu do místa zájmu, které si zobrazuje ultrazvukovou sondou. Jak bylo zmíněno výše, vakuová biopsie byla vyvinuta a je používána u nás i ve světě pro intervenční odběrové výkony v prsní žláze (proto druhý název mamotomie). Dostupné zdroje neuvádí použití v jiné oblasti.

Možnost získat výrazně větší objem tkáně přinesla myšlenku využít tuto metodu k odběrům tkáně i v jiných lokalizacích. Konkrétně nádorové tkáně z primárně inoperabilních maligních tumorů k testování chemorezistence, fenotypizaci, případně k dalším in vitro prováděným testováním. Použití mini-

invazivní odběrové metody v lokální anestezii znamená menší zatížení a lepší snášenlivost pro pacienta a eliminaci komplikací spojených s chirurgickým operačním odběrem. Získání výrazně většího množství tkáně než při obvyklém perkutánním biotickém výkonu pak dává předpoklad dostatečné koncentrace maligních nádorových buněk ve vzorcích, které jsou určeny pro testování.

### Materiál a metodika

Pro provedení cílených odběrů z nádorů jsme zvolili standardní, středně velkou mamotomickou jehlu 11G a zavedení pod palpační (u povrchověji uložených nádorů) nebo UZ kontrolou (u hlouběji uložených tumorů).

Výkony jsme si rozdělili na dvě skupiny a stanovili si počet vzorků, které budeme odebírat :

a) odběry in vitro – u prvních výkonů standardně odběry do 10 vzorků, později standardně odběry od 16 do 20 vzorků z operačního resektátu

b) odběry in vivo – pokud možno odběr více než 10 vzorků, maximálně 20 vzorků z Tu pacienta v lokální anestezii, eventuálně při kombinaci algosedace a lokální anestezie pacienta Na počátku jsme zkoušeli odběry z resektátů tumorů, abychom si ověřili :

- možnosti polohování jehly k zachování vakua
- kvalitu odběrů (tj. dostatečnou velikost a dostatečný počet biotických vzorků)
- získali případně další informace k odběrům in vivo.

Biotické vzorky byly ihned po odběru z tumoru umístěny do speciálního roztoku a do 0,5 hodiny dopraveny pracovníkům na základnu experimentální onkologie, která je součástí MOÚ. Pro odběry in vivo jsme si stanovili další podmínky:

- nejmenší rozměry tumoru, který lze bezpečně biotipovat za použití mamotomu, jsme stanovili na 5cm v nejkratším průmětu

- solidnost tkáně - určena z hodnoty měřené denzity Tu při CT vyšetření - alespoň 50% (vyloučeny tumory, jejichž nekrotická část byla vyšší než 50% objemu tumoru)

### Výsledky

Během druhé poloviny roku 2004 a první poloviny roku 2005 bylo provedeno celkem 20 výkonů vakuové biopsie pro testování chemoterapeutik. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce (tab. 1).

Z přehledu je zřejmé, že vakuově odebírané vzorky tumorů

Tabulka č. 1

pacient	rok nar.	typ odběru	počet odběrů	datum odběru	Dg.	nasazeno	výsledek
LM	1938	in vitro	8 + 16 odběrů	24.5.2004	C49	DOX, DDP	rezistence na vše
HP	1986	ex vivo	12 odběrů	7.7.2004	C80	nenasazeno - malý počet buněk	
ŠJ	1981	in vitro	16 odběrů	22.7.2004	C49	nenasazeno - malý počet buněk	
PJ	1952	in vitro	16 odběrů	2.8.2004	C49	nenasazeno - malý počet buněk	
HS	1956	ex vivo	13 odběrů	30.11.2004	C64	nenasazeno - malý počet buněk	
PZ	1931	in vitro	16 odběrů	15.12.2004	C49	nenasazeno - malý počet buněk	
SM	1922	in vitro	20 odběrů	5.4.2005	C43	nenasazeno - malý počet buněk	
OL	1919	in vitro	10 odběrů	6.4.2005	C43	DTIC, DDP, BCNU	rezistence na vše
ND	1947	in vitro	10 odběrů	8.4.2005	C18	5-FU,OXA,IRI,TOM,DDP	buňky nepřežily dobu kultivace
HE	1939	in vitro	20 odběrů	13.4.2005	C48,C56	DOX	rezistence na vše
SM	1935	ex vivo	10 odběrů	15.4.2005	C50	nenasazeno - malý počet buněk	
PZ	1931	in vitro	16 odběrů	20.4.2005	C49	nenasazeno - malý počet buněk	
VJ	1950	in vitro	20 odběrů	28.4.2005	C50	DOX,TAX,5-FU,TXR,NVB, GMC,DDP,CBDCA	NAV - citl.
KM	1951	in vitro	20 odběrů	25.4.2005	C18	nenasazeno - malý počet buněk	
KT	1971	in vitro	18 odběrů	30.5.2005	C49	nenasazeno - malý počet buněk	
MM	1958	ex vivo	20 odběrů	31.5.2005	C43	DTIC	rezistence na vše
SM	1941	ex vivo	pokus - komplikace	14.6.2005		nenasazeno - bez vzorku	

