

Peritoneal lavage under udredning for ventrikelcancer prædikterer overlevelsen

Rune Broni Strandby¹, Lars Bo Svendsen¹, Jane Preuss Hasselby² & Michael Patrick Achiam¹

STATUSARTIKEL

1) Kirurgisk Afdeling C, Rigshospitalet
2) Patologisk Afdeling, Rigshospitalet

Ugeskr Læger
2015;177:V08140449

Årligt diagnosticeres der over 550 danske patienter med cardia- og ventrikelcancer [1]. Prognosen er fortsat dårlig på trods af kirurgisk behandling og perioperativ kemoterapi, da mange diagnosticeres på et sent stadium. Den gennemsnitlige femårsoverlevelse i Danmark efter intenderet kurativ behandling er henholdsvis 33% for cardiacancer og 41% for ventrikelcancer [1].

Cytologisk undersøgelse af peritoneal skyllevæske, også benævnt *peritoneal washing cytology* (PWC), er en velkendt diagnostisk modalitet. Modaliteten benyttes til detektion af intraperitonealt frie maligne celler, som er klassificeret som cytologipositive (C1), selv når makroskopiske cancermetastaser/karcinose ikke er til stede. PWC anbefales af American Joint Committee on Cancer [2] og The Japanese Gastric Cancer Association [3] i udredningen af ventrikelcancer. Proceduren er dog på nuværende tidspunkt ikke anvendt ved ventrikelcancer i Danmark.

Formålet med artiklen er en metodegennemgang af PWC-undersøgelsen samt en præsentation af kliniske resultater for overlevelse og recidiv hos cytologipositive patienter med ventrikelcancer samt en diskussion af den kliniske anvendelighed.

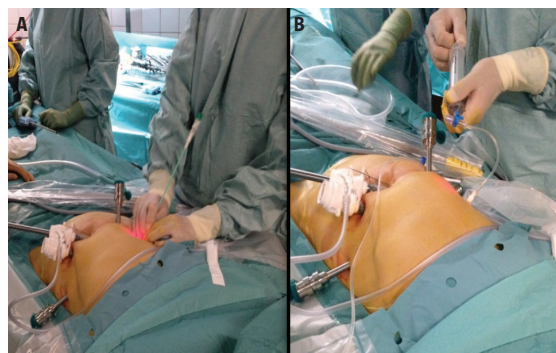
PERITONEAL WASHING CYTOLOGY

PWC er en minimalt invasiv procedure og foretages typisk i forbindelse med prædiagnostisk laparoskopi. Formålet er at gennemskylle intraabdominale kaviteter for at undersøge for maligne celler i skyllevæsken.

I forbindelse med PWC foretages der en abdominalpunktur, hvorefter 100-500 ml opvarmet NaCl installerer (Figur 1A). Væsken fordeles herefter sufficient i de subfreniske, subhepatiske, parakoliske og intraomentale kaviteter samt fossa Douglasi [4-6].

FIGUR 1

Udførelse af peritoneal lavage. A. Punktur med grisehalekateter og efterfølgende indgift af NaCl intrabdominalt. B. Aspiration af væske.



Der aspireres efterfølgende 50-60 ml skyllevæske ad flere omgange [4, 7] (Figur 1B). Under proceduren skal man undgå at manipulere med tumoren, da in vitro-forsøg har vist, at dette kan forårsage en øget forekomst af C1-celler [8]. Der findes dog ingen kliniske forsøg, hvor man har dokumenteret dette hos mennesker. Efterfølgende undersøges aspiratet med konventionel cytologi, immunhistokemi, *immunoassays* eller revers transkriptase-polymerasekædereaktion (RT-PCR). Immunoassays bliver ikke gennemgået her pga. få tilgængelige studier.

Anvendelsen alene af konventionel cytologi er pga. den lavere sensitivitet formentlig forældet [9] (Tabel 1). Ved en standardhæmatoksilin-eosin-/May-Grünwald Giemsa-farvning kan det være vanskeligt at skelne mellem benigne mesoteliale celler og maligne tumorceller. Desuden findes der en betydelig interobservervariabilitet, der specielt afhænger af patologiekspertisen [12].

