

Histopathology in veterinary oncology. Part I. Factors essential for useful results

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

The results of histopathological examination, the pathology report, provide important information for clinical oncologist, moreover are crucial for proper diagnosis and treatment protocol for the tumor bearing patient. However, there are numerous errors that can produce false or non-relevant diagnostic results. To achieve useful histopathological report, the proper collection and respective handling of samples before they are sent to the laboratory is required. The histopathological diagnosis, histologic grade, tumor margins examination and vessels invasion are the most important microscopic features for treatment planning. Also, the properly prepared cover letter with all important information must accompany each sample since it may influence the diagnostic procedure and likewise the choice of therapy. In this article, factors contributing in the outcome of histopathological results useful for oncologic patient and clinician were critically evaluated.

Keywords: histopathology, margins evaluation, trimming, useful results, cover letter.

Badanie histopatologiczne polega na mikroskopowej ocenie tkanek, które zostały pobrane od żywego pacjenta lub ze zwłok, zostały w należyty sposób utrwalone, pokrojone i zabarwione stosownymi

Badanie histopatologiczne w onkologii weterynaryjnej. Część I. Warunki uzyskania przydatnego wyniku

Rafał Sapierzyński

z Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

metodami histologicznymi, histochemicznymi i ewentualnie immunohistochemicznymi. Celem tego badania jest określenie ostatecznego rozpoznania lub jego przybliżenie, a także uzyskanie informacji, które pozwolą zaplanować odpowiednie leczenie. Analiza histopatologiczna często także umożliwia określenie rokowania – przewidywanie krótko- i długotrwałych efektów leczenia. Badanie histopatologiczne może obejmować ocenę fragmentu lub fragmentów (wycinka/wycinków) bądź ocenę całej zmiany. W pierwszym przypadku materiał do badania uzyskuje się za pomocą biopsji wycinkowej (za pomocą skalpela pobiera się fragment większej zmiany), biopsji gruboigłowej (biopsja tru-cut), biopsji endoskopowej (za pomocą kleszczyków, w trakcie badania endoskopowego) lub rzadziej oderwania za pomocą kleszczy fragmentu zmiany widocznej bezpośrednio (na skórze, w jamie ustnej lub na prząciu). Badanie całej zmiany wymaga resekcji chirurgicznej, w czasie której usuwa się nie tylko zidentyfikowaną makroskopowo

nieprawidłowość morfologiczną, ale także zapas otaczającej morfologicznie prawidłowej tkanki (tzw. margines chirurgiczny lub margines tkanek zdrowych).

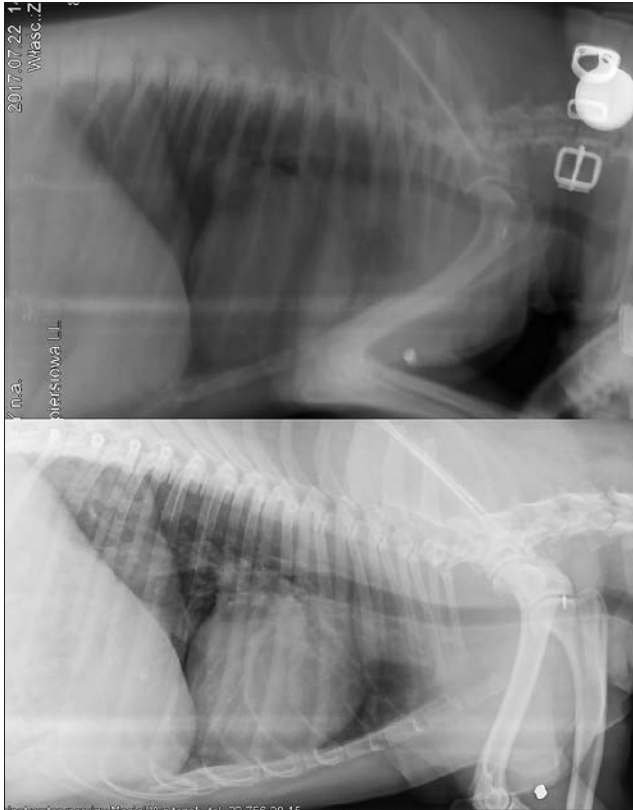
W przypadku badania wycinka zmiany efektem analizy mikroskopowej będzie przybliżenie lub określenie rozpoznania wstępnego, z kolei gdy wykonuje się badanie całej zmiany, oczekuje się od patologa podania informacji na temat:

- **precyzyjnego rozpoznania typu nowotworu i stopnia jego złośliwości** (o ile został opracowany dla danego nowotworu),
- oceny doszczętności zabiegu chirurgicznego – **ocena marginesów chirurgicznych/histologicznych**,
- **oceny ewentualnego rozsiewu choroby nowotworowej** – ocena zajęcia naczyń krwionośnych i chłonnych, nerwów, węzłów chłonnych,
- **oceny parametrów o znaczeniu rokowniczym i terapeutycznym** – o ile istnieją dla danego typu nowotworu i gatunku pacjenta.

W zdecydowanej większości przypadków informacje te można uzyskać w toku badania histopatologicznego, jednak podstawowym tego warunkiem jest dostarczenie przez lekarza kierującego reprezentatywnej próbki lub próbek, które pobrano we właściwy sposób, odpowiednio je utrwalono, oznaczono i przesłano.

Jednocześnie do przesłanego materiału należy dostarczyć skierowanie (pismo przewodnie) zawierające wszelkie dane, które pomogą patologowi ustalić informacje, jakich oczekuje lekarz kierujący próbkę. Nawet najlepszy patolog nie będzie w stanie udzielić oczekiwanych odpowiedzi na pytania zadane przez lekarza

kierującego, w przypadku gdy przesłana próbka jest złej jakości, nie została w odpowiedni sposób utrwalona lub jest nieoznaczona lub oznaczona w nieodpowiedni sposób (ryc. 1). W wytycznych jednego z laboratoriów zajmujących się wykonywaniem badań histopatologicznych materiału uzyskiwanego od ludzi jeden z punktów



Ryc. 1. Rycina wyjaśnia, dlaczego rozpoznanie histopatologiczne można postawić w oparciu o ocenę preparatów dobrej jakości. Na obu zdjęciach zaprezentowano rentgenogramy wykonane u tego samego pacjenta, przy czym na górze zdjęcie jest złej jakości („poruszone”), szczególnie anatomiczne są zatarte, a więc interpretacja obrazu jest niemożliwa. Na zdjęciu dolnym pacjent leżał nieruchomo, jakość obrazu jest dobra, a interpretacja możliwa do przeprowadzenia. Tak samo jest z badaniem histopatologicznym – interpretacji można poddać tylko preparaty dobrej jakości

Tabela 1. Kluczowe wytyczne dotyczące pobierania i zabezpieczania materiału do badania histopatologicznego

- Materiał umieścić w utrwalaczu tak szybko, jak to tylko możliwe (materiał powinien się znaleźć w utrwalaczu do 30 minut od pobrania)
- Do utrwalania używa się 10% roztwór formaliny, czyli 4% roztwór formaldehydu (formalina jest 40% wodnym roztworem formaldehydu)
- Stosunek objętości tkanki do objętości utrwalacza 1:10 (**ryc. 2**)
- Materiał z różnych miejsc należy odpowiednio oznaczyć lub umieścić w osobnych naczyniach z utrwalaczem i odpowiednio opisać
- Naczynia powinny być zabezpieczone w sposób chroniący je przed uszkodzeniem/słuczeniem (najlepiej specjalne plastikowe słoiki) i powinny posiadać szeroki wlot (**ryc. 3**)

Ryc. 3. Umieszczenie materiału o zbyt dużej objętości w naczyniu z małym wlotem skutkuje tym, co widać na rycinie – słuczenie słoja jest jedyną możliwością wyjęcia z niego materiału. Materiał tkankowy utrwalony w formalinie sztywnieje i pęcznieje, co sprawia, że materiał, który bez problemu włożono do słoja, nie może być z niego wyjęty. Problemem w tym przypadku jest to, że personel laboratorium jest narażony na skałeczenie w trakcie rozbijania słoja, jak i okrawania materiału.

