

Badanie histopatologiczne w onkologii weterynaryjnej. Część III. Guzy z komórek tucznych u psów

Rafał Sapieryński

z Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

W poprzednim artykule z tego cyklu omówiono strukturę wyniku histopatologicznego i zaprezentowano możliwość, ci jakie daje badanie mikroskopowe wycinków tkanek zmian patologicznych pobranych lub usuniętych od pacjentów z nowotworem. W tym artykule zostaną zaprezentowane korzyści płynące z określenia stopnia złośliwości histologicznej na przykładzie guzów z komórek tucznych u psów.

Stopień złośliwości nowotworu (*histologic grading*) jest określony dzięki badaniu mikroskopowemu tkanek guza sposobem klasyfikowania danego typu rozrostu złośliwego, co pozwala z dużym prawdopodobieństwem na przewidywanie jego zachowania biologicznego (właściwości kliniczne nowotworu), decydującego o przebiegu choroby nowotworowej, w tym zdolności do naciekania tkanek, tendencji do wznowy, ryzyka dawania przerzutów. Na podstawie oceny stopnia złośliwości histologicznej można dokonać wyboru optymalnej metody leczenia. Systemy oceny stopnia złośliwości ustala się oddzielnie dla każdego typu nowotworu, niekiedy różne dla różnych podtypów tego samego nowotworu (nie istnieje jednolity system złośliwości, który można zastosować do celów prognostycznych dla kilku lub wielu nowotworów jednocześnie). Stopień histologicznej

złośliwości ustala się na podstawie cech histologiczno-morfologicznych, niekiedy różnych w przypadku różnych nowotworów, i w onkologii weterynaryjnej określony został w przypadku niektórych typów nowotworów – nie we wszystkich (choć lepiej powiedzieć, że dla większości nowotworów nie opracowano jak dotąd takiego systemu, który miałby przydatność praktyczną). Ustalenie stopnia złośliwości histologicznej odbywa się poprzez zestawienie pojedynczych lub różnych cech histopatologicznych z zachowaniem biologicznym określonym w toku wielomiesięcznej/wieloletniej obserwacji pacjenta po zastosowanym leczeniu. Klasyfikacja opiera się na ocenie mikroskopowej preparatów barwionych metodą przeglądową (hematoksylina-eozyna), także barwienia immunohistochemicznego, badaniu takich parametrów, jak: architektonika tkankowa (np. stopień tworzenia cewek), głębokość nacieku (np. naciekanie tkanki podskórnej), obecność atypii komórkowej (stopień zróżnicowania komórek, atypia jąder komórkowych), aktywność mitotyczna komórek (różne systemy oceny liczby figur mitotycznych), obecność półmartwicy czy naciekanie naczyń krwionośnych. W najprostszych systemach stosuje się jedno kryterium histopatologiczne, np. nasilenie aktywności proliferacyjnej

Histopathology in veterinary oncology. Part III. Mast cell tumors in dogs

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

This paper aims at the presentation of mast cell tumor (MCT), a benign, local mast cells aggregation forming a nodule, that occurs in the skin of many species, but most often in dogs. This tumor may become malignant and is one of the most common dermal and subdermal neoplastic tumors recognized in canine patients. In MCTs, the histologic grade is extremely important in planning the treatment approach, so in each case the histopathology report should include histologic sub-classification of this tumor. At least two systems are routinely used in MCTs; a three-tier histologic system (Patnaik) and a two-tier histologic grading (Kiupel) system. Various histologic criteria are considered during microscopic examination, including mitotic activity, differentiation of neoplastic cells, karyomegaly and presence of multinucleated giant cells. Both systems have the prognostic value since a strong correlation has been established between the grade with overall survival, the MCT-associated mortality and the risk of metastasis. Also other clinical, epidemiological, molecular and immunohistochemical parameters of MCTs should be considered together with its histologic grade.

Keywords: dog, histopathology, histologic grade, mast cell tumor, prognosis.

ocenione na podstawie liczby mitoz (np. skala „cut off 5” dla guzów komórek tucznych u psów; **tabela 1** i **tabela 1A**). Zazwyczaj jednak systemy klasyfikacji stosowane przy ustalaniu stopnia złośliwości wymagają oceny kilku parametrów jednocześnie (np. skala dwustopniowa

Tabela 1. Skala „cut off 5” dla oceny stopnia złośliwości guzów z komórek tucznych u psów (1)

Liczba mitoz w 10 polach widzenia przy dużym powiększeniu	Mediana okresu przeżycia	Liczba psów w danej grupie
MC≤5	70 miesięcy	80
MC>5	2 miesiące	19

Tabela 1A. Skala „cut off 5” dla oceny zachowania biologicznego guzów z komórek tucznych u psów (2)

Liczba mitoz w 10 polach widzenia przy dużym powiększeniu	Mediana okresu przeżycia	3-letnie okresy przeżycia
MC≤5	Nieosiągnięta w okresie obserwacji	90% psów
MC>5	145 dni	25% psów

w przypadku guzów z komórek tucznych u psów; **tabela 2**).