Malignitetskriteriet for C1-celler ved brug af konventionel cytologi varierer imellem studierne. I flere har man anvendt Papanicolaou's graderingssystem, hvor grad IV og V anses for at være lig C1 [13], dvs. som minimum sikre eller stærke holdepunkter for malignitet. Andre har defineret C1-celler som tilstedeværelsen af minimum tre sikre maligne celle-clusters [14].

! FORKORTELSER

C0 = ingen maligne celler erkendt i peritonealskyllevæsken
C1 = positive maligne celler erkendt i peritonealskyllevæsken
C1M0 = positiv peritonealcytologi, men uden makroskopisk erkendte metastaser
IHC = immunhistokemiske metoder
RT-PCR = revers transkriptase-polymerasekædereaktion

For at optimere analysesensitiviteten kombineres konventionel cytologi ofte med immunhistokemiske metoder (IHC) med anvendelse af monoclonale antistoffer [15]. Ved anvendelse af et panel af antistoffer kan man i de fleste tilfælde adskille tumorceller fra reaktivt forandret mesotel og inflammatoriske celler, herunder bl.a. makrofager [15].

Den mest sensitive cytologianalyse er RT-PCR. Metoden er til gengæld dyr, tager lang tid og kræver stor ekspertise. RT-PCR kræver desuden et cellerigt materiale, hvilket typisk ikke er til stede i peritoneal skyllevæske. En væsentlig begrænsende faktor er forekomsten af falsk positive resultater [9]. Dels er der risiko for transkription af tumorassocierede gener i benigne celler, og dels udtrykker egentlige tumorceller ikke nødvendigvis det gen, der analyseres for [10]. Derfor skal det overvejes at anvende et bredt panel af tumormarkører [16].

Overordnet findes der ikke en fejlfri metode til vurdering af tilstedeværelsen af maligne celler i peritoneal skyllevæske. Hvis RT-PCR ikke anvendes, tilrådes det at anvende konventionel cytologi og supplere med IHC for at støtte det cytomorfologiske billede [7].

KLINISKE RESULTATER: BETYDNINGEN AF POSITIV PERITONEAL CYTOLOGI

4-7% af patienterne med ventrikelcancer uden fjernmetastaser/karcinose er cytologipositive (C1M0) [5, 17]. Desuden er højere tumor (T)-stadie (T3-T4), nodus (N)-stadie (N1-N2) og tumorstørrelse > 6 cm korreleret med positiv cytologi [15] (Tabel 2). Dette skyldes formentlig, at tumorgennemvækst af organvæggen (T3/T4) giver en større overflade for maligne celler at eksfoliere fra, hvilket kan forklare en betydelig del af spredningen af maligne celler fra en tumor. Det er tilmed påvist, at tumorinvolvering på > 3 cm² af ventriklens serosa bevirker signifikant flere tilfælde af C1M0 end tumorinvolvering < 3 cm² [18]. Dermed er overfladearealet af serosainfiltrationen en væsentlig risikofaktor for udvikling af C1M0, hvilket understøtter den bærende hypotese om, at eksfolieringen af celler forekommer hyppigere, når tumoren eksponeres på organoverfladen ved gennemvækst. Undtagelsen fra denne teori er dog, at T2-tumorer også være årsag til C1-celler. I et studie fandtes 27% af patienter med C1M0 at have T2-tumorer, og kun 8,1% havde samtidig spredning til regionale lymfeknuder [20]. Disseminering kan således foregå via andre pathways end direkte eksfoliering. Perforerede lymfbaner er foreslået som mulig årsag, men fænomenet er dårligt belyst i litteraturen [4].

