

NOWOTWORY TKANEK MIĘKKICH

JANUSZ RYŚ

Zakład Patomorfologii Nowotworów, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Krakowie

1. Spis procedur diagnostycznych i chirurgicznych

- Biopsja cienkoigłowa (*fine needle aspiration*)
- Biopsja gruboigłowa
- Otwarta biopsja nacinająca (*intralesional resection*)
- Biopsja wycinająca (*marginal resection*)
- Szerokie wycięcie zmiany (*wide resection*)
- Radykalne wycięcie nowotworu (*radical resection*)

2. Biopsja aspiracyjna cienkoigłowa

Biopsja aspiracyjna cienkoigłowa nie jest metodą zalecaną rutynowo w diagnostyce pierwotnych nowotworów tkanek miękkich. Możliwości diagnostyczne na podstawie jedynie materiału cytologicznego, zwłaszcza w przypadku nowotworów niezłośliwych i mięsaków z grupy o niższym stopniu złośliwości, są ograniczone.

Wyjątek od wspomnianej zasady stanowi diagnostyka cytologiczna prowadzona w wyspecjalizowanych ośrodkach diagnostycznych, w których ocena mikroskopowa uzyskanych rozmazów jest uzupełniana badaniem cytogenetycznym lub molekularnym na obecność specyficznych aberracji chromosomowych.

W ośrodkach niedysponujących wspomnianymi technikami molekularnymi rola badań cytologicznych ogranicza się do weryfikacji wznów miejscowych i odległych przerzutów, a w przypadku guzów diagnozowanych pierwszorazowo – do wykluczenia zmian o charakterze przerzutowym (rak, czerniak, rozrost układu chłonnego).

3. Biopsja gruboigłowa (*oligobiopsy*) i biopsja nacinająca (*intralesional resection*)

Biopsja gruboigłowa uznawana jest za standardową procedurę diagnostyczną dla wszystkich guzów tkanek miękkich umiejscowionych pod powiezią powierzchowną bądź zlokalizowanych w obrębie tkanki podskórnej, których największa średnica przekracza 5 cm, a także w przypadku wszystkich nowotworów tkanek miękkich podejrzanych klinicznie o charakter złośliwy. W przypadku gdy materiał tkankowy uzyskany drogą biopsji gruboigłowej nie wystarcza do

ustalenia rozpoznania, dopuszczalne jest wykonanie otwartej biopsji nacinającej. W trakcie tego zabiegu chirurg świadomie usuwa jedynie część tkanki nowotworowej. Za tego typu procedurę uważany jest również zabieg polegający na chirurgicznym zmniejszeniu masy guza lub jego wyłęczkowaniu, a także zabieg, który z założenia miał mieć charakter „biopsji wycinającej”, ale badanie mikroskopowe preparatu operacyjnego wykazało, że linia cięcia operacyjnego przechodzi przez utkanie nowotworu.

3.1. Zalecenia dla klinicysty włącznie z zaleceniami postępowania z pobranym materiałem biopsyjnym

Zaleca się, aby materiał tkankowy uzyskany drogą oligobiopsji (mikrowycinki tkankowe) lub otwartej biopsji nacinającej został – bez utrwalenia i w warunkach sterylnych – niezwłocznie przekazany do pracowni histopatologicznej. Jeżeli nie ma możliwości, aby materiał trafił do pracowni w ciągu kilkunastu minut, należy umieścić go w 10-procentowym wodnym roztworze zbuforowanej formaliny na co najmniej 3–6 godzin. W przypadku otwartej biopsji nacinającej zaleca się dodatkowo odpowiednie oznakowanie materiału (np. za pomocą klipsów lub nici chirurgicznych) umożliwiające ocenę jego topografii. Niedopuszczalne jest fragmentowanie uzyskanego materiału oraz samowolne pobieranie wycinków do badań dodatkowych.

