

Badanie histopatologiczne w onkologii weterynaryjnej.

Część V. Mięsaki tkanek miękkich u psów

Rafał Sapieryński

z Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Histopathology in veterinary oncology. Part V. Soft tissue sarcomas in dogs

Sapieryński R., Department of Pathology and Veterinary Diagnostics
Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

Soft tissue sarcomas (STSs) are heterogeneous group of malignant tumors derived from tissues of mesenchymal origin, and they include: non-oral fibrosarcomas, myxosarcomas, liposarcomas, hemangiopericytomas, neurofibrosarcomas and undifferentiated and pleomorphic sarcomas. Despite of various origin and localization, they have been grouped together because of similarities in their biological behavior. STSs comprise 8–15% of all cutaneous and subcutaneous tumors in dogs and are especially prevalent among middle-aged to old, medium to large breed dogs. These tumors have a low to moderate postsurgical recurrence rate and low metastatic potential. Microscopic examination is necessary to evaluate histologic grade, mitotic index and extent of surgical resection of the tumor and therefore it is crucial for treatment planning and prognosis in dogs with STSs. Here, histologic presentation and analysis of different STSs in dogs was critically reviewed.

Keywords: soft tissue tumors, histologic analysis, dogs.

Mięsaki tkanek miękkich u psów (MTM; soft tissue sarcoma – STS) to grupa złośliwych nowotworów mezenchymalnych wykazujących zbliżone cechy histopatologiczne i podobne zachowanie biologiczne (niezależne od lokalizacji guza), rozwijających się w obrębie różnych tkanek miękkich (tab. 1; 1, 2). Określenie dokładnego typu histologicznego mięsaka na podstawie rutynowego badania histopatologicznego może być trudne i zazwyczaj wymaga wykonania dodatkowych barwień histo- i immunohistochemicznych (co wydłuża czas oczekiwania na wynik i podnosi koszt badania). W świetle faktu, że ocena typu histologicznego w obrębie mięsaków rozwijających się w tkankach miękkich u psów nie ma znaczenia praktycznego i precyzyjne określenie typu histologicznego tych

nowotworów nie wydaje się celowe, mięsaki o podobnym zachowaniu biologicznym umieszczono w jednej grupie MTM.

Do grupy mięsaków tkanek miękkich u psów zalicza się: włókniakomięsaka, mięsaki ściany naczyń krwionośnych (perivasculat wall tumors; dawniej określane jako obłoniaki), mięsaki osłonek nerwów obwodowych (dawniej schwannoma, nerwiakowłókniamięsak; z wyłączeniem mięsaka splotu barkowego i splotu lędźwiowo-krzyżowego), tłuszczakomięsaka, śluzakomięsaka, mięsaka mezenchymalnego, mięsaka pleomorficznego (dawniej złośliwa włóknista histiocytoma – malignant fibrous histiocytoma) oraz mięsaki niezróżnicowane (ryc. 1; 1). Inne mięsaki, takie jak: mięsak histiocytarny, naczyńniakomięsak, kostniakomięsak tkanek miękkich, mięśniak gładkokomórkowy mięsakowy, mięsak prążkowanokomórkowy mięsakowy, mięsak maziówki, GIST (guz zrębowy jelita) oraz włókniakomięsak jamy ustnej, nie są zaliczane do grupy mięsaków tkanek miękkich (dla każdego z wymienionych nowotworów stosuje się inne metody klasyfikacji, odmienne jest także zachowanie biologiczne guzów i podejście terapeutyczne; 1).

Według definicji mięsak jest zawsze nowotworem złośliwym, jednak definicja zdecydowana większość MTM to guzy o najniższym, I stopniu złośliwości, przy których ryzyko wznowy miejscowej jest niewielkie (poniżej 10% MTM I stopnia daje wznowy), nawet w sytuacji, gdy komórki nowotworowe obserwuje się w bliskości lub w obrębie marginesu histologicznego. Jedynie poniżej 10% MTM u psów to nowotwory o najwyższym, III stopniu złośliwości histologicznej, przy których zarówno ryzyko wznowy, jak i przerzutów jest wysokie; chociaż ryzyko rozwoju przerzutów w przebiegu MTM u psów wydaje się niskie (0–6%), to w guzach o najwyższym stopniu złośliwości może być umiarkowane (6–41%; 1). Wydaje się też, że częstość występowania poszczególnych stopni złośliwości MTM u psów może się różnić w zależności od rodzaju praktyki weterynaryjnej, w której zbierano dane. Kiedy kolekcjonowano przypadki psich mięsaków tkanek miękkich w lecznicach pierwszego kontaktu, to odsetek MTM o III stopniu złośliwości wynosił 6–7%, natomiast w lecznicach referencyjnych odsetek ten był zdecydowanie wyższy, wahał się bowiem w granicach 22,7–29%; 1). Ma to najprawdopodobniej związek z tym, że przypadki trudniejsze (guzy o wysokiej złośliwości – szybko rosnące, „nieoperacyjne”) częściej trafiają do specjalisty chirurga.

Według badań epidemiologicznych MTM u psów stanowią około 8–15% wszystkich nowotworów skóry i tkanki podskórnej, występując z częstością od 114 do 122 przypadków na 100 000 psów rocznie,

Tabela 1. Cechy mięsaków tkanek miękkich (opracowano na podstawie 1, 2)

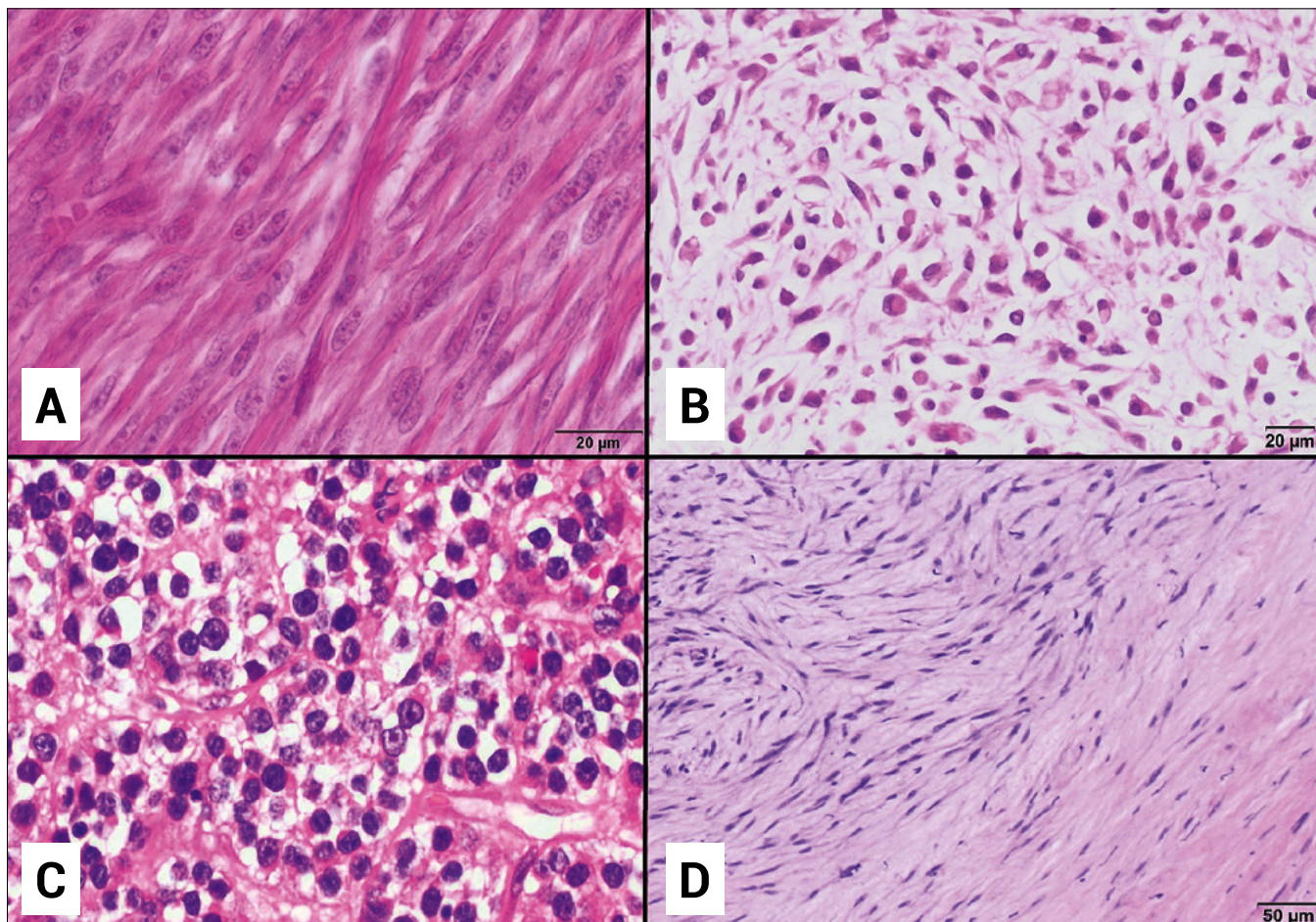
Zdolność do powstawania w każdej lokalizacji anatomicznej.
Guzy mają słabo wyrażone brzozy lub posiadają pseudotorebkę łącznotkankową.
Tendencja do naciekania tkanek poprzez ciąłość powięzi.
Wysoka tendencja do wznowy po prostej resekcji chirurgicznej*.
Skłonność do rozsiewu drogą naczyń krwionośnych**.
Słaba odpowiedź na chemioterapię i radioterapię w przypadku guza makroskopowego***.

