Rozpoznawanie i czynniki rokownicze w nowotworach melanocytarnych u psów i kotów. Część I. Czerniaki jamy ustnej

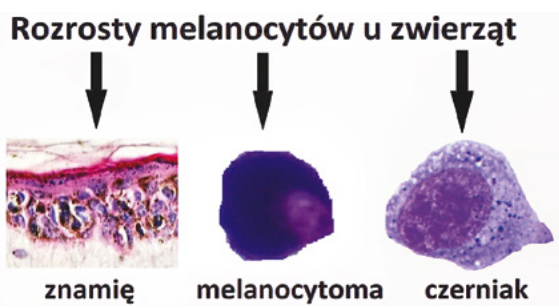
Katarzyna Kliczkowska-Klarowicz, Rafał Sapierzyński

z Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Nowotwory melanocytarne wywodzą się z melanocytów lub melanoblastów– komórek pochodzenia neuroektodermalnego znajdujących się w warstwie podstawnej nabłonka i produkujących barwnik – melaninę. W onkologii weterynaryjnej istnieją nieścisłości co do nazewnictwa nowotworów pochodzenia melanocytarnego u zwierząt, które wymaga ujednolicenia. Według klasyfikacji nowotworów melanocytarnych u zwierząt WHO mianem czerniaka określa się nowotwór złośliwy pochodzenia melanocytarnego (*melanoma*, *melanosarcoma*, *melanoma malignum*), natomiast nowotwór będący jego niezłośliwym odpowiednikiem określa się mianem melanocytoma (*melanocytoma*; 1). Zastosowanie takiego nazewnictwa u zwierząt wydaje się zasadne w przypadku nowotworów melanocytarnych skóry, które mogą wykazywać zarówno złośliwy, jak i niezłośliwy charakter biologiczny (2). Z kolei, z uwagi na fakt, że praktycznie wszystkie nowotwory melanocytarne jamy ustnej (nawet te histologicznie „niezłośliwe") mają potencjał złośliwości, zasadne wydaje się ich klasyfikowanie jako czerniaki o niskiej lub wysokiej złośliwości (patrz dalej; 3). Rycina 1 obrazuje schematycznie klasyfikację rozrostów komórek tkanki barwnikotwórczej u zwierząt.

W diagnostyce rozrostów melanocytarnych u zwierząt należy też uwzględnić **znamiona barwnikowe** oraz plamy soczewicowe, które są ogniskową lub wieloogniskową, nienowotworową proliferacją melanocytów zlokalizowanych w naskórku, skórze właściwej lub w obu tych lokalizacjach jednocześnie. Znamiona barwnikowe występują najczęściej na skórze brzucha lub gruczołu sutkowego u suk (ryc. 2A) oraz w obrębie powiek, warg i płytki nosowej u kotów (szczególnie rudych, trikolor i niebieskich; ryc. 2B).

Zachowanie biologiczne nowotworów melanocytarnych u psów, a co za tym idzie rokowanie ma ścisły związek z lokalizacją guza, dlatego opracowano



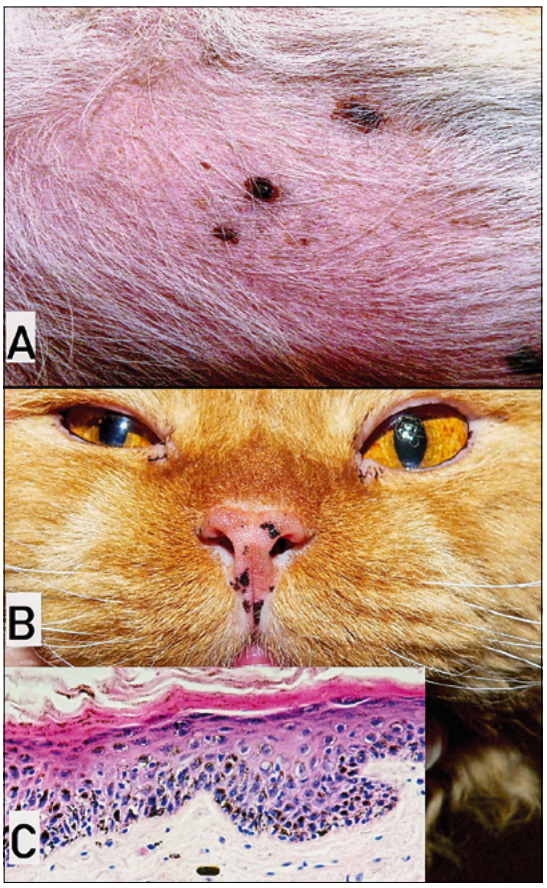
Ryc. 1. Schemat obrazujący klasyfikację rozrostów melanocytarnych u zwierząt: znamiona są nienowotworowymi rozrostami melanocytów, melanocytomy niezłośliwymi, a czerniaki złośliwymi nowotworami tych komórek

Diagnosis and prognostic factors in melanotic tumors in dogs and cats. Part 1. Oral melanomas

Kliczkowska-Klarowicz K., **Sapierzyński R.**, Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

This article aims at the presentation of melanotic tumors in companion animals. Melanocytic neoplasms are common in dogs and uncommon in cats. Oral melanoma is the most common oral malignant neoplasm in dogs. Melanotic tumors behavior depends on their location – oral tumors have in most cases aggressive biological behavior and skin tumors are considered to be more benign. In both, skin and oral melanotic neoplasms, there are some exceptions which behave in a different way. Histopathology is crucial in making proper diagnosis of melanoma but also enables to predict biological behavior of the tumor. The most important prognostic factors are: mitotic count (MC), nuclear atypia and expression of Ki67 protein.

Keywords: dog, cat, melanotic neoplasms, oral melanoma, melanocytoma, melanoma, malignant melanoma, prognosis.