O tym, że takie sytuacje nie zdarzają się rzadko, świadczy fakt, że w laboratorium posiadamy specjalny topór przeznaczony do rozbijania sło

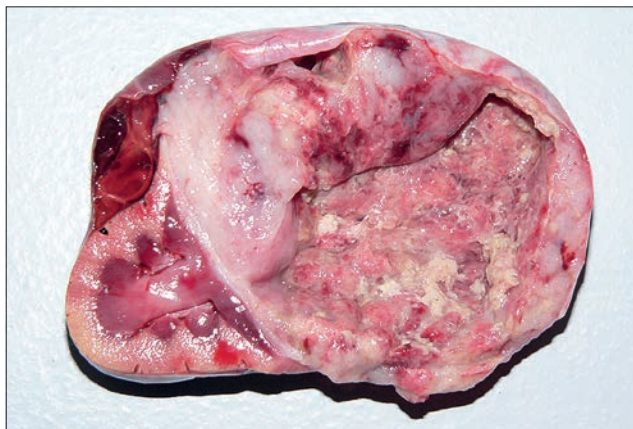


Ryc. 2. Ryciny wskazują niewłaściwy sposób „utrwalania” materiału histopatologicznego – utrwalacza jest zbyt mało (będzie to skutkowało autolizą tkanek), materiał został wciśnięty do naczynia (orientacja przestrzenna niemożliwa do określenia), szansa na uzyskania wiarygodnego wyniku w tym przypadku jest niewielka





Ryc. 4. Im mniejsza jest zmiana, tym rozpoznanie jest bardziej precyzyjne – po prawej stronie niewielka próbka, która zmieści się w kasetce histologicznej i może zostać zbadana w całości. Po stronie lewej większy guz, z którego do badania zostaną wybrane fragmenty – możliwe będzie jednak zbadanie stosunkowo dużego obszaru guza



Ryc. 5. Przekrój poprzeczny nerki z rozpadającym się guzem – w tym przypadku do badania pobiera się fragmenty guza wraz z przylegającym mięszem nerki, w rzeczywistości badaniu zostanie poddany jedynie niewielki obszar całego guza

brzmi: „Źle oznaczone lub nieoznaczone materiały będą odsyłane do placówki pobierającej materiał do badania na koszt tej placówki”, co jest podyktowane świadomością, jak duże znaczenie dla losów pacjenta mogą mieć wszelkie zaniechania lub błędy popełnione w trakcie procedury histopatologicznej.

Jedno z pierwszych zdań w publikacji, która ukazała się w „Veterinary Pathology” i zawierała wytyczne odnośnie do technicznych aspektów badania histopatologicznego w patologii chirurgicznej, brzmi: „Procedura uzyskania optymalnego wyniku badania histopatologicznego zapoczątkowana jest przez lekarza nadsyłającego materiał” (1).

Warunek podstawowy – przesyłamy próbki dobrej jakości

Zasady pobierania, zabezpieczania, utrwalania i przesyłania materiału do badań histopatologicznych są dostępne w innych publikacjach (2), dlatego w tabeli 1 podano tylko podstawowe informacje odnośnie do tego zagadnienia. W dalszej części opracowania omówiono zagadnienia, które mają istotne znaczenie dla uzyskania odpowiedzi, których oczekuje lekarz kierujący od wyniku badania histopatologicznego (które wymieniono powyżej).

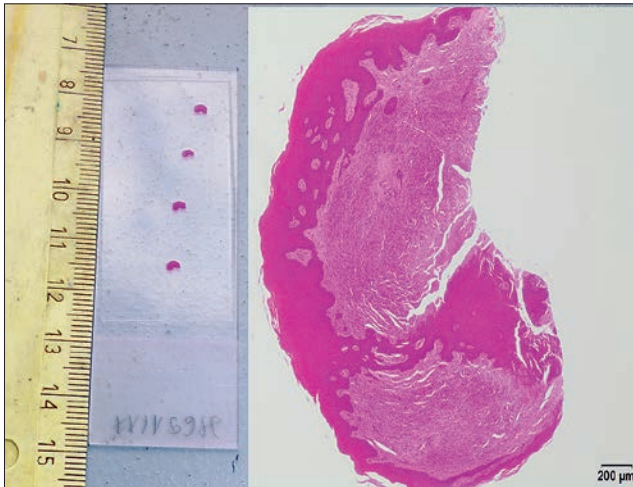
Określenie rozpoznania histopatologicznego i ocena stopnia złośliwości nowotworu

W przypadku niektórych nowotworów (kostniakomięsaki, mięsaki weneryczne u psów, raki przejściowonabłonkowe, czerniaki, raki prostaty) rozpoznanie histopatologiczne jest najważniejszym parametrem (ważniejszym niż doszczętność zabiegu chirurgicznego), który warunkuje

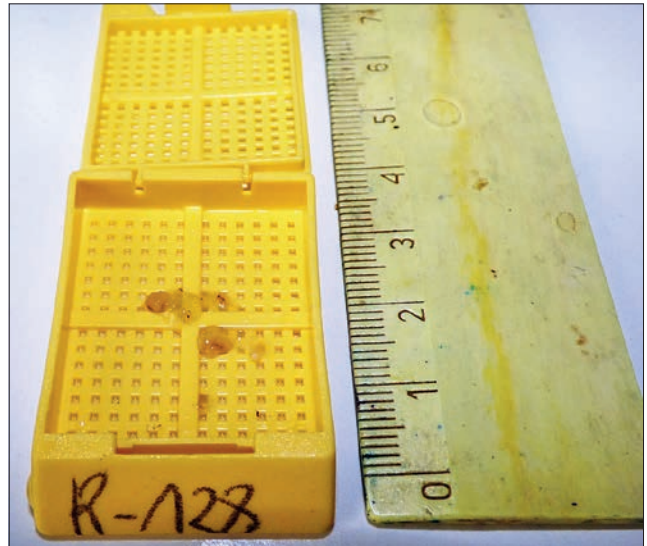
zachowanie biologiczne i pozwala z dużym prawdopodobieństwem ocenić tendencję do naciekania tkanek, wznowy czy dawania przerzutów (3). Zdecydowanie mniejsze znaczenie mają w takich przypadkach inne parametry mikroskopowe, takie jak czystość marginesów histologicznych, stopień złośliwości nowotworu, czy np. aktywność proliferacyjna komórek nowotworowych. Rozpoznanie histopatologiczne nowotworu obejmuje określenie, czy jest to zmiana niezłośliwa, czy złośliwa oraz jaki jest jej typ histogenetyczny – z której tkanki lub których komórek nowotwór się wywodzi. Określenie rozpoznania histopatologicznego oraz zidentyfikowanie wszystkich nieprawidłowości jakie mają miejsce w obrębie przesłanego materiału będą tym bardziej precyzyjne im większy fragment zmiany zostanie poddany zbadaniu, w praktyce im większy jest przesłany materiał (większy guz), tym odzwierciedlenie jego prawdziwej natury jest mniejsze (ryc. 4). Można wręcz powiedzieć, że jedynie dokładne zbadanie całej masy nowotworu i otaczających go tkanek pozwoli na precyzyjną odpowiedź na powyższe zagadnienia. Jeżeli wycinek zmieści się w całości w jednej lub dwóch kasetach histologicznych, to cały jego przekrój podłużny zostanie zbadany, jeżeli materiał jest większy, to do badania pobiera się jedynie wybrane fragmenty guza (ryc. 5). W przypadku zmian dużych określenie rozpoznania i stopnia złośliwości nowotworu zazwyczaj nie nastręcza trudności, patolog wybiera do badania kilka reprezentatywnych wycinków, w których zapewne znajdą się obszary zawierające aktywnie proliferujące, dobrze utrwalone komórki nowotworowe, a jeżeli nie (niekiedy w dużym guzie, np. naczyniakomięsaku śledziony u psa, 90% masy stanowią wylewy krwi lub martwica), to patolog pobierze z utrwalonego formaliną guza jego dodatkowe wycinki. Jeżeli guz jest duży, to można go