Komentarz:

* Wiele MTM o niskiej złośliwości histologicznej (I stopień złośliwości) nie daje wznowy nawet przy niedoszczętnej resekcji chirurgicznej.

** W badaniach własnych obserwowano też występowanie przerzutów MTM drogą limfogenną (do węzłów chłonnych; 3).

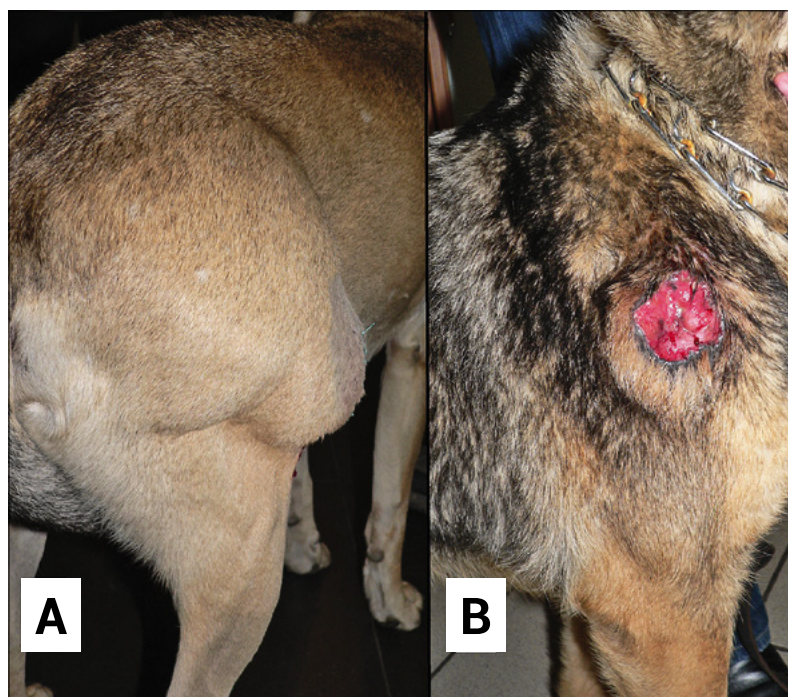
*** Radioterapia jest dobrą metodą kontrolowania wznowy miejscowej – naświetlanie rany pooperacyjnej po niedoszczętnej usuniętych MTM o wysokiej złośliwości.



Ryc. 1. Obraz mikroskopowy mięsaków tkanek miękkich u psów. A – włóknakiomięsak dobrze zróżnicowany – widoczne wrzecionowate komórki nowotworowe, o wydłużonych jądrach komórkowych oraz kwasochłonne (różowe) włókna kolagenowe. B – śluzakomięsak – komórki są wydłużone, wielokątne, gwiazdkowate i okrągłe, cytoplazma ma długie wypustki, komórki są zawieszane w obfitym śluzakowatym zrzebie. C – tłuszczakomięsak – komórki charakteryzuje obecność okrągłych jąder komórkowych oraz obfita cytoplazma posiadająca wakuole tłuszczowe. D – nerwiakowłóknakiomięsak – komórki są wydłużone, jądra komórkowe ciemne i „przecinkowate”, macierz pozakomórkowa obfita. Barwienie hematoksylina – eozyna, powiększenie 200×

bez wyraźnej predyspozycji rasowej, płciowej lub wynikającej z faktu kastracji/sterylizacji (1, 2, 4, 5). Guzy występują najczęściej u psów w średnim wieku i starszych (10–11-letnich), nieco częściej u psów średniej wielkości i dużych. Mięsaki mogą pojawić się w każdej lokalizacji, najczęściej jednak rozwijają się w obrębie skóry i tkanki podskórnej, pod postacią różnej wielkości guzowatych mas, zazwyczaj o powolnym wzroście, choć w niektórych przypadkach rosną szybko (ryc. 2), i mogą ulegać martwicy lub powierzchownemu owrzodzeniu. Zmiany są mięsiste w konsystencji, z możliwymi obszarami chełboczącymi (jamy zawierające półpłynny materiał), mogą być związane z tkankami otaczającymi, rzadziej są przesuwalne względem podłoża. Najczęstszym miejscem lokalizacji MTM są kończyny (ryc. 3; 60% guzów), rzadziej tułów i ogon (35% guzów), najrzadziej głowa (5% guzów). Objawy kliniczne są najczęściej związane z występowaniem efektu masy – w zależności od wielkości i lokalizacji guz utrudnia połykanie, poruszanie się, powoduje kulawiznę lub ból miejscowy.

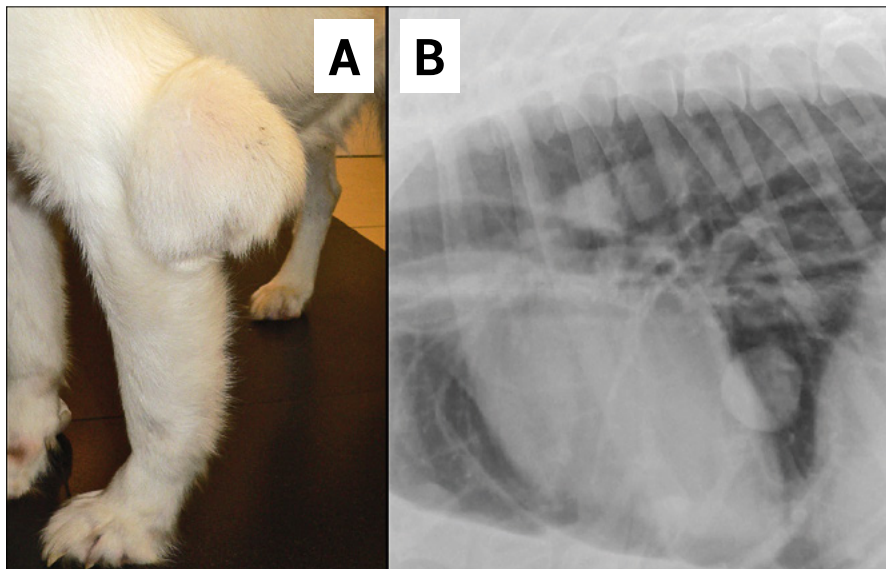
Można powiedzieć, że doszczętne usunięcie MTM skutkuje pełnym wyleczeniem, jednak ryzyko wznowy po resekcji niedoszczętnej jest różne i zależy głównie od stopnia złośliwości histologicznej



Ryc. 2. Dwa przypadki mięsaków tkanek miękkich u psów. A – na pośladku widoczny duży mięsak wrzecionowatokomórkowy. B – włóknakiomięsak okolicy stawu barkowego, uwagę zwraca owrzodzenie powierzchni guza



Ryc. 3. Tak jak w prezentowanym przypadku mięsaki tkanek miękkich często obejmują obwodowe odcinki kończyn; w tym przypadku badanie histopatologiczne wykazało obłoniaka



Ryc. 4. Mięsaki tkanek miękkich charakteryzuje niski potencjał dawania przerzutów, jednak w tym przypadku guzowi zlokalizowanemu na łokciu (ryc. A) towarzyszył przerzut do płuc (ryc. B)

Ryc. 5. Tak jak w tym przypadku, obłoniaki (mięszk nowotworu widoczny po lewej i w centrum ryciny) niekiedy naciekają mięśnie (po stronie prawej), co jest powiązane z wyższą tendencją do wznowy po resekcji chirurgicznej. Barwienie hematoksylina-eożyna, powiększenie 40x

guza (2). Ryzyko pojawienia się przerzutów mięsaków tkanek miękkich u psów jest trudne do oszacowania i w zależności od stopnia złośliwości wynosi 1,7–4,4% (ryc. 4), natomiast 20–30% psów, u których mięsak został rozpoznany, umrze z jego powodu (6, 7, 8).

Nowotwory z komórek ściany naczyń krwionośnych – obłoniaki

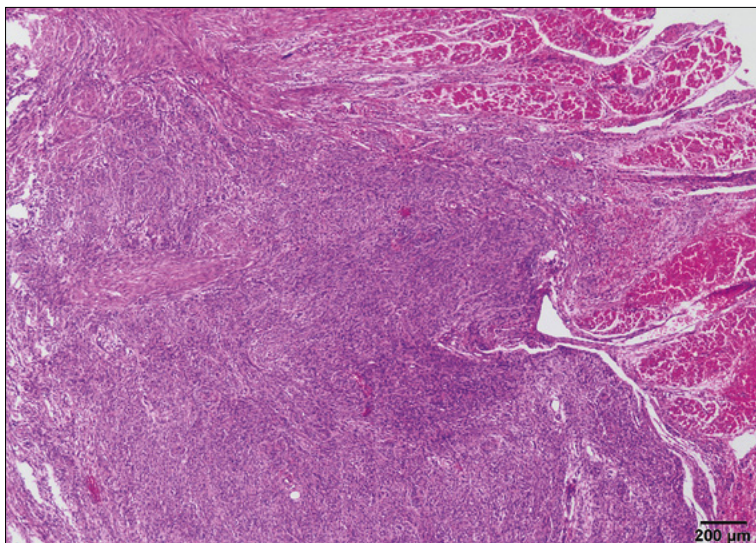
Specyficzną formą MTM są **obłoniaki** (perivascular wall tumors – PWT), które w przeszłości ze względu na ich stosunkowo łagodne zachowanie biologiczne zaliczano do mięsaków o niskiej lub umiarkowanej złośliwości. Nowotwory te wywodzą się z różnych komórek budujących ścianę naczyń krwionośnych, z wyłączeniem komórek śródbłonna (nowotwory wywodzące się z komórek śródbłonna to naczyńniaki krwionośne lub naczyńniaki krwionośne mięsakowe) i charakteryzują się niską tendencją do dawania przerzutów (poniżej 5% dają przerzuty) i do wznowy miejscowej. W grupie PWT mieszczą się: wywodzące się z pericytów heman-giopericytomy – typowe obłoniaki, myopericytomy,