Na skierowaniu załączonym do materiału biopsyjnego klinicysta winien zamieścić – oprócz danych personalnych chorego lub chorej (imię i nazwisko oraz wiek) – podstawowe dane niezbędne do diagnostyki morfologicznej, tj.: miejsce pobrania wycinka, umiejscowienie zmiany w stosunku do powięzi powierzchownej, opis badań obrazowych oraz wyniki wcześniej wykonanych badań diagnostycznych. Wskazane jest również umieszczenie danych z wywiadu na temat kontaktu chorego lub chorej z uznanymi czynnikami o charakterze etiopatogenetycznym (napromienianie, uraz, przewlekły obrzęk limfatyczny kończyn, infekcje wirusami HHV8 lub wirusem zapalenia wątroby typu B, uznane karcynogeny chemiczne: polichlorek winylu, azbest).

3.2. Ocena makroskopowa materiału tkankowego

Jeżeli do badania otrzymano bardzo drobne mikrowycinki, materiał tkankowy winien być w całości zabezpieczony do badania mikroskopowego, tj. niezwłocznie utrwalony w 10-procentowym wodnym roztworze zbuforowanej formaliny co najmniej na 3–6 godzin. W przypadku dysponowania mikrowycinkami o większych rozmiarach można je przekroić podłużnie i jeden z przekrojów utrwalić w całości w 10-procentowym wodnym roztworze zbuforowanej formaliny, a z drugiego pobrać wycinki do badań dodatkowych (sposób zabezpieczania materiału do badań dodatkowych opisano w punkcie 4.2).

Postępowanie z materiałem tkankowym z otwartej biopsji nacinającej jest analogiczne jak w przypadku biopsji wycinającej (patrz punkty 4.1 i 4.2).

3.3. Zatapianie materiału w bloczkach parafinowych i skrawanie bloczków

Mikrowycinki należy umieścić w kasetkach równolegle względem siebie w liczbie nie większej niż 2–3 mikrowycinki na jedną kasetkę. Zatopione w bloczkach parafinowych skrawane są następnie standardowo na skrawki o grubości 4 μm .

3.4. Rutynowe barwienie skrawków parafinowych

Skrawki parafinowe z zatopionymi mikrowycinkami są barwione rutynowo hematoksyliną i eozyną.

3.5. Zalecane badania dodatkowe (histochemiczne, immunohistochemiczne i molekularne) (patrz punkty 4.6 i 4.7)

4. Zasady opracowania materiału operacyjnego w przypadku biopsji wycinającej (*marginal resection*)

Pojęcie biopsji wycinającej oznacza usunięcie guza wraz z rzekomą torebką i niewielkim marginesem makroskopowo niezmiennych tkanek w jego otoczeniu. Radykalny charakter zabiegu chirurgicznego musi być potwierdzony badaniem mikroskopowym. Jeżeli badanie mikroskopowe ujawni obecność tkanki nowotworowej w brzegu preparatu, wówczas tego typu zabieg chirurgiczny traktowany jest na równi z biopsją nacinającą.

4.1. Zalecenia dla klinicysty włącznie z zaleceniami postępowania z pobranym materiałem operacyjnym (*surgical specimen*)

Optymalnym rozwiązaniem jest niezwłoczne przekazanie całego materiału tkankowego – w warunkach sterylnych i bez utrwalenia – do pracowni lub zakładu histopatologii. W przypadku biopsji wycinającej chirurg winien zwrócić szczególną uwagę na precyzyjne oznaczenie biegunów preparatu operacyjnego za pomocą klipsów lub nici chirurgicznych. Konieczne jest oznaczenie odpowiednio biegunów od strony skóry (zwłaszcza gdy materiał operacyjny nie obejmuje fragmentu skóry ponad guzem), marginesu głębokiego, strony przyśrodkowej i bocznej. Dodatkowo wskazane jest oznaczenie nićmi chirurgicznymi naczyń krwionośnych i nerwów, których zajęcie ma szczególne znaczenie z klinicznego punktu widzenia.

W sytuacji, gdy nie ma możliwości, aby materiał trafił do pracowni w ciągu kilkunastu minut, należy umieścić go w 10-procentowym wodnym roztworze zbuforowanej formaliny na co najmniej 10–12 godzin.

Na skierowaniu załączonym do materiału biopsyjnego klinicysta winien zamieścić komplet danych klinicznych opisanych w punkcie 3.1.