w całości umieścić w naczyniu z formaliną (w dalszym ciągu pamiętając o zasadzie, że stosunek utrwalacza do objętości tkanki winien wynosić co najmniej 10:1), jednak winien być on ponacinany, tak aby umożliwić formalinie penetrację do wszystkich obszarów guza lub resektowanej tkanki. Umieszczenie wycinka w zbyt małej objętości utrwalacza lub umieszczenie go w naczyniu bez nacinania będzie skutkowało postępującą autolizą tkanek w jego centralnych obszarach, co może uniemożliwić określenie rozpoznania. Jeżeli guz jest na tyle duży, że przesłanie go w całości będzie trudne z przyczyn technicznych (konieczność umieszczenia go w kilkulitrowym wiaderku), zasadne jest pobranie i przesłanie do laboratorium dobrze oznaczonych i opisanych reprezentatywnych wycinków samego guza, jak i marginesów wycinka, a pozostałą jego część można do czasu uzyskania rozpoznania przechowywać w lecznicy w pojemniku z utrwalaczem. Bardzo pomocne w takich przypadkach podczas oceny histopatologicznej w laboratorium będzie wykonanie dokumentacji fotograficznej, z zaznaczeniem miejsc, z których pobrano przesłany materiał.

W przypadku małych wycinków zmiany (biopsja tru-cut, biopaty pobrane w czasie endoskopii) z reguły możliwe jest określenie wstępnego rozpoznania histologicznego, które ukierunkuje lekarza prowadzącego co do dalszych działań diagnostycznych (ryc. 6). Niestety, ryzyko uzyskania wyniku niediagnostycznego w takich przypadkach jest duże i wynika ono z kilku możliwych przyczyn: materiał nie zawiera tkanki patologicznej, do badania pobrano niereprezentatywny fragment zmiany (jedynie obszar martwicy, wylewu krwi, obszar podścieliska nowotworu) lub też wycinek jest po prostu za mały (po umieszczeniu w utrwalaczu dodatkowo się obkurczy) i stanie się niewidoczny w bloczku parafinowym.



Ryc. 6. Kiedy do badania pobiera się wycinek zmiany, to badanie histopatologiczne daje ograniczony zakres informacji; takie parametry, jak doszczętność zabiegu chirurgicznego czy zajęcie naczyń chłonnych, nie mogą zostać określone. Z lewej strony szkiełko histologiczne z czterema skrawkami histologicznymi wycinka guza dziąsła, a po prawej jego obraz histologiczny, skala w prawym dolnym rogu wskazuje, że bada się naprawdę niewielki wycinek, jego powierzchnia to 8 mm²



Ryc. 7. Dobrym rozwiązaniem, które zapobiega zagubieniu lub uszkodzeniu małych wycinków tkankowych (biopaty tru-cut lub wycinki endoskopowe) wysyłanych do laboratorium, jest ich umieszczenie w kasetkach histologicznych i włożenie do naczynia z utrwalaczem (współpracujące z lekarzem laboratorium udostępni takie kasetki)

W związku z faktem, że takie wycinki zawierają w sobie tylko niewielki fragment całej zmiany, to nie nadają się one do oceny czystości marginesów histologicznych oraz stopnia histologicznej złośliwości, a niekiedy też oceny typu histologicznego (można rozpoznać mięsaka kości, ale już nie da się określić, czy jest to kostniakomięsak czy włókniakomięsak). Należy mieć świadomość, że w przypadku zbadania małego wycinka zmiany nowotworowej jednoznaczne opracowanie leczenia, a także określenie rokowania długookresowego w większości przypadków nie będzie możliwe. Należy dołożyć starań, żeby odpowiednio zabezpieczyć małe wycinki tkankowe, poprzez umieszczenie ich w małym naczyniu, kasetce histologicznej (ryc. 7) lub na skrawku papieru. Ważne jest też, aby w skierowaniu znalazła się informacja o ich liczbie (w przypadku zmętnienia utrwalacza część takich wycinków może nie zostać odnaleziona przez osobę przygotowującą preparaty).

Określenie **stopnia histologicznej złośliwości** nie jest możliwe we wszystkich typach zmian nowotworowych, bowiem nie przeprowadzono jak dotąd stosownych badań lub wyniki tych badań nie są jednoznaczne. Określenie stopnia złośliwości nie wymaga szczególnego przygotowania próbki przed wysłaniem, wytyczne są identyczne z tymi, które opisano powyżej. Określenie stopnia złośliwości opiera się na zidentyfikowaniu określonych cech mikroskopowych nowotworu, ustaleniu nasilenia tej cechy (zazwyczaj za pomocą liczby – „punktów”), a następnie po zliczeniu punktów z każdej badanej cechy ustaleniu stopnia złośliwości. Przykładowy system stopniowania histologicznego zaprezentowano w tabeli 2.