angioleiomiomy – naczyńniakomięśniaki, angiomiofibroblastmy – naczyńniakomięśniaki zarodkowe, angiofibromy – naczyńniakowłókniaki. Zapewne wiele z mięsaków sklasyfikowanych jako obłoniaki to w rzeczywistości nowotwory wywodzące się z komórek osłonek nerwów obwodowych. Zastosowanie panelu odpowiednich przeciwciał w barwieniu immunohistochemicznym pozwala na precyzyjną klasyfikację guzów z grupy obłoniaków, jednak poszczególne podtypy nie różnią się od siebie zachowaniem biologicznym więc z praktycznego punktu widzenia takie działanie nie jest uzasadnione. Umieszczanie powyższych podtypów w jednej grupie MTM jest uzasadnione i praktykowane między innymi przez autora niniejszej publikacji oraz innych autorów (2).

Obłoniaki pojawiają się najczęściej u psów średniej wielkości i dużych, mogą pojawić się na różnych częściach ciała, jednak zdecydowanie najczęściej na obwodowych odcinkach kończyn – okolica łokcia i stawu skokowego. Klinicznie mają charakter dużych, kulistych, mięsistych zmian, często opisywanych jako „nietypowe tłuszczaki”.

Wydaje się, że brak jest związku pomiędzy stopniem histologicznej złośliwości obłoniaków a tendencją do dawania wznowy. Skłonność do pojawienia się wznowy jest zdecydowanie wyższa w przypadku, gdy średnica obłoniaka przekracza 5 cm i wtedy, gdy nowotwór nacieka mięśnie (ryc. 5). W przypadku zmian o średnicy poniżej 5 cm, które udało się usunąć doszczętnie, rokowanie jest dobre, chociaż pełne wyleczenie uzyskuje się także w przypadkach, gdy komórki nowotworowe obserwowano w bliskości lub na granicy marginesu histologicznego/chirurgicznego, a resekcja z zachowaniem czystych marginesów histologicznych praktycznie zawsze oznacza całkowite wyleczenie.

W przypadku obłoniaków nawet przy niekorzystnej lokalizacji guza amputacja kończyny nie powinna być metodą z wyboru, jako że często obserwuje się brak wznowy pooperacyjnej przy resekcji marginalnej lub niedoszczętniej.



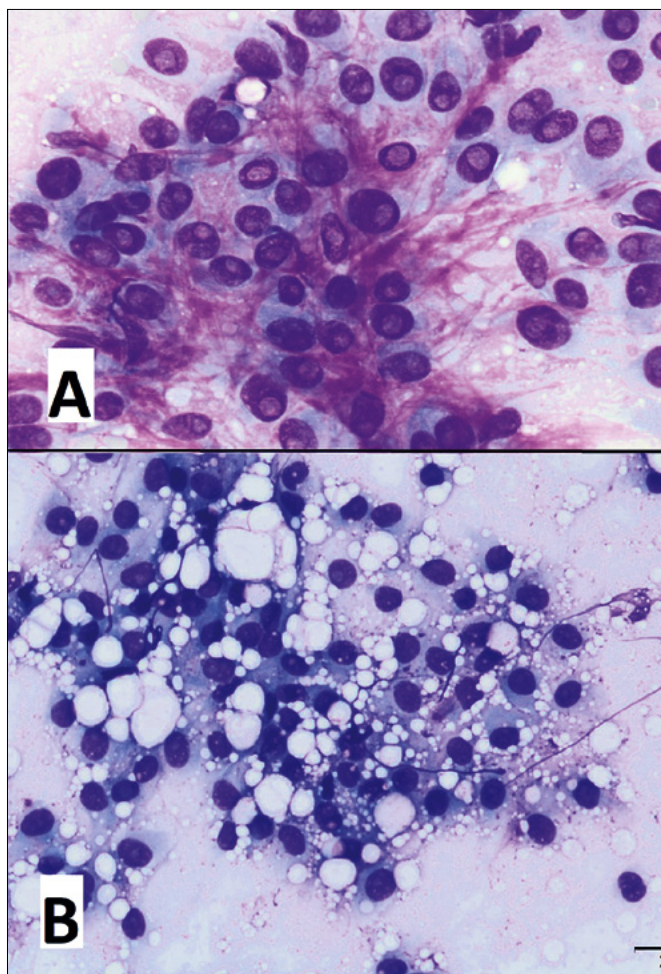
Rola badań mikroskopowych w mięsakach tkanek miękkich u psów

Wśród licznych testów diagnostycznych stosowanych w przypadku mięsaków tkanek miękkich u psów bardzo duże znaczenie ma badanie mikroskopowe, zarówno badanie cytologiczne, jak i histopatologiczne.

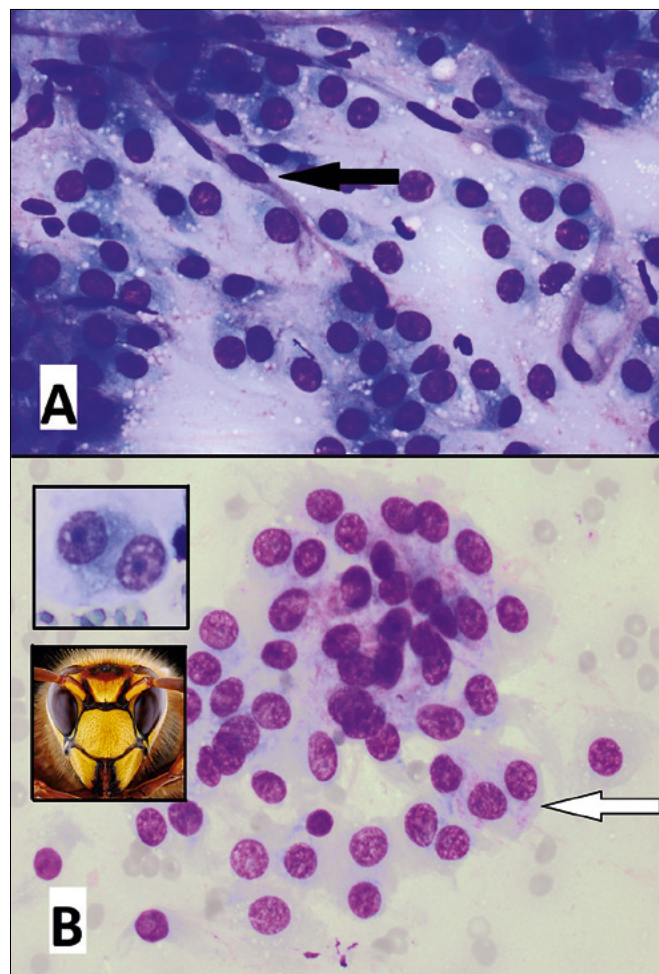
Badanie cytologiczne

Najczęściej badaniu cytologicznemu poddaje się rozmazy wykonane z materiału pobranego drogą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, jednak można też przeprowadzić ocenę preparatów odciskowych z powierzchni przekroju resekowanego mięsaka. Możliwa jest także szacunkowa ocena doszczętności zabiegu resekcji chirurgicznej MTM poprzez wykonanie preparatów odciskowych z marginesu resektu. Obecność komórek o morfologii typowej dla mięsaka sugeruje, że zabieg

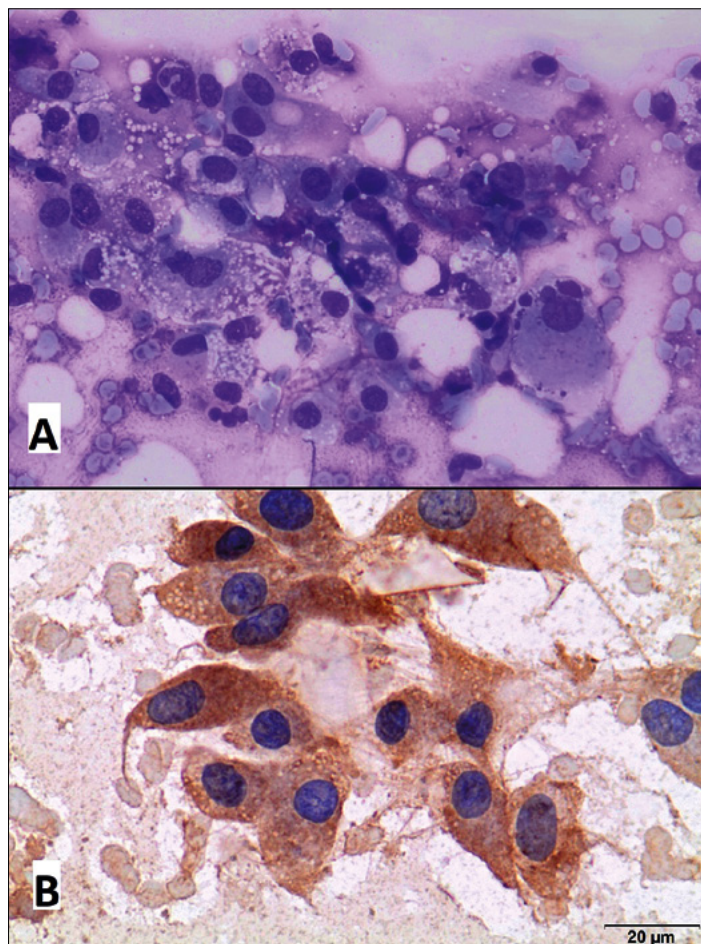
był niedoszczętny i wymagane jest poszerzenie łoża po wycięciu guza. W przypadku niektórych mięsaków, których spistość jest duża (duża ilość macierzy pozakomórkowej), komórki nowotworowe złuszcza się bardzo trudno i nie mogą być zaaspirowane w czasie biopsji lub pobrany materiał jest skąpy, co skutkuje wynikiem nie-diagnostycznym (1). Zastosowanie większej strzykawki, „pompowanie” tłoczkiem w czasie aspiracji lub pobranie większej liczby rozmazów może poprawić skuteczność badania. Szacuje się, że wiarygodność badania cytologicznego w rozpoznawaniu mięsaków tkanek miękkich u psów wynosi powyżej 90%, a w przypadku obłoniaków nawet 96% (1). Z obserwacji własnych wynika, że biopsja aspiracyjna cienkoigłowa jest dobrą metodą rozpoznawania mięsaków tkanek miękkich u psów. Rozpoznanie poszczególnych typów histologicznych jest natomiast trudniejsze i możliwe w około 67% przypadków (ryc. 6 i 7). Pomocne w określeniu podtypu histologicznego mięsaków tkanek miękkich u psów może



