

PŁUCO

RENATA LANGFORT¹, LECH CHYCZEWSKI², MAŁGORZATA SZOŁKOWSKA¹, EWA KAZNOWSKA³,
ALDONA WOŹNIAK^{4,5}, KATARZYNA IWANIK^{4,5}, MAŁGORZATA JANICKA-JEDYŃSKA^{4,5},
DONATA JARMOŁOWSKA-JURCZYŹYŃ^{4,5}, JULIUSZ PANKOWSKI⁶

¹Zakład Patomorfologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

²Zakład Patomorfologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

³Podkarpackie Centrum Chorób Płuc w Rzeszowie

⁴Wielkopolskie Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii w Poznaniu

⁵Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

⁶Szpital Specjalistyczny Chorób Płuc w Zakopanem

BADANIE MAKROSKOPOWE MATERIAŁU POOPERACYJNEGO

RENATA LANGFORT, MAŁGORZATA SZOŁKOWSKA, EWA KAZNOWSKA, ALDONA WOŹNIAK,
KATARZYNA IWANIK, MAŁGORZATA JANICKA-JEDYŃSKA, DONATA JARMOŁOWSKA-JURCZYŹYŃ,
JULIUSZ PANKOWSKI

1. Spis procedur chirurgicznych

- Wideo-torakoskopia (*video-assisted thoracoscopy*)
- Biopsja otwarta płuca
- Usunięcie płata lub płatów płuca metodą wideo-torakoskopii
- Segmentektomia
- Lobektomia
- Lobektomia z mankietem chirurgicznym oskrzela (*sleeve-lolectomia*)
- Bilobektomia
- Bilobektomia z mankietem chirurgicznym oskrzela
- Pneumonektomia
- Mankiet oskrzela z guzem
- Inne procedury:
- limfangiektomia
- usunięcie fragmentu opłucnej ściennej, osierdzia, przepony
- resekcja fragmentu ściany klatki piersiowej
- mediastinoskopia, mediastinotomia, lobektomia z segmentektomią

2. Zalecenia dla lekarza wykonującego procedurę chirurgiczną

Materiał należy umieścić w odpowiednio dobranym naczyniu (jednorazowym, czystym, zdezynfekowanym) umożliwiającym łatwe włożenie i wyjęcie materiału. Na naczyniu na niezmywalnej etykiecie należy podać imię i nazwisko chorego, stosowane w danej jednostce oznaczenia (np. kody kreskowe), rodzaj pobranego materiału. Przed umieszczeniem materiału pojemnik powinien być napełniony utrwalcaczem – 10-procentowym zbuforowanym obojęt-

nym (pH 7,0–7,4) wodnym roztworem formaliny, czyli 4-procentowym roztworem formaldehydu. W materiale zawierającym kilka elementów tkankowych (fragment drugiego płata, osierdzia, przepony, tkanki tłuszczowej śródpiersia, opłucnej ściennej, ściany klatki piersiowej itp.), których ocena mikroskopowa jest istotna (np. określenie doszczętności zabiegu chirurgicznego), konieczne jest ich oznakowanie. Sposób oznakowania powinien być wcześniej ustalony z lekarzem pracowni lub zakładu patomorfologii.

Razem z materiałem lekarz powinien dostarczyć:

- wyniki wcześniejszych badań histopatologicznych (jeśli były wykonywane), zwłaszcza dotyczące chorób nowotworowych,
- opis badania bronchofiberoskopowego,
- opis badań obrazowych klatki piersiowej, zwłaszcza tomografii klatki piersiowej, PET-TK (jeśli było wykonywane).

W postępowaniu z formaliną należy stosować wszelkie zalecane środki ostrożności umieszczone na etykiecie utrwalcza i ustalone zasadami BHP. Należy pamiętać, aby pobrany materiał został umieszczony w pojemniku z formaliną nie później niż do 30 minut od jego pobrania, a objętość utrwalcza powinna być ok. 8–10-krotnie większa od objętości utrwalonego materiału. Należy bezwzględnie przestrzegać pH roztworu formaliny, gdyż wszelkie zmiany pH wpływają na jakość badań immunohistochemicznych i molekularnych, podobnie jak czas utrwalania, który nie powinien być krótszy niż 6 godzin i nie dłuższy niż 48 godzin.

Po umieszczeniu materiału w naczyniu, należy je szczelnie zamknąć, tak aby zabezpieczyć przed wydostaniem się materiału i utrwalcza.

Do materiału należy dołączyć odpowiednio wypełnione skierowanie na badanie patomorfologiczne, w którym powinny się znaleźć istotne informacje obejmujące:

- imię i nazwisko chorego,
- datę urodzenia, PESEL, płeć,
- nazwę podmiotu kierującego materiałem do badania,
- rozpoznanie kliniczne,
- informacje dotyczące przesyłanego materiału (rodzaj, strona, okolica itp.),
- dodatkowe, istotne dane kliniczne – dotyczące początku i przebiegu choroby, opisu badania bronchofiberoskopowego, przebytych lub towarzyszących chorób, zwłaszcza nowotworowych, układowych (tkanki łącznej), śródmiąższowych płuc, przebytego leczenia (chemio-, radioterapia, immunosupresja, kortykoterapia), narażenia zawodowego (azbest, krzem), nałogów (palenie papierosów czynne i bierne),
- datę wystawienia skierowania,
- czytelny podpis lekarza kierującego materiałem na badanie oraz pieczętę z prawem wykonywania zawodu,
- informację o liczbie przesyłanych pojemników z materiałem, z wyszczególnieniem rodzaju materiału i miejsca jego pobrania dla każdego pojemnika,
- informację o rodzaju zastosowanego utrwalcza lub jego braku.