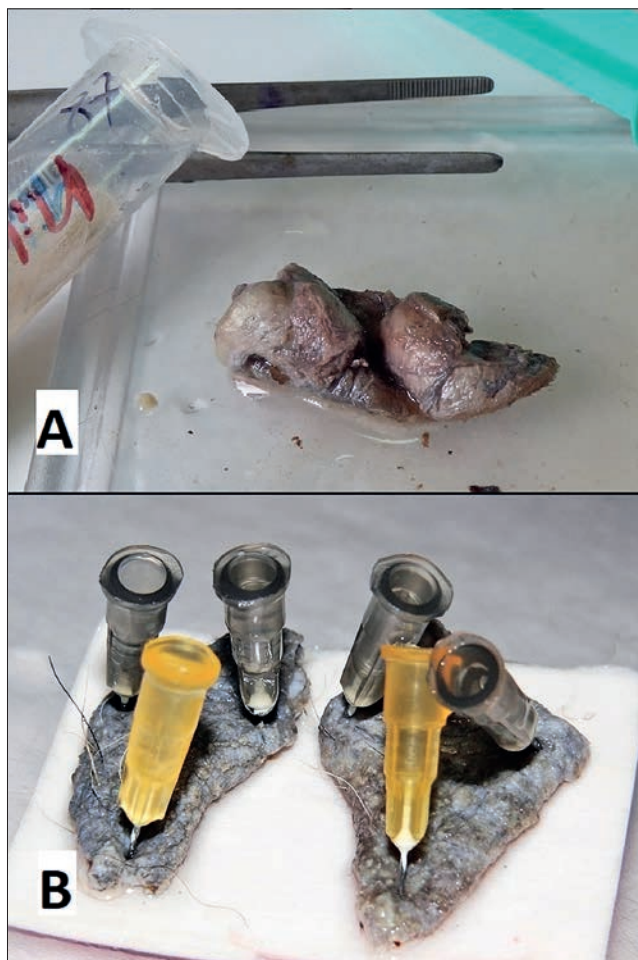
Tabela 2. Przykładowy system określania histologicznej złośliwości w przypadku mięsaków tkanek miękkich u psów zasugerowany w podręczniku onkologii histopatologicznej pod redakcją Donalda J. Meutena z 2017 r.

Stopień zróżnicowania komórek	
1 punkt	mięsak dobrze zróżnicowany
2 punkty	mięsak umiarkowanie zróżnicowany
3 punkty	mięsak niezróżnicowany
Sumaryczna liczba mitoz w 10 polach widzenia (HPF – 2,37mm ²)	
1 punkt	0–9 mitoz
2 punkty	10–19 mitoz
3 punkty	powyżej 19 mitoz
Obecność obszarów martwicy	
0 punktów	brak obszarów martwicy
1 punkt	martwica zajmuje do 50% powierzchni guza
2 punkty	martwica zajmuje powyżej 50% powierzchni guza
Suma punktów	Stopień złośliwości
≤3	1 stopień złośliwości histologicznej
4–5	2 stopień złośliwości histologicznej
≤6	3 stopień złośliwości histologicznej

Ocena czystości marginesu histologicznego

Rola lekarza kierującego materiał do badania histopatologicznego jest szczególnie istotna w przypadku przygotowywania materiału, który ma być badany pod kątem zachowania marginesów tkanek zdrowych, bowiem ocena doszczętności zabiegu chirurgicznego możliwa jest często jedynie w przypadku właściwego zabezpieczenia próbki (4, 5, 6). Należy pamiętać, że pojęcie „marginesów chirurgicznych”, czyli rzeczywistej odległości pomiędzy brzegiem usuniętej tkanki a granicą guza nowotworowego, nie jest tożsame z tym, co widzi patolog pod mikroskopem. Badanie histopatologiczne pozwala na ustalenie „marginesów histologicznych”, czyli najmniejszej odległości pomiędzy brzegiem

skrawka histologicznego i granicą nowotworu. Przyczyną tych różnic jest fakt, że tkanki usunięte z organizmu w trakcie zabiegu chirurgicznego ulegają natychmiastowemu obkurczeniu, co może pogłębiać się po umieszczeniu ich w utrwalaczu (3, 7, 8). Dodatkowo, po umieszczeniu wycinka w utrwalaczu często ulega on deformacji, co w znaczny sposób wpływa na możliwość orientacji przestrzennej wycinka i określenie, które z jego fragmentów należy zbadać pod kątem doszczętności wycinka (ryc. 8A). W badaniach przeprowadzonych na tkankach zwierzęcych potwierdzono, że w trakcie zabiegu chirurgicznego i utrwalania tkanek w formalinie i dalszej obróbki próbki ulegają obkurczeniu. Różnica pomiędzy marginesem chirurgicznym a marginesem histologicznym może być znaczna, „skrócenie” marginesu



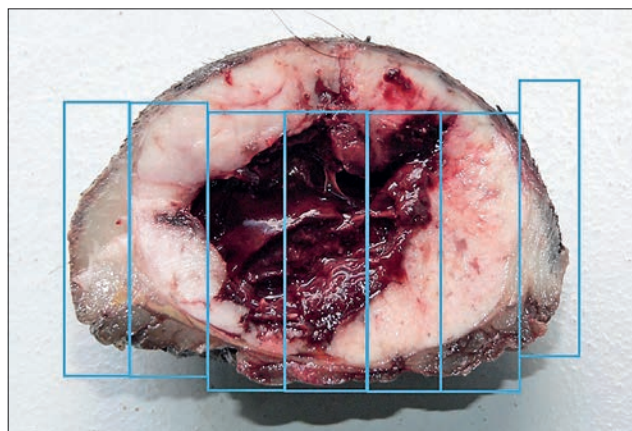
Ryc. 8. Sposób zabezpieczania materiału ma kluczowe znaczenie, gdy ma być oceniona doszczędność zabiegu chirurgicznego. Na rycinie A widoczny ściśnięty i skręcony wycinek skóry wraz z guzem – w tym przypadku nie ma możliwości zidentyfikowania brzegów chirurgicznych, dlatego też ocena czystości marginesów nie jest możliwa. Na rycinie B widoczne są dwa wycinki zmienionej skóry rozpięte na grubej teksturze – brzegi chirurgiczne są doskonale widoczne, a więc ocena marginesów histologicznych w tym przypadku nie będzie problemem

wynosi nawet do 30–50% pierwotnego wymiaru resektowanej tkanki; z reguły długość „zmniejsza się” o 20%, a szerokość „zmniejsza się” o 15% (3, 8). Zmniejszenie tej różnicy można uzyskać poprzez rozpinanie wycinka na twardym materiale – korek, tektura (**ryc. 8B**).

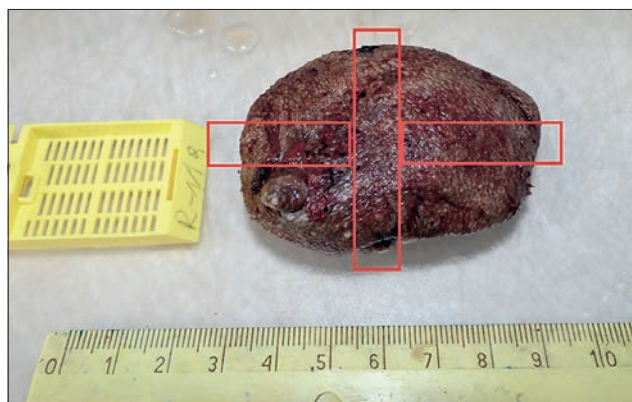
Ocena doszczędności zabiegu chirurgicznego pozwala z dużym prawdopodobieństwem określić rokowanie dla pacjentów onkologicznych, a w niektórych przypadkach ma większe znaczenia dla pacjenta niż samo rozpoznanie. Idealnie byłoby zbadać 100% powierzchni marginesu chirurgicznego, jednak jest to nierealne ze względów technicznych. Przykładowo, guzek skórny usunięty wraz z zapasem otaczającej go skóry, łącznie o wymiarach 35×25×10 mm, będzie można wstępnie podzielić na 7 „plastrów” o grubości 5 mm, z kolei każdy z owych siedmiu plasterów można pokroić na 1000 skrawków parafinowych o grubości 5 µm, czyli, żeby zbadać cały taki guz i ocenić wszystkie jego marginesy, należy

wykonać i zbadać 7000 preparatów histologicznych, o kosztach takiego badania nie wspominając (**ryc. 9**)! Dostępna jest technika histologiczno-chirurgiczna (histologia 3D, chirurgia mikrograficzna Mohsa), w trakcie której ocenia się czystość wszystkich marginesów chirurgicznych, wykonując badanie mikroskopowe w trakcie trwania zabiegu chirurgicznego (badanie śródoperacyjne). U ludzi stosuje się ją w przypadku złośliwych nowotworów skóry, najczęściej w rakach podstawonokomórkowych i wiąże się z wysokim kosztem (przykładowo, w jednej z klinik chirurgii onkologicznej dla ludzi w zależności od wielkości guza koszt procedury mieści się w granicach 2500–8000 zł). U zwierząt zbliżoną technikę histologiczną oceniano w mięsakach poiniekcyjnych u kotów, guzach z komórek tłuszczowych u psów, rakach płaskonabłonkowych u psów, kotów i koni (4, 6, 9).