Ryc. 2. Przykłady znamion melanocytarnych u zwierząt. Na ryc. A widoczne znamiona barwnikowe na skórze brzucha u suki, na ryc. B znamiona barwnikowe (plamy soczewicowe) na nosie i brzegach powiek u rudego kota. Ryc. C przedstawia obraz histopatologiczny takich znamion – widoczny rozrost melanocytów w obrębie naskórka; barwienie hematoksylina-eozyna, powiększenie 200×

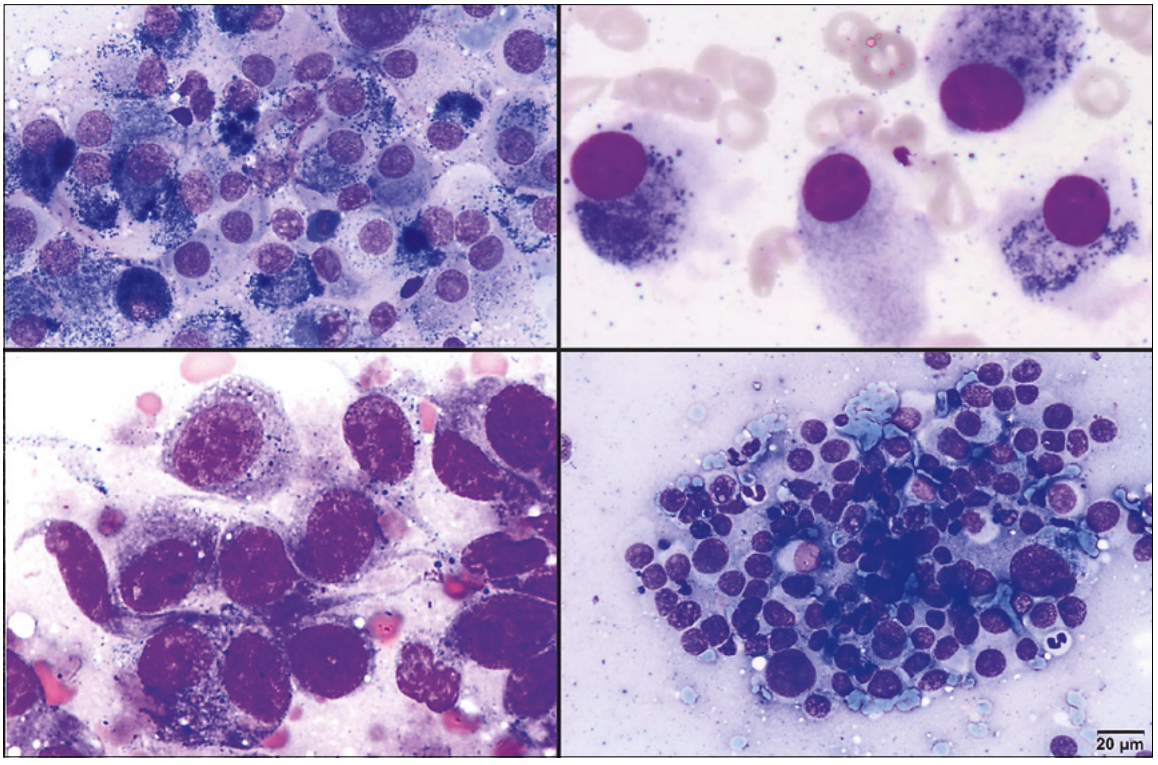
odmienne kryteria diagnostyczno-klasyfikacyjne tych nowotworów zależnie od miejsca wzrostu guza. Cytując najnowsze wydanie podręcznika patologii onkologicznej, nowotwory melanocytarne u psów dzieli się na guzy jamy ustnej, które stanowią ponad połowę tego rodzaju zmian, guzy skóry (mniej niż połowa nowotworów melanocytarnych u psów) oraz guzy gałki ocznej, dla których istnieją oddzielne systemy rozpoznawania i klasyfikacji (2, 3). Nowotwory melanocytarne jamy ustnej z zasady rokują gorzej niż zlokalizowane w skórze, nie należy jednak zapominać, że lokalizacja jest tylko jednym z czynników, które należy brać pod uwagę w ustalaniu rokowania. Zarówno w jamie ustnej, jak i w skórze pojawiają się guzy o zachowaniu biologicznym odmiennym od „typowego" i jako wyjątki od reguły mogą stanowić wyzwanie diagnostyczne zarówno dla lekarza prowadzącego, jak i patologa. Niniejszy cykl artykułów omawia czynniki istotne podczas ustalania rozpoznania dla nowotworów melanocytarnych w poszczególnych lokalizacjach.

Rozpoznawanie nowotworów melanocytarnych u psów i kotów

Badanie cytologiczne

Pierwszym etapem w rozpoznaniu czerniaka jest badanie cytologiczne materiału pobranego metodą biopsji cienkoigłowej z aspiracją lub bez aspiracji w przypadku, gdy guz jest dobrze unaczyniony i silnie krwawi. Badanie cytologiczne można również wykonać, oceniając preparat odciskowy z powierzchni guza, jednak w przypadku zastosowania tej techniki pobrania materiału wynik nie jest zazwyczaj diagnostyczny. Sedacja pacjenta nie zawsze jest konieczna, chociaż zdecydowanie poprawia komfort wykonania biopsji w przypadku guzów jamy ustnej. Komórki czerniaka, zależnie od podtypu morfologicznego guza, mogą mieć kształt nabłonkowaty, mezenchymalny (wrzecionowaty, mięsakowaty), zdarzają się też formy mieszane (nabłonkowato-mezenchymalne). Jądra komórkowe mogą mieć różny kształt (okrągły, owalny, wielokątny), mogą być olbrzymie (makrokarioza) i zazwyczaj wykazują anizokariozę (różna wielkość jąder komórkowych). Jąderka często są wyraźnie widoczne, o nieregularnym kształcie, duże (często o średnicy zbliżonej lub większej od średnicy erytrocytów) i mogą być mnogie. Figury mitotyczne mogą być liczne i atypowe. Aktywność barwnikotwórcza bywa różna – ziarna melaniny mogą być liczne, często nierównomiernie rozmieszczone w cytoplazmie, a w przypadku czerniaków amelanotycznych są nieobecne. Przykładowe obrazy cytologiczne czerniaków u psów zaprezentowano na ryc. 3.

W sytuacji, gdy komórki nowotworowe w ogóle nie produkują melaniny i nie da się wykazać obecności barwnika w komórkach nowotworowych, aby odróżnić czerniaki amelanotyczne od mięsaków lub nisko zróżnicowanych raków, należy wykonać barwienie immunocytochemiczne (barwienie rozmazów cytologicznych) z użyciem panelu przeciwciał wykrywających ekspresję: MelanA, wimentyny oraz cytokeratyny. Komórki czerniaka wykazują ekspresję dwóch pierwszych antygenów, natomiast nie powinny wykazywać immunoekspresji cytokeratyny. Możliwe jest też wykonanie barwienia na obecność jedynie MelanA (ryc. 4), co zmniejsza koszty badania. W badaniach własnych obejmujących 38 amelanotycznych złośliwych guzów jamy ustnej u psów (czerniaki amelanotyczne, nisko zróżnicowane mięsaki oraz raki) aż 1/3 czerniaków amelanotycznych została poprawnie zdiagnozowana dopiero po zastosowaniu immunocytochemii (4). Należy zaznaczyć, że różnorodność morfologiczna komórek