Znaczenie kliniczne oceny stopnia histologicznej złośliwości guzów z komórek tucznych u psów (mastocytom)

Jednym z nowotworów u zwierząt, w przypadku którego stopień histologicznej złośliwości ma szczególne znaczenie, jest guz z komórek tucznych u psów (mast cell tumor – MCT), stopniowanie histologiczne w tym przypadku pozwala z 90–95% dokładnością przewidzieć zachowanie biologiczne nowotworu. Zdecydowana większość mastocytom u psów to guzy o niskiej złośliwości, które po resekcji chirurgicznej nie dają wznowy ani przerzutów. W pierwszej kolejności należy odróżniać **mastocytomy skóry** (naciek nowotworu w obrębie skóry właściwej z możliwym zajęciem tkanki podskórnej; *cutaneous mast cell tumor*) oraz **mastocytomy tkanki podskórnej** (naciek nowotworowy w tkance podskórnej bez zajęcia skóry właściwej; *subcutaneous mast cell tumor*; **ryc. 3**). W drugiej kolejności należy dokonać oceny stopnia histologicznej złośliwości, najlepiej w oparciu o badanie histopatologiczne całego guza usuniętego w trakcie zabiegu resekcji. Obecnie w użyciu są dwa systemy klasyfikacji histologicznej złośliwości MCT skóry u psów: system klasyfikacji trójstopniowej opracowany w roku 1986 przez Patnaika i wsp. (4) oraz system klasyfikacji dwustopniowej z roku 2011 opracowany przez zespół patologów pod przewodnictwem

Matti Kiupela (**tab. 2**; 3). Do tej pory brak jest jednak jednoznaczności odnośnie do tego, który z owych systemów jest bardziej przydatny, pomimo przeprowadzonych kilku badań porównawczych (5, 6). Przewagą klasyfikacji dwustopniowej są bardziej ściśle kryteria histologiczne, co sprawia, że zgodność co do oceny poszczególnych stopni wykonanej przez różnych patologów jest wysoka – wynosi bowiem 96,8% (3). Co istotne, ostatnio opublikowane badania wykazały, że z bardzo dużym prawdopodobieństwem można określić stopień złośliwości mastocytomy w trakcie badania przedoperacyjnego małych wycinków pobranych różnymi metodami (biopsja wycinkowa-klinowa, biopsja gruboigłowa i trepanobiopsja; 7). Zgodność badania przedoperacyjnego z badaniem pooperacyjnym dla określenia stopnia złośliwości mastocytomy w skali dwu- i trójstopniowej wynosi, odpowiednio, 92 i 96%. Przy zastosowaniu klasyfikacji dwustopniowej pełną zgodność uzyskano, gdy materiał pobierano za pomocą biopsji gruboigłowej, a mniejszą, gdy materiał pobierano metodą klinową i trepanobiopsji (90% i 95%). Przy zastosowaniu klasyfikacji trójstopniowej pełną zgodność uzyskano, gdy materiał pobierano za pomocą biopsji gruboigłowej i trepanobiopsji, z kolei przy biopsji klinowej zgodność wyniosła 92%. Według autorów tej pracy badanie histologiczne niewielkich wycinków guza jest dobrą metodą przedoperacyjnej diagnostyki w przypadku mastocytom u psów i to bez względu na to, jakiej techniki biopsji się używa (7).

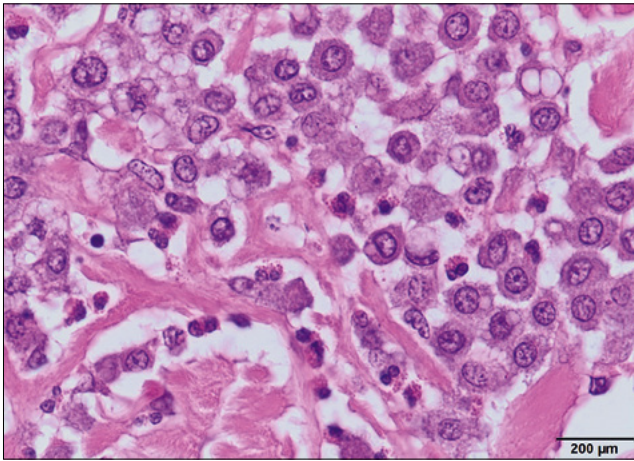
Jest to o tyle istotne, że pozwala zaplanować precyzyjny plan terapeutyczny, szczególnie określić rozległość zabiegu operacyjnego i konieczność wdrożenia dodatkowych metod leczenia, a także przedstawić opiekunowi psa przewidywane wyniki proponowanego leczenia.

Zarówno klasyfikacja dwu-, jak i trójstopniowa mają pewne ograniczenia, bowiem niektóre z użytych kryteriów nie są obiektywne, co prowadzi do pewnych rozbieżności w interpretacji stopnia złośliwości tego samego guza z komórek tucznych przez różnych patologów. W klasyfikacji trójstopniowej (Patnaik) szczególnie problematyczne są mastocytomy II stopnia złośliwości (najpowszechniejszy stopień histologicznej złośliwości mastocytom u psów), w których trudno jest odróżnić guzy o niskiej (około 75% MCT II stopnia) i o wysokiej (około 25% MCT II stopnia) agresywności biologicznej (pomimo że należą do tego samego stopnia złośliwości), co sprawia, że przewidywanie ich zachowania biologicznego jest niezwykle trudne (8, 9, 10). Dodatkowo, w klasyfikacji trójstopniowej nie został sprecyzowany sposób oceny nasilenia proliferacji komórkowej, ponadto, istnieją duże rozbieżności odnośnie do klasyfikacji mastocytom II stopnia w oparciu o ten system, dokonanej przez różnych patologów – zgodność takiego badania waha się w granicach 50–74% (3, 11, 12). W badaniach porównawczych guzy I stopnia w klasyfikacji trójstopniowej są guzami dobrze zróżnicowanymi w klasyfikacji dwustopniowej, a guzy III stopnia w klasyfikacji trójstopniowej są guzami o wysokiej złośliwości w klasyfikacji dwustopniowej (5, 6, 9). Z kolei guzy o II stopniu w klasyfikacji dwustopniowej są klasyfikowane zazwyczaj jako guzy o niskiej złośliwości, a rzadziej jako guzy o wysokiej złośliwości w klasyfikacji dwustopniowej (5, 6, 9).