W przypadku niewielkich zmian skórnych/podskórnych lub drobnych zmian w narządach teoretycznie możliwe jest



Ryc. 9. Rycina ułatwia zrozumienie, dlaczego rzeczywiste zbadanie całego guza nie jest możliwe. Widoczny przekrój podłużny guza usuniętego ze skóry i tkanki podskórnej (długość wycinka 35 mm, szerokość 25 mm), niebieskie prostokąty pokazują sposób krojenia guza na „plastery” (7 plasterów o grubości 5 mm każdy), z których każdy można pokroić na 1000 skrawków o grubości 5 µm każdy, co łącznie daje 7000 skrawków, czyli 7000 szkiełek histologicznych. Pamiętajmy, że to tylko połowa guza!



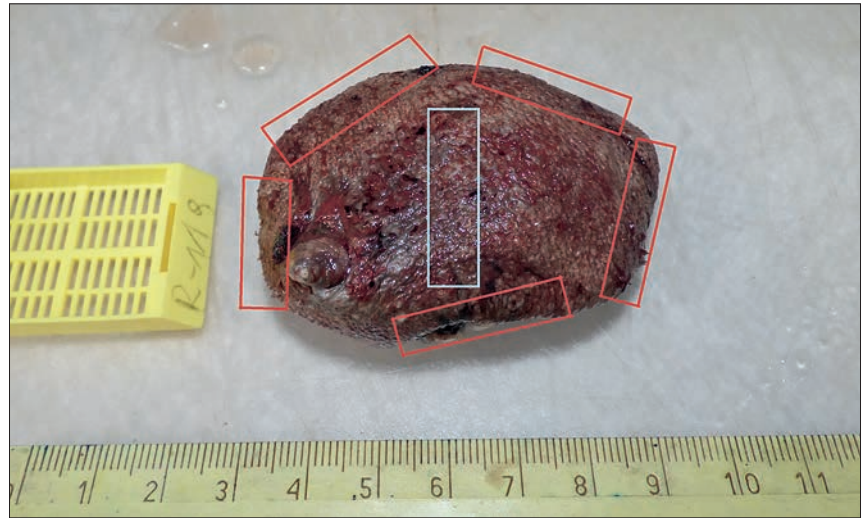
Ryc. 10. Na rycinie zademonstrowano praktyczne podejście do badania histopatologicznego. Z guza przedstawionego na rycinie w praktyce pobiera się 3 wycinki (schematycznie oznaczone czerwonymi prostokątami), jeden z osi poprzecznej guza i dwa wycinki z osi podłużnej

zbadać wszystkich marginesów, w medycynie weterynaryjnej oceny marginesów chirurgicznych dokonuje się głównie w przypadku guzów skóry i tkanki podskórnej (3). Trzeba mieć świadomość, że nawet niewielki guz wraz z otaczającą go tkanką można zbadać tylko częściowo, pobierając do oceny reprezentatywne próbki tkanek (zazwyczaj w takich przypadkach pobiera się 2–4 wycinki równoległe i prostopadłe do osi długiej wycinka; **ryc. 10**). Zwiększenie badanej powierzchni marginesu można uzyskać, stosując technikę, w której pobiera się wycinek równoległy do marginesu chirurgicznego, jednak w tym przypadku nie da się ocenić odległości komórek nowotworowych od marginesu chirurgicznego (w rzeczywistości można w ten sposób ocenić do 1–5% rzeczywistych marginesów – **ryc. 11**; 3).

W przypadku zmian większych możliwe jest zbadanie tylko wybranych („na ślepo”) fragmentów guza (w tym wybranych marginesów chirurgicznych), tych, które operator uzna za „podejrzone”, jednak

w takich przypadkach owe obszary muszą zostać oznaczone przez operatora za pomocą tuszu (bądź mniej preferowany sposób za pomocą igieł lub nitów chirurgicznych) z jednoczesnym opisem, co i w jaki sposób zostało oznaczone (np. jeden węzełek – margines doczaszkowy, dwa węzłki – marginesy doogonowy; tusz żółty – marginesy boczne, tusz zielony – margines dolny). Nie ma żadnych jednoznacznych zasad, jakie obowiązują przy wyborze, które fragmenty dużej próbki należy pobrać do badania marginesów histologicznych, dlatego w rzeczywistości nie muszą być one reprezentatywne dla całego wycinka. Im więcej pobranych wycinków, tym szansa na zbadanie wszystkich marginesów jest większa, jednak koszt badania histologicznego zwiększa się i może nie być akceptowany przez właściciela. Pominięcie procedury oznaczania marginesów chirurgicznych bywa przyczyną zafałszowania wyniku oceny marginesów histologicznych (3).

Dla uzyskania wiarygodnej oceny doszczętności zabiegu chirurgicznego zdecydowanie najbardziej korzystne jest oznaczenie wycinka za pomocą tuszu tuż po zabiegu (preferowany czas od 30 minut od resekcji), na nieutralnej tkance, przez operatora, który zmianę wycinał i jest najlepiej zorientowany odnośnie do jej umiejscowienia. Przed barwieniem materiał należy osuszyć z nadmiaru płynów (w tym formaliny), a następnie zastosować tusz wodoodporny, przeznaczony do tego celu i za pomocą gazika lub wacika zabarwić te obszary, które mają być zbadane. W dalszej kolejności należy umożliwić wyschnięcie tuszu (około 5–10 minut, zapobiegnie to wypłukaniu tuszu

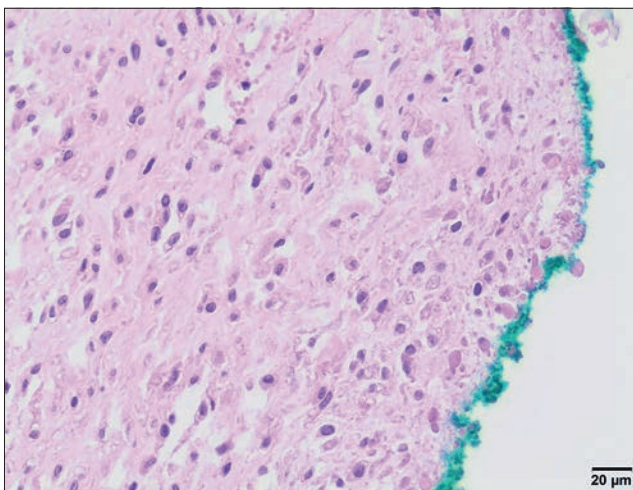


Ryc. 11. Na rycinie zademonstrowano sposób pobierania wycinków, który zwiększa szanse na wiarygodną ocenę doszczętności zabiegu chirurgicznego. Czerwone prostokąty wskazują sposób pobierania wycinków dla oceny czystości marginesów histologicznych, zaś niebieski prostokąt wskazuje na miejsce pobrania wycinka, który służy do określenia rozpoznania i typu histologicznego nowotworu. Należy pamiętać, że większa część objętości wycinka i tak nie zostanie zbadana, a koszt badania w takiej sytuacji będzie wyższy