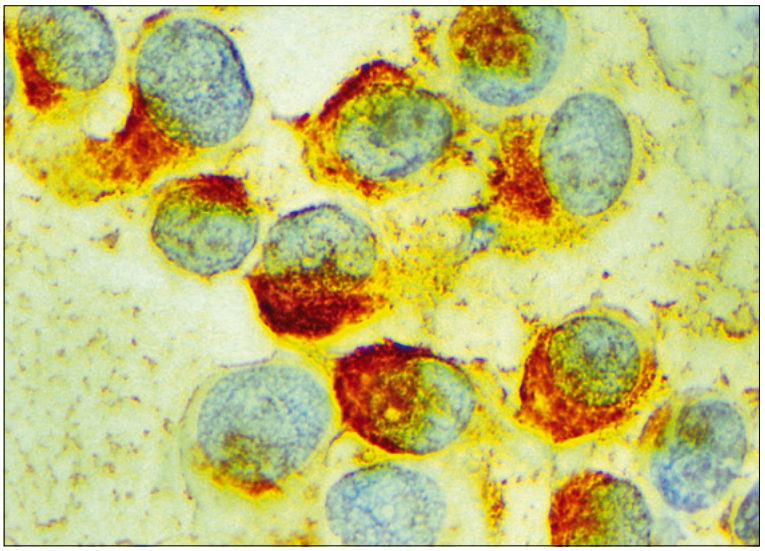
Ryc. 3. Przykłady obrazów cytologicznych czerniaków (opisy w tekście). Barwienie odczynnikiem Giemsy

w obrębie guzów melanocytarnych często bywa znaczna i z tego powodu w badaniu cytologicznym nie można nigdy wykluczyć złośliwego charakteru zmiany. Chociaż według Munday i wsp (2) badanie cytologiczne nie powinno być badaniem, na podstawie którego ocenia się rokowanie w przypadku czerniaków jamy ustnej, to wydaje się, że rozpoznanie czerniaka, którego komórki wykazują cytologiczne cechy wysokiej złośliwości, upoważnia do podejrzewania wysokiej agresywności guza, szczególnie gdy komórki nowotworowe stwierdza się też w regionalnych węzłach chłonnych.

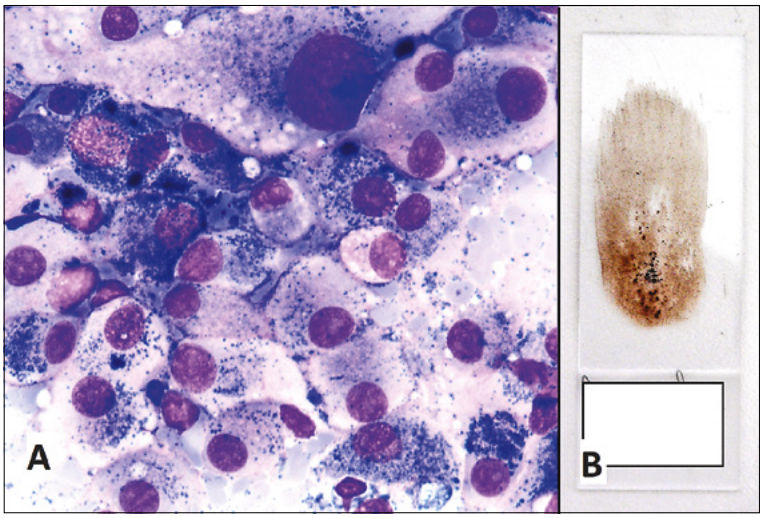
Jeżeli guzom towarzyszy powiększenie regionalnych węzłów chłonnych, to z nich również należy pobrać materiał do badania cytologicznego. U części pacjentów z czerniakiem przerzuty nie pojawiają się w węźle regionalnym, ale w innych bardziej oddalonych węzłach, dlatego też badaniu klinicznemu należy poddać wszystkie węzły dostępne do oceny i z każdego powiększonego pobrać materiał cytologiczny (ryc. 5). Podczas badania cytologicznego materiału pobranego z powiększonych węzłów chłonnych od pacjenta z czerniakiem należy zachować daleko idącą ostrożność. W jednym z badań obejmujących węzły chłonne żuchwowe psów z czerniakiem jamy ustnej rozpoznanie fałszywie dodatnie uzyskano w 2/4 przypadki (badaniem cytologicznym rozpoznano czerniaka pomimo rzeczywistego braku tego nowotworu w badanym węźle). Może to wynikać z faktu, że oceniający rozmaz cytolog za komórki czerniaka uznał melanofory, czyli makrofagi obładowane ziarnami melaniny – melanofory mogą się dostać z miąższu guza lub tkanek otaczających guz do regionalnego węzła chłonnego drogą naczyń chłonnych (ryc. 6; 5). W takich przypadkach z pomocą przyjść może badanie immunocytochemiczne. W badaniach własnych, dzięki zastosowaniu barwienia immunohistochemicznego z zastosowaniem przeciwciał anty-MelanA udało się potwierdzić melanocytarne pochodzenie komórek przerzutów do węzłów chłonnych u psów z nisko zróżnicowanym złośliwym nowotworem jamy ustnej w 6 badanych przypadkach, przy czym w 2 z tych przypadków rutynowe badanie cytologiczne (oceniano rozmazy zabarwione odczynnikiem Giemsy) nie dało jednoznacznej odpowiedzi odnośnie do typu histologicznego nowotworu (4).

Badanie histopatologiczne

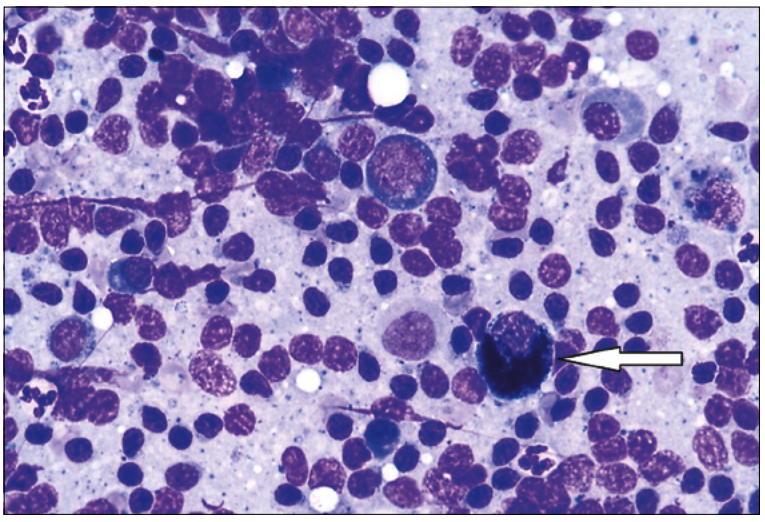
Materiałem do badania w przypadku podejrzenia czerniaka mogą być bioptaty tru-cut, małe wycinki guza lub cały guz usunięty chirurgicznie. W przypadku melanocytomy i dobrze zróżnicowanych czerniaków ustalenie melanocytarnego pochodzenia guza w badaniu mikroskopowym zazwyczaj nie nastręcza trudności, bowiem komórki nowotworowe najczęściej zawierają w swojej cytoplazmie ziarna melaniny (ryc. 7).