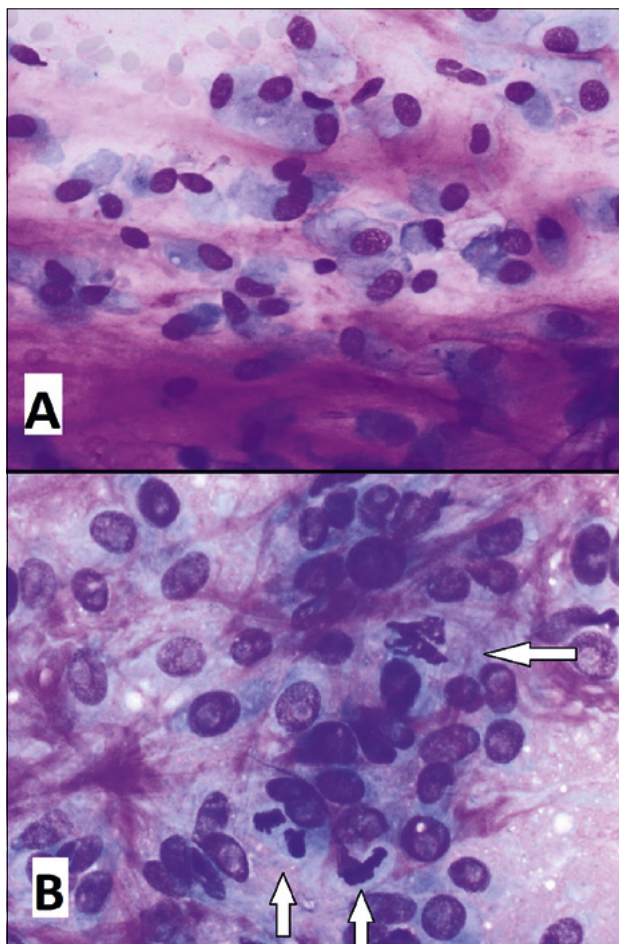
Ryc. 6. Obraz mikroskopowy mięsaków tkanek miękkich u psów. Wydaje się że badanie cytologiczne charakteryzuje się umiarkowaną przydatnością w rozpoznawaniu typu histologicznego mięsaka tkanek miękkich, jednak – tak jak w prezentowanych przypadkach – rozpoznanie nie następuje trudności. A – obraz cytologiczny włókniakiomęsaka – oprócz licznych wrzecionowatych komórek z owalnymi jądrami widoczna jest kwasochłonna (różowa) włóknista macierz pozakomórkowa – rozpoznanie cytologiczne potwierdzono badaniem histopatologicznym. B – obraz cytologiczny tłuszczakiomęsaka – widoczne liczne komórki o okrągłych lub owalnych jądrami komórkowych oraz z obfitą zwakułizowaną cytoplazmą – rozpoznanie cytologiczne potwierdzono badaniem histopatologicznym. Barwienie barwnikiem Giemsy, powiększenie 200×



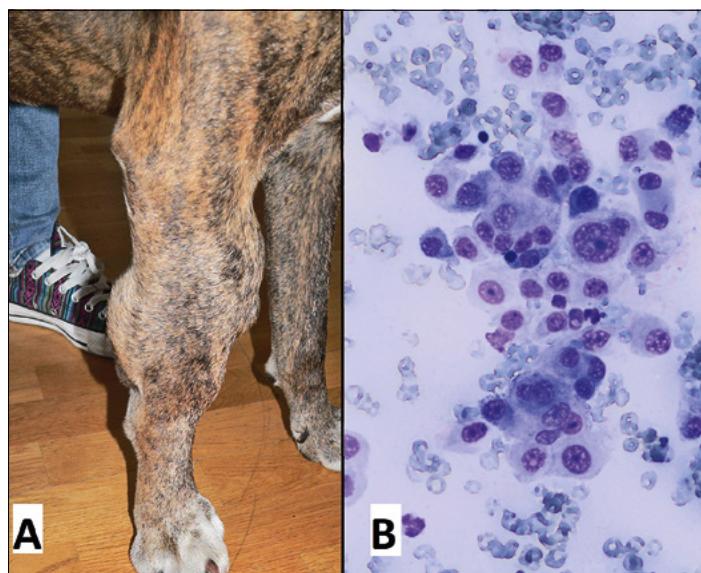
Ryc. 7. Badanie cytologiczne jest dobrą metodą rozpoznawania obłoniaków u psów, obraz cytologiczny w przypadku tych nowotworów jest dość charakterystyczny. A – oprócz widocznych komórek wrzecionowatych z owalnymi jądrami widoczne też drobne naczynia włosowate (jądro jednej z komórek śródbłonna oznaczono czarną strzałką). B – oprócz opisanych powyżej komórek obłoniaka widoczna inna komórka o dwóch jądrami komórkowych – komórki takie określa się jako „głowa osy”. Barwienie barwnikiem Giemsy, powiększenie 200×



Ryc. 8. Obraz cytologiczny wznowy włókniakerwiakomięsa. A – rozmaz zabarwiony barwnikiem Giemsy ukazuje pleomorficzne komórki mezenchymalne wskazujące, że nowotwór jest mięsakiem, jednak dopiero barwienie immunocytochemiczne z zastosowaniem przeciwciał anty S-100 (brązowa barwa cytoplazmy komórek na rycinie B) potwierdza jego pochodzenie z tkanki nerwowej. Powiększenie 200x



Ryc. 9. Obraz cytologiczny dwóch przypadków włókniakerwiakomięsa u psów. A – widoczne liczne komórki mezenchymalne, z łagodnie atypowymi jądrami komórkowymi, bez aktywności mitotycznej oraz obfitą białkową włóknistą macierzą pozakomórkową – powyższy obraz sugeruje, że jest to mięsak o niskiej lub umiarkowanej złośliwości. B – widoczne komórki mezenchymalne z umiarkowanym pleomorfizmem komórkowym, o wyraźnych i dużych jąderekach, z licznymi figurami mitotycznymi (oznaczone strzałkami) – powyższy obraz sugeruje mięsaka o wysokiej złośliwości. Barwienie barwnikiem Giemsy, powiększenie 200x



Ryc. 10. Wznowa mięsaka tkanek miękkich (obłoniaka) u psa; A – widoczna rozlana deformacja okolicy przedramienia. B – obraz cytologiczny ukazuje komórki mezenchymalne ze znaczną atypią komórkową – rozpoznanie wznowy mięsaka nie budzi wątpliwości. Barwienie barwnikiem Giemsy, powiększenie 200x

być barwienie immunocytochemiczne z zastosowaniem odpowiednich przeciwciał mono- lub poliklonalnych (ryc. 8). Co istotne, badanie cytologiczne jest nieprzydatne w określaniu stopnia histologicznej złośliwości MTM, uważa się też, że nie jest pomocne w planowaniu leczenia (1). Jednak w opinii autora nie jest to do końca zgodne z prawdą, ponieważ umożliwia ono z dużym prawdopodobieństwem rozpoznanie obłoniaka, który zazwyczaj nie wymaga agresywnego zabiegu chirurgicznego. W przypadku mięsaków innych niż obłoniaki ocena cytologiczna może być tylko szacunkowa (ryc. 9). Uważa się też, że badanie cytologiczne nie nadaje się do oceny występowania wznowy miejscowej MTM, dlatego że komórki mięsaka (atypowe komórki wrzecionowate) mogą wyglądać jak aktywne proliferujące komórki ziarniny zapalnej, która pojawia się w obrębie gojącej się rany pooperacyjnej i może utrzymywać się przez długi czas. Wydaje się jednak, że w przypadku gdy biopsja aspiracyjna z szybko rosnącej guzowatej masy w obszarze blizny pooperacyjnej po usunięciu mięsaka dostarcza bogatej populacji znacznie atypowych komórek mezenchymalnych, bez towarzyszącego nacieku zapalnego (obserwowanego typowo w tkance ziarninowej), to daje patologowi duże podstawy do rozpoznania wznowy mięsaka (ryc. 10).