Tumorhistologiske karakteristika er også påvist at influere på forekomsten af C1-celler. Generelt fore-

TABEL 1

Sensitivitet og specificitet i forhold til at kunne forudsige peritonealt recidiv for de forskellige analysemetoder.

| Metode | Patienter, n | Sensitivitet, % | Specificitet, % | Reference |
|-----------------------|--------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Konventionel cytologi | 47 | 43 | 87 | Kodera et al [10] |
| Immunhistokemi | 47 | 75 | 77 | Kodera et al [10] |
| RT-PCR | 80 | 51-81 | 80-82 | Vogel et al [11] |

RT-PCR: se forkortelsesboks.

kommer C1-celler hyppigere hos patienter med lavt differentierede adenokarcinomer, herunder mucinøse karcinomer og signetringscellekarcinomer end hos patienter med højt- eller middeldifferentierede adenokarcinomer eller papillære karcinomer [13, 19].

Overordnet synes patienter med C1-celler at have dårligere overlevelse (Tabel 3) og større recidivfrekvens end patienter med negativ cytologi (C0) [6, 19] med forbehold for enkelte studier [5, 14]. I et studie med 61 patienter fandtes en medianoverlevelse for patienter med C1M0-celler efter resektion på 13,3 vs. 37,9 måneder for patienter med C0M0 (p < 0,001) [19]. I et andet studie fandt man dog ikke, at C1M0 var en prognostisk faktor i den multivariate analyse [14]. I de to studier blev der anvendt kombineret konventionel cytologi og immunhistokemi [19] og konventionel cytologi alene [14].

Derudover er det rapporteret, at hvis maligne

TABEL 2

Risikofaktorer for udvikling af C1.

| Risikofaktor | Reference |
|--|---------------------|
| T3/T4-stadium | Nekarda et al [15] |
| N1/N2-stadium | Nekarda et al [15] |
| Serosainfiltration > 3 cm ² | Ribeiro et al [18] |
| Lav histologisk differentieringsgrad | Bando et al [13] |
| Signetringscellekarcinom | Lorenzen et al [19] |
| Tumorstørrelse > 6 cm | Nekarda et al [15] |

C1: se forkortelsesboks.

TABEL 3

Femårsoverlevelse for patienter med C1M0 hhv. C0M0.

| Reference | Patienter, n | C1M0, % | C0M0, % |
|---------------------|--------------|---------|---------|
| Nekarda et al [15] | 118 | 8,0 | 60,0 |
| Fukagawa et al [21] | 88 | 7,8 | 25,3 |

C1M0 og C0M0: se forkortelsesboks.



FAKTABOKS

Cytologisk undersøgelse af peritoneal skyllevæske, også benævnt *peritoneal washing cytology* (PWC), anvendes til detektion af frie maligne celler intrabdominalt.

Tilstedeværelse af maligne celler, klassificeret som cytologipositive, er i flere studier fundet at være korreleret med øget frekvens af recidiv og deraf dårligere overlevelse.

Metoden er kritiseret for lav sensitivitet og er således marginalt anvendelig i klinisk brug på nuværende tidspunkt.

Større, konklusive studier med brug af mere sensitive metoder som revers transkriptase-polymerasekædereaktion og et bredt panel af tumormarkører er nødvendige for at afklare PWC's fulde potentiale.

celler kan identificeres i ≥ 3 abdominale kaviteter kontra i en kavitet, vil patienterne have dårligere overlevelse og større recidivfrekvens, hvilket tyder på en mere omfattende disseminering af tumorceller [22]. I andre studier har man foretaget to skylninger i den præoperative fase: en skylning før og en efter præoperativ kemoterapi. Formålet var at afklare den neoadjuverende kemoterapis effekt på patienter med C1M0-celler. Medianoverlevelsen var her 36,1 vs. 9,2 måneder for patienter, som konverterede fra C1 til CO, vs. patienter, som forblev C1-positive [19].

Tumorlokalisering og C1M0 korreleret til overlevelse er også undersøgt, men med divergerende resultater [20, 23]. I et større studie fandt man, at patienter med C1M0-tumorer, som var beliggende i antrum ventriculi, havde signifikant bedre prognose end patienter med tumorer, som var beliggende i corpus ventriculi, diffust i ventriklen eller cardia [23]. Et andet studie viste det modsatte [20]. I tillæg hertil blev incidensen af C1M0-celler ikke fundet at være korreleret med en bestemt tumorlokalisering i ventriklen [24]. C1-sygdom kan således ikke entydigt betegnes som et mål for avanceret cancersygdom.