většinou nestačí na pokrytí testování cytostatiky. Záleží samozřejmě především na velikosti tumoru (recidivy tumoru) procentu regresivních změn a hustotě maligních buněk v něm (celularita). Ta bývá v různých částech tumoru nestejná – zejména u sarkomů. Ani počty kolem 20 vakuovaných odběrů většinou nepřinesly dostatečný počet maligních buněk k testování.

Pro srovnání uvádíme v následující tabulce přehled testovaných vzorků tumorů z resektátů peroperačně odebíraných v období let 2001-2003 (tab. 2)

Je zřejmé, že výsledky z chirurgických resekcí jsou mnohem povzbudivější, neboť je zde podstatně větší šance na dostatek odebraného materiálu (dostatek maligních buněk) k testování. Největší citlivost – v průměru takřka 30% - jsme zaznamenali při testování tumorů ovaria, prsu a kupodivu i melanomu.

### Diskuse

Jelikož účinek cytostatik není přísně specifický pro nádorové buňky, ale působí více či méně toxicky i na normální buňky, jsou vedlejší účinky řady cytostatik limitujícím faktorem chemoterapie a ve svých důsledcích mohou vést i k závažnému poškození nemocného. Současná onkologická chemoterapie je založena převážně na empirických zkušenostech a generalizaci výsledků rozsáhlých klinických studií, aniž by respektovala individualitu nemocného a biologickou odlišnost každého nádoru. Je více než pravděpodobné, že respektování faktorů individuality a možnosti jejich posouzení může do značné míry optimalizovat výběr protinádorových farmak, jejich dávky, což ve svých důsledcích příznivě ovlivní terapeutický efekt a sníží riziko nežádoucích účinků. Jedním z přístupů individualizované chemoterapie je výběr cytostatik s maximální účinností pro daný nádor a současně eliminace těch, na něž je nádor vysoce rezistentní, na základě hodnocení chemosensitivit/chemorezistence nádorové populace v in vitro podmínkách.

Nejrozšířenější metodou testování in vitro chemosensitivit/chemorezistence je tetrazoliový test (MTT test) popsáný v roce 1983 (1). Rozlišení živých a mrtvých buněk je založeno na schopnosti živých buněk redukovat žlutou, rozpustnou tetrazoliovou sůl MTT (3-4,5-dimethylazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) mitochondriálním enzymem sukcinát-dehydrogenázou na nerozpustný modrý formazan (2). Formazan je

**Citlivost/rezistence cytostatik v MTT testu  
02/2003 – 01/2005**

<b>Ca kolorektál.</b>				
	cytostatikum	počet testovaných	citlivost celkem	citlivost (%)
1	5-fluorouracil	78	14	18
2	oxaliplatin	54	5	9,3
3	irinotekan	58	12	20,7
4	tomudex	54	5	9,3
5	cisplatin	45	11	24,5
<b>Grawitz. TU ledviny</b>				
	cytostatikum	celkem vyšetřeno	citlivost ocelkem	citlivost (%)
1	5-fluorouracil	29	7	24,1
2	gemcitabin	27	4	14,8
3	vinblastin	24	6	25
4	karboplatina	23	1	4,3
<b>Ca ovaria</b>				
	cytostatikum	celkem vyšetřeno	citlivost celkem	citlivost (%)
1	paklitaxel	69	17	24,6
2	cisplatin	54	19	35,2
3	karboplatina	47	13	27,7
4	topotekan	47	27	57,4
5	gemcitabin	44	5	11,4
6	doxorubicin	45	8	17,7
<b>Melanom</b>				
	cytostatikum	celkem vyšetřeno	citlivost celkem	citlivost (%)
1	dakarbazin	30	8	26,7
2	cisplatin	28	12	42,9
3	karmustin	23	3	13
4	bleomycin	21	4	19
5	vinblastin	19	7	36,8
6	melfalan	15	3	20
7	vinkristin	10	5	50
<b>Ca prsu</b>				
	cytostatikum	celkem vyšetřeno	citlivost celkem	citlivost (%)
1	doxorubicin	35	10	28,6
2	paklitaxel	23	6	26,1
3	5-fluorouracil	21	6	28,6
4	docetaxel	15	3	20
5	navelbin	17	3	17,6
6	gemcitabin	8	1	12,5
7	cisplatin	11	4	36,4
8	karboplatina	12	4	33,3

**Tabulka č. 2**

pak rozpuštěn dimethyl sulfoxidem (DMSO), případně jiným organickým rozpouštědlem. Absorbance barevného produktu je měřena fotometricky při 570 nm a výsledky jsou srovnávány s hodnotami identických kontrolních kultur neovlivněných cytostatiky.