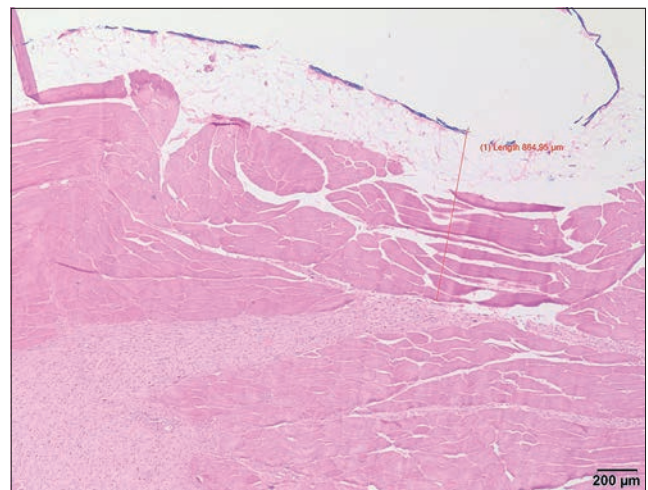
z tkanek przez formalinę) i umieścić wycinek w utrwalaczu. Jeżeli wycinek jest duży, to w pierwszej kolejności należy oznaczyć marginesy, umożliwić wyschnięcie tuszu, a następnie materiał pokroić na mniejsze fragmenty. Dużą zaletą oznaczania marginesów chirurgicznych tuszem jest fakt, że tusz jest doskonale widoczny w skrawku na szkiełku mikroskopowym (**ryc. 12 i 13**). W uzasadnionych przypadkach marginesy chirurgiczne można oddzielić od głównej masy guza i przesłać je w oddzielnym naczyniu (oznaczonym „marginesy chirurgiczne”), jednak wąskie paski tkanki często ulegają skręceniu i trudno jest uzyskać z nich dobrej jakości preparat histopatologiczny.

Ocena zajęcia naczyń krwionośnych i chłonnych oraz węzłów chłonnych

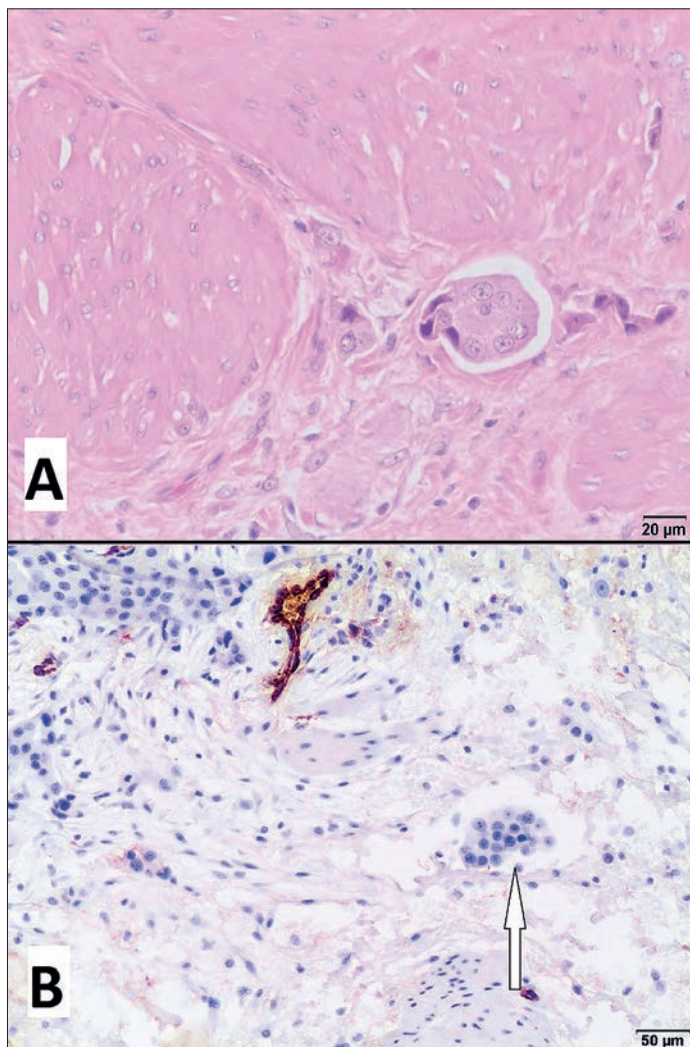
Uzyskanie informacji odnośnie do zajęcia naczyń krwionośnych i/lub chłonnych wymaga przesłania nie tylko wycinków samego guza, ale także tkanek otaczających guz, dlatego najczęściej nie jest to możliwe w przypadku, gdy do badania przekazano jedynie drobne jego fragmenty – biopsja wycinkowa, biopsja tru-cut (jeżeli jednak w małym wycinku widoczne jest zajęcie naczyń, możemy ten fakt odnieść do całego wycinka – stwierdzono zajęcie naczyń krwionośnych). Fakt zdeformowania wycinka także może wpływać na rezultat badania, gdyż w takich przypadkach może



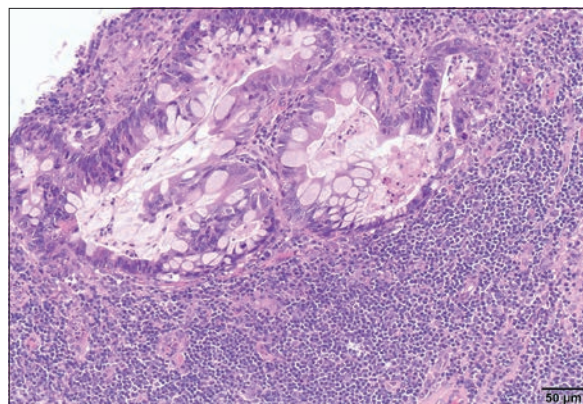
Ryc. 12. Obraz histopatologiczny marginesu histologicznego guza usuniętego z okolicy międzyłopatkowej od kota. W tym przypadku lekarz kierujący oznaczył brzegi chirurgiczne wycinka zielonym tuszem, co doskonale uwidacznia granicę i wskazuje na niedoszczętność resekcji chirurgicznej – komórki nowotworowe są widoczne na granicy wycinka. Barwienie hematoksylina-eoZYna, powiększenie 200×



Ryc. 13. Obraz histopatologiczny marginesu histologicznego guza usuniętego z okolicy międzyłopatkowej kota. W tym przypadku lekarz kierujący oznaczył brzegi chirurgiczne wycinka niebieskim tuszem, dolny margines wycinka jest doskonale widoczny (niebieska przerywana linia na górze ryciny), a zmierzony w programie komputerowym dystans pomiędzy marginesem chirurgicznym a komórkami nowotworowymi (czerwona linia) wynosi 865 µm. Barwienie hematoksylina-eoZYna, powiększenie 20×