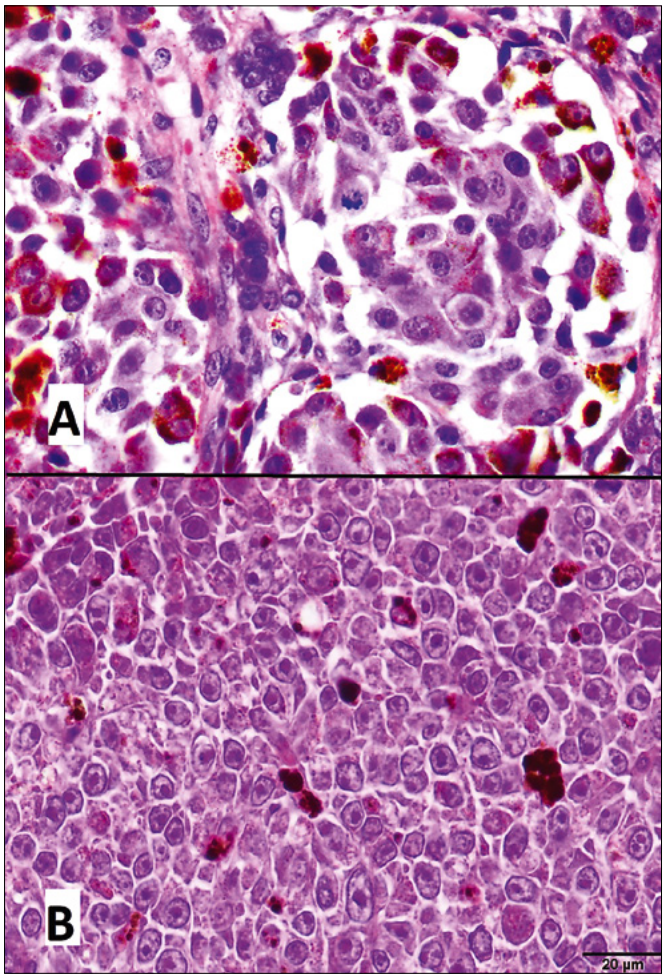
Ryc. 4. Obraz mikroskopowy dodatniej reakcji immunocytochemicznej z przeciwciałem wykrywającym antygen MelanA (brązowa barwa cytoplazmy) w cytoplazmie komórek nisko różnicowanego czerniaka amelanotycznego. Materiał pobrano metodą BAC z guza jamy ustnej, barwienie immunocytochemiczne, powiększenie 400×



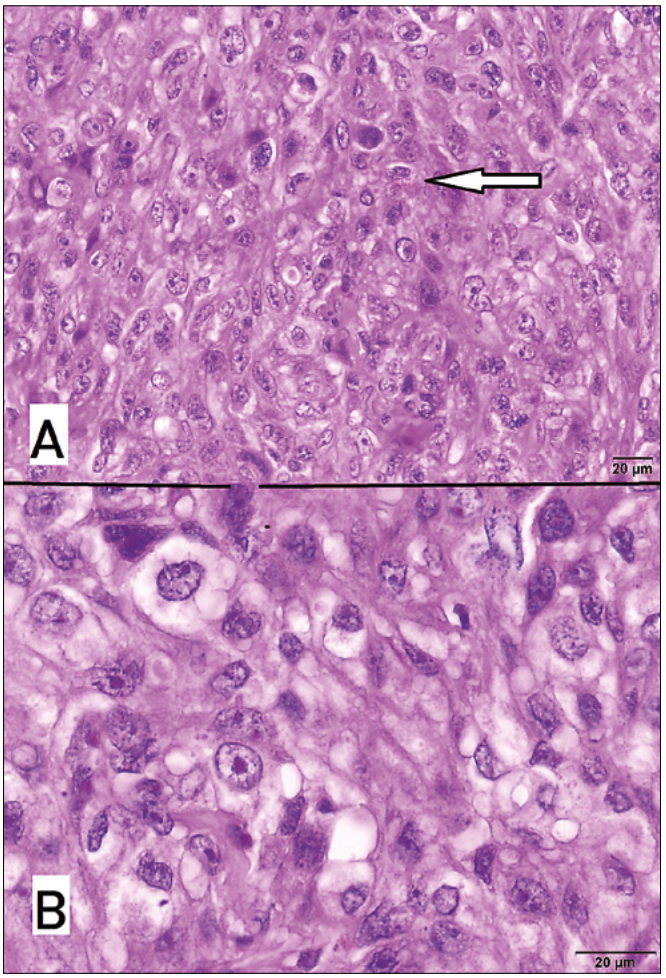
Ryc. 5. Przypadek przerzutu czerniaka jamy ustnej do węzła chłonnego żuchwowego psa. Na ryc. A widoczne komórki nowotworowe ze znacznym pleomorfizmem komórkowym i anizokariozą oraz granatowymi ziarnistościami cytoplazmatycznymi; barwienie odczynnikiem Giemsy, powiększenie 200×. Na ryc. B niezabarwiony rozmaz cytologiczny tego przypadku – widoczne jest brązowe zabarwienie rozmazu wynikające z dużej ilości melaniny w próbce