3. Zasady opracowania materiału operacyjnego

3.1. Postępowanie z materiałem operacyjnym

Po dostarczeniu materiału osoba przyjmująca materiał (najczęściej diagnosta lub technik laboratoryjny) sprawdzają zgodność danych umieszczonych na skierowaniu z opisem na pojemniku.

Materiał obejmujący płuco należy zważyć, a następnie rozprężyć roztworem formaliny. Rozprężenie wykonuje się poprzez podanie formaliny nabranej do strzykawki o dużej pojemności bezpośrednio do drzewa oskrzelowego lub drogą nakłuwania igłą miąższu płuca, w kilku miejscach, aż do wygładzenia powierzchni opłucnej.

W przypadkach, w których guz jest dużych rozmiarów, zlokalizowany obwodowo, należy go ponacinać prostopadłe do powierzchni opłucnej, na fragmenty grubości ok. 0,5–1 cm, a powierzchnię przekroju poprzekładać bibułą. Taki sposób umożliwia lepszą penetrację formaliny do tkanek guza i zabezpiecza materiał przed cytolizacją.

Szybkość penetracji formaliny w tkanki wynosi ok. 1 mm/1 godz.

Nacięty guz należy zmierzyć i podać trzy wymiary.

Na koniec materiał należy umieścić ponownie w naczyniu wypełnionym formaliną, a powierzchnię płuca przykryć warstwą waty lub gazy, tak aby zabezpieczyć powierzchnię płuca przed wyschnięciem.

Należy przestrzegać czasu utrwalania. Najkorzystniej jest pobierać wycinki maksymalnie po 48 godzinach od utrwalania.

3.2. Pobranie wycinków do badania mikroskopowego

Osoba przystępująca do pobrania wycinków (lekarz patomorfolog lub przeszkolony lekarz specjalizujący się w patomorfologii) musi postępować zgodnie z zasadami obowiązującymi w przypadkach kontaktu z materiałem zakaźnym, określonymi przez BHP. Powinna być ubrana w jednorazowy strój ochronny (fartuch fizelinowy, fartuch plastikowy, rękawice, maseczkę chroniącą drogi oddechowe) i okulary.

Przed przystąpieniem do pobrania wycinków materiał należy umieścić w digestorium i wypłukać pod bieżącą wodą, aby zmniejszyć drażniące działanie formaliny.

Wypłukany materiał umieszcza się w miejscu przeznaczonym do pobierania wycinków, w którym jest zainstalowany sprawnie działający wyciąg.

Po sprawdzeniu zgodności danych umieszczonych na skierowaniu i pojemniku lekarz przystępuje do pobrania wycinków.

3.2.1. Pobranie wycinków

A. Materiał należy opisać makroskopowo:

- zmierzyć materiał;
- podać rodzaj otrzymanego materiału (płuco lub płat itp.);
- opłucna – wygląd, grubość, włóknienie, zmiany zapalne, zachowana ciągłość, wciągnięta przez guz, zmiany ogniskowe i guzkowe;
- inne elementy tkankowe przylegające do płuca (opłucna płucna, fragmenty osierdzia, przepony, inne);
- brzeg chirurgiczny oskrzela – długość, grubość ściany oskrzela, związany z naciekiem nowotworowym (R2), wolny od nacieku nowotworowego (R0), określić odległość marginesu od guza;
- brzeg chirurgiczny naczyniowy – długość, grubość ściany naczynia, zajęty przez guz (V2), wolny od nacieku nowotworowego (V0), określić odległość marginesu od guza;
- margines miąższu płuca – w przypadkach resekcji anatomicznej guza, usunięcia guza z otaczającym miąższem istotna jest ocena marginesu odcięcia oraz określenie odległości marginesu od guza;

Fragmenty tkankowe stanowiące margines chirurgiczny należy oznaczać niezmywalnym tuszem.