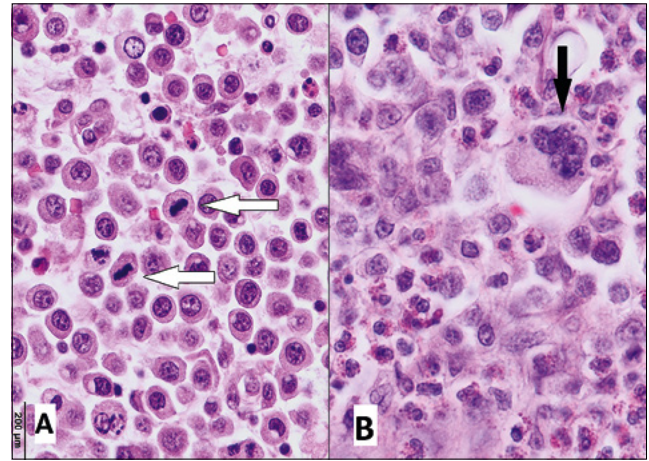
Podobnie w klasyfikacji dwustopniowej (Kiupel) kryterium oceny takich parametrów histologicznych, jak jądro „dziwaczne” czy kariomegalia jest niejednoznaczne, co wprowadza pewien stopień subiektywizmu (niektóre mastocytomy o niskiej histologicznej złośliwości wykazują agresywne zachowanie biologiczne). Z tego

Tabela 2. Kryteria dwustopniowego systemu oceny stopnia złośliwości guzów komórek tucznych u psów. Oceny badanych parametrów mikroskopowych dokonuje się w obszarach guza, gdzie są one najsilniej wyrażone (**ryc. 1 i 2**; 3)

Kryteria mikroskopowe Ocena się łącznie 10 pól widzenia przy powiększeniu 400× (high power field – hpf)	I stopień złośliwości Guz z komórek tucznych o niskiej złośliwości (wszystkie kryteria muszą być spełnione)	II stopień złośliwości Guz z komórek tucznych o wysokiej złośliwości (obecność którejkolwiek z cech)
Aktywność mitotyczna Komórki wielojądrowe (minimum 3 jądra komórkowe) Obecność jąder „dziwacznych” (jądra o skrajnej atypii, płatkowate, z wcięciami, o nieregularnym zarysie) Obecność kariomegalii (jądra, które są co najmniej dwa razy większe od „przeciętnych” w danym guzie)	Maksymalnie 6 mitoz w 10 hpf Maksymalnie 2 komórki wielojądrowe w 10 hpf Maksymalnie 2 jądra „dziwaczne” w 10 hpf Obecność kariomegalii w maksymalnie 9% jąder komórkowych	Przynajmniej 7 mitoz w 10 hpf Co najmniej 3 komórki wielojądrowe w 10 hpf Co najmniej 3 jądra „dziwaczne” w 10 hpf Obecność kariomegalii w co najmniej 10% jąder komórkowych



Ryc. 1. Obraz mikroskopowy guza z komórek tłuszczowych dobrze zróżnicowanego (I stopień w skali trójstopniowej i I stopień w skali dwustopniowej) – komórki nowotworowe są dobrze zróżnicowane, przypominają prawidłowe mastocyty, pleomorfizm komórkowy, komórki wielojądrowe i figury mitotyczne niewidoczne; barwienie hematoksylina–eozyna, powiększenie 200×

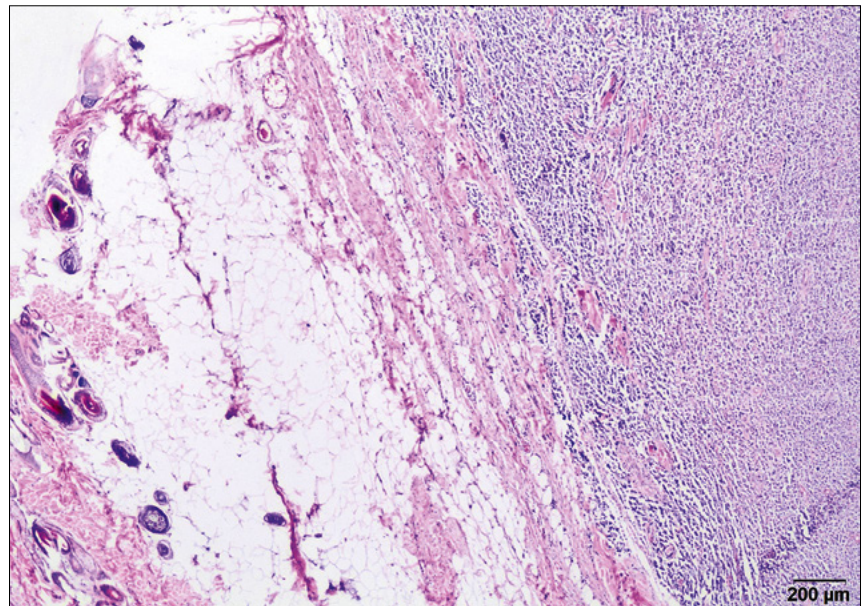


Ryc. 2. Obraz mikroskopowy guza z komórek tłuszczowych nisko zróżnicowanego (III stopień w skali trójstopniowej i II stopień w skali dwustopniowej) – komórki nowotworowe wykazują umiarkowany lub znaczny pleomorfizm komórkowy i jądro, figury mitotyczne są liczne (białe strzałki na ryc. A), komórki wielojądrowe posiadające minimum 3 jądra także (czarna strzałka na ryc. B); barwienie hematoksylina–eozyna, powiększenie 200×

powodu stopień złośliwości mastocytomy (bez względu na zastosowany system klasyfikacji) musi być traktowany jako jeden z parametrów branych pod uwagę podczas określania rokowania i wyboru metody leczenia; do innych parametrów należą: obraz makroskopowy guza, jego lokalizacja, występowanie przerzutów, czystość brzegów histologicznych, ekspresja receptora c-KIT, immunoekspresja białek pro- i antyapoptotycznych czy ekspresja inhibitorów metaloproteinaz (5, 6).