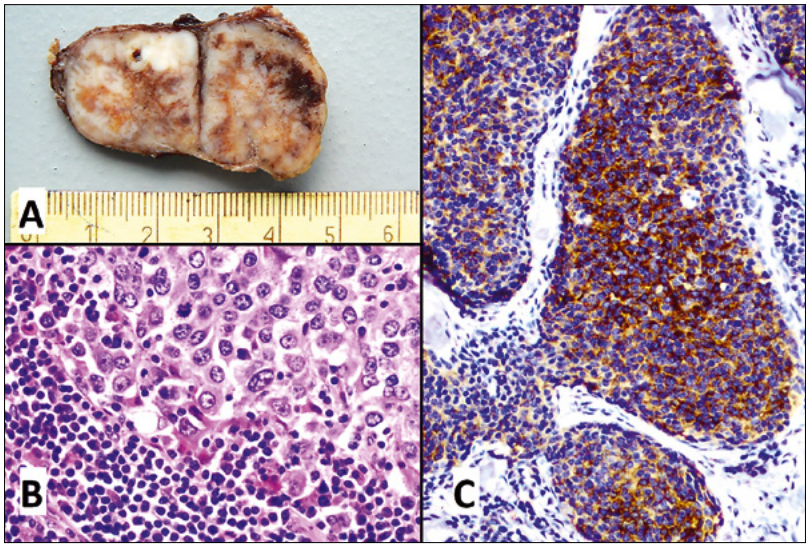
Ryc. 6. Obraz cytologiczny materiału pobranego drogą BAC z powiększonego węzła chłonnego żuchwowego od psa z czerniakiem jamy ustnej – widoczna jest populacja komórek limfoidalnych różnej wielkości oraz jeden melanofor (makrofag wypełniony czarnymi ziarnami melaniny – oznaczony strzałką) – taka komórka musi być różnicowana z komórkami czerniaka; barwienie odczynnikiem Giemsy, powiększenie 200×



Ryc. 7. Obraz histopatologiczny dwóch przypadków czerniaka, widoczny na ryc. A jest bogaty w melaninę, w przypadku na ryc. B ilość melaniny jest umiarkowana. Objawy złośliwości histologicznej są szczególnie silnie wyrażone w czerniaku na ryc. B – wyraźne, duże i kwasochłonne jąderka oraz znaczny pleomorfizm jądrowy. Barwienie hematoksylina-eozyna, powiększenie 200×



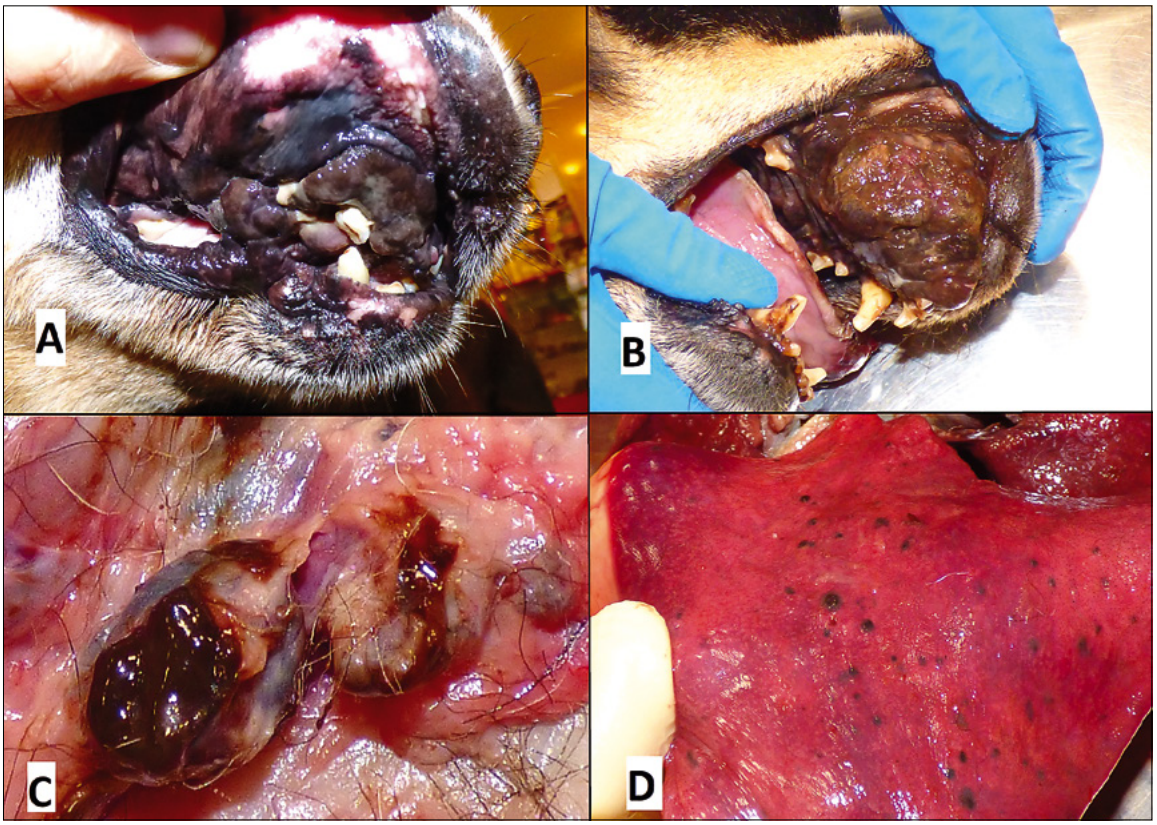
Ryc. 8. Obraz histologiczny czerniaka amelanotycznego – widoczne są pleomorficzne komórki, z takimi samymi jądrami, z wyraźnymi kwasochłonnymi jąderkami oraz jasną cytoplazmą; strzałką na ryc. A oznaczono komórek z brązowymi cytoplazmatycznymi ziarnami (prawdopodobnie ziarna melaniny). Barwienie hematoksylina-eozyna, powiększenie 100× (ryc. A) i 400× (ryc. B)



Ryc. 9. Przerzut czerniaka amelanotycznego do węzła chłonnego. Na ryc. A widoczny przekrój podłużny węzła chłonnego zajętego przez przerzuty czerniaka, na ryc. B obraz histopatologiczny tego przypadku (na dole i po lewej widoczne limfocyty, na górze i po prawej komórki nowotworowe); barwienie hematoksyliną-eozyną, powiększenie 200×. Na ryc. C widoczny wynik barwienia immunohistochemicznego z przeciwciałem anty-MelanA – brązowa barwa cytoplazmy wskazuje na reakcje dodatnią; barwienie immunocytochemiczne, przeciwciała anty-MelanA, powiększenie 100×

Problem diagnostyczny może pojawić się wtedy, gdy komórki nowotworowe nie produkują melaniny lub produkują niewielką jej ilość (ziarna melaniny obserwuje się w poniżej 5% komórek – czerniaki amelanotyczne; patrz dalej). Jednak nawet w takich przypadkach, biorąc pod uwagę lokalizację zmian i wygląd komórek nowotworowych, można podejrzewać melanocytarne pochodzenie nowotworu (ryc. 8). Rozpoznanie powinno zostać jednoznacznie potwierdzone za pomocą barwienia immunohistochemicznego z wykorzystaniem jednego z przeciwciał: Melan-A (najczęściej stosowany w praktyce; ryc. 9), PNL-2, TRP-1 lub TRP-2 lub „koktajlu" zawierającego mieszaninę kilku przeciwciał (2, 6).