Metoda byla ve světě použita pro stanovení citlivosti nádorů žaludku, střeva, sleziny, prsu, jícnu a lymfomů na panel cytostatik MMC, 5-FU, ADM a DDP (3-5). Studie uvádějí 90% hodnotitelných nádorů, u nichž in vitro výsledky byly podkladem pro výběr cytostatik pro daného nemocného. Korelace s klinickým efektem byla okolo 83-86%. Za hlavní přednost testu in vitro je považována možnost poměrně přesně detekovat stupeň rezistence na některou ze zkoušených látek a následně vyřazení neúčinných terapeutik z léčebného protokolu. Podobně příznivé hodnocení MTT testu pro volbu účinných cytostatik uvádí další studie u kolorektálních karcinomů (6).

Na základě dosud publikovaných prací lze charakterizovat MTT test jako jednoduchou, rychlou a relativně standardní

metodiku pro predikci chemorezistence a v jistém přiblížení chemosenzitivitu nádorů v podmínkách in vitro. Jako každá metodika má však i MTT test některé limity jejichž příkladem je nemožnost rozlišit cytostatický od cytotoxického účinku a riziko ovlivnění výsledku přítomností vysokého procenta normálních buněk v kultuře. Problémem, který může ovlivnit spolehlivost výsledků je schopnost některých chemoterapeutik redukovat MTT. Tento faktor však může být eliminován vyšetřením kontrolním testem MTT bez buněk.

Test chemorezistence v MOÚ Brno V Laboratoři chemorezistence MOÚ Brno byl cytotoxický test zaváděn a optimalizován v průběhu roku 2003 za účelem klinického využití. Plně rutinní podoby nabyl od počátku letošního roku, kdy je hrazen ze zdravotního pojištění a kdy jsou vzorky zpětně verifikovány pomocí cytospinového barvení. Namísto klasického MTT je však používána reagentie WST-1 (Roche), kdy tento načervenalý solubilní (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát je redukován na rozpustný formazan (temně červenohnědý). Reakce probíhá opět na mitochondriální membráně živých buněk. Zabarvení formazanu se vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm. Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk (čím tmavší barva a tedy vyšší absorbance, tím vyšší procento živých buněk).

Použití WST-1 metodu zjednodušuje a urychluje, celý reakční mechanismus probíhá pouze ve vodném prostředí (7). Cytotoxickým testem je vyšetřována široká škála solidních tumorů, zejména kolorekta, ovarií, mammy, ledvin, maligního melanomu a samozřejmě také sarkomu. Jeho

výskyt v porovnání s jinými není častý, ze 316 vzorků pacientů vyšetřovaných od počátku ledna do konce listopadu 2004 na sarkomy připadlo jen 15 z nich (4,7 %). Výťažnost buněk pro MTT test, kdy je potřeba aspoň 0,5 – 1 milionu buněk na testování rezistence vůči jednomu cytostatiku, byla poměrně nízká, test mohl být proveden jen u 8 vzorků (53,3 % oproti 85,4% pro všechny typy nádorů). V průměru byla nasazena 2 cytostatika ze sedmi, které testujeme dle terapeutických protokolů v tomto pořadí důležitosti:

- 1) doxorubicin (Adriamycin)
- 2) cisplatin
- 3) vepesid
- 4) docetaxel (Taxotere)
- 5) vinkristin
- 6) dakarbazin
- 7) vinblastin

Z našich výsledků je zřejmé, že vakuové odběry ve většině případů nestačí pokrýt potřebu počtu maligních buněk k testování chemorezistence. Odběry jsou přitom limitovány: velikostí

tumoru u resekátu, velikostí a strukturou tumoru, kdy odběr byl proveden ex vivo, dále jsou limitovány celularitou (t.j. hustotou maligních buněk v odebraném vzorku) a možnými komplikacemi (krvácení) u odběrů in vivo.

Daleko nejpodstatnější je však fakt, že možnost využití u sarkomů, kde jsme předpokládali největší zisk, se nepotvrdilo, neboť častou lipomatózou, myxomatózou či jinou měkkou složkou tumoru lze z tumorózní infiltrace za vakuu nasávat obtížněji, neboť se často rozpadá na drť. Kromě toho velké sarkomy v sobě často obsahují i arey zcela benigní tkáňové složky, což nelze použitou zobrazovací metodou v tumoru rozlišit a odebrané vzorky pak obsahují jak buňky maligní tak k testování bezcenné buňky benigní.