Ryc. 14. Obraz mikroskopowy granicy pomiędzy rakiem przejściowo nabłonkowym pęcherza moczowego i warstwą mięśniową. Na rycinie A widoczny obszar mięśni gładkich poniżej guza, w centrum ryciny widoczne skupisko komórek nowotworowych w jamistej przestrzeni, która może być naczyniem krwionośnym; barwienie hematoksylina-eozyna, powiększenie 200×. Na rycinie B ten sam obszar guza w innym skrawku zabarwionym metodą immunohistochemiczną na obecność komórek śródbłonna (przeciwciała anty-czynnik VIII; reakcja dodatnia to ciemnobrązowa barwa – na górze ryciny widoczne ciemnobrązowe struktury, które są komórkami śródbłonna małego naczynia krwionośnego). Widać wyraźnie, że skupisko komórek nowotworowych (oznaczone strzałką) znajduje się w przestrzeni, która nie jest ograniczona komórkami śródbłonna, co świadczy, że komórki nowotworowe nie znajdują się ani w naczyniu krwionośnym, ani w naczyniu limfatycznym – wniosek: brak zajęcia naczyń krwionośnych przez komórki nowotworowe. Barwienie immunohistochemiczne, powiększenie 200×



Ryc. 15. Obraz histopatologiczny węzła chłonnego krezkowego od psa z gruczolakorakiem okrężnicy – widoczne komórki limfoidalne w węzle chłonnym oraz cewki komórek morfologicznie odpowiadające komórkom nabłonka okrężnicy – wniosek: zajęcie węzła chłonnego krezkowego przez gruczolakoraka okrężnicy. Barwienie hematoksylina-eozyna, powiększenie 100×

dochodzić do pęknięcia czy zgniatania tkanek, a tym samym identyfikacja naczyń krwionośnych może nie być możliwa. Niekiedy do jednoznacznego określenia, czy doszło do inwazji do naczyń, konieczne może być zastosowanie barwienia immunohistochemicznego z użyciem przeciwciał identyfikujących komórki śródbłonna naczyniowego (przeciwciała anty-czynnik VIII; **ryc. 14**), co z kolei może wykluczać te wycinki, które zbyt długo przetrzymywano w formalinie (utrwalanie tkanek w formalinie przez okres dłuższy niż 24 godziny może zmieniać właściwości antygenowe białek i zafałszowywać wyniki barwienia immunohistochemicznego). Niekorzystny wpływ na wyniki tego barwienia może mieć też niedostateczne utrwalenie tkanek oraz ich odwapnianie (odwapni się najczęściej nowotwory kości oraz złożone guzy gruczołu sutkowego; 10).

Ocena zajęcia regionalnych węzłów chłonnych dostarcza istotnych informacji o znaczeniu rokowniczym, pozwala też zaplanować odpowiednie leczenie uzupełniające do zabiegu chirurgicznego. W onkologii weterynaryjnej węzły chłonne bada się histologicznie w dwóch przypadkach, po pierwsze dla określenia lub sprecyzowania

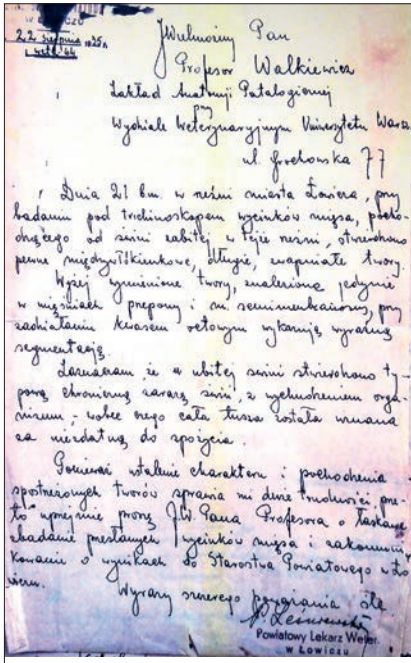
rozpoznania chłoniaka lub podtypu chłoniaka oraz w celu potwierdzenia albo wykluczenia przerzutów nowotworów nielimfoidalnych do węzłów chłonnych (**ryc. 15**). Do badania tego drugiego niezbędne może być pobranie całego podejrzanego węzła chłonnego (badanie wycinków lub biopsji tru-cut może nie być reprezentatywne, bowiem przerzuty mogą występować wielogniskowo lub ogniskowo bądź są niewielkie i łatwe do przeoczenia podczas pobierania próbki do badania) i wykonanie seryjnych skrawków z podłużnego przekroju węzła, co zwiększa szanse na wykrycie ewentualnych komórek nowotworowych w badanym wycinku, jednak nie daje absolutnej pewności w przypadku, gdy komórek nowotworowych w wybranych skrawkach się nie wykrywa. Niestety, w niektórych przypadkach do wykazania obecności nielicznych ognisk przerzutowych do węzłów chłonnych (mikroprzerzuty) niezbędne jest wykonanie bardzo licznych skrawków parafinowych zabarwionych metodą immunohistochemiczną (np. wykrywanie pancytokeratyny, która umożliwia wykrycie pojedynczych komórek nowotworowych w węzle chłonnym). W ostatnio opublikowanych badaniach

wykonanych na węzłach chłonnych pobranych od psów z różnymi rodzajami raków wykazano, że aż w 25% przypadków w węzłach, które w toku rutynowego badania histopatologicznego uznano za wolne od komórek nowotworowych, barwieniem immunohistochemicznym skrawków seryjnych, stwierdzono obecność mikroprzerzutów lub izolowanych, pojedynczych komórek nowotworowych (11).

Warto jeszcze dodać, że odnalezienie regionalnego węzła chłonnego, który został usunięty razem z resekowanym blokiem tkankowym (amputowana kończyna, wycięta cała listwa mleczna), może być trudne w materiale utrwalonym w formalinie (1), dlatego wskazane jest wyizolowanie takiego węzła zaraz po zabiegu chirurgicznym i umieszczenie go w oddzielnym naczyniu z formaliną lub oznaczenie lokalizacji węzła za pomocą nici chirurgicznej (o czym stosowna informacja winna się znaleźć w skierowaniu).