4.2. Wstępne pobieranie wycinków do badań dodatkowych z materiału operacyjnego dostarczonego bez utrwalenia (w warunkach sterylnych)

Preparat tkankowy dostarczony do pracowni lub zakładu patomorfologii w warunkach sterylnych musi być (przynajmniej do momentu pobrania wycinków do badania cytogenetycznego) opracowywany z zachowaniem wszystkich zasad aseptyki (przy użyciu sterylnych narzędzi). Sekcjonowanie nieutrwalonego materiału tkankowego ogranicza się do wykonania pojedynczego przekroju tkanek prawidłowych i obwodowej części guza od strony najszerszego marginesu chirurgicznego. Z obwodowej części guza, z miejsc, w których stwierdza się lity naciek bez widocznych ognisk rozmiękania i wylewów krwawych, należy w pierwszej kolejności pobrać wycinki do badania cytogenetycznego i umieścić je w sterylnym pojemniku wypełnionym roztworem Hanksa z dodatkiem antybiotyków*. W drugiej kolejności pobiera się wycinki do badań molekularnych oraz do badań

*W 100 ml płynu Hanksa należy rozpuścić: 10 000 jednostek penicyliny i 10 mg streptomycyny. Przygotowany płyn transportowy (100 ml) najlepiej rozdzielić do jałowych pojemników, na porcje do jednorazowego użycia. Zachować bezwzględnie warunki sterylne. Przechowywać w lodówce w temperaturze 4°C. Przed użyciem pojemnik z płynem transportowym należy ogrzać do temperatury 37°C.

w mikroskopie elektronowym. Wycinki z tkanki nowotworowej przeznaczone do badań molekularnych należy podzielić na małe fragmenty o średnicy do 0,2 cm i zamrozić, najlepiej w ciekłym azocie, a następnie przechowywać w temperaturze -70°C . Innym sposobem zabezpieczania materiału tkankowego do badań molekularnych jest ich umieszczenie w medium o nazwie RNAlater™ (nie wymaga zamrażania). Wycinki do badań ultrastruktury są utrwalane w roztworze Forsmana.

Po pobraniu wycinków do badań dodatkowych cały obwód preparatu operacyjnego należy oznaczyć tuszem (dobrze jest oznaczyć każdy z biegunów preparatu tuszem o odmiennym kolorze), a następnie umieścić w pojemniku z 10-procentowym wodnym roztworem formaliny w ilości dziesięciokrotnie większej od objętości otrzymanego preparatu na 10–12 godzin.

4.3. Makroskopowa ocena preparatu operacyjnego (*surgical specimen*)

Makroskopową ocenę utrwalonego w formalinie preparatu operacyjnego rozpoczyna się od określenia jego wymiaru w trzech płaszczyznach oraz od oznaczenia tuszem (bądź wielokolorowymi tuszami) marginesów chirurgicznych (jeżeli nie zostały one wcześniej oznaczone w trakcie „zabezpieczania” materiału nieutralowanego). Następnie sekcjonuje się preparat tak, by uzyskać jego równoległe przekroje prostopadłe do najwęższego marginesu chirurgicznego. Cięcia prowadzi się w odstępach co 5 mm. Na każdym z wykonanych przekrojów ocenia się wymiary guza oraz szerokość marginesu zmienionych tkanek w jego otoczeniu. Zalecane jest zaznaczenie w opisie, jakie struktury anatomiczne znajdują się w brzegu preparatu (np. powięź, mięsień szkieletowy, okostna). Opisując makroskopowo charakter guza nowotworowego, należy się skoncentrować na jego:

- typie wzrostu (rozprężający, gdy guz jest ostro odgraniczony od otoczenia lub naciekający) oraz obecności ognisk satelitarnych;
- konsystencji (lity, lito-torbielowaty, torbielowaty);
- wejrzeniu (włóknisty, tłuszczowy, myksoidny/śluzowaty, o konsystencji mięsa);
- obecności ognisk martwicy (różnicować je z polami śluzowatymi/myksoidnymi), wylewów krwawych i zwapnień. Należy ocenić procent powierzchni guza zmienionej martwiczo;
- stosunku guza do ważnych struktur tkankowych, takich jak nerwy, duże naczynia krwionośne, powięź, mięśnie oraz okostna lub kość (jeżeli obecne są w preparacie).