Z práce vyplynula i další zjištění, např. to, že počet odebraných vzorků by musel přesáhnout v průměru 20 bioptických vakuových odběrů vakuovou jehlou 11G, aby byla šance na dostatek buněk k testování a to není zdaleka tak jednoduché, jak to na první pohled vypadá: kromě velikosti tumoru tu hraje roli i nutnost vytvoření vakuu v Tu tkáni.

Pro reprezentativnější hodnocení nebyl k dispozici větší soubor, ale i na základě výše uvedených výsledků se perkutánní bioptický vakuovaný odběr spíše nejeví vhodný k vyšetřování chemorezistence pomocí MTT cytotoxického testu. Podstatně výtěžnější bylo testování při klasickém chirurgickém odběru většího vzorku tkáně – to však je již náplní jiného sdělení.

### Závěr

Vakuová biopsie zůstává metodou, jejímž primárním ziskem je rozšíření diagnostiky mléčné žlázy, kde má dnes své již standardní místo. Při použití přístroje k odběrům v ostatních topikách má velmi limitované použití, dané zejména velikostí jehly a tím možností bezpečného zavedení jen do větších nádorových infiltrací. Limitací je i použití u více vaskularizovaných tumorů, kdy větší krvácení z bioptovaného tumoru lze perkutánně obtížněji řešit.

**Sdělení je publikováno za podpory grantu IGA č. 8017-2/2004 : Využití vakuové biopsie k testování chemorezistence maligních nádorů**

### Literatura :

1. Bitmanová H, Skovajsová M: Roční zkušenosti s užíváním mamotomie s vakuovou asistencí za kontroly ultrazvukového zobrazení. *česká radiologie*, roč. 58, č.4, srpen/2004, str.200-202
2. Berridge MV et al.: The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts, *Biochemica* 4: 15-19, 1996
3. Cox D, Bradley S, England D: The significance of mamotome core biopsy specimens without radiographically identifiable microcalcification and their influence on surgical management – a retrospective review with histological correlation. *Breast*, 2005, Aug 1
4. Denizot F and Lang R: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J Immunol Methods*. 89: 271-7, 1986.
5. Vargas HI, Agbunag RV et al. : State of srt of minimally invasive breast biopsy : principles and practice. *Breast Cancer*, 2000, 7(4), 370-9
6. Fischmann A, Pietsch-Breitfeld B, Muller-Schimpfle M et al.: Radiologic-histopathologic correlation of microcalcifications from 11g vacuum biopsy: analysis of 3196 core biopsies. *Rofo* 2004 Apr, 176(4): 538-43
7. Furukawa T, Kubota T, Suto A et al.: Clinical usefulness of chemosensitivity testing using the MTT assay, *J Surg Oncol*. 48: 188-93, 1991.
8. Heywang-Kobrunner SH, Schreer I, Decker T, Bocker W : Interdisciplinary consensus on the use and technique of vacuum-assisted stereotactic breast biopsy. *Eur J Radiol*. 2003 Sep, 47(3):232-6.

9. Hoorntje LE, Peeters PH, Mali WP, Borel Rinkes IH.: Vacuum-assisted breast biopsy: a critical review. *Eur J Cancer*. 2003 Aug, 39(12):1676-83.
10. Iwuagwu O, Drew P: Vacuum-assisted biopsy device-diagnostic and therapeutic applications in breast surgery. *Breast* 2004, Dec.13 (6): 483-7.
11. Kettritz U, Rotter K, Schreer I, Muraier M, Schulz-Wendtland R, Peter D Heywang-Kobrunner S.H.: Stereotactic vacuum-assisted breast biopsy in 2 874 pa patients:a ulticenter study. *Cancer*. 2004 Jan 15,100 (2):245-51.
12. Kettritz U, Morack G, Decker T: Stereotactic vacuum-assisted breast biopsies in 500 women with microcalcifications : radiological and pathological correlations. *Eur J Radiol*. 2005, Aug.55 (2),270-6
13. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods*. 65: 55-63, 1983.
14. Saikawa Y, Kubota T, Furukawa T et al.: Single-cell suspension assay with an MTT end point is useful for evaluating the optimal adjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer, *Jpn J Cancer Res*. 85: 762-5, 1994.
15. Suto A, Kubota T, Shimoyama Y, Ishibiki K and Abe O: MTT assay with reference to the clinical effect of chemotherapy, *J Surg Oncol*. 42: 28-32, 1989.
16. Yamaguchi H, Tanimura H, Nakamori M et al.: Clinical evaluation of chemosensitivity testing for patients with colorectal cancer using MTT assay, *Dis Colon Rectum*. 39: 416-22, 1996.