- węzły chłonne okolicy brzegu chirurgicznego oskrzela (liczba, wielkość, kolor, zmienione przerzutowo, wciągnięte przez naciek nowotworowy w masę guza),
- guz – lokalizacja:
 - płat, segment,
 - związany z oskrzelem (wrasta do światła, niszczy ścianę oskrzela, chrząstkę, nacieka otaczający mięsz płuca, przez ciągłość nacieka węzły chłonne),
 - zlokalizowany obwodowo,
 - wymiary,
 - związek z opłucną (nacieka opłucną, przekracza ją, niezwiązany z opłucną – podać odległość w mm), nie można ocenić (opłucna uszkodzona),
 - ograniczenie,
 - martwica, jama (średnica),
 - wylewy krwi, złogi pylicze,
 - naciekanie naczyń krwionośnych,
 - odległość od linii cięcia chirurgicznego oskrzela i naczyń;
- otaczający guz mięsz płuca (zmieniony zapalnie, niedodmowo, widoczne guzki satelitarne – liczba, wielkość, kolor, odległość od głównej masy guza), pozostały mięsz płuca (zmiany ogniskowe: wygląd, wielkość, lokalizacja, zmiany zapalne, rozedmowe);
- wygląd oskrzeli (ocena błony śluzowej, średnica, rozstrzenie, zawartość);
- węzły chłonne wewnątrzplucne (gr. 13, 14) – liczba, wielkość, wygląd.

W przypadku rozbieżności pomiędzy badaniem makroskopowym a obrazowym, dotyczących np. lokalizacji, wielkości zmiany, należy rozważyć konieczność wykonania dokumentacji fotograficznej przy użyciu systemu wizyjnego z kamerą lub aparatu fotograficznego.

B. Pobranie wycinków do badania mikroskopowego:

- wypreparować węzły chłonne okolicy brzegu chirurgicznego (każdy węzeł należy umieścić w odrębnej kasetce);
- pobrać pierścień oskrzela brzegu chirurgicznego oskrzela, w przypadkach gdy brzeg jest zszyty metalowymi szwami, dopuszczalne jest odcięcie brzegu i pobranie kolejnego fragmentu poza zszyciem. W opisie materiału należy umieścić informację, jakiej szerokości fragment odcięto;
- pobrać brzeg chirurgiczny naczyniowy;
- rozciąć wszystkie dostępne oskrzela nożyczkami;
- zalecana liczba wycinków z guza: 2–4 (z części centralnej, obwodowej guza, z uwzględnieniem wycinka obejmującego otaczający mięsz płuca) oraz wycinek guza z opłucną, guza z oskrzelem, wycinki z każdego miejsca budzącego podejrzenie naciekania (najkorzystniej pobierać 1 wycinek/1 cm guza, ze względu na heterogenną budowę raków płuca);

- guz śródoskrzelowy – wycinek guza z oskrzelem, guza z otaczającym mięszem płuca, guza z każdą strukturą podejrzaną o naciekanie (naczynia, węzły chłonne, sąsiedni płat), z obwodowej części guza, z guza z opłucną, guza z marginesem chirurgicznym oskrzela;
- guz obwodowy – wycinek z obwodu guza, z guza z opłucną z miejsca wciągnięcia opłucnej lub najmniejszej odległości od opłucnej, z guza z mięszem płuca;

W wycinku pobranym z guza znajdującego się w pobliżu opłucnej należy dodatkowo wykonać barwienie na włókna elastyczne metodą van Giesona (*elastic van Gieson* – EvG), które jest zalecane w celu dokładnej oceny relacji nowotworu do błon sprężystych opłucnej, potwierdzenia lub wykluczenia naciekania opłucnej przez raka.

Raki gruczolowe *in situ* (AIS) oraz raki gruczolowe z minimalnym naciekiem (MIA) mogą osiągać średnicę 3 cm. W przypadkach, w których istnieje podejrzenie AIS lub MIA, zmiana powinna być przebadana w całości. Wskazówką, że guz może odpowiadać AIS lub MIA, jest badanie TK klatki piersiowej, w którym opisywany jest guz o typie „matowej szyby” (*ground glass nodule* – GGN).

- do badania mikroskopowego należy pobrać:
 - znalezione zmiany ogniskowe, zapalne w otoczeniu guza i z pozostałego mięszu; mięsz płuca należy ocenić makroskopowo i palpacyjnie, gdyż niektóre ze zmian (AAH, AIS, *tumorlet*) są często bardzo dyskretne i słabo widoczne,
 - po jednym wycinku z pozostałych segmentów niezmienionego mięszu,
 - wszystkie znalezione węzły chłonne wewnątrzplucne.

4. Cechy makroskopowe istotne dla określenia stopnia zaawansowania raka

4.1. Cecha pT

- Wielkość guza.
- Ocena opłucnej płucnej (związek z guzem, zmiany ogniskowe).
- Ocena otaczającego mięszu płuca (zapalenie, niedodma z oceną ich rozległości, zmiany guzkowe).
- Lokalizacja w stosunku do otaczających struktur anatomicznych, wnęki.
- Odległość od linii cięcia chirurgicznego (oskrzela głównego ≥ 2 cm lub < 2 cm).

4.2. Cecha pN

Ocena węzłów chłonnych wewnątrzplucnych (13, 14) i okolicy brzegu chirurgicznego oskrzela (12, 11).

4.3. Cecha pM1a

- Dodatkowy guzek lub guzki w przeciwległym płacie.
- Guzki nowotworowe w opłucnej.
- Wysięk w opłucnej lub osierdziu z **potwierdzonymi komórkami nowotworowymi**.

