

## Novosti pri obravnavi bolnikov z malignim melanomom

Marko Hočevar

Maligni melanom (MM) vznikne v melanocitih in je najbolj maligni kožni rak. Starost bolnikov, ki zbolijo za MM, je v povprečju za 10 do 15 let nižja kot pri drugih najpogostejših vrstah raka (rak dojke, pljuč, danke in širokega črevesa), incidenca MM pa se med vsemi vrstami raka najhitreje povečuje. Tako je danes med prebivalstvom, starim od 35 do 45 let, MM že tisti, ki zakrivi največ z rakom povzročenih smrti. Ob vsem naštetem je zato presenetljivo, da pri bolnikih z MM s srednje velikim in velikim tveganjem za razsoj boleznijo (stadij II in III) še vedno nimamo uspešnega standardnega načina adjuvantnega zdravljenja.

Eden glavnih vzrokov je v tem, da je bilo doslej določanje stadija boleznijo bolnikov z MM zelo nenatančno, kar je tudi problem večine kliničnih študij, ki so se ukvarjale z lokalnim ali sistemskim adjuvantnim zdravljenjem. Danes vemo, da so bolniki z MM in klinično lokalizirano boleznijo (stadij I in II) v resnici zelo heterogena skupina. Približno 25-30% bolnikov z MM, debelejšim kot 1,5 mm, ima v regionalnih bezgavkah ali oddaljenih organih že mikrometastaze, zato je njihova prognoza slabša. Pri ostalih 70-75% bolnikov mikrometastaz ni in njihova prognoza je že brez dodatnega zdravljenja odlična. Teh dveh skupin doslej ni bilo mogoče ločiti, zato je v kliničnih študijah prišlo do njunega prekrivanja, tako povzročena heterogenost bolnikov pa je v veliki meri zabrisala potencialne pozitivne učinke adjuvantnega zdravljenja.

V zadnjih nekaj letih smo razvili nove metode, ki omogočajo bistveno natančnejšo določitev stadija boleznijo bolnikov z MM že ob diagnozi in zato obetajo boljše čase tudi študijam adjuvantnega zdravljenja bolnikov z MM.

Med najpomembnejše novosti uvrščamo predvsem biopsijo varovalne bezgavke in uporabo tirozinazne polimerazne verižne reakcije z obratno transkripcijo (RT-PCR).

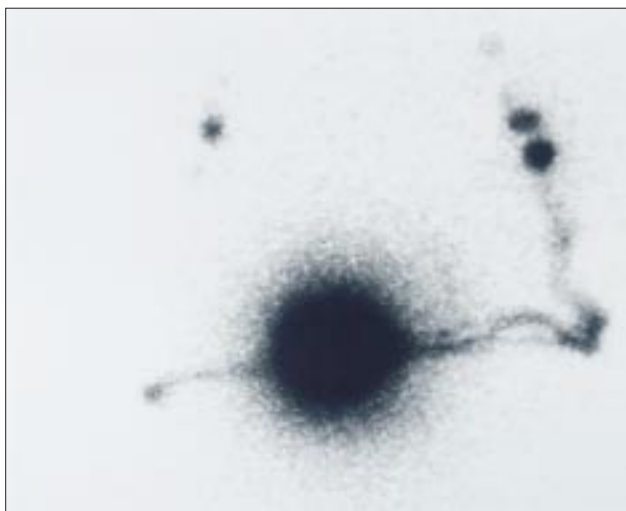
### BIOPSIJA VAROVALNE BEZGAVKE

Koncept varovalne bezgavke (*sentinel lymph node*) je že leta 1977 uporabil urolog Cabanas pri bolnikih z rakom penisa. Predvideval je, da v vsakem limfatičnem drenažnem področju obstaja bezgavka, kamor najprej priteče limfa iz področja primarnega tumorja. Metastaze v ostalih bezgavkah te bezgavčne lože lahko pričakujemo samo takrat, če je zasevek že v tej, t.i. varovalni bezgavki. Zato je napravil celotno ingvinalno disekcijo samo pri bolnikih z zasevkom v omenjeni bezgavki, pri drugih pa jo je opustil. Za lokalizacijo varovalne bezgavke je uporabljal limfografijo.