W miarę możliwości należy sporządzić dokumentację fotograficzną lub cyfrową makroskopowego obrazu guza i tkanek w jego otoczeniu.

4.4. Pobieranie wycinków do badania histologicznego

W pierwszej kolejności pobierane są wycinki z najwęższego marginesu chirurgicznego, a następnie z pozostałych biegunów guza wraz z otaczającymi je tkankami prawidłowymi. Przy założeniu, że kształt chirurgicznego preparatu („specymenu”) przypomina sześciąt, wycinki muszą być pobrane z wszystkich sześciu marginesów chirurgicznych. Dopuszczalne jest niepobieranie wycinków z marginesów chirurgicznych oddalonych od brzegu guza o co najmniej 5 cm (wyjątek w tym względzie stanowią mięsaki nabłonkowe – *epithelioid sarcoma*, i naczyniopochodne – *angiosarcoma*, których wzrost charakteryzuje się obecnością subklinicznych guzków satelitarnych umiejscowionych proksymalnie w stosunku do guza pierwotnego).

Guzy o średnicy do 2–4 cm winny być pobierane w całości do badania mikroskopowego. W przypadku większych guzów zalecane jest pobranie 1 wycinka tkankowego na każdy centymetr największej średnicy guza, aczkolwiek w przypadku guzów o bardzo dużych rozmiarach dopuszczalne jest pobieranie mniejszej liczby wycinków, zwłaszcza gdy makroskopowo guz ma homogenne wejrzenie. Guzy o wysokim stopniu złośliwości (*high grade*), ustalonym na podstawie wcześniejszego badania, nie wymagają pobierania takiej liczby wycinków jak guzy o niskim stopniu złośliwości. Należy pobierać wycinki z miejsc o różnorodnym obrazie makroskopowym; nie ma natomiast potrzeby pobierania więcej niż 1 wycinka z obszarów zmienionych martwiczo (materiał należy pobierać z pogranicza martwicy i przetrwałego guza).

W większości guzów do badania wystarczy pobranie do 12 wycinków, nie licząc wycinków z marginesów chirurgicznych. W przypadku guzów o wyraźnie heterogennej budowie wskazane jest zabezpieczenie większej ilości materiału do badania histologicznego.

Średnia minimalna liczba wycinków, którą patolog jest **obowiązany** pobrać z preparatu operacyjnego, to 12, nie licząc wycinków pobranych z marginesów chirurgicznych.

4.5. Zatapiać materiału w bloczkach parafinowych i skrawanie bloczków

Pobrane wycinki należy umieścić w plastikowych kasetkach, a następnie przeprowadzić rutynowo w procesorze tkankowym do etapu przepojenia parafiną. Wycinki zatopione w bloczkach parafinowych skrawane są następnie standardowo na skrawki o grubości $4\ \mu\text{m}$.

4.6. Rutynowe barwienie skrawków parafinowych

Skrawki parafinowe z zatopionymi mikrowycinkami są barwione rutynowo hematoksyliną i eozyną.

Wybrane skrawki należy zabarwić dodatkowo metodą PAS oraz trichromem wg Massona, a także wybarwić na obecność włókien srebrochłonnych.

4.7. Zalecane badania dodatkowe (immunohistochemiczne i molekularne)

Zdecydowana większość badań immunohistochemicznych na potrzeby diagnostyki nowotworów tkanek miękkich wykonywana jest na rutynowo przygotowanym materiale tkankowym utrwalonym w formalinie i zatopionym w bloczkach parafinowych. Materiał ten jest skrawany na skrawki o grubości 4 μm i umieszczany na szkiełkach podstawowych powlekanych materiałem zwiększającym adhezję (szkiełko super-frost+). Przed rozpoczęciem badania immunohistochemicznego materiał na wspomnianych szkiełkach podstawowych jest zgrzewany w temperaturze ok. 60°C.