Liczba wycinków, które należy pobrać do badania mikroskopowego, zależy od procedury chirurgicznej oraz wielkości zmiany. Zmiany do 3 cm, jeśli istnieje podejrzenie, że odpowiadają AIS lub MIA, powinny być przebadane w całości! Zawsze należy pobrać: marginesy chirurgicznej resekcji, wycinki z guza, mięsz obwodowy oraz znalezione i nadesłane węzły chłonne, wg zasady każdy węzeł należy zbadać oddzielnie. W zależności od rodzaju procedury należy pobrać:

- biopsja chirurgiczna z guzem – 6 wycinków,
- segmentektomia – 6 wycinków,
- lobektomia (z mankietem chirurgicznym lub bez) – 15 wycinków,
- bilobektomia z mankietem chirurgicznym oskrzela – 25 wycinków,
- pneumonektomia – 40 wycinków.

Piśmiennictwo

1. Kulig A, Danilewicz M, Łukaszek S. Organizacja i wyposażenie pracowni patomorfologicznej oraz zasady postępowania z materiałami do badań histopatologicznych i cytologicznych. *Pol J Pathol* 1999; 50 (Suppl. 2).
2. Langfort R. Diagnostyka morfologiczna w chorobach płuc. Rodzaje materiałów i zasady ich przygotowania do badania histologicznego. *Pol J Pathol* 2010; 61 (Suppl. 1): s1-s12.
3. Litzky LA, Gal A. Lung specimen handling and practical considerations. In: Hasleton P, Flieder DB (eds.). *Spencer's Pathology of the lung*. Cambridge University Press, Cambridge 2013; 41-65.
4. Corrin B, Nicholson AG. The processing of lung specimens. W: Corrin B, Nicholson AG. *Pathology of the lung*. Churchill Livingstone, Edinburgh 2011; 753-764.
5. Jones KD, Churg A, Henderson DW, et al. Data set for reporting of lung carcinomas. Recommendations from International Collaboration on Cancer Reporting. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137: 1054-1062.
6. Westra W, Hruban RH, Phelps T, Isacson C (eds.). *Surgical Pathology Dissection: An Illustrated Guide*. 3rd ed. Springer-Verlag, New York 2004; 102-109.
7. Goldstraw P. Staging manual in thoracic oncology. IASLC 2009. Dostępne na: <https://umfiasi2015.files.wordpress.com/2013/03/pulmon-iaslc-manual.pdf>.
8. Werner M, Chott A, Fabiano A, et al. Effect of formalin fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 1016-1019.
9. Leong TYM, Cooper K, Leong A. Immunohistology – past, present, and future. *Adv Anat Pathol* 2010; 17: 404-441.

STANDARDY POSTĘPOWANIA Z MATERIAŁEM CYTOLOGICZNYM UZYSKANYM OD CHORYCH NA NOWOTWORY PŁUCA

LECH CHYCZEWSKI

1. Uwagi ogólne

W obecnej dobie diagnostyka patomorfologiczna, w tym cytologiczna, ewoluuje w kierunku pobierania możliwie jak najmniejszej ilości materiału tkankowego, przy minimalnej traumatyzacji chorego. Patomorfolog na podstawie tego minimalnego materiału powinien, obok klasycznego rozpoznania określającego możliwe dokładnie typ nowotworu, odpowiednio zabezpieczyć ten materiał do dalszych badań. Badania te obejmują opracowanie materiału metodami immunohistochemicznymi (IHC) lub immunocytochemicznymi (ICC), genetyczno-molekularnymi opartymi na hybrydyzacji *in situ* (FISH, CISH), klasycznymi metodami genetyczno-molekularnymi opartymi na izolacji z materiału komórkowego DNA/RNA i dalszego opracowania technikami PCR. Potrzeby te wynikają z pojawienia się nowych strategii leczenia onkologicznego (leczenie spersonalizowane). W związku z tym u chorych na raka płuca typu gruczolowego, wielkomórkowego

i nieokreślonego (NOS) materiał tkankowy przesłany do badań histologicznych i cytologicznych powinien także służyć do określenia statusu genetyczno-molekularnego genu *EGFR* (mutacje aktywujące eksonów 18–22), genu *ALK* (rearanzacje) i ewentualnie genu *K-Ras*. Z powyższych uwag wynikają dla patologa następujące wyzwania:

- postępowanie laboratoryjne z uzyskanym do badań materiałem powinno być niezwykle oszczędzające („szanowanie materiału”),
- sposób utrwalania i obróbki materiału powinien uwzględniać nie tylko wymogi narzucone przez rutynową diagnostykę morfologiczną, lecz także wymogi badań dodatkowych (IHC/ICC i badań genetyczno-molekularnych).

Istotnymi czynnikami leżącymi u podstaw sukcesu tych badań są czas i sposób utrwalania materiału biologicznego, dobór odpowiedniego utrwalacza i metody obróbki materiału. Najtańszym i akceptowalnym utrwalaczem jest roztwór zbuforowanej formaliny

(praktyczny sposób przygotowania takiego roztworu zamieszczono w dalszej części niniejszego opracowania). Jednak utrwalacze sporządzone na bazie alkoholu wydają się najkorzystniejsze do badań genetyczno-molekularnych.