Klasyfikacja trójstopniowa w określaniu rokowania mastocytom u psów

W oparciu o klasyfikację trójstopniową na 137 psów z MCT obejmujących skórę, leczonych za pomocą zabiegu chirurgicznego jako jedynej metody terapeutycznej, śmierć z powodu nowotworu odnotowano w 0% przypadków MCT I stopnia, 12% przypadków MCT II stopnia i 83,3% przypadków MCT III stopnia; rok od zabiegu przeżyło 100% psów z MCT I stopnia, 87% psów z MCT II stopnia i 16% psów z MCT III stopnia; mediana okresu przeżycia dla psów z MCT III stopnia wyniosła 3,6 miesiąca (6). Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w badanych parametrach rokowniczych pomiędzy psami z I i II stopniem złośliwości, rokowanie było zdecydowanie gorsze u pacjentów z MCT



Ryc. 3. Obraz mikroskopowy guza z komórek tłuszczowych tkanki podskórnej – mięsz nowotworu widoczny po stronie prawej, po lewej widoczna skóra właściwa (widoczne mieszki włosowe) oraz tkanka tłuszczowa podskórna; barwienie hematoksylina–eozyna, powiększenie 10×

III stopnia złośliwości (6). Ryzyko występowania przerzutów jest zdecydowanie bardziej prawdopodobne u psów z MCT III stopnia (około pięciokrotnie wyższe) niż u psów z MCT I i II stopnia, jednak u 5,8% psów z MCT I stopnia w momencie rozpoznania nowotworu stwierdzono obecność przerzutów (6). W innym badaniu

obejmującym 163 psy z MCT II stopnia średnia okresu przeżycia wyniosła 875 dni. Rok, dwa i trzy lata od zabiegu resekcji przeżyło odpowiednio: 85%, 84% i 81% pacjentów, a śmierć w wyniku nowotworu odnotowano u 17% psów (8). Podsumowanie przydatności rokowniczej klasyfikacji trójstopniowej przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Podsumowanie przydatności rokowniczej trójstopniowej klasyfikacji histologicznej złośliwości mastocytom u psów (opracowano w oparciu o 3, 4, 6, 8, 9)

Stopień złośliwości histologicznej	Szansa na przeżycie 1500 dni	Przerzuty w momencie rozpoznania	Ryzyko wznowy po doszczętnej/niedoszczętnej resekcji	Mediana okresu przeżycia	Szansa na przeżycie roku od zabiegu	Ryzyko śmierci z powodu nowotworu
MCT o niskiej złośliwości (I stopień)	83%	6%	1%/6–30%	>1300 dni	100%	0%
MCT o pośredniej złośliwości (II stopień)	44%	16%	5–11%/6–30%	>1300 dni	85–92%	13–23%
MCT o wysokiej złośliwości (III stopień)	6%	49%	19%/80–95%	278 dni	46%	64–83,3%

Klasyfikacja dwustopniowa w określaniu rokowania mastocytom u psów

W pracy zespołu patologów pod kierownictwem Kiupela (3), którzy opracowali klasyfikację dwustopniową, określono wyraźne różnice w przeżywalności psów z guzami o niskiej (*low grade* – mediana przeżycia powyżej dwa lata) i wysokiej (*high grade* – mediana okresu przeżycia poniżej cztery miesiące) złośliwości (3). Ten system klasyfikacji pozwala przewidzieć długość całkowitego okresu przeżycia, śmiertelność z powodu mastocytomy oraz czas do pojawienia się kolejnych guzów. W badaniach z 2015 r. obejmujących przypadki 137 psów z MCT skóry właściwej, leczonych za pomocą zabiegu chirurgicznego jako jedynej metody terapeutycznej, śmierć z powodu MCT odnotowano u 4,5% psów z MCT o niskiej złośliwości i 75% psów z MCT o wysokiej złośliwości; rok od zabiegu przeżyło 95% psów z MCT o niskiej złośliwości i 24% psów z MCT o wysokiej złośliwości; mediana okresu przeżycia dla psów z MCT III stopnia wyniosła 3,6 miesiąca (6). Ryzyko obecności przerzutów jest istotnie wyższe (2,5 raza) w przypadku MCT o wysokiej złośliwości w porównaniu z MCT o niskiej złośliwości, jednak ryzyko wykrycia przerzutów w momencie rozpoznania MCT o niskiej złośliwości wynosi 14,9%. (6). Ryzyko wznowy pooperacyjnej dla „doszczętnie” usuniętych guzów komórek tłuszczowych (badanie histopatologiczne wykazało czyste brzegi chirurgiczne) o niskiej złośliwości wyniosło 4%, a dla guzów o wysokiej złośliwości ten odsetek był znacząco wyższy i wynosił 35% (13). Podsumowanie przydatności rokowniczej klasyfikacji dwustopniowej przedstawiono w tabeli 4.

Zastosowanie innych parametrów histologicznych o znaczeniu rokowniczym w guzach z komórek tłuszczowych u psów