Zalecana podstawowa lista odczynów immunohistochemicznych obejmuje barwienie skrawków na obecność: cytokeratyn (AE1/AE3), EMA, białka S100, aktyny gładkomięśniowej (SMA), desminy, miogeniny, antygenów CD31, CD34 i CD117 oraz antygeny proliferacyjnego Ki67.

Inne odczyny pomocne w diagnostyce (wykonywane w drugiej kolejności) to reakcje na obecność kaldesmonu, β -kateniny oraz antygenów: HMB45, ALK-1, MDM2, CDK4, INI-1.

Listę badań cytogenetycznych i molekularnych na potrzeby diagnostyki mięsaków czytelnik znajdzie w innych opracowaniach poświęconych patomorfologii nowotworów tkanek miękkich. Należy pamiętać, że wybrane badania molekularne (przede wszystkim techniką FISH, ale także PCR) można wykonać z materiału utrwalonego w formalinie i zatopionego w blokach parafinowych. Warunkiem uzyskania wartościowego materiału genetycznego (DNA/RNA) jest odpowiednie buforowanie wodnego roztworu formaliny.

5. Zasady opracowania materiału operacyjnego w przypadku odjęcia kończyny lub jej fragmentu

Zalecenia postępowania z materiałem operacyjnym są analogiczne jak w punkcie 4. Wyjątek stanowią:

- pobieranie wycinków z marginesu chirurgicznego preparatu (obejmuje jedynie wycinki z proksymalnego marginesu preparatu operacyjnego); obowiązuje pobranie pełnego przekroju marginesu tkanek miękkich oraz pobranie wycinków z marginesu kości i szpiku;

- ocena stosunku guza do okostnej i kości i pobranie wycinków z tkanki kostnej w rzucie guza;
- sekcjonowanie tkanki tłuszczowej (w szczególności w miejscach spływu tkanki limfatycznej) na obecność przerzutowo zmienionych węzłów chłonnych.

6. Ocena węzłów chłonnych

Z wyjątkiem mięsaka nabłonkowego, mięsaka jasnokomórkowego tkanek miękkich oraz pęcherzykowej odmiany *rhabdomyosarcoma*, przerzuty do węzłów chłonnych u chorych na mięsaki tkanek miękkich obserwowane są rzadko. Niemniej jednak stwierdzenie przerzutowo zmienionych węzłów chłonnych w każdym z wyżej wymienionych materiałów operacyjnych winno być odnotowane w raporcie ze względu na jego prognostyczne znaczenie. Każdy znaleziony węzeł chłonny winien być pobrany do badania mikroskopowego.

7. Ocena odpowiedzi na leczenie chemiczne i leczenie napromienianiem

Dotychczas nie wypracowano jednolitego systemu oceny efektów przedoperacyjnego neoadiuwantowego leczenia chemicznego oraz leczenia napromienianiem u chorych na mięsaki tkanek miękkich. Odpowiedź na leczenie jest najczęściej wyrażona odsetkiem powierzchni przetrwałego utkania nowotworu. Celem jej oceny należy pobrać do badania wycinki z przekroju poprzecznego obejmującego najdłuższą oś guza, unikając ognisk rozmiękania; wymagane jest pobranie do badania histologicznego przynajmniej 1 wycinka z pogranicza martwicy i przetrwałej tkanki nowotworowej. Badanie mikroskopowe tego wycinka pozwala na potwierdzenie, że opisane obszary guza zostały trafnie uznane za zmienione martwiczo. Obraz makroskopowy guza może być mylący; czasami obszary guza uznane makroskopowo za zmienione martwiczo, faktycznie w badaniu mikroskopowym okazują się fragmentami guza z cechami śluzowatego zwyrodnienia lub obrzęku podścieliska.

Piśmiennictwo

1. Lester SC. Manual of Surgical Pathology. 2nd ed. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia 2006; 553-563.
2. Edge SB, Byrd DR, Carducci MA, et al. (eds.). AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. Springer, New York 2009; 291-298.
3. Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 10th ed. Mosby Elsevier, St Louis 2011; 2627.