Recidivfrekvensen blandt 351 patienter er påvist at være 51% hos patienter med C1M0-celler vs. 24,6% hos patienter med C0M0-celler [4]. Derudover blev der i et andet studie fundet signifikant flere tilfælde af recidiv hos patienter med C1M0-celler og en tumorstørrelse > 6 cm versus < 6 cm [13]. I modsætning hertil er det også rapporteret i et studie med 136 patienter med ventrikelcancer, at C1M0 ikke er korreleret til recidiv [14].

DISKUSSION

Ved gennemgang af litteraturen blev C1M0-celler i forbindelse med PWC fundet at være korreleret med dårlig overlevelse og stor recidivfrekvens for patienter med ventrikelcancer. Dette er bekræftet i flere studier [5, 6, 23], men negative fund er også rapporteret [5, 14]. Der skal tages forbehold for en betydelig me-

todisk bias i detektionen af maligne celler i skyllevæsken, hvilket kan begrænse PWC's anvendelse i klinikken, f.eks. aggressiv behandling med kemoterapeutika med henblik på at eradicere maligne celler intrabdominalt hos patienter med C1M0-celler. I flere studier konkluderer man da også, at analysesensitiviteten er alt for lav til, at man kan drage klinisk konsekvens af analyseresultatet [14, 25]. I et større europæisk studie med 136 patienter med ventrikelcancer fandt man ikke, at C1M0-celler var korreleret med en dårlig prognose [14]. Det samme resultat fandtes tilsvarende for rectum- og colontumorer ($n = 829$). Det blev således konkluderet, at cytologieresultatet ikke bidrog til den prognostiske information ud over den almindelige tumor-nodus-metastase (TNM)-klassifikation [14]. Detektionsraten af C1M0 i det pågældende arbejde var 5,9% for ventrikeltumorer, hvilket er sammenligneligt med raten i andre studier [14]. Der blev anvendt konventionelle cytologiske farvninger i studiet, hvorfor der formentlig er tale om et sensitivitetssproblem. Dette er fuldt foreneligt med resultaterne hos Wang *et al*, der fandt en sensitivitet på kun 33,3% i en kohorte på 40 patienter ved anvendelse af konventionelle farvemethoder [25]. Ligeledes har flere studier vist, at kun 34-59% af patienter med synlig karcinose havde C1-celler [13, 17]. Dette understreger yderligere sensitivitetssproblematikken.

Forklaringen på den lave prævalens af C1-celler er formentlig multifaktoriel betinget. For det første er den begrænsede sensitivitet for konventionel cytologi en betydelig fejlkilde [9]; herunder formodes ukorrekt håndtering og analyse af skyllevæsken at spille en rolle [26]. Runyon *et al* angav, at forsinket analyse af skyllevæsken var en ledende årsag til falsk negative resultater pga. cellelysering [26]. For det andet er patogenesen bag spredningen af frie maligne celler fra tumorer ikke fuldt afklaret. Som nævnt er der påvist C1 hos patienter med tumorer, der ikke gennemvoksede serosa [4, 20]. I et studie af Rosenberg *et al* fandt man C1-celler i hhv. 7% og 18% af T1- og T2-tumorerne [4]. Overraskende var der dog ingen T1N0-tumorer, som recidiverede hos de fem C1-positive patienter, mens dette ikke var tilfældet for T2-tumorerne. Dette rejser spørgsmålet om, hvorvidt der enten er tale om et sensitivitetssproblem (falsk positive resultater) eller en ukendt patogenese for disseminering af frie maligne celler fra T1-tumorer. I tillæg hertil er en mulig forklaring også, at den præoperative staging af T-stadiet er underestimeret. Dette virker dog mindre sandsynligt, da man i de fleste studier har påvist, at T3-/T4-tumorer i modsætning til T1-/T2-tumorer er signifikant korreleret til forekomsten af C1 [6, 13, 15].