W badaniach Sabbatini i wsp (6) wykazano, że **mastocytomy ograniczone do tkanki podskórnej** (bez zajęcia skóry właściwej) zazwyczaj roją dobrze (90% wykazuje łagodne zachowanie biologiczne), prawdopodobieństwo przeżycia jednego roku po zabiegu resekcji chirurgicznej wynosi 91%, a ryzyko śmierci z powodu MCT wynosi 8%, wznowy obserwuje się w 8% przypadków, a przerzuty w 4% przypadków. Dobre rokowanie obserwuje się, gdy guz zostaje

usunięty doszczętnie, jego brzegi są ograniczone (nie nacieka tkanek otaczających), a liczba mitoz/10 hpf jest niższa niż 4 (12). Liczba mitoz powyżej 4/10 hpf, wysoka aktywność proliferacyjna mierzona za pomocą immunoekspresji Ki67 (powyżej 21,8% komórek wykazujących ekspresję Ki67), obecność komórek wielojądrowych, brak ziarnistości cytoplazmatycznych w komórkach nowotworowych, naciekanie tkanek otaczających – to czynniki rokowniczo niekorzystne (12). „Doszczętna” resekcja chirurgiczna mastocytom tkanki podskórnej wiąże się z 2% ryzykiem wznowy pooperacyjnej, a z drugiej strony jedynie w 12% przypadków, w których komórki nowotworowe stwierdzono w obrębie marginesu histologicznego wycinka, obserwowano wznowę miejscową (12). Wydaje się też, że rokowanie winno być korzystne w przypadku mastocytom w lokalizacji śródmięśniowej, z kolei niekorzystne, gdy zmiana wywodzi się i wzrasta w obrębie jamy nosowej (14, 15).

W przypadku guzów z komórek tłuszczowych u psów ocena stopnia histologicznej złośliwości ma większe znaczenie niż inne parametry, przykładowo, **doszczętność zabiegu chirurgicznego**. Stwierdzono mianowicie, że w przypadku MCT o niskiej złośliwości (I stopień w skali dwustopniowej) ryzyko wznowy jest minimalne, nawet w przypadku gdy komórki nowotworowe znajdują się w obrębie lub w bliskości marginesów histologicznych wycinka, z kolei ryzyko wznowy w przypadku MCT o wysokiej złośliwości (II stopień w skali dwustopniowej) jest wysokie (i wynosi około 35–40%) nawet w sytuacji, gdy marginesy histologiczne uznano za doszczętnie (10, 12, 16). Ryzyko wznowy po zabiegu chirurgicznym dla guzów z komórek tłuszczowych o niskiej złośliwości jest ogólnie niskie (2,5–11%), przy czym nie stwierdzono różnic odnośnie do ryzyka pojawienia się wznowy w przypadku MCT usuniętych doszczętnie (z minimum 5 mm marginesem histologicznym i przynajmniej jedną podwiązią) i MCT usuniętych niedoszczętnie (margines histologiczny poniżej 5 mm, resekcja nie obejmowała powięzi poniżej nowotworu; 10). W badaniu tym wykazano też, że w prawie połowie przypadków, gdy doszło do wznowy odległej MCT, w badaniu histopatologicznym guza pierwotnego resekcję uznano za doszczętną (10).

Wydaje się, że ryzyko wznowy miejscowej dla MCT o niskiej złośliwości, których średnica nie przekracza 4 cm, jest

minimalne, gdy uda się zachować 2 cm marginesów bocznych i usunie się przynajmniej jedną powięź w głębokim/dolnym marginesie. W innym badaniu obejmującym guzy o I i II stopniu złośliwości za bezpieczne marginesy uznano 1 cm bocznych i 4 mm głębokich/dolnych. Dla MCT o wysokiej złośliwości obecnie rekomenduje się zachowanie przynajmniej 3 cm marginesu bocznego i usunięcie przynajmniej jednej powięzi leżącej w głębokim/dolnym marginesie chirurgicznym (16).

W ocenie rokowania MCT u psów znaczenie pomocnicze mają też **parametry kliniczne**, przykładowo czynnikami niekorzystnymi rokowniczo dla krótszych okresów przeżycia i wystąpienia przerzutów w momencie rozpoznania są: średnica guza powyżej 3 cm (ryc. 4), obecność owrzodzenia powierzchni guza (ryc. 5), lokalizacja na palcu lub w okolicy pachwinowej, przynależność do rasy shar pei, występowanie objawów klinicznych związanych z nowotworem – podstadium b (wymioty, biegunka, świąd, obrzęk okoliczny; 5, 17). Dodatkowo, stwierdzono też, że ryzyko wznowy MCT II i III stopnia złośliwości jest wyższe dla guzów większych (mediana 3 cm średnicy) niż guzów mniejszych (mediana 2 cm), a także dla mastocytom o wyższej aktywności proliferacyjnej (mediana 6,5 mitoz/10 hpf) niż o niższej (mediana 0 mitoz/10 hpf; 13). W innych badaniach wyższą śmiertelność z powodu MCT II stopnia odnotowano u Jack Russel terierów (cztery z sześciu psów tej rasy padło z powodu MCT – 8). Ponadto, mastocytomy zlokalizowane w jamie ustnej, połączeniach skóry i śluzówki jamy ustnej oraz na skórze kufy roją gorzej (mediana przeżycia 9–14 miesięcy, ryzyko przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych 50–70%) niż guzy o innych lokalizacjach (12).

W 2011 r. opublikowano wyniki badań, w których poszukiwano czynników o znaczeniu prognostycznym u psów z **mnogimi mastocytomami skóry** (w momencie rozpoznania wykryto minimum trzy MCT u jednego pacjenta; 18). Do czynników o negatywnym znaczeniu rokowniczym (krótszy całkowity okres przeżycia, wyższe ryzyko pojawienia się przerzutów) w takich przypadkach należały następujące parametry: przynajmniej jeden guz miał III stopień złośliwości histologicznej, lokalizacja poza kończynami (MCT zlokalizowane na kończynach rokowały lepiej) oraz zastosowanie winblastyny/lomustyny w protokole

Tabela 4. Podsumowanie przydatności rokowniczej dwustopniowej klasyfikacji histologicznej złośliwości mastocytom u psów (opracowano w oparciu o 3, 5, 6, 9, 10, 12)

Stopień złośliwości histologicznej	Przerzuty w momencie rozpoznania/ryzyko pojawienia się przerzutów lub nowych guzów	Ryzyko wznowy po „doszczętniej” resekcji	Mediana okresu przeżycia	Szansa na przeżycie 1 roku od zabiegu	Ryzyko śmierci z powodu nowotworu
MCT o niskiej złośliwości	15%/20%	2,5–17%	24 miesiące	95%	3–6%
MCT o wysokiej złośliwości	35%/70%	36–40%	3,6–10,5 miesiąca	24%	75–90%