V začetku 90. let je Morton uporabil koncept varovalne bezgavke tudi pri bolnikih z MM, metodo pa je izboljšal z uporabo predoperativne limfoscintigrafije, s katero določimo bezgavčno ložo oziroma lože, kamor se limfa drenira, število varovalnih bezgavk v njej in njihovo natančno lego. Pri bolnikih z MM na trupu, glavi in vratu je limfna drenaža zelo nepredvidljiva in individualno pogojena. Morton je za intraoperativno identifikacijo varovalnih bezgavk uporabljal modrilo *patent blue*, ki ga je injiciral intradermalno v okolico tumorja ali ob brazgotino po predhodni diagnostični eksciziji. Modrilo obarva mezoepitelne in bezgavke ter tako omogoči njihovo selektivno identifikacijo. V Mortonovi seriji 237 disekcij je bilo manj kot 1% lažno negativnih rezultatov, tj. primerov, ko varovalna bezgavka ni odražala statusa celotne bezgavčne lože. Metodo so kasneje še izboljšali, med operacijo so začeli uporabljati sondo (detektor gama žarkov), ki zazna sevanje iz bezgavke z ujetim radioaktivnim koloidom, uporabljenim pri limfoscintigrafiji. To še dodatno olajša intraoperativno identifikacijo varovalne bezgavke, hkrati pa omogoči manj invaziven poseg, saj incidiramo kožo tik nad bezgavko. Danes izvajamo večinoma kombiniran pristop, tako da uporabljamo istočasno modrilo in sondo.

Pravilna tehnika biopsije prve drenažne bezgavke zahteva:

- *Predoperativno limfoscintigrafijo* za določanje regionalne bezgavčne lože oziroma lož, določanje števila varovalnih bezgavk in določanje njihove natančne lege. Pri nas uporabljamo za hitro markiranje pri limfoscintigrafiji s  $^{99m}\text{Tc}$  markiran nanokoloid, ki ga sestavljajo dovolj majhni delci (70% delcev je manjših od 30 nm).  $^{99m}\text{Tc}$  je zelo primeren za klinično uporabo, saj emitira gama žarke z energijo 140 keV in ima razpolovno dobo samo 6 ur. S  $^{99m}\text{Tc}$  markiran nanokoloid injiciramo intradermalno na štiri mesta ob tumorju ali ob brazgotini po predhodni eksciziji. Dinamični scintigram (30 minut) nam pokaže pot limfne drenaže in varovalne bezgavke (slika 1). Po 2 urah ponovimo slikanje in na koži označimo mesto varovalne bezgavke. Tako lahko napravimo takoj po končani limfoscintigrafiji minimalno incizijo.
- *Intakten primarni tumor ali stanje po diagnostični eksciziji*. Diagnostična ekscizija zahteva varnostni rob, ki ni širši od 5 mm (idealno 2 mm). Samo pri takem varnostnem robu lahko pričakujemo, da kasneje ekscidirana bezgavka v resnici drenira področje primarnega tumorja. Pri večjem varnostnem robu je velika verjetnost, da bezgavka, ki jo prikažemo kot varovalno, v resnici ne drenira področja, kjer je ležal tumor, ampak sosednje področje kože. Sosednja področja



**Slika 1.** Limfoscintigrafija po diagnostični eksciziji melanoma kože desno lumbalno. Varovalna bezgavka v desni pazduhi in dve varovalni bezgavki z aferentno mezgovnico v levi pazduhi.

kože lahko imajo v isti loži različne varovalne bezgavke, podobno kot inervirajo senzibilna vlakna različnih korenin hrbtenjače različne dermatome.

- *Uporaba intraoperativne sonde.* Odstotek intraoperativno identificiranih varovalnih bezgavk je z modrilom okoli 80%, kar je za današnje standarde premalo. Pri uporabi sonde se ta odstotek dvigne nad 90%, pri kombinirani uporabi sonde in modrila pa nad 99% (sliki 2 in 3).