2. Najczęstszy sposób i źródło uzyskania materiału cytologicznego

1. Materiał pobrany z oskrzela podczas rutynowej bronchofiberoskopii:
 - wycinki (do badań histopatologicznych),
 - wydzielina oskrzelowa,
 - popłuczyny oskrzelowe,
 - materiał pobrany szczoteczką,
 - BAL (płukanie oskrzelikowo-pęcherzykowe).
2. Materiał pobrany bezpośrednio z guza i/lub węzłów chłonnych śródpiersiowych w wyniku bronchofiberoskopii z nakłuciem poprzez ścianę oskrzela pod kontrolą USG (EBUS) lub ścianę przełyku (EUS).
3. Materiał pobrany w wyniku transtorakalnej biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej pod kontrolą tomografii komputerowej lub USG.
4. Materiał pobrany w wyniku biopsji cienkoigłowej węzłów chłonnych obwodowych (podobojczykowych, szyjnych, pachowych i innych) oraz z narządów podejrzanych o przerzuty nowotworowe.
5. Płyn wysiękowy pobrany z jamy opłucnowej poprzez nakłucie transtorakalne grubą igłą.
6. Płwocina pobrana po uprzedniej inhalacji chorego roztworem soli fizjologicznej (obecnie procedura stosowana rzadziej).

3. Metody laboratoryjnego postępowania z materiałem cytologicznym

Rozmazy bezpośrednie (wykonywane najlepiej na szkiełkach silanizowanych, bezpośrednio z pobranego materiału i utrwalane na szkiełkach). Są najczęściej stosowaną, rutynową techniką postępowania z materiałem cytologicznym pobieranym techniką aspiracyjną przy użyciu cienkiej igły oraz w technikach EBUS/EUS. Wskazane jest, żeby rozmazy te wykonywał patolog bądź doświadczona лаборantka, która powinna asystować przy wykonywaniu procedury pobierania materiału. Zapewnia to właściwe wykonanie i utrwalenie rozmazów.

Zalety tej procedury to: szybkość wykonania i diagnozy, nieobciążanie dodatkowymi kosztami, uzyskanie dobrego obrazu detali komórek, możliwość wykonania ICC (na niezabarwionych bądź odbarwionych preparatach) oraz badań genetyczno-molekularnych.

Wady to: ręczna obróbka, wykonanie wielu rozmazów (w niektórych przypadkach ponad 20), „brudne” tło, obecność samych jąder komórkowych pozbawionych cytoplazmy, możliwość przesuszenia

komórek, czasami konieczność stosowania mikrodysekcji w celu wzbogacenia ilości komórek nowotworowych do badań genetyczno-molekularnych.

Rozmazy przy użyciu cytowirówki – optymalna, rutynowo stosowana metoda do sporządzenia rozmazów z płynów wysiękowych jamy opłucnowej i torbieli. Przy większej objętości płynu można wykonać więcej rozmazów. Utrwalanie alkoholem bądź suszenie preparatów na powietrzu. Preparaty nadają się do badań techniką FISH, a także do technik izolacji DNA i PCR.

Wady: duże zagęszczenie komórek, co może mieć ujemne implikacje w diagnostyce (nakładanie się komórek) oraz w przypadku technik ICC, a także techniki hybrydyzacji *in situ*.

Cytobloki – mogą być komplementarną metodą stosowaną przy innych metodach cytologicznych. Jest to metoda polegająca na zatopieniu osadu komórkowego w bloczki parafinowe. Dzięki temu, po zastosowaniu typowych metod histologicznej obróbki wraz ze skrawaniem przy użyciu mikrotonu, można uzyskać preparaty barwione rutynowo hematoksyliną i eozyną, jak również skrawki na badania dodatkowe. Zaletami cytooblocków są: możliwość skrojenia licznych skrawków, zachowanie pewnych elementów architektury guza, możliwość archiwizacji do dalszych opracowań, łatwość wykonania badań, w tym badań kontrolnych przy stosowaniu metod ICC, uzyskanie porównywalnych i optymalnych wyników badań genetyczno-molekularnych. Wady to: wydłużony czas badania, nie zawsze porównywalne wyniki stosowanych barwień przy używaniu różnych utrwalaczy, przekroje komórek na różnych poziomach – nie zawsze widoczne jądro i jąderko (ważne w technikach genetyczno-molekularnych *in situ*). Metoda ta, jako przydatna, powinna być stosowana rutynowo. Poniżej została omówiona szerzej.

Cytologia płynna (liquid-based cytology – LBC). Nie jest w powszechnym użyciu, ponieważ wymaga posiadania dość drogiego aparatu. Jej zaletą jest zautomatyzowanie procesu wykonania rozmazu z pozbyciem się zbędnych elementów (krew, śluz), dzięki czemu uzyskujemy „czysty” obraz rozmazu. Inne zalety to łatwość transportu, zbierania materiału do badań i wykonania rozmazów. Komórki na szkiełku tworzą pojedynczą warstwę, co ułatwia interpretację badań ICC, szczególnie zaś badań metodą FISH i innych badań genetyczno-molekularnych. Niewątpliwą zaletą jest zredukowane pole do analizy mikroskopowej (oszczędność czasu patomorfologa). Wadami metody są: dość mała „komórkowość” preparatu, obkurczenie komórek (w metodzie jako utrwalacza używa się przeważnie metanolu), brak elementów architektury, brak informacji na temat wyników badań przy zastosowaniu niektórych przeciwciał (nie wszystkie przeciwciała zbadano przy zastosowaniu tej stosunkowo nowej i wchodzącej do użytku metody).