Ryc. 4. Masywna deformacja w okolicy prawej łopatkii to guz z komórek tucznych – sam rozmiar guza jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym – badanie cytologiczne biopłatów wykazało wysoką złośliwość histologiczną



Ryc. 5. Owrzodzenie powierzchni masocytomy to inna niekorzystna cecha guza

chemioterapeutycznym (18). Istnieją także doniesienia, które wskazują na brak związku pomiędzy MCT mnogimi a przebiegiem nowotworu u psów (12)

Podsumowanie rokowniczego znaczenia badania histopatologicznego w przypadku guzów z komórek tucznych skóry u psów oraz sugerowany sposób postępowania (opracowano w oparciu o 12)

MCT o niskiej złośliwości

(I stopień Kiupel, I stopień Patnaik, MC<5)

Zdecydowana większość (95%) ma łagodne zachowanie biologiczne – są mastocytomami „niezłośliwymi”, okresy przeżycia powyżej 4 lat. Zabieg chirurgicznej resekcji skutkuje pełnym wyleczeniem w 95% przypadków, w większości przypadków nie odrastają nawet przy niedoszczętnej resekcji (komórki nowotworowe na granicy cięcia) lub po usunięciu z wąskim marginesem tkanek zdrowych (poniżej 1 mm). Zalecaną metodą postępowania w takich przypadkach jest obserwacja pacjenta (okresowe kontrole). W przypadku gdy komórki nowotworowe obserwuje się na granicy lub w bliskości marginesu histologicznego, sugerowana ocena nasilenia proliferacji (barwienie immunohistochemiczne Ki67), a w przypadku wysokiej aktywności proliferacyjnej – także mutacji receptora c-KIT (barwienie immunohistochemiczne).

MCT o wysokiej złośliwości

(II stopień Kiupel, III stopień Patnaik, MC>5)

Nowotwory o agresywnym zachowaniu biologicznym – mastocytomy „złośliwe”, okresy przeżycia 4–12 miesięcy. Wznowy obserwuje się w 30–40% przypadków guzów usuniętych z „czystymi” marginesami histologicznymi. Bez względu na to, czy brzegi chirurgiczne są czyste, czy nie, wskazane jest wykonanie oceny nasilenia proliferacji (barwienie immunohistochemiczne Ki67) oraz mutacji receptora c-KIT (barwienie immunohistochemiczne).

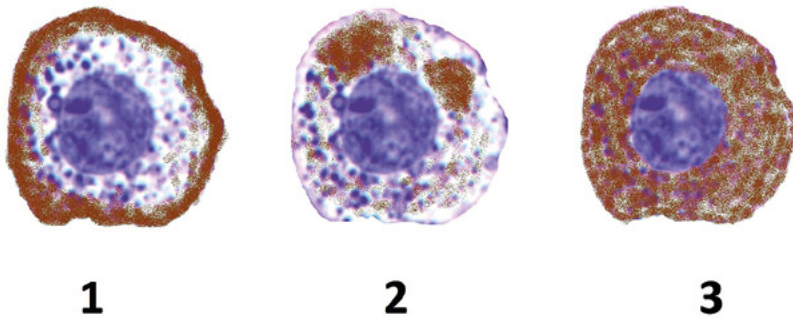
Zastosowanie barwienia immunohistochemicznego w określaniu rokowania w przypadku guzów komórek tucznych u psów

Przydatne w określaniu rokowania w przypadkach guzów z komórek tucznych u psów jest barwienie immunohistochemiczne (8, 9, 19). Ekspresja antygenu Ki67 (antygenu jąder komórkowych komórek będących w cyklu podziałowym) jest skorelowana ze stopniem złośliwości histologicznej mastocytomy u psów (niższa ekspresja w guzach o niższej złośliwości histologicznej, bez względu na zastosowany system klasyfikacji). Dodatkowo, stwierdzono wyraźną korelację pomiędzy nasileniem ekspresji Ki67 a ryzykiem zgonu z powodu MCT, mianowicie ryzyko zgonu z powodu MCT o indeksie $Ki67 \geq 10,6$ (odsetek komórek wykazujących reakcję pozytywną) było o osiem razy większe niż w przypadku MCT o indeksie $Ki67 < 10,6$ (9). Barwienie immunohistochemiczne oceniające ekspresję Ki67 jest też pomocne w określaniu zachowania biologicznego mastocytom II stopnia złośliwości (skala trójstopniowa; rokowanie w tym stopniu złośliwości często jest nieprzewidywalne), bowiem jest skorelowana z długością okresu przeżycia psów po leczeniu chirurgicznym (8). Wykazano też przydatność rokowniczą oceny ekspresji białka BAX (jedno z białek pro-apoptycznych) określanej metodą immunohistochemiczną (19). Wyższa ekspresja tego białka była obserwowana w guzach o wyższej złośliwości histologicznej, w porównaniu z guzami o niższej złośliwości, ponadto ryzyko śmierci z powodu MCT było pięciokrotnie wyższe u psów, u których ekspresja białka BAX była wysoka, a okresy przeżycia krótsze w porównaniu z pacjentami z niską ekspresją BAX (19).