Badanie cytologiczne jest wiarygodną metodą rozpoznania mięsaków tkanek miękkich u psów, w niektórych przypadkach dającą także możliwość określenia podtypu histologicznego (włókniakomięsak, obłoniak, tłuszczakomięsak, mięsaki osłonek nerwów obwodowych), jednak bez możliwości określenia stopnia złośliwości histologicznej, i charakteryzuje się małą/umiarkowaną przydatnością oceny pojawienia się wznowy pooperacyjnej.

Badanie histopatologiczne

Podstawą rozpoznania i klasyfikacji mięsaków tkanek miękkich u psów jest badanie histopatologiczne, bowiem służy ono do postawienia lub potwierdzenia (gdy wcześniej wykonywano badanie cytologiczne) rozpoznania, określenia podtypu histologicznego, stopnia złośliwości histologicznej lub innych parametrów o znaczeniu rokowniczym (np. ocena nasilenia proliferacji) oraz oceny doszczętności zabiegu chirurgicznego. Badanie histopatologiczne w przypadku MTM można wykonać przed operacją resekcji guza (biopsja wycinkowa za pomocą skalpela, trepanobiopsja lub biopsja gruboigłowa – tru-cut) oraz po usunięciu całej zmiany lub jej dużego fragmentu (zabieg cytoredukcyjny). W pierwszym przypadku do badania należy pobrać liczne wycinki (np. minimum 6 bioptatów w przypadku biopsji gruboigłowej), by uniknąć niediagnostycznego lub niejednoznacznego wyniku. Badanie histopatologiczne małych wycinków MTM (biopsja wycinkowa, biopaty tru-cut) pozwala na określenie rozpoznania, zazwyczaj łącznie z określeniem typu histologicznego, a także rozpoznanie wznowy miejscowej mięsaka, jednak ocena stopnia histologicznej złośliwości w małych wycinkach mięsaka z reguły nie jest możliwa. Do jednoznacznego określenia stopnia złośliwości histologicznej konieczne jest badanie dużych fragmentów, a najlepiej całego resekowanego guza.

W ostatnio opublikowanych badaniach przeprowadzonych w Stanach Zjednoczonych poddano analizie wyniki badania histopatologicznego MTM odnośnie do informacji w nim zawartych, w kontekście wytycznych Amerykańskiej Szkoły Patologów. Analizowano 5 kryteriów wyniku: opis pacjenta i historię choroby, opis makroskopowy resektu, określenie stopnia złośliwości histologicznej, ocenę marginesów histologicznych oraz komentarz do wyniku (9). Informacje dotyczące opisu pacjenta i historii medycznej choroby zawarte były w odpowiednio 91,2 i 90,8% wyników, opis makroskopowy próbki umieszczony był w 64,8% wyników. Oceny marginesów histologicznych dokonano w 91,6% przypadków, jednak obiektywna odległość komórek nowotworowych od marginesu histologicznego wycinka podana była jedynie w 59,6% wyników. Ocena stopnia złośliwości histologicznej mięsaka podana była w 97,2% przypadków, a podklasyfikacja histologiczna jedynie w 50% przypadków (9).

W przypadku MTM u psów jeszcze przed podjęciem decyzji o rozległości zabiegu chirurgicznego istotne jest określenie rozpoznania oraz ustalenie przynajmniej szacunkowego stopnia złośliwości histologicznej

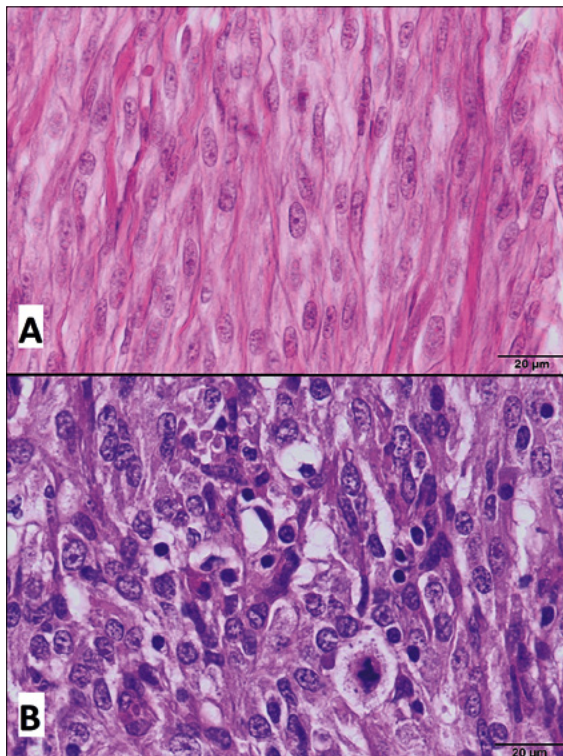
mięsaka. W badaniach przeprowadzonych przez Bray i wsp. (8) wykazano, że w zdecydowanej większości przypadków (powyżej 80%) zabieg resekcji takiego guza jest zabiegiem niezaplanowanym, tzn. operator nie ma żadnej wiedzy na temat tego, co resekuję, ani tego, jakie jest potencjalne zachowanie biologiczne guza. Autorzy konkludują, że powodzenie takiej operacji wynika z tego, że u psów zdecydowana większość mięsaków tkanek miękkich charakteryzuje niska złośliwość histologiczna/biologiczna. Jednak takie niezaplanowane postępowanie w przypadkach mięsaków o wysokiej złośliwości skutkuje wznową miejscową, co z kolei wymaga powtórnego wycięcia rany pooperacyjnej albo wdrożenia radioterapii jako dodatkowej metody leczenia. Z drugiej strony w części przypadków mięsaków o niskiej złośliwości, dla których nie przeprowadzono badania przedoperacyjnego, zabieg chirurgiczny może być niepotrzebnie zbyt rozległy – np. amputacja kończyny w przypadku obłoniaka okolicy łokcia. Z powyższego wynika, że w każdym przypadku, gdy podejrzewa się MTM u psa, należy przed operacją podjąć próbę oceny, z jakim typem nowotworu mamy do czynienia.

Ocena typu histologicznego

Typ histologiczny mięsaka tkanek miękkich u psów nie ma znaczenia rokowniczego, chociaż niektóre badania sugerują, że nerwiakowłókniakomięsaki, śluzakomięsaki i włókniakomięsaki cechuje większe ryzyko wznowy miejscowej niż obłoniaki (2,6–32,1% dla trzech pierwszych typów vs. 9% dla obłoniaków; 8). Problemem w określaniu typu histologicznego może być konieczność zastosowania dodatkowych barwień histochemicznych (barwienie van Giesona, barwienie PAS na obecność śluzu) i immunohistochemicznych (desmina, aktyna, S-100), co wiąże się z dodatkowymi kosztami badania mikroskopowego. Badania przeprowadzone przez Yap i wsp. (10) wykazały, że rozbieżności pomiędzy różnymi patologiami w rozpoznawaniu poszczególnych typów MTM wynoszą około 10%. Istnieje prawdopodobieństwo, że brak różnic w zachowaniu biologicznym poszczególnych typów MTM u psów jest wynikiem tego, że do tej pory nie przeprowadzono dobrze zaplanowanych badań obejmujących duże grupy psów z różnymi typami mięsaków (brak też jednoznacznych kryteriów takiej klasyfikacji), w których pacjentów poddano by kilkuletniej obserwacji klinicznej.

Ocena stopnia złośliwości histologicznej

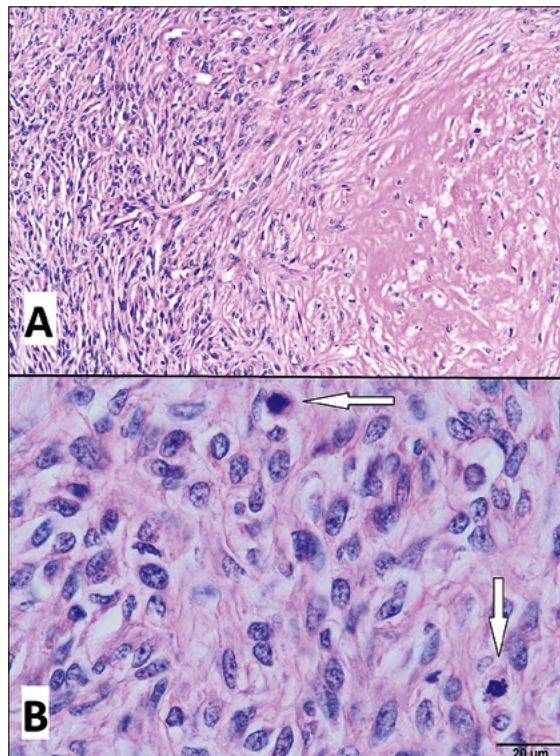
Stopień histologicznej złośliwości guza jest kluczowym parametrem o znaczeniu rokowniczym, jest on bowiem ściśle skorelowany z parametrami takimi jak ryzyko wznowy pooperacyjnej, ryzyko pojawienia się przerzutów odległych oraz długość okresu wolnego od choroby (1, 6, 7). Określenie stopnia złośliwości histologicznej jeszcze przed zabiegiem może w znacznym stopniu wpłynąć na wybór metody leczenia: prosta resekcja w przypadku MTM o niskiej złośliwości (I stopień; ryc. 11A) lub amputacja kończyny w przypadku MTM o wysokiej złośliwości (III stopień; ryc. 11B). Zasadą jest wykorzystanie do oceny dużych fragmentów guza, jednak w przypadku, gdy jest to