På baggrund af ovenstående synes PWC's klini-

ske anvendelighed at være tvivlsom på nuværende tidspunkt, selvom man i mange studier har påvist en signifikant nedsat overlevelse og øget recidivfrekvens hos patienter med C1M0 [4, 6, 19]. Der findes flere uafklarede spørgsmål bl.a. TNM-stadiet, tumorlokaliseringen og den begrænsede sensitivitets betydning for proceduren. Såfremt C1 får direkte behandlingskonsekvens, må der forlanges en større præcision af PWC-analysen. Det er derfor af største prioritet at få foretaget større konklusive studier med brug af mere sensitive analysemetoder, såsom RT-PCR, for at afklare PWC's fulde potentiale [16].

Hvis validiteten af PWC kan optimeres, har værktøjet i høj grad potentiale til, at man med det kan identificere patienter med øget risiko for recidiv og deraf dårligere overlevelse. Metoden kan tænkes at få betydning for valget af de patienter, som skal tilbydes nyere aggressive kemoterapeutika, som forhåbentlig kan forbedre prognosen ved ventrikercancer.

KONKLUSION

PWC har på nuværende tidspunkt en uafklaret klinisk anvendelighed. Større studier med brug af mere sensitive metoder er påkrævet for at afklare PWC's fulde potentiale.

SUMMARY

Rune Broni Strandby, Lars Bo Svendsen, Jane Preuss Hasselby & Michael Patrick Achiam:

Peritoneal washing cytology during work-up for gastric cancer predicts survival

Ugeskr Læger 2015;177:V08140449

The aim of this study was to review the current literature regarding prognostic outcome for patients with gastric cancer and positive cytology. We found that positive cytology was correlated with worse overall survival and higher recurrence rate among gastric cancer patients. However, the accuracy of peritoneal washing cytology (PWC) is found not to be optimal, which is a significant problem when using the modality in a clinical setting. Further studies with more sensitive methods are needed to establish the relevant role of PWC

KORRESPONDANCE: Rune Broni Strandby, Kirurgisk Afdeling C, Rigshospitalet, Blegdamsvej 9, 2100 København Ø. E-mail: rune.broni.strandby.01@regionh.dk

ANTAGET: 20. november 2014

PUBLICERET PÅ UGESKRIFTET.DK: 26. januar 2015

INTERESSEKONFLIKTER: Forfatternes ICMJE-formularer er tilgængelige sammen med artiklen på Ugeskriftet.dk

TAKSIGELSE: Projektet, der er af større omfang end denne statusartikel, er finansieret af Kræftens Bekæmpelse