W ocenie wyników leczenia psów z guzem z komórek tucznych pomocną może być ocena ekspresji inhibitorów

metaloпротеinaz (TIMP-1; metaloproteinazy są grupą enzymów, które biorą udział w trawieniu macierzy pozakomórkowej, co jest warunkiem rozprzestrzeniania się komórek nowotworowych – zwiększając inwazyjność nowotworu). Niższa aktywność TIMP-1 w komórkach nowotworowych (poniżej 22,9% komórek wykazywało cytoplazmatyczną ekspresję) wiązała się z wyższym ryzykiem śmierci z powodu MCT (trzykrotnie wyższe niż dla MCT powyżej tej wartości), a także krótszymi okresami przeżycia psów (mediana okresu przeżycia 238 dni; 20). Według autorów tej pracy ocena immunoekspresji TIMP-1 w komórkach nowotworowych może być używana jako niezależny parametr rokowniczy, i to niezależnie od stopnia histologicznej złośliwości mastocytomy (20).

Barwienie immunohistochemiczne stosowano też do oceny immunoekspresji receptora kinazy tyrozynowej (c-kit, KIT, CD117, który jest zaangażowany w etiopatogenezę guza z komórek tucznych – jego nadekspresja lub stała aktywacja odpowiada za niekontrolowaną proliferację nowotworowych mastocytom) jako parametru o znaczeniu prognostycznym. Choć w niektórych badaniach wykazano (11, 21, 22), że rozmieszczenie KIT w cytoplazmie komórek nowotworowych może być czynnikiem o znaczeniu prognostycznym, to w badaniach Costa Casagrande i wsp. stwierdzono, że zarówno nasilenie ekspresji, jak i rozmieszczenie reakcji barwnej w cytoplazmie komórek nowotworowych nie koreluje ani ze stopniem histologicznej złośliwości, ani z zachowaniem biologicznym mastocytomy u psów, co ogranicza jego zastosowanie jako parametru rokowniczego (21). Zapewne takie rozbieżności wynikają z faktu, że zaburzenia ekspresji KIT mogą być wynikiem różnych mutacji czy aberracji chromosomalnych genu *c-kit*, których znaczenie rokownicze może być odmienne, niestety ocena,



Ryc. 6. Schemat obrazujący różne wzorce immunoekspresji KIT w cytoplazmie komórek mastocytomy (brązowa barwa odpowiada immunoekspresji KIT): wzorec nr 1 – wzorec podbłonowy (reakcja widoczna głównie na obwodzie cytoplazmy tuż pod błoną komórkową), wzorec nr 2 – wzorec punktowy (widoczne punktowe obszary wykazujące znaczną immunoekspresję ze zmniejszeniem immunoekspresji podbłonowej) i wzorec nr 3 – wzorec rozproszony (jednolita reakcja w całej cytoplazmie komórki nowotworowej). Wzorce nr 2 i 3 wiążą się z mniej korzystnym rokowaniem w porównaniu z wzorcem nr 1

z jakim typem nieprawidłowości genetycznych mamy do czynienia w danym przypadku MCT wymaga stosownych metod molekularnych. Jednak ocena charakteru immunoekspresji KIT w komórkach nowotworowych (roz rozmieszczenie i charakterystyka reakcji barwnej) może dawać informacje istotne w rokowaniu. Charakter ekspresji można przedstawić w kilku wzorcach: wzorec podbłonowy – wzorec nr 1 (reakcja widoczna głównie na obwodzie cytoplazmy tuż pod błoną komórkową), wzorec punktowy – wzorec nr 2 (ze zmniejszeniem immunoekspresji podbłonowej) i wzorec rozproszony – wzorec nr 3 (jednolita reakcja w całej cytoplazmie; **ryc. 6**; 11, 22). W jednym z badań wykazano, że wzorce nr 2 i 3 były powiązane ze skróceniem okresu przeżycia oraz zwiększonym ryzykiem wznowy miejscowej po resekcji chirurgicznej MCT skóry (11). Podobne wyniki uzyskano w analizie mastocytom podskórnych, w przypadku wzorca nr 2 i 3 immunoekspresji KIT obserwowano zwiększone ryzyko wznowy miejscowej (88%) i powstania przerzutów odległych (92%; 24).

Ostatnio opublikowano też badanie, z wykorzystaniem podwójnego barwienia immunohistochemicznego, w którym w skrawkach histologicznych przeprowadzono jednoczesne barwienie ekspresji Ki67 i KIT. Wykazano, że rokowanie jest gorsze (okresy przeżycia krótsze) u osobników wykazujących profil immunoekspresji Ki67⁺/KIT⁺ (mediana okresu przeżycia 14,4 mies.) niż profil immunoekspresji Ki67⁻/KIT⁺ (mediana okresu przeżycia 24,5 mies.; 25).

Badanie histopatologiczne guza z komórek tucznych usuniętego od psa dostarcza wielu cennych informacji o istotnej przydatności rokowniczej, dlatego też winno być wykonane w każdym przypadku. W kolejnych planowanych publikacjach zostaną przybliżone korzyści, jakie płyną z badania mikroskopowego w przypadku

innych typów nowotworów złośliwych powszechnie występujących u psów i kotów.