Ryc. 11. Obraz histologiczny dwóch przypadków mięsaków tkanek miękkich u psów. A – widoczne liczne komórki mezenchymalne, wrzecionowate o morfologii fibroblastów, z łagodnie atypowymi jądrami komórkowymi, bez widocznej aktywności mitotycznej oraz obfitą białkową włóknistą macierzą pozakomórkową – powyższy obraz wskazuje, że jest to włókniakomięsak o niskiej złośliwości. B – widoczne komórki mezenchymalne z umiarkowanym/znacznym pleomorfizmem komórkowym, o wyraźnych i dużych jąderkach, widoczna też jedna atypowa figura mitotyczna (na dole na prawo od centrum ryciny) – powyższy obraz wskazuje na mięsaka niezróżnicowanego o wysokiej złośliwości. Barwienie hematoksylina-eoazyne, powiększenie 200×

niemożliwe, można podjąć próbę oszacowania stopnia złośliwości MTM na podstawie oceny mikroskopowej małych wycinków pobranych przed zabiegiem operacyjnym. W takich przypadkach zgodność badania plasuje się na umiarkowanym poziomie (stopień złośliwości jest zazwyczaj niedoszacowany – 29% przypadków, nieco rzadziej przeszacowany – 12% przypadków) – szczególnie przedoperacyjne rozpoznanie mięsaka o niskiej złośliwości powinno być traktowane z dużą ostrożnością (11). W badaniach porównawczych mięsaków tkanek miękkich u psów wykazano, że klasyfikacja histologiczna stopnia złośliwości MTM u psów wprawdzie charakteryzuje się doskonałą powtarzalnością (100%), jeżeli badanie jest wykonywane przez tego samego patologa (intra-observer agreement – dwukrotne badanie w pewnym odstępie czasu przez tego samego patologa), jednak umiarkowaną powtarzalnością (56%), jeżeli badanie tego samego guza wykonywane było przez różnych patologów (inter-observer agreement; 10).

System histologiczny oceny stopnia złośliwości MTM u psów obejmuje 3 kryteria histologiczne (stopień zróżnicowania komórek nowotworowych, ocena liczby mitoz, obecność i rozległość martwicy; **ryc. 12**) i był on z powodzeniem stosowany dla celów praktycznych, jednak metody oceny tych kryteriów nie zawsze były takie same lub nie były precyzyjnie opisane w publikacjach. Z tego też powodu w ostatnim wydaniu



Ryc. 12. Obraz histopatologiczny ukazuje inne cechy wskazujące na mięsaka o wysokiej złośliwości histologicznej: obecność obszaru martwicy (różowy obszar po prawej na ryc. A), niskie zróżnicowanie komórek oraz liczne figury mitotyczne (oznaczone strzałkami na ryc. B). Barwienie hematoksylina-eoazyne, powiększenie 100× (ryc. A) i 200× (ryc. B)

podręcznika weterynaryjnej patologii onkologicznej („Tumors in Domestic Animals”) zaproponowano ujednolicone kryteria oceny parametrów mikroskopowych MTM (**tabela 2**; 2). Ten proponowany system klasyfikacji wymaga szczegółowej walidacji na dużej populacji psów z MTM w kontekście występowania wznowy pooperacyjnej, całkowitego okresu przeżycia, okresu wolnego od choroby, dawania przerzutów; okres obserwacji powinien trwać minimum 3 lata, a uzyskane wyniki powinny być poddane stosownej analizie statystycznej (2).

Ocena nasilenia proliferacji

Ocena nasilenia proliferacji komórek nowotworowych (łączna liczba mitoz w 10 polach widzenia przy dużym powiększeniu – 400×) może być stosowana jako niezależny parametr o znaczeniu rokowniczym (**tabela 3**; 7, 8, 12). Wyższa aktywność proliferacyjna wiąże się z szybszym pojawieniem się wznowy, większą tendencją powstania przerzutów oraz krótszymi okresami przeżycia. Inne parametry mikroskopowe oceny nasilenia proliferacji, takie jak immunoekspresja Ki67 czy badanie AgNOR (organizatory jąderkowe), mogą mieć znaczenie pomocnicze w ocenie rokowania, ale nie są rutynowo stosowane w praktyce (jeżeli mają być wykonane, to są dodatkowo płatne), a ponadto wobec faktu, że najważniejsze parametry uzyskuje się

Tabela 2. Zasady proponowanego systemu oceny stopnia histologicznej złośliwości mięsaków tkanek miękkich u psów oraz praktyczne zastosowanie tego systemu (opracowano w oparciu o 1, 2, 6, 7, 12)

Kryterium oceny		Punkty	
Stopień zróżnicowania komórek nowotworowych – ocenia się, w jakim stopniu komórki nowotworowe przypominają komórki tkanki prawidłowej			
Guz dobrze zróżnicowany – możliwe określenie podtypu		1	
Guz o umiarkowanym zróżnicowaniu – możliwe określenie podtypu		2	
Mięsak niezróżnicowany – określenie podtypu niemożliwe		3	
Liczba mitoz – 10 pól widzenia pod dużym powiększeniem – high power field – hpf (wystandaryzowane pole o powierzchni 2,37 mm ²) – ocenę należy przeprowadzić w obszarach bogatych w komórki o najwyższej aktywności proliferacyjnej. Jeżeli liczba mitoz jest graniczna, to należy przeprowadzić kolejną ocenę.			
0–9 mitoz		1	
10–19 mitoz		2	
Powyżej 19 mitoz		3	
Obecność obszarów martwicy (oceniana mikroskopowo oraz o ile możliwe – makroskopowo w czasie pobierania wycinków guza do badania mikroskopowego)			
Brak martwicy		0	
≤50% powierzchni zajmowanej przez martwicę		1	
>50% powierzchni zajmowanej przez martwicę		2	
Znaczenie rokownicze systemu			
Suma punktów	Stopień złośliwości	Ryzyko przerzutów	Ryzyko wznowy przy resekcji brzeżnej lub niedoszczętnej
≤3	I (dobrze zróżnicowany)	0–13%	7%
4–5	II (umiarkowanie zróżnicowany)	7–33%	35%
≥6	III (nisko zróżnicowany)	22–44%	75%

Tabela 3. Wartość prognostyczna oceny nasilenia proliferacji komórek mięsaków tkanek miękkich (2, 6, 7, 12)

Na podstawie Kuntz i wsp. (6), badanie objęło 75 psów			
Wartość MC (mitotic count, liczba mitoz w 10 polach widzenia)	Całkowity okres przeżycia	Ryzyko wznowy pooperacyjnej	Ryzyko rozwoju przerzutów
Do 9	1444 dni	Nie badano	1,6%
10–19	532 dni	Nie badano	6%
Powyżej 19	236 dni	Nie badano	6% (MC>20: 30%)
Na podstawie Coindre i wsp. (12), badanie objęło 160 psów			
Wartość MC	Całkowity okres przeżycia	Ryzyko wznowy pooperacyjnej	Ryzyko rozwoju przerzutów
0–9	118 tygodni	25%	Nie badano
Powyżej 9	49 tygodni	63%	Nie badano

zwykle w toku badania rutynowego (czyli są dostarczane lekarzowi praktykowi w cenie badania podstawowego), stosowanie wspomnianych barwień dodatkowych w większości przypadków jest nieuzasadnione.

Ocena doszczędności zabiegu chirurgicznego

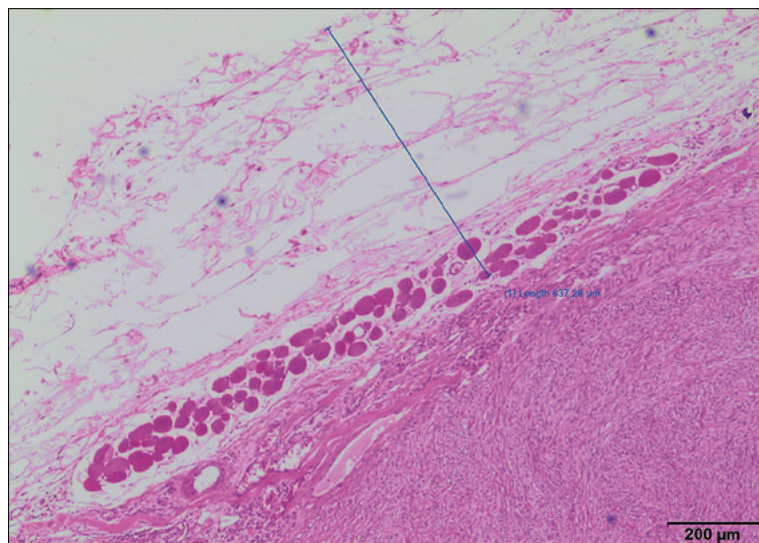
Ocena, czy zabieg resekcji chirurgicznej był doszczętny (czysty margines chirurgiczny/histologiczny), jest kolejnym kluczowym mikroskopowym parametrem istotnym z punktu widzenia rokowniczego w przypadku mięsaków tkanek miękkich u psów – obecnie uznaje się, że najważniejszym czynnikiem pozwalającym na miejscową kontrolę mięsaków tkanek miękkich u psów jest usunięcie nowotworu z czystymi marginesami chirurgicznymi/histologicznymi (7, 13). W wielu badaniach wykazano, że doszczętne usunięcie mięsaka potwierdzone badaniem histopatologicznym daje szansę na lepsze wyniki leczenia, wiąże się bowiem ze znacznym zmniejszeniem ryzyka wznowy miejscowej i wydłużeniem okresu przeżycia. Ryzyko wznowy mięsaka przy niedoszczętnej resekcji jest 10,5 raza wyższe w stosunku do przypadków,

w których guz został usunięty z czystymi marginesami histologicznymi (6).