LITTERATUR

- Dansk Esophagus, Cardia- og Ventrikel-cancergruppe. Årsrapport 2012. http://decv.gicancer.dk/Content/Files/Dokumenter/DECV_rapport2012_final.pdf (15. sep 2014).
- Washington K. 7th edition of the AJCC cancer staging manual: stomach. *Ann Surg Oncol* 2010;17:3077-9.
- Sano T, Aiko T. New Japanese classifications and treatment guidelines for gastric cancer: revision concepts and major revised points. *Gastric Cancer* 2011;14:97-100.
- Rosenberg R, Nekarda H, Bauer P et al. Free peritoneal tumour cells are an independent prognostic factor in curatively resected stage IB gastric carcinoma. *Br J Surg* 2006;93:325-31.
- Nath J, Moorthy K, Taniere P et al. Peritoneal lavage cytology in patients with oesophago-gastric adenocarcinoma. *Br J Surg* 2008;95:721-6.
- Lee SD, Ryu KW, Eom BW et al. Prognostic significance of peritoneal washing cytology in patients with gastric cancer. *Br J Surg* 2012;99:397-403.
- La Torre M, Ferri M, Giovagnoli MR et al. Peritoneal wash cytology in gastric carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2010;36:982-6.
- Han TS, Kong SH, Lee HJ et al. Dissemination of free cancer cells from the gastric lumen and from perigastric lymphovascular pedicles during radical gastric cancer surgery. *Ann Surg Oncol* 2011;18:2818-25.
- Leake PA, Cardoso R, Seevaratnam R et al. A systematic review of the accuracy and utility of peritoneal cytology in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 2012;15(suppl 1):S27-37.
- Kodera Y, Nakanishi H, Yamamura Y et al. Prognostic value and clinical implications of disseminated cancer cells in the peritoneal cavity detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and cytology. *Int J Cancer* 1998;79:429-33.
- Vogel P, Ruschoff J, Kummel S et al. Immunocytology improves prognostic impact of peritoneal tumour cell detection compared to conventional cytology in gastric cancer. *Eur J Surg Oncol* 1999;25:515-9.
- Lin O. Challenges in the interpretation of peritoneal cytologic specimens. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133:739-42.
- Bando E, Yonemura Y, Takeshita Y et al. Intraoperative lavage for cytological examination in 1,297 patients with gastric carcinoma. *Am J Surg* 1999;178:256-62.
- Cotte E, Peyrat P, Piaton E et al. Lack of prognostic significance of conventional peritoneal cytology in colorectal and gastric cancers: results of EVOCAPE 2 multicentre prospective study. *Eur J Surg Oncol* 2013;39:707-14.
- Nekarda H, Gess C, Stark M et al. Immunocytochemically detected free peritoneal tumour cells (FPCT) are a strong prognostic factor in gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1999;79:611-9.
- Wong J, Kelly KJ, Mitra A et al. RT-PCR increases detection of submicroscopic peritoneal metastases in gastric cancer and has prognostic significance. *J Gastrointest Surg* 2012;16:889-96.
- Burke EC, Karpeh MS Jr, Conlon KC et al. Peritoneal lavage cytology in gastric cancer: an independent predictor of outcome. *Ann Surg Oncol* 1998;5:411-5.
- Ribeiro U Jr, Gama-Rodrigues JJ, Bitelman B et al. Value of peritoneal lavage cytology during laparoscopic staging of patients with gastric carcinoma. *Surg Laparosc Endosc* 1998;8:132-5.
- Lorenzen S, Panzram B, Rosenberg R et al. Prognostic significance of free peritoneal tumor cells in the peritoneal cavity before and after neoadjuvant chemotherapy in patients with gastric carcinoma undergoing potentially curative resection. *Ann Surg Oncol* 2010;17:2733-9.
- Oh CA, Bae JM, Oh SJ et al. Long-term results and prognostic factors of gastric cancer patients with only positive peritoneal lavage cytology. *J Surg Oncol* 2012;105:393-9.
- Fukagawa T, Katai H, Saka M et al. Significance of lavage cytology in advanced gastric cancer patients. *World J Surg* 2010;34:563-8.
- Homma Y, Ushida S, Yamada M et al. Positive peritoneal washing cytology in multiple cavities can predict poor prognosis of advanced gastric cancer patients. *Ann Surg Oncol* 2010;17:455-60.
- Mezhir JJ, Shah MA, Jacks LM et al. Positive peritoneal cytology in patients with gastric cancer: natural history and outcome of 291 patients. *Indian J Surg Oncol* 2011;2:16-23.
- Ribeiro U Jr, Safatle-Ribeiro AV, Zilberstein B et al. Does the intraoperative peritoneal lavage cytology add prognostic information in patients with potentially curative gastric resection? *J Gastrointest Surg* 2006;10:170-6.
- Wang JY, Lin SR, Lu CY et al. Gastric cancer cell detection in peritoneal lavage: RT-PCR for carcinoembryonic antigen transcripts versus the combined cytology with peritoneal carcinoembryonic antigen levels. *Cancer Lett* 2005;223:129-35.
- Runyon BA. Malignancy-related ascites and ascitic fluid »humoral tests of malignancy«. *J Clin Gastroenterol* 1994;18:94-8.