4. Techniki sporządzania cytobloków

Do sporządzenia cytobloku (CB) mogą posłużyć: płyn z jamy opłucnowej, materiał cytologiczny pobrany przy nakłuciu cienką igłą poprzez ścianę klatki piersiowej, ścianę oskrzela bądź przez ścianę przelyku, popłuczyny oskrzelowe, materiał pobrany szczoteczką i inne. Przed sporządzeniem cytobloku materiał cytologiczny powinien być wstępnie oceniony pod kątem komórkowości w rozmazie bezpośrednim wykonanym prostą, rutynową metodą. Materiał z cienkiej igły może zawierać fragmenty tkanki, konglomeraty komórek nowotworowych i pojedyncze komórki. Jest to wysoce efektywna i bardzo przydatna metoda wykrywania komórek nowotworowych. Jeżeli rutynowa metoda sporządzenia rozmazu jest niewydolna, to odpowiedź diagnostyczną można nierzadko uzyskać na podstawie badania cytobloku. Dzięki temu unika się procedury ponownego pobierania materiału, traumatyzowania chorego i mnożenia kosztów. Dodatkowo informacje, jakie można uzyskać z badania cytobloku, ocenia się na 15–55% przypadków. Cytoblok, przy pozyskaniu materiału cienką igłą, zwiększa możliwość rozpoznania komórek nowotworowych w powiązaniu z cytologią rutynową nawet o 10%.

Cytobloki można wykonać w sposób niezwykle prosty bądź też przy użyciu bardziej zaawansowanych metod, a nawet w systemie w pełni zautomatyzowanym (Cellient™ CB). Podstawowymi etapami obróbki materiału jest jego utrwalenie, odwirowanie, przeprowadzenie i przeniesienie do parafiny. Problemem jest zastosowanie odpowiedniego utrwalacza i stworzenie środowiska, w którym osad zachowałby integrację. W systemach automatycznych stosowane są utrwalacze alkoholowe (metanol i etanol w LBC i metanol w automatycznym systemie cytobloków). Alkohol pozwala na zachowanie kwasów nukleinowych o wysokiej jakości. Utrwalanie w zbuforowanym roztworze formaliny jest mniej polecane z uwagi na fragmentację i denaturację DNA, a także gorsze zachowanie morfologicznych szczegółów jądra. Substancje najczęściej używane jako środowisko, które pozwala na utrzymanie integracji osadu (spajają komórki), to plazma z trombiną lub agar.

Poniżej podano krótką charakterystykę stosowanych metod.

Prosta sedymentacja – najwcześniej stosowana metoda, obarczona ryzykiem dużych strat komórek. Osad utrwała się, przeprowadza technikami histologicznymi, zatapia w parafinie w próbówce.

Metoda płukania igły aspiracyjnej solą fizjologiczną – materiał cytologiczny z igły aspiracyjnej wypłukuje się 30–40 ml soli fizjologicznej lub medium RPMI (medium stosowane w hodowlach komórkowych, pozwala na dłuższe przetrzymywanie komórek bez ich destrukcji), po czym zawiesinę komórek należy odwirować (przy stosowaniu soli fizjologicznej

bezpośrednio po wypłukaniu materiału z igły). Przy zastosowaniu soli fizjologicznej zawiesinę, przed wykonaniem cytobloku, można użyć do celów badań metodą cytometrii przepływowej bądź do badań mikrobiologicznych. Alternatywnie płukanie można przeprowadzić zbuforowanym roztworem formaliny bądź 50-procentowym roztworem etanolu. Po odwirowaniu osad należy zintegrować przy użyciu agaru bądź plazmy z trombiną, po czym utrwalić i przeprowadzić rutynowymi technikami histologicznymi do zatopienia w parafinie. Metoda ta jest powszechnie używana, łatwa w wykonaniu i szybka. Daje dobre wyniki w badaniach metodami ICC i genetyczno-molekularnymi.

Metoda wytworzenia skrzepu w aspiracyjnej igle (*tissue coagulum clot* – TCC) – w metodzie tej nie płucze się igły aspiracyjnej z zawartością materiału cytologicznego, pozwalając na wytworzenie skrzepu z materiału cytologicznego będącego mieszaniną zaaspirowanych komórek nowotworowych i krwi. Skrzep usuwa się z cylindra igły na filtracyjną bibułę, nieco podusza (krótco, aby zachować morfologię komórek), po czym umieszcza w pojemniku z roztworem zbuforowanej formaliny. Następnie materiał jest przeprowadzany rutynowo do kostki parafinowej. Zaletą tej metody jest zachowanie wszystkich komórek. Uzyskuje się także dobre rezultaty w badaniach ICC. W laboratorium autorów czasami skrzep usuwany jest z igły i doprowadzany do cytobloku, niezależnie od materiału płynnego, z którego wykonywane są bezpośrednie rozmazy. W niektórych przypadkach właśnie w skrzepie, a nie w rozmazach znajdują się komórki nowotworowe.