W przypadku gdy operacja jest jedyną zastosowaną metodą terapeutyczną MTM, margines chirurgiczny uważa się za bezpieczny, gdy zachowano 2–3 cm makroskopowo prawidłowej tkanki oraz usunięto co najmniej jedną powięź w dolnym marginesie (1). Nie ustalono jak dotąd, co właściwie oznacza określenie „czyste marginesy” (czysty margines histologiczny), w zależności od publikowanych badań za „czyste marginesy” uznawano te przypadki, w których dystans między komórkami nowotworowymi a marginesem histologicznym wynosił od 1 do 10 mm (7, 14). Z kolei w badaniach Stefanello i wsp. (15) wykazano, że wznowy miejscowe nie pojawiały się w tych przypadkach mięsaków o niskiej złośliwości (I stopień histologicznej złośliwości), w których dystans pomiędzy komórkami nowotworowymi a marginesem histologicznym wynosił powyżej 3 mm. Niestety brak jest podobnych danych u psów z MTM o pośredniej lub wysokiej złośliwości histologicznej. Sugerowane kategorie w ocenie czystości marginesów histologicznych przedstawiono w tabeli 4.

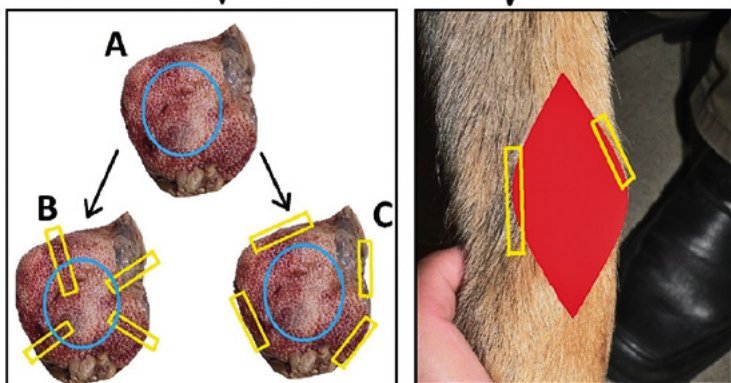
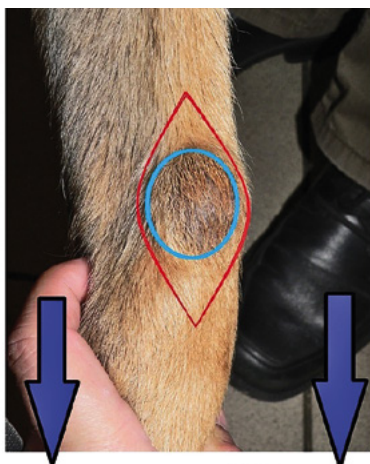
Tabela 4. Sugerowane kategorie oceny marginesów histologicznych w przypadku mięsaków tkanek miękkich u psów (opracowano na podstawie 7)

- Za „czysty szeroki” margines histologiczny (complete margins) uznaje się przypadki, w których dystans pomiędzy komórkami nowotworowymi a marginesem wycinka wynosi powyżej 3–5 mm.
- Za „czysty wąski” margines histologiczny (close margins) uznaje się przypadki, w których dystans pomiędzy komórkami nowotworowymi a marginesem wycinka wynosi poniżej 3 mm.
- Za „resekcję brzezną” uznaje się przypadki, w których dystans pomiędzy komórkami nowotworowymi a marginesem wycinka wynosi poniżej 1 mm lub margines wycinka przebiega w obrębie pseudotorebki nowotworu lub nie zawiera prawidłowo wyglądającej tkanki.
- Za „brak marginesów histologicznych” (incomplete margins) uznaje się przypadki, w których komórki nowotworowe są widoczne na granicy co najmniej jednego marginesu.



Ryc. 13. Obraz mikroskopowy marginesu histologicznego mięsaka tkanek miękkich usuniętego chirurgicznie u psa. Miąższ nowotworu na dole i po prawej, w bliskości marginesu widoczna tkanka tłuszczowa, pomiędzy tkanką tłuszczową i nowotworem pasemko mięśni. Na niebiesko oznaczono najkrótszy dystans pomiędzy komórkami nowotworowymi a marginesem histologicznym – wynosi on precyzyjne 637,28 µm. Barwienie hematoksylina-eozyna, powiększenie 20×

Dzięki zastosowaniu mikroskopu z kamerą, połączeniu tego zestawu do komputera z odpowiednim oprogramowaniem możliwe jest precyzyjne określenie szerokości marginesu histologicznego, jednak warunkiem jest tu odpowiednie zabezpieczenie wycinka (ryc. 13). Z kilku powodów mikroskopowa ocena doszczętności resekcji chirurgicznej nie jest doskonała (patrz ramka), jakkolwiek wskazana w każdym przypadku MTM. Kluczowe dla oceny doszczętności zabiegu jest przesłanie odpowiednio zabezpieczonych próbek nowotworu, najlepiej jeżeli zostanie przesłany cały resekowany guz, a jeżeli to niemożliwe (np. ze względu na jego wielkość), to jego reprezentatywne wycinki wybrane przez operatora na podstawie oceny resektu – chirurg pobiera i przesyła do badania te fragmenty guza, co do których istnieje podejrzenie, że w tych obszarach zabieg mógł nie być doszczętny. Istnieją dwa podstawowe sposoby pobierania wycinków do oceny doszczętności zabiegu: wycinki prostopadłe do marginesu chirurgicznego (perpendicular margins) lub wycinki równoległe do marginesu chirurgicznego (parallel margins; en face margins) – ryc. 14. Inną możliwą opcją postępowania jest pobranie dodatkowych wycinków z brzegów łoża po resekcji guza (shaved margins; ryc. 14) i umieszczenie ich w oddzielnym naczyniu z utrwalaczem – obecność komórek nowotworowych w takich wycinkach wskazuje na niedoszczętną resekcję i wysokie prawdopodobieństwo wznowy MTM.



Jest kilka ograniczeń, z powodu których ocena mikroskopowa marginesów histologicznych nie jest w 100% miarodajna, a o czym należy pamiętać, interpretując wynik badania histopatologicznego.

Precyzyjna ocena wszystkich marginesów histologicznych nie jest możliwa z powodu ograniczeń technicznych, którym poddawany jest materiał w trakcie

Ryc. 14. Schemat ukazujący metody pobierania wycinków do badania czystości marginesów histologicznych. Na rycinie górnej obłoniak zlokalizowany na nadgarstku psa – na niebiesko zakreślono granicę guza, na czerwono planowany przebieg cięcia chirurgicznego. Na rycinie dolnej po lewej sposób pobierania wycinków z resekowanego materiału; A – resekowany materiał wraz z zaznaczonym na niebiesko zarysem guza; B – żółte prostokąty ukazują sposób pobierania wycinków prostopadłych do marginesu chirurgicznego; C – żółte prostokąty ukazują sposób pobierania wycinków równoległych do marginesu chirurgicznego. Na rycinie dolnej po prawej zaprezentowano schematycznie łożo po usuniętym mięsaku (czerwony obszar), żółte prostokąty ukazują sposób pobierania wycinków z brzegów łoża po resekcji (metoda „shaved margins”)

Tabela 5. Wartość rokownicza oceny czystości marginesów histologicznych w przypadku mięsaków tkanek miękkich u psów (opracowano w oparciu o 1, 2, 6, 7, 12)

<p>Ryzyko wznowy miejscowej po resekcji chirurgicznej w przypadku mięsaków tkanek miękkich bez względu na stopień złośliwości histologicznej</p> <ul style="list-style-type: none"> - Marginesy czyste i szerokie: ryzyko wznowy 2–5% (95–98% mięsaków nie daje wznowy). - Komórki nowotworowe w obrębie lub w bliskości marginesów: ryzyko wznowy 17–25% przypadków (75% mięsaków nie daje wznowy).
<p>Ryzyko wznowy miejscowej po resekcji chirurgicznej w przypadku mięsaków tkanek miękkich z uwzględnieniem stopnia złośliwości histologicznej.</p> <p>Komórki nowotworowe w obrębie marginesu histologicznego:</p> <ul style="list-style-type: none"> - I stopień złośliwości: ryzyko wznowy 7%, - II stopień złośliwości: wznowy 34%, - III stopień złośliwości: wznowy 75%.

jego obróbki w laboratorium (zagadnienie to omówiono we wcześniejszej publikacji; 16). Problemy rozpoczynają się od momentu przeprowadzenia zabiegu resekcji i związane są z postępowaniem chirurga (brak oznaczenia marginesów), obkurczaniem się mięśniówki, powięzi i tkanki tłuszczowej. Balansując między kosztami, pracochłonnością, zyskiem i możliwościami, za podstawową opłatę laboratoria komercyjne badają 3–6 wycinków – z praktycznego punktu widzenia zbadanie całości w trójwymiarze jest po prostu niemożliwe. Dodatkowo, dochodzą kwestie związane z utrwalaniem wycinka – materiał w formalinie kurczy się oraz deformuje, co utrudnia orientację i zmienia relacje pomiędzy strukturami w przesłanym resecie. W aspekcie tym bardzo ważną rolę pełni chirurg, który guz wycinał, i powinien go w odpowiedni sposób wyselekcjonować i oznaczyć.