Na podstawie oceny morfologii komórek nowotworowych (głównie kształtu komórek i jąder komórkowych) w trakcie badania mikroskopowego czerniaki można podzielić na kilka podtypów morfologicznych, m.in.: nabłonkowaty, wrzecionowatokomórkowy oraz mieszany. Jednak do tej pory nie wykazano wpływu tej klasyfikacji na zachowanie biologiczne guza, nie ma ona więc, podobnie jak intensywność melanizacji komórek, znaczenia prognostycznego (6).

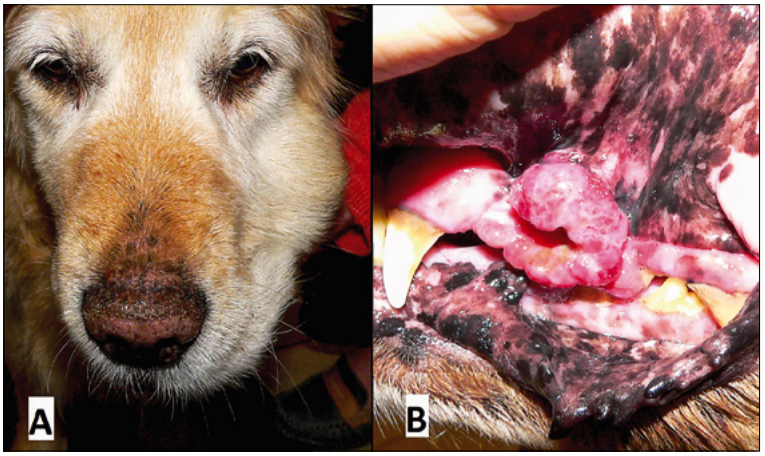


Ryc. 10. Przypadek ukazujący wysoką złośliwość biologiczną czerniaków jamy ustnej. Na ryc. A widoczny guzowaty rozrost okalający prawy górny kieł u starszej suki, ten sam guz po kilku tygodniach widoczny na ryc. B. Na ryc. C węzeł chłonny żuchwowy – na przekroju widoczny czarny miąższ nowotworu, z kolei na ryc. D widoczne mnogie czarne ogniska przerzutowe w płucach

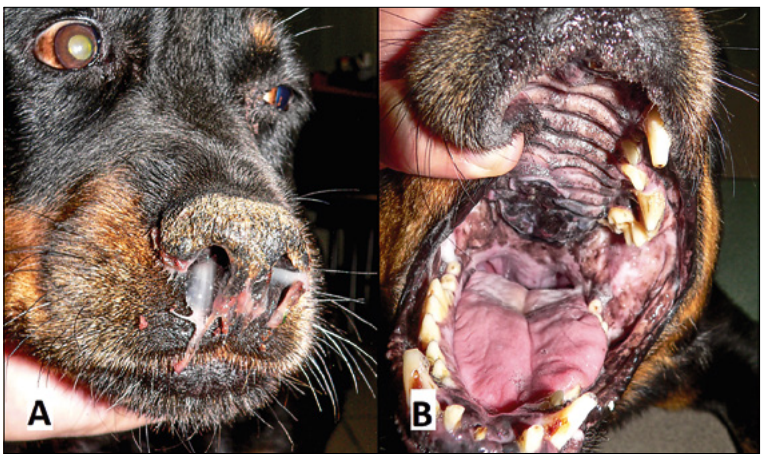
Czerniaki jamy ustnej

Zdecydowaną większość (powyżej 90%) nowotworowych zmian melanocytarnych jamy ustnej rozpoznawanych u zwierząt stanowią guzy o wysokiej złośliwości histologicznej i biologicznej – „czerniaki o wysokiej złośliwości" (ryc. 10). Czerniaki to najczęściej występujące nowotwory złośliwe jamy ustnej u psów (2, 7). Średnia wieku psów, u których zdiagnozowano czerniaka jamy ustnej wynosi około 11 lat, zmiany zlokalizowane są najczęściej na błonie śluzowej dziąseł i warg, brak jest predyspozycji płciowej oraz wyraźnej predylekcji rasowej (2, 7).

Objawy kliniczne nowotworu związane są z lokalizacją guza oraz jego naciekowym wzrostem (liza leżącej w bliskości guza kości obserwowana jest w aż 80% przypadków, 7), co powoduje ból i objawia się niechęcią do jedzenia oraz apatią. Właściciele zauważają również deformację twarzoczaszki, obecność zmiany guzowatej, nieprzyjemny zapach z jamy ustnej wynikający z powierzchownego owrzodzenia guza (owrzodzenia często towarzyszą czerniakom) oraz wtórnego zakażenia bakteryjnego (ryc. 11). Nowotwory zlokalizowane na podniebieniu mogą również objawiać się ropnym wypływem z nosa, który często zawiera domieszkę krwi (ryc. 12). Guzy zlokalizowane na wargach łatwo zwracają uwagę właścicieli, jednak zmiany na dziąsłach lub podniebieniu mogą długo pozostać niezauważone. Powiększenie węzłów chłonnych towarzyszące czerniakom jamy ustnej



Ryc. 11. Dwa przypadki czerniaka jamy ustnej u psów. Na ryc. A widoczna deformacja okolicy policzkowej suki rasy golder retriewer, wynikająca z obecności czerniaka dziąsła szczęki, z kolei na ryc. B widoczny guz w podobnej lokalizacji u innego psa – uwagę zwraca różowa barwa miąższu guza – w tym przypadku komórki nowotworowe nie zawierały melaniny



Ryc. 12. Przypadek czerniaka jamy ustnej u samicy, rottweilera, która została doprowadzona do lecznicy z powodu stwierdzonej niechęci do jedzenia, bolesności nosa i wypływu z jamy ustnej. Na ryc. A widoczny obustronny ropny wypływ z nosa podbarwiony krwią, którego przyczyną był czerniak na rosnący na podniebieniu – widoczny na ryc. B

nie jest jednoznaczne z obecnością przerzutów – w jednym z badań na 15 psów z towarzyszącym czerniakowi powiększeniem węzłów chłonnych jedynie u 4 wykryto przerzuty w badaniu histopatologicznym (5).

Czerniaki jamy ustnej u kotów

Czerniaki jamy ustnej u kotów występują rzadko, zazwyczaj rozpoznaje się je u zwierząt starszych (średnia wieku 12 lat), a rokowanie jest z reguły złe – większość chorych kotów poddanych zostaje eutanazji ze względu na obecność przerzutów, które pojawiają się średnio 2 miesiące od zabiegu resekcji guza jamy ustnej (8).