**Slika 2.** Modro obarvana mezgovnica.

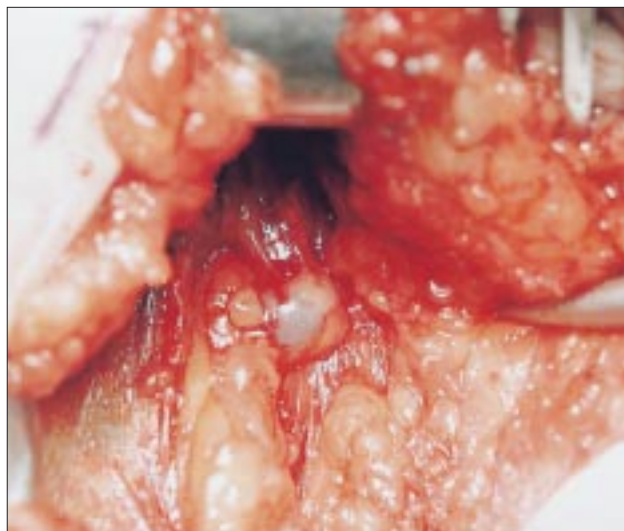
- *Dobro opremljen oddelek za patologijo z izkušenim, v patologijo malignega melanoma orientiranim patologom.* Obdelava in pregled omejenega števila varovalnih bezgavk (običajno ene ali dveh) sta bistveno natančnejša kot pri analizi velikega števila bezgavk po elektivnih disekcijah, kjer pregledamo od vsake identificirane bezgavke samo en blok. Varovalne bezgavke vklopimo

vedno v celoti, bloke pa režemo serijsko, na vsakih 500 mikronov. Če najdemo v bezgavkah celice, ki jih ne znamo opredeliti, napravimo iz prej pripravljenih paralelnih rezov še imunohistokemična barvanja (S-100 in HMB45). Možnost lažno negativnega izvida je tako bistveno nižja kot pri rutinski histopatološki preiskavi. Občutljivost preiskave še dodatno zviša uporaba tirozinazne RT-PCR reakcije, o kateri bo govora v nadaljevanju. Po navedbah iz literature odkrije rutinski histološki pregled v bolnišnici, kjer se srečujejo z MM le občasno, metastaze MM v bezgavkah, če imamo eno melanomsko celico na  $10^4$  limfocitov, natančen pregled serijsko narezane bezgavke z uporabo imunohistokemije pri eni melanomski celici na  $10^5$  limfocitov, pri tirozinazni reakciji pa že pri eni tumorski celici na  $10^6$  limfocitov.

Po priporočilih WHO iz leta 1999 sodi biopsija varovalne bezgavke v standardni postopek pri obravnavi bolnikov z MM. Ker je tehnologija zahtevna, naj se z njo ukvarjajo samo centri, ki imajo ustrezno znanje in opremo.

#### TIROZINAZNA RT-PCR

Za določitev melanomskih celic v periferni cirkulaciji je Smith leta 1991 prvi opisal obratno transkripcijo (RT) in verižno polimerizacijo (PCR). Pri tem je uporabil podatek, da najdemo aktivno ekspresijo gena za tirozinazo, ki je ključni encim sinteze pigmenta melanina, le v melanocitih in celicah MM. Ker v periferni cirkulaciji ni melanocitov,



**Slika 3.** Modro obarvana prva varovalna bezgavka.

pomeni dokaz tirozinazne mRNA v periferni krvi obenem dokaz, da so v krvi celice MM. Metoda tirozinazne RT-PCR so pozneje pričeli uporabljati tudi za dokaz zasevkov MM v bezgavkah.