Warunek dodatkowy – skierowanie dobrej jakości

Precyzyjne wypełnienie skierowania (pisma przewodniego; **ryc. 16**) ma kluczowe



Ryc. 16. Przykład listu przewodniego z 1935 r. dołączanego do próbek przekazanych do badania histopatologicznego: „...Dnia 21 b.m. w rzeźni miasta Łowicza, przy badaniu pod trichinoskopem wycinków mięsa pochodzącego od świni zabitej w tejże rzeźni, stwierdzono pewne międzywłókienkowe, długie, zwapniałe twory. Wyżej wymienione twory znalezione jedynie w mięśniach przepony i *m. semimembranaceus*, przy zadziałaniu kwasem octowym wykazują wyraźną segmentację. Zaznaczam, że u ubitej świni stwierdzono typową chroniczną zarazę świń z wyraźnym wychudzeniem organizmu i wobec czego cała tusza została uznana za niezdatną do spożycia. Ponieważ ustalenie charakteru i pochodzenia spostrzeżonych tworów sprawia mi duże trudności, przeto uprzejmie proszę J.W. Pana Profesora o łaskawe zbadanie przesłanych wycinków mięsa i zakomunikowanie o wynikach do Starostwa Powiatowego w Łowiczu. Wyrazy szczerzego poważania śle...”. Z archiwum Zakładu Patomorfologii Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego w Warszawie

znaczenia dla zwiększenia przydatności praktycznej uzyskanego wyniku. **Analiza statystyczna wyników badań własnych obejmujących preparaty cytologiczne wykazała, że przydatność diagnostyczna wyniku była dodatnio skorelowana z ilością informacji zawartych w skierowaniu** (12). Bazując na podstawie własnych doświadczeń, można przyjąć, że podobnie jest w przypadku badania histopatologicznego. Dobrym przykładem jest tu dobrze zróżnicowany włókniamięsak szczęki u dużych psów. Nowotwór ten, pomimo swojej biologicznej złośliwości charakteryzuje się obrazem histologicznym typowym dla włókniaka, dlatego też brak informacji odnośnie do rasy/wielkości psa oraz lokalizacji guza w skierowaniu może skutkować pomyłką. Precyzyjne wypełnienie skierowania zaoszczędzi czas zarówno osobie przygotowującej preparat histologiczny, jak i samemu patologowi, który ocenia preparaty histologiczne. Dodatkowo, na podstawie informacji dostępnych w skierowaniu patolog może dokonać interpretacji obrazu mikroskopowego, który widzi, i z pewnością opatry

wynik stosownym komentarzem, przydatnym z punktu widzenia lekarza klinicyisty (warto korzystać z wiedzy, jaką posiada patolog), w przypadku braku informacji klinicznych taka interpretacja jest trudna i bywa ryzykowna (**ryc. 17**). W **tabe- li 3** zaprezentowano zestaw podstawowych informacji, które należy umieścić w skierowaniu załączonym do materiału kierowanego do badania histopatologicznego.

Piśmiennictwo

- Kamstock D.A.: Recommended guidelines for submission, trimming, margin evaluation, and reporting of tumor biopsy specimen in veterinary surgical pathology. *Vet. Pathol.* 2011, **48**, 19–31.
- Malicka E. i wsp.: *Materiały pomocnicze do ćwiczeń z histopatologii zwierząt*. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2002.
- Stromberg P.C., Meuten D.J.: Trimming tumors for diagnosis and prognosis. W: Meuten D.J.: *Tumors in Domestic Animals*, wyd. 5, Wiley Blackwell, Ames 2017, 27–43.
- Brenstein J.A., Hodgins E.C., Holloway H.W., Hedlund C.S., Storey E.S., Hubert J.D.: Mohs micrographic surgery: a technique for total margin assessment in veterinary cutaneous oncologic surgery. *Vet. Comp. Oncol.* 2006, **4**, 151–160.
- Scarpa F., Sabatini S., Marconato L., Capitani O., Morini M., Bettini G.: Use of histologic margin evaluation to predict recurrence of cutaneous malignant tumors in dogs and cats after surgical excision. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2012, **240**, 1181–1187.
- Brenstein J.A., Storey E.S., Bauer W.: Mohs's micrographic surgery for the management of a periocular mast cell tumor in a dog. *Vet. Ophthalmol.* 2013, **16**, 234–239.
- Upchurch D.A., Malenfant R.C., Wignall J.R., Ogdin D.M., Saile K.: Effects of sample site and size, skin tension lines, surgeon, and formalin fixation on shrinkage of skin samples excised from canine cadavers. *Am. J. Vet. Res.* 2014, **75**, 1004–1009.
- Risselada M., Mathews K.G., Griffith E.: Surgically planned versus histologically measured lateral tumor margins for resection of cutaneous and subcutaneous mast cell tumors in dogs: 46 cases (2010–2013). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2015, **247**, 184–189.
- Giudice C., Stefanello D., Sala M., Cantatore M., Russo F., Romussi S., Travetti O., Di Giancamillo M., Grieco V.: Feline injection-site sarcoma: recurrence, tumor grading and surgical margin status evaluated using the three-dimensional histological technique. *Vet. J.* 2010, **186**, 84–88.
- Ramos-Vara J.A., Borts L.B.: Immunohistochemistry: fundamentals and applications in oncology. W: Meuten D.J.: *Tumors in Domestic Animals*, wyd. 5, Wiley Blackwell, Ames 2017, 44–87.
- Casey K.M., Staffey M.A., Affolter V.K.: Identification of occult micrometastases and isolated tumour cell within regional lymph nodes of previously diagnosed non-metastatic (stage 0) canine carcinomas. *Vet. Comp. Oncol.* 2016, **15**, 785–792.
- Sapierzyński R., Czopowicz M., Ostrzeszewicz M.: Factors affecting the diagnostics utility of canine and feline cytological samples. *J. Small Anim. Pract.* 2016, doi:10.1111/jsap.12598.

Dodatkowe informacje	
Histopatologia	
Lokalizacja:
Rodzaj zmiany: guz odgraniczony guz naciekający /inne:
Kształt:
Konsystencja: twarda chlebnotłwa miękka ciastowata
Wielkość:
Tempo wzrostu:
Dotychczasowe leczenie:
Mikrobiologia	
Rozpoznanie/objawy:
Stosowane antybiotyki:
Inne PROSZĘ DO DR SAPIERZYŃSKIEGO	

Ryc. 17. Przykład współczesnego skierowania, który ukazuje, że niektórzy koledzy pokładają zbyt dużą wiarę w umiejętności zawodowe patologów. Zwraca uwagę brak jakichkolwiek informacji przydatnych w określeniu rozpoznania histopatologicznego i jego interpretacji

Tabela 3. Podstawowe informacje, które powinny się znaleźć w skierowaniu do badania histopatologicznego

- Miejsowość i data
- Lecznica zlecająca
- Dane właściciela
- Dane pacjenta (gatunek, wiek, płeć i status płciowy, rasa)
- Przedmiot badania (typ zmiany – zmiana płaska, owrzodzenie, guz, brodawka itp.; lokalizacja, wielkość, wygląd makroskopowy)
- Metoda pobrania próbki (biopsja wycinkowa, wycięciowa, trepanobiopsja, biopsja cienkoigłowa, preparat odciskowy itp.) oraz liczba wycinków w przypadku mniejszych próbek
- Objawy kliniczne potencjalnie związane ze zmianą (kulawizna, świąd, smoliste stolce, wymioty itp.)
- Historia medyczna pacjenta (wcześniejsze poważne choroby, w tym zmiany nowotworowe, w tym wykonywane iniekcje wraz z ich lokalizacją)
- Dotychczasowe leczenie (ograniczamy się do istotnych informacji)
- Wyniki badań dodatkowych (należy podać stwierdzone nieprawidłowości w wynikach badania krwi, badań obrazowych, wyniki testów serologicznych)
- Wyniki wcześniejszych badań obejmujących badaną zmianę (badanie cytologiczne, badania obrazowe zmiany, badania mikrobiologiczne)
- Rozpoznanie różnicowe lekarza zlecającego
- Pieczęć i podpis osoby zlecającej

Dr hab. Rafał Sapierzyński, prof. nadzw. SGGW;
e-mail: sapieh@wp.pl