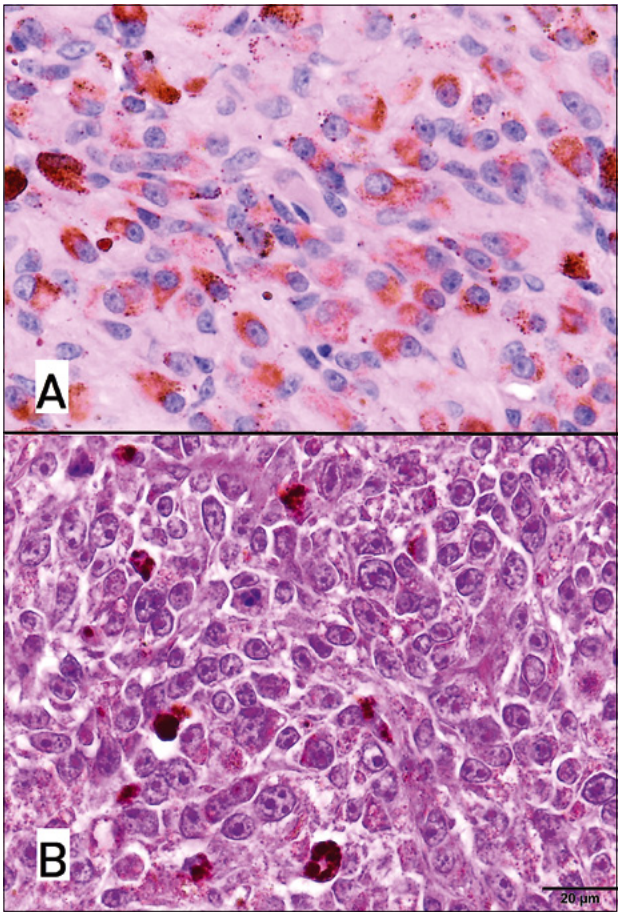
Rokowanie

Guzy melanocytarne jamy ustnej w większości przypadków wykazują agresywne zachowanie biologiczne – w badaniach Sarowitz (7) obejmujących 40 psów z czerniakami jamy ustnej (w tym zlokalizowanych na wargach) z przyczyn związanych z nowotworem padło około 50% psów, mediana okresu, jaki minął od zabiegu chirurgicznego do wystąpienia przerzutów/wznowy, wyniosła 5–6 miesięcy, a mediana całkowitego czasu przeżycia dla tej grupy psów wyniosła poniżej 7 miesięcy. Z kolei w badaniach Spangler i Kass (9) 60% guzów dało wznowy lub przerzuty, śmiertelność związana z występowaniem nowotworu wyniosła 70%, z medianą całkowitego czasu przeżycia wynoszącą 5 miesięcy i medianą czasu, jaki upłynął od operacji do wystąpienia wznowy lub przerzutów, 2,5 miesiąca. Wśród psów, które padły z przyczyn związanych z nowotworem, odsetek pacjentów, którzy przeżyli 1 rok, wyniósł niecałe 5% (9). Gorsze rokowania w tym badaniu spowodowane były najprawdopodobniej wykluczeniem z grupy czerniaków jamy ustnej zmian zlokalizowanych na wargach, które z powodów opisanych niżej mogą rokować lepiej (zostały one włączone przez autorów tego badania do grupy czerniaków warg i obwodowych odcinków kończyn, patrz dalej).

Zestawienie efektów leczenia chirurgicznego psów z czerniakiem jamy ustnej wykazało, że radykalne zabiegu chirurgiczne (mandibulektomia i maksilektomia) mogą poprawić efekty takiej terapii. U psów, u których wykonano mandibulektomię, wznowy miejscowe obserwowano w 40% przypadków, mediana okresu przeżycia wyniosła od 7 do 17 miesięcy, a rok od zabiegu przeżyło 21% psów. Parametry te u psów leczonych za pomocą maksilektomii wyniosły odpowiednio: 21 – 48%, 5–10 miesięcy i 27% (10).

Czerniaki jamy ustnej o niskiej złośliwości

Nie wszystkie czerniaki jamy ustnej cechuje wysoce agresywny/złośliwy charakter – w badaniu opublikowanym przez Esplin i wsp. (11) opisano 71 przypadków czerniaków o niskiej złośliwości zarówno histologicznej, jak i biologicznej, szacunkowo guzy te stanowią około 8% nowotworowych zmian melanocytarnych jamy ustnej u psów. Jedynie 3 z 64 psów poddanych długookresowej obserwacji padło z przyczyn związanych z nowotworem, a mediana czasu przeżycia wszystkich psów objętych badaniem od momentu wykonania zabiegu chirurgicznego wyniosła prawie 3 lata. 77% guzów miało poniżej 1 cm średnicy (przy czym tylko jeden z pozostałych osiągnął powyżej 2 cm), większość nie wykazywała owrzodzenia. Guzy charakteryzowały się niską złośliwością histologiczną – liczba mitoz w żadnym z nich nie była większa niż 3/10 pól widzenia pod dużym powiększeniem (high power field, HPF), a w prawie 80% przypadków figur mitotycznych nie obserwowano wcale. Guzy były intensywnie pigmentowane, jądra komórkowe nie wykazywały cech atypii i zawierały pojedyncze, małe, centralnie położone jąderka (ryc. 13A; 11).



Ryc. 13. Obraz histologiczny dwóch przypadków czerniaka jamy ustnej o odmiennej złośliwości histologicznej. Na ryc. A widoczny czerniak o niskiej złośliwości histologicznej – jądra komórkowe są małe, łagodnie pleomorficzne, jąderka słabo widoczne, małe i granatowe. Na ryc. B widoczny czerniak o wysokiej złośliwości histologicznej – jądra komórkowe wykazują znaczny pleomorfizm, jąderka są wyraźne, duże i intensywnie kwasochłonne. Barwienie hematoksylina-eozyna, powiększenie 200×