Metoda wytworzenia skrzepu przy użyciu plazmy z trombiną lub przy udziale samej trombiny – do odwirowanego osadu dodajemy plazmy z trombiną bądź samą trombinę. Aby nie doszło do wytworzenia zlepek (agregatów) komórek, poleca się wstrząsać probówkę z zawartością. Po wytworzeniu skrzepu należy go potraktować rutynowymi metodami histologicznymi. Zalety tej metody to: prostota w wykonaniu, niski koszt, dostępność odczynników, optymalne zachowanie morfologii komórek, możliwość wykonania dalszych badań (ICC i badań genetyczno-molekularnych).

Metody zatapiania komórek w agarze, koloidalnej torebce oraz innych mediach – do zatopienia komórek w celu zapobieżenia dezintegracji osadu stosowane są także takie media, jak agar, HistoGel™, żelująca albumina, kolodium, pre-żelujący krochmal, pianka żelatynowa, pianka alkoholu poliwinylowego oraz inne. Ogólne zasady postępowania z zatopionym w tych mediach materiałem są podobne do opisanych powyżej. W przypadku skąpego materiału poleca się stosowanie koloidalnych torebek (z nitrocelulozy). Torebka jest wytwarzana z płynnej nitrocelulozy na wewnętrznych ściankach stożkowej próbówki, przy-

mując jej kształt. Po wirowaniu zagęszczony osad komórkowy znajduje się w stożku. Po wyjęciu torebki, odcina się jej stożkowaty koniec z zawartością i przeprowadza w sposób rutynowy. Zaletą tej metody jest skoncentrowanie komórek w mniejszej objętości.

Metoda Shandon™ Cytoblock™ – metoda oparta na wirowaniu materiału w cytowirówce (Thermo Shandon Cytospin) przy użyciu specjalnych kasetek do cytobloków i odczynników zgrupowanych w zestawie (kit). Jest mało informacji na temat wydolności tej metody w badaniach ICC i genetyczno-molekularnych. Wadą są podwyższone koszty.

Metoda Cellient™ – jest pierwszym w pełni zautomatyzowanym systemem do uzyskiwania cytobloków. W metodzie tej w materiale identyfikowane są drobne fragmenty tkanki i automatycznie przenoszone do zautomatyzowanej obróbki histologicznej (doprowadzane do kostki parafinowej). Proces ten trwa zaledwie niecałą godzinę. Technika oparta jest na filtracji z zastosowaniem próżni. Do utrwalania materiału stosowany jest metanol, co może dawać błędnie pozytywne rezultaty przy stosowaniu barwienia ICC na obecność receptora progesteronowego, o czym należy pamiętać. Poza tym system daje doskonałe rezultaty w pozostałych technikach zarówno ICC, jak i genetyczno-molekularnych. Uzyskuje się jednolicie rozłożone komórki, z doskonale zachowanymi detalami jądra i cytoplazmy, przy minimalnych stratach ilości komórek. Zaletą jest pełna automatyka i krótki czas uzyskania kostki parafinowej. Wadą jest wysoka cena aparatury i odczynników.

Rola techniki cytobloków w badaniach metodami ICC i genetyczno-molekularnymi – technika cytobloków daje możliwość, obok rutynowego, podstawowego badania cytologicznego, dalszych badań materiału, np. metodami ICC i genetyczno-molekularnymi. Stąd też powinna być wprowadzona do rutynowych procedur morfologicznego opracowania materiału cytologicznego. W wielu przypadkach dotarcie do guza nowotworowego jest możliwe jedynie poprzez zastosowanie technik biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej bądź rozpoznanie opiera się na badaniu cytologicznym materiału pobranego z płynu z jamy ciała. Wówczas technika cytobloku jest szczególnie przydatna w ustaleniu szczegółowego rozpoznania przy zastosowaniu odpowiedniego panelu przeciwciał w badaniach ICC i badań genetyczno-molekularnych. Odnosi się to szczególnie do materiału uzyskanego w wyniku procedury EBUS-TBNA. Sporządzenie cytobloku i zastosowanie odpowiedniego panelu przeciwciał w badaniach ICC pozwala wówczas w ponad 97% na postawienie dokładnej diagnozy zarówno morfologicznej, jak i genetyczno-molekularnej. Ocenia się, że w przypadku braku cytobloku rozpoznanie na podstawie samego rozmazu cytologicznego można sprecyzować jedynie w 44% przypadków. Badania wykazują także,