Piśmiennictwo

- Romansik E.M., Reilly C.M., Kass P.H.: Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet. Pathol.* 2007, **44**, 335–341.
- Berlato D., Murphy S., Monti P., Stewart J., Newton J.R., Flindall A., Magelonn G.A.: Comparison of mitotic index and Ki67 index in the prognostication of canine cutaneous mast cell tumours. *Vet. Comp. Oncol.* 2013, **13**, 143–150.
- Kiupel M., Webster J.D., Bailey K.L., Best S., DeLay J., Detrisac C.J., Fitzgerald S.D., Gamble D., Ginn P.E., Goldschmidt M.H., Hendrick M.J., Howerth E.W., Janovitz E.B., Langohr L., Lenz S.D., Lipscomb T.P., Miller M.A., Misdorp W., Moroff S., Mullaney T.P., Neyens I., O'Toole D., Ramos-Vara J., Scase T.J., Schulman F.Y., Sledge D., Smedley R.C., Smith K.W., Snyder P., Southern E., Stedman N.L., Steficek B.A., Stromberg P.C., Valli V.E., Weisbrode S.E., Yager J., Heller J., Miller R.: Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behaviour. *Vet. Pathol.* 2011, **48**, 147–155.
- Patnaik A.K., Ehler W.J., MacEwen E.G.: Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet. Pathol.* 1984, **21**, 496–499.
- Stefanello D., Buracco P., Sabattini S., Finotello R., Giudice C., Grieco V., Iussich S., Tursi M., Scase T., Di Palma S., Bettini G., Ferrari R., Martano M., Gattino F., Marrington M., Mazzola M., Vasconi M.E., Annoni M., Marconato L.: Comparison of 2- and 3-category histologic grading systems for predicting the presence of metastasis at the time of initial evaluation in dogs with cutaneous mast cell tumors: 386 cases (2009–2014). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2015, **246**, 765–769.
- Sabattini S., Scarpa F., Berlato D., Bettini G.: Histologic grade of canine mast cell tumor: Is 2 better than 3? *Vet. Pathol.* 2015, **52**, 70–73.
- Shaw T., Kuding S.T., Firestone S.M.: Diagnostic accuracy of pre-treatment biopsy for grading cutaneous mast cell tumors in dogs. *Vet. Comp. Oncol.* 2017, doi: 10.1111/vco.12346.
- Maglennon G.A., Murphy S., Adams V., Miller J., Smith K., Bluden A., Scase T.J.: Association of Ki67 index with prognosis for intermediate-grade canine cutaneous mast cell tumours. *Vet. Comp. Oncol.* 2008, **6**, 268–274.
- Vascellari M., Giantin M., Capello K., Carminato A., Morello E.M., Vercelli A., Granato A., Buracco P., Dacasto M., Mutinelli E.: Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in canine cutaneous mast cell tumors: association with grading and prognosis. *Vet. Pathol.* 2012, **50**, 110–121.
- Smith J., Kiupel M., Farrelly J., Cohen R., Olmsted G., Kirpensteijn J., Brocks B., Post G.: Recurrence rates and clinical outcome for dogs with grade II mast cell tumors with low AgNOR count and Ki67 index treated with surgery alone. *Vet. Comp. Oncol.* 2015, **15**, 36–45.
- Kiupel M., Webster J.D., Kaneene J.B., Miller R., Yuzbasian-Gurkan V.: The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet. Pathol.* 2004, **41**, 371–377.

- Kiupel M.: Mast cell tumors. W: Meuten D.J.: *Tumors in Domestic Animals*. Wyd. 5, 2–17, Wiley Blackwell, Ames, 176–202.
- Donnelly L., Mullin C., Balko J., Goldschmidt M., Krick E., Hume C., Brown D.C., Sorenmo K.: Evaluation of histological grade and histologically tumour-free margins as predictors of local recurrence in completely excised canine mast cell tumors. *Vet. Comp. Oncol.* 2013, **13**, 70–76.
- Khoo A., Lane A., Wyatt K.: Intranasal mast cell tumor in the dog: A cases series. *Can. Vet. J.* 2017, **58**, 851–854.
- Robinson W.P., Elliott J., Baines S.J., Owen L., Shales C.J.: Intramuscular mast cell tumors in 7 dogs. *Can. Vet. J.* 2017, **58**, 931–935.
- Sledge D.G., Webster J., Kiupel M.: Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathological approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. *Vet. J.* 2016, **215**, 43–54.
- Śmiech A., Ślaska B., Łopuszyński W., Jasik A., Szczepaniak M., Wilkolek P.: Epidemiological study of canine mast cell tumours according to the histological malignancy grade. *Pol. J. Vet. Sci.* 2017, **20**, 455–465.
- O'Connell K., Thomson M.: Evaluation of prognostic indicators in dogs with multiple, simultaneously occurring cutaneous mast cell tumors: 63 cases. *Vet. Comp. Oncol.* 2011, **11**, 51–62.
- Barra C.N., Macedo B.M., Cadrobbi K.G., Pulz L.H., Huete G.C., Kleeb S.R., Xavier J.G., Catao-Dias J.L., Nishiyama A.T., Fukumasa H., Strefezi R.F.: Apoptosis intrinsic pathway proteins predict survival in canine cutaneous mast cell tumours. *Vet. Comp. Oncol.* 2017, doi: 10.1111/vco.12330.
- Pulz L.H., Barra C.N., Kleeb S.R., Xavier J.G., Catao-Dias J.L., Sobral R.A., Fukumasa H., Strefezi R.F.: Increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 correlates with improved outcome in canine cutaneous mast cell tumors. *Vet. Comp. Oncol.* 2016, **15**, 606–614.
- Costa Casagrande T.A., de Olivera Barros L.M., Fukumasa H., Cogliati B., Chaible L.M., Dagli M.L.Z., Matera J.M.: The value of molecular expression of KIT and KIT ligand analyzed using real-time polymerase chain reaction and immunohistochemistry as a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumours. *Vet. Comp. Oncol.* 2013, **13**, 1–10.
- Gil da Costa R.M.: C-kit as a prognostic and therapeutic marker in canine cutaneous mast cell tumor: From laboratory to clinic. *Vet. J.* 2015, **205**, 5–10.
- Webster J.D., Kiupel M., Yuzbasian-Gurkan V.: Evaluation of the kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumors. *BMC Cancer*, 2006, **6**, 85.
- Thompson J.J., Yager J.A.: Canine subcutaneous mast cell tumors: cellular proliferation and KIT expression as prognostic indices. *Vet. Pathol.* 2011, **48**, 169–181.
- Fonseca-Alves C.E., Diola Bento D., Torres-Neto R., Werner J., Kitchell B., Laufer-Amorim R.: Ki67/KIT double immunohistochemical staining in cutaneous mast cell tumors from Boxer dogs. *Res. Vet. Sc.* 2015, **102**, 122–126.

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