Czynniki rokownicze w czerniakach jamy ustnej u psów

Parametry kliniczne

Zarówno wiek pacjenta, płeć, rasa, jak i masa ciała nie mają znaczenia rokowniczego w przypadku czerniaków jamy ustnej u psów (6). Chociaż w klasyfikacji „TNM" WHO nowotworów melanocytarnych jamy ustnej u psów (patrz dalej) wielkość guza jest głównym parametrem rokowniczym, to niestety w klasyfikacji tej nie bierze się pod uwagę żadnych parametrów histopatologicznych i według istniejących badań nie ma ona praktycznego zastosowania rokowniczego (9, 12, 13), dlatego też nie ma zgodności co do przydatności rokowniczej wielkości guzów melanocytarnych u psów. Negatywną wartość prognostyczną wielkości guza u 111 psów z czerniakiem jamy ustnej wykazał Prolux i wsp. (14), a także Spangler i wsp. (9) i Hahn i wsp. (12), jednak w szeregu innych badań nie znaleziono takiej korelacji (6, 15). Wpływ na rokowanie

u psów z czerniakami jamy ustnej może mieć lokalizacja guza – zmiany zlokalizowane w donosowej części jamy ustnej są szybciej zauważane przez właścicieli oraz resekcja chirurgiczna z zachowaniem czystych marginesów chirurgicznych w takich przypadkach jest bardziej prawdopodobna (7). Naciekający wzrost guza może mieć negatywny wpływ na przeżycie psów z czerniakiem jamy ustnej – w jednym z badań obecność naciekania kości miała istotny negatywny wpływ na długość trwania pierwszej remisji oraz całkowity czas przeżycia psów z czerniakiem jamy ustnej (odpowiednio 2,4 *vs* 6,7 oraz 3,9 *vs* 9,5 mies.; 14). Jednak w badaniach Kosovsky i wsp. (16) oraz Wallace i wsp. (17) obecność lizy kości oceniana na podstawie zdjęć RTG nie miała wartości rokowniczej. Tak jak w przypadku większości nowotworów złośliwych, obecność przerzutów odległych uznaje się za negatywne czynniki prognostyczne (9), natomiast nie wykazano wpływu rokowniczego występowania przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (6). W badaniach Grimes i wsp. (5) doszczętność zabiegu chirurgicznego oceniana w preparatach histopatologicznych nie miała wpływu na wystąpienie wznowy pooperacyjnej.

System oceny zaawansowania klinicznego nowotworów jamy ustnej u psów i kotów (Owen L.N.: TNM classification of tumors in domestic animals. Geneva, World Health Organization, 1980).

Guz pierwotny (T)
Tis (guz *in situ*)
T1 – Guz o średnicy poniżej 2 cm
- T1a – bez cech naciekania kości
- T1b – z cechami naciekania kości

T2 – Guz o średnicy 2-4 cm
- T2a – bez cech naciekania kości
- T2b – z cechami naciekania kości

T3 – Guz o średnicy powyżej 4 cm
- T3a – bez cech naciekania kości
- T3b – z cechami naciekania kości

Regionalne węzły chłonne (N)
N0 – Brak zajęcia regionalnych węzłów chłonnych
N1 – Węzły po tej samej stronie co guz, ruchome względem tkanek otaczających
- N1a – bez cech zajęcia węzła przez przerzuty
- N1b – z dowodami na zajęcie węzła przez przerzuty

N2 – Węzły po drugiej stronie co guz, ruchome względem tkanek otaczających
- N2a – bez cech zajęcia węzła przez przerzuty
- N2b – z dowodami na zajęcie węzła przez przerzuty

N3 – Węzły chłonne nieruchome względem tkanek otaczających (związane z tkankami)

Przerzuty odległe (M)
M0 – Brak przerzutów odległych
M1 – Przerzuty odległe obecne

Stopień zaawansowania klinicznego	T	N	M
I	T1	N0, N1a, N2a	M0
II	T2	N0, N1a, N2a	M0
III	T3	N0, N1a, N2a	M0
IV	Każdy T	N1b	M0
	Każdy T	N2b, N3	M0
	Każdy T	Każdy N	M1

Znaczenie rokownicze opisanego systemu oceny zaawansowania klinicznego nowotworów jamy ustnej u psów i kotów nie zostało udokumentowane w dostępnej literaturze (6, 12), jednak przydatność wybranych parametrów wchodzących w jego skład została potwierdzona przez niektórych autorów (opis w tekście).

Parametry histopatologiczne

W literaturze można znaleźć wiele publikacji, w których poszukuje się najbardziej miarodajnych czynników prognostycznych dla guzów melanocytarnych jamy ustnej u psów. W najnowszym podręczniku weterynaryjnej patologii onkologicznej wyłoniono najważniejsze czynniki możliwe do oceny podczas badania mikroskopowego czerniaków jamy ustnej i warg, których znaczenie prognostyczne zostało odpowiednio udokumentowane (2; podsumowanie czynników rokowniczych w czerniakach jamy ustnej u psów zaprezentowano w tab. 1).

Pierwszym ocenianym parametrem jest **sumaryczna liczba figur mitotycznych (mitotic count, MC) w 10 HPF**. W przypadku guzów, w których komórki zawierają dużo barwnika nie jest konieczne odbarwianie skrawków ponieważ wykazano, że w obszarach takich MC jest prawie zawsze równy 0, nigdy nie przekraczając 2. Ocenia się 10 HPF z największą liczbą mitoz, omijając ogniska martwicy i pola objęte intensywnym naciekiem zapalanym. Wartością graniczną podczas ustalania rokowania są 4 mitozy/10 HPF (tab. 1).

Jeżeli analiza MC wskazuje na czerniaka jamy ustnej o niskiej złośliwości lub jeżeli wartość MC jest bliska 4, wtedy powinno się **ocenić dodatkowo atypię jądrową**, którą ocenia się w 3 HPF lub w 100–200 komórkach nowotworowych (ryc. 13B). Stwierdzenie atypii jądrowej w mniej niż 30% komórek wspiera rokowanie korzystne, natomiast w powyżej 30% komórek rokowanie jest niepomyślne (tab. 1).

Jeżeli rokowania oparte na analizie MC oraz na ocenie atypii jądrowej różnią się od siebie, zalecane jest wykonanie **barwienia immunohistochemicznego przeciwciałem MIB-1 wykrywającym białko Ki67**. Liczy się jądra komórkowe wykazujące ekspresję Ki67 w polach o największej intensywności barwienia, a za wartość graniczną uznaje się 15% wybarwionych jąder komórek nowotworowych – ekspresja Ki67 poniżej 15% przechyla szalę na stronę prognozy korzystnej (2, 18).

Do potencjalnych czynników rokowniczych w badaniu mikroskopowym można zaliczyć również koekspresję receptorów dla płytkopochodnego czynnika wzrostu α i β (platelet – derived growth factor receptor, PDGFR), która w jednym z badań była negatywnie skorelowana z całkowitym czasem przeżycia psów, który wyniósł 183 dni u psów z koekspresją PDGFR-α i -β w porównaniu do 335 dni u psów, u których takiej koekspresji nie wykazano (19).