Kolejnym problemem może być identyfikacja różnych struktur w wycinku histologicznym – np. granica między nowotworem a otaczającą tkanką łączną czy identyfikacja powięzi. Niekiedy powięzi są doskonale widoczne dla chirurga w czasie operacji, ale paradoksalnie mogą nie być tak dobrze widoczne w czasie oceny mikroskopowej (6, 7).

O prawdziwości powyższego świadczą przypadki wznowy lub rozsiewu złośliwych nowotworów, w których badanie histopatologiczne wskazało, że nowotwór został usunięty w całości, tak więc: odrasta 16% doszczętnie usuniętych mięsaków poiniekcyjnych u kotów, 2,5–40% doszczętnie usuniętych mastocytom u psów, 2–22% doszczętnie usuniętych MTM u psów (6, 13, 15). Wykazano także, że w części przypadków (4,9%), w których marginesy histologiczne usuniętego mięsaka tkanek miękkich były wolne od komórek nowotworowych, komórki nowotworowe były znalezione w wycinkach pobranych z brzegu łoża po resekcji MTM (17). Z drugiej strony, nie w każdym przypadku, gdy resekcja była niedoszczętna (komórki nowotworowe w bliskości lub w obrębie marginesów histologicznych), dojdzie do wznowy miejscowej.

W badaniach Milovancev i wsp. (18) porównywano metody oceny czystości marginesów histologicznych w przypadku MTM u psów. Oceniono materiał pobrany za pomocą odcisków cytologicznych z marginesu chirurgicznego (materiał na szkiełka mikroskopowe uzyskiwano poprzez przyłożenie marginesu chirurgicznego do szkiełka) oraz metodą „shaved margins” (pobranie dodatkowych wycinków z brzegów łoża po resekcji guza – porównaj **ryc. 14**) i porównano je z metodą klasyczną oceny marginesów

histologicznych (wycinki prostopadłe do marginesu chirurgicznego – porównaj **ryc. 14**). W badaniach tych wykazano słabą korelację w ocenie czystości marginesów chirurgicznych pomiędzy metodą klasyczną a metodą odciskową i metodą typu „shaved margins”, bowiem wyniki były często rozbieżne i z tego powodu obecnie metody te nie są polecane w określaniu czystości brzegów (18). Stosowanie oceny cytologicznej odcisków marginesu histologicznego może być jednak przydatne z praktycznego punktu widzenia – w przypadku gdy w badaniu mikroskopowym stwierdza się komórki nowotworowe w preparatach odciskowych, zasadne wydaje się poszerzenie zakresu resekcji (18).

Znaczenie rokownicze oceny czystości marginesów histologicznych przedstawiono w **tabeli 5**.

Inne parametry o potencjalnym znaczeniu rokowniczym

Badanie kliniczne pacjenta z mięsakiem tkanek miękkich umożliwia określenie lokalizacji, wielkości i wyglądu guza nowotworowego. Wydaje się, że MTM o średnicy guza powyżej 5 cm częściej dają wznowy miejscowe i charakteryzują się krótszymi okresami przeżycia po resekcji chirurgicznej, jednak w niektórych badaniach nie wykazano takiej zależności (1, 6, 13). Podobnie inne cechy kliniczne sugerujące złośliwość, takie jak szybki wzrost, obecność powierzchownego owrzodzenia lub martwicy w mięszu guza oraz brak ruchomości z powodu naciekania tkanek otaczających, mogą mieć związek z gorszym rokowaniem (8), chociaż według Dennis i wsp. (7) takiej zależności nie ma.

Wynik badania histopatologicznego

Wynik badania histopatologicznego mięsaka tkanek miękkich u psów powinien zawierać:

- rozpoznanie histopatologiczne typu mięsaka (o ile możliwe; niekiedy wymaga wykonania barwienia immunohistochemicznego),
- stopień złośliwości histologicznej,
- wynik oceny nasilenia proliferacji (łączna liczba mitoz w 10 polach widzenia przy powiększeniu 400×, najlepiej pole widzenia o powierzchni 2,37 mm²),
- doszczętność zabiegu chirurgicznego (czystość marginesów histologicznych) – o ile ocena była możliwa do przeprowadzenia – najlepiej podać dystans od komórek nowotworowych do marginesu histologicznego.

Bazując na wyniku badania histopatologicznego, Dennis i wsp. (7) zaproponowali algorytm prognostyczny

Tabela 6. Proponowany algorytm prognostyczny dla mięsaków tkanek miękkich u psów, przedstawiony przez Dennis i wsp. (7)

I stopień	II stopień	III stopień
Występowanie przerzutów		
Rzadko	Raczej rzadko	Umiarkowanie często
Ryzyko wznowy		
Margines niezachowany lub resekcja brzeżna, lub margines czysty, ale wąski		
Raczej niskie	Umiarkowanie wysokie	Wysokie
Margines czysty szeroki		
Niskie	Niskie	Raczej niskie

w przypadku mięsaków tkanek miękkich u psów, który zaprezentowano w **tabeli 6**.

Piśmiennictwo

- Bray J.P.: Soft tissue sarcoma in the dog – part 1: a current review. *J. Small Anim. Pract.* 2016, **57**, 510–519.
- Meuten D.J.: W: Meuten D.J.: Appendix: diagnostic schemes and algorithms. W: *Tumors in Domestic Animals*. 5th edit., Wiley Blackwell, Ames, 2017, 942–978.
- Sapierzynski R., Czopowicz M., Jagielski D.: Metastatic lymphadenomegaly in dogs – cytological study. *Pol. J. Vet. Sc.* 2017, **20**, 731–736.
- Dobson J.M., Samuel S., Milstein H., Rogers K., Wood J.L.: Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J. Small Anim. Pract.* 2002, **43**, 240–246.
- Boerkamp K.M., Teske E., Boon L.R., Grinwis G.C., van den Bosche L., Rutteman G.R.: Estimated incidence rate and distribution of tumours in 4,653 cases of archival submissions derived from the Dutch golden retriever population. *BMC Vet. Res.* 2014, **10**, 34.
- Kuntz C.A., Dernell W.S., Powers B.E., Devitt C., Straw R.C., Withrow S.J.: Prognostic factors for surgical treatment of soft-tissue sarcomas in dogs: 75 cases (1986–1996). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1997, **211**, 1147–1151.
- Dennis M.M., McSparran K.D., Bacon N.J., Schulman F.Y., Foster R.A., Powers B.E.: Prognostic factors for cutaneous and subcutaneous soft tissue sarcomas in dogs. *Vet. Pathol.* 2011, **48**, 73–84.
- Bray J., Polton G., McSparran K., Bridges J., Whitbread T.M.: Soft tissue sarcoma managed in first opinion practice: outcome in 350 cases. *Vet. Surg.* 2014, **43**, 774–782.
- Livaccari A.M., Selmic L.E., Reagan J.K., Driskell E.A., Cray M.T., Lamoureux L.M., Garrett L.D.: Evaluation of information presented within soft tissue sarcoma histopathology reports in the United States: 2012–2015. *Vet. Comp. Oncol.* 2018, doi: 10.1111/vco.12397.
- Yap F.W., Rasotto R., Priestnall S.L., Parsons K.J., Stewart J.: Intra- and inter-observer agreement in histological assessment of canine soft tissue sarcoma. *Vet. Comp. Oncol.* 2017 **15**, 1553–1557.
- Perry J.A., Culp W.T.N., Dailey D.D., Eickhoff J.C., Kamstock D.A., Thamm D.H.: Diagnostic accuracy of pre-treatment biopsy for grading soft tissue sarcomas in dogs. *Vet. Comp. Oncol.* 2014, **12**, 106–113.
- Coindre J.M.: Grading of soft tissue sarcomas: review and update. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2006, **130**, 1448–1453.
- Bray J.P.: Soft tissue sarcoma in the dog – part 2: surgical margins, controversies and a comparative review. *J. Small Anim. Pract.* 2017, **58**, 63–72.
- Russell D.S., Townsend K.L., Gorman E., Bracha S., Curran K., Milovancev M.: Characterizing microscopical invasion patterns in canine mast cell tumours and soft tissue sarcomas. *J. Comp. Pathol.* 2017, **157**, 231–249.
- Stefanello D., Morello E., Roccabianca P., Iussich S., Nassuato C., Martano M., Squassino C., Avallone G., Romussi S., Buracco P.: Marginal excision of low-grade spindle cell sarcoma of canine extremities: 35 dogs (1996–2006). *Vet. Surg.* 2008, **37**, 461–465.
- Sapierzynski R.: Badanie histopatologiczne w onkologii weterynaryjnej. Część I. Warunki uzyskania przydatnego wyniku. *Życie Wet.* 2018, **92**, 884–891.
- Harris K.P., Dobson J.M., Constantino-Casas F.: Evaluation of the tumor bed biopsy technique in canine and feline oncologic surgery. 23rd Annual ECVS Scientific Meeting. Copenhagen, Denmark, 2014.
- Milovancev M., Townsend K.L., Gorman E., Bracha S., Curran K., Russell D.S.: Shaved margin histopathology and imprint cytology for assessment of excision in canine mast cell tumors and soft tissue sarcomas. *Vet. Surg.* 2017, **46**, 879–885.