że połączenie metod konwencjonalnych rozmazów cytologicznych z techniką płynnej biopsji (LBC) i cytoblokiem poprawia czułość procedury EBUS-TBNA w ocenie stopnia zaawansowania raka płuca (*staging*). Cytoblok pozwala także zwiększyć odsetek (do 60%) przypadków oznaczeń molekularno-genetycznych genu *EGFR* w materiale cytologicznym dyskwalifikowanym z powodu małej liczby komórek. Do badań genetyczno-molekularnych genu *EGFR* powinno się kwalifikować materiał cytologiczny, który zawiera 20–70% komórek nowotworowych i nie mniej niż 100 komórek nowotworowych. Jeżeli tych komórek jest mniej niż 20%, wówczas wskazana jest mikrodyssekcja w celu wzbogacenia materiału przeznaczonego do badań genetyczno-molekularnych. Do badań genu *K-RAS* i *ALK* preferowane są rozmazy bezpośrednie, rozmazy z cytowirówki i LBC. Uważa się, że do tych oznaczeń wystarczy obecność w rozmazie nawet 5% komórek nowotworowych. Kwalifikacji materiału cytologicznego do badań genetyczno-molekularnych powinien bezwzględnie dokonać wykwalifikowany patolog.

W podsumowaniu należy jeszcze raz podkreślić, że w oznaczeniach genetyczno-molekularnych prowadzonych na materiale cytologicznym ważny jest sposób utrwalania materiału (preferowany utrwalacz alkoholowy), dostateczna ilość komórek nowotworowych, w miarę duża homogenność materiału, jak również udział patologa w kwalifikacji materiału.

Przepis na wykonanie roztworu formaliny zbuforowanej (wg DAKO):

- 100 ml formaliny 39%,
 - 6,5 g Na_2HPO_4 ,
 - 4,5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$.
- Odczynniki zmieszać i uzupełnić do 1 dcl H_2O .

Piśmiennictwo

1. Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, et al. Mutational analysis in cytological specimens of advanced lung adenocarcinoma: a sensitive method for molecular diagnosis. *J Thorac Oncol* 2007; 2: 1086-1090.
2. Betz BL, Dixon CA, Weigelin HC, et al. The use of stained cytologic direct smears for ALK gene rearrangement analysis of lung adenocarcinoma. *Cancer Cytopathol* 2013; 121: 489-499.
3. Collins BT. Endobronchial ultrasound fine – needle aspiration biopsy of pulmonary non-small cell carcinoma with subclassification by immunohistochemistry panel. *Cancer Cytopathol* 2013; 121: 146-154.
4. Crapanzano JP, Heymann JJ, Monaco S, et al. The state of cell block variation and satisfaction in the era of molecular diagnostics and personalized medicine. *CytoJournal* 2014; 11: 7.
5. Dacic S. Molecular genetic testing for lung adenocarcinomas: a practical approach to clinically relevant mutations and translocations. *J Clin Pathol* 2013; 66: 870-874.
6. Esterbrook G, Anathhanam S, Plant PK. Adequacy of endobronchial ultrasound transbronchial needle aspiration samples in the subtyping of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2013; 80: 30-34.

7. Fatima N, Cohen C, Lawson D, et al. TTF-1 and Napsin A double stain: a useful marker for diagnosing lung adenocarcinoma on fine – needle aspiration cell blocks. *Cancer Cytopathol* 2011; 119: 127-133.
8. Gauchotte G, Vignaud JM, Menard O, et al. A combination of smears and cell block preparations provides high diagnostic accuracy for endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration. *Virchows Arch* 2012; 461: 505-512.
9. Jain D, Mathur SR, Iyer VK. Cell blocks in cytopathology: a review of Preparative methods, utility in diagnosis and role in ancillary studies. *Cytopathology* 2014; 25: 356-371.
10. Kalhor N, Wistuba II. Perfecting the fine – needle aspirate cell block. *Cancer Cytopathol* 2013; 121: 109-110.
11. Loo PS, Thomas SC, Nicolson MC, Fyfe MN, Kerr KM. Subtyping of undifferentiated non- small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 442-447.
12. Loukeris K, Vazquez MF, Sica G, et al. Cytological cell blocks: predictors of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma subtypes. *Diagn Cytopathol* 2012; 40: 380-387.
13. Mitiushkina NV, Iyevleva AG, Poltoratskiy AN, et al. Detection of EGFR mutations and EML4 – ALK rearrangements in lung adenocarcinomas using archived cytological slides. *Cancer Cytopathol* 2013; 121: 370-376.
14. Righi L, Graziano P, Fornari A, et al. Immunohistochemical subtyping of nonsmall cell lung cancer not otherwise specified in fine – needle aspiration cytology: a retrospective study of 103 cases with surgical correlation. *Cancer* 2011; 117: 4316-4323.
15. Sanz-Santos J, Serra P, Andreo F, et al. Contribution of cell blocks obtained through endobronchial ultrasound – guided transbronchial needle aspiration to the diagnosis of lung cancer. *BMC Cancer* 2012; 12: 34.
16. Smouse JH, Cibas ES, Janne PA, et al. EGFR mutations are detected comparably in cytologic and surgical pathology specimens of nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2009; 117: 67-72.
17. Wallace WA, Rassi DM. Accuracy of cell typing in nonsmall cell lung cancer by EBUS/EUS – FNA cytological samples. *Eur Respir J* 2011; 38: 911-917.