Postopek je v obeh primerih enak, razlika je le v vzorcu. Pri določitvi tirozinazne mRNA v periferni krvi izoliramo RNA iz periferne venske krvi, v drugem primeru pa iz tkiva

bezgavke. Vedno izoliramo celotno RNA, ki vsebuje, če so v vzorcu melanomske celice, seveda tudi tirozinazno mRNA. Celotno RNA nato z reverzno transkriptazo prepisemo v komplementarno DNA (cDNA), nato pa v verižni polimerizaciji pomnožimo samo tisti del cDNA, ki se je prepisal iz tirozinazne mRNA. Tako pomnožene produkte lahko z elektroforezo prikažemo na 2% agaroznem gelu, obarvanem z etidijevim bromidom. Za kontrolo napravimo vedno tudi verižno polimerizacijo za glukoza 6-fosfat-dehidrogenazo (GAPDH), ki ima konstitucionalno ekspresijo. Kot pozitivna kontrola nam služi melanomska celična kultura (B16).

Zaradi izjemne občutljivosti tirozinazne reakcije lahko postavimo v primerjavi s standardnimi preiskavami višji stadij pri skoraj 47% bolnikov z MM. Ker je metoda v uporabi šele nekaj let, nimamo kliničnih rezultatov sledenja bolnikov, pri katerih je bil rezultat tirozinazne reakcije pozitiven, rezultati konvencionalnih preiskav (tudi imunohistokemije) pa negativni. Zato še ne moremo soditi o biološko-kliničnem pomenu podatkov, ki nam jih omogoči RT-PCR tehnologija. Kljub temu je tirozinazna RT-PCR že ena od osnovnih metod za določitev stadija pri večini kliničnih študij sistemskega adjuvantnega zdravljenja MM.

Napočil je čas, da se skoraj 100 let dolga zgodba o radikalni kirurgiji s 5 cm varnostnim robom in elektivno disekcijo bezgavk pri MM konča. Vzrok za to so spoznanja, do katerih smo prišli z uporabo novih tehnologij, ki omogočajo natančnejšo in bolj individualno obravnavo bolnikov. Zahtevnost novih tehnologij pa seveda narekuje koncentriranje bolnikov na enem mestu.

Ker večina pigmentnih lezij ni MM in ker število ekscizij nevusov v Sloveniji močno presega zmožnosti katerekoli posamične institucije, centralizirana obravnavo vseh bolnikov s pigmentnimi lezijami ni smiselna. Pri močno sumljivih pigmentnih lezijah ali pri klinično evidentnem MM pa bi bila na mestu napotitev bolnika na Onkološki inštitut. Pri vseh posegih zaradi pigmentnih kožnih lezij moramo vedeti, da je varnostni rob pri diagnostični eksciziji največ 5 mm (idealno 2 mm). Ozek varnostni rob po eksciziji primarnega tumorja nam omogoči, da lahko

kasneje opravimo biopsijo varovalne bezgavke in da bo histopatološki izvid pravilno napovedal zasevke in tako omogočil najboljši načrt dodatnega zdravljenja.

Nova postopka, biopsija varovalne bezgavke in tirozinazna reakcija, nam omogočata zaznavo metastaz že v predklinični fazi in hitrejši začetek zdravljenja. Zadnji podatki že kažejo, da je 5-letno preživetje bolnikov, pri katerih so metastaze v bezgavkah odkrili v predklinični fazi, kar za 16% boljše kot pri tistih, pri katerih so bile bezgavke odkrite šele klinično.

#### Literatura:

1. Eggermont AMM. Adjuvant therapy of malignant melanoma and the role of sentinel node mapping. *Recent results in cancer research* 2000; 157:178-89.
2. Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer* 1977; 39:456-66.
3. Morton DL, Wen D-R, Wong Jh, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992; 127:392-9.
4. Pijpers R, Collet GJ, Meijer S, Hoekstra OS. The impact of dynamic lymphoscintigraphy and gamma probe guidance on sentinel node biopsy in melanoma. *Eur J Nucl Med* 1995; 22:1238-41.
5. Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C, Blair GE. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 1991; 338(8777):1227-9.
6. Van der Velde-Zimmerman D, Schipper MEI, de Weger RA, et al. Sentinel node biopsies in melanoma patients: A protocol for accurate, efficient, and cost-effective analysis by preselection for immunohistochemistry on the basis of Tyr-PCR. *Ann Surg Oncol* 2000; 7:51-4.
7. Snoj M. Varovalna bezgavka pri malignem melanomu. *Radiol Oncol* 1998; 33(Suppl 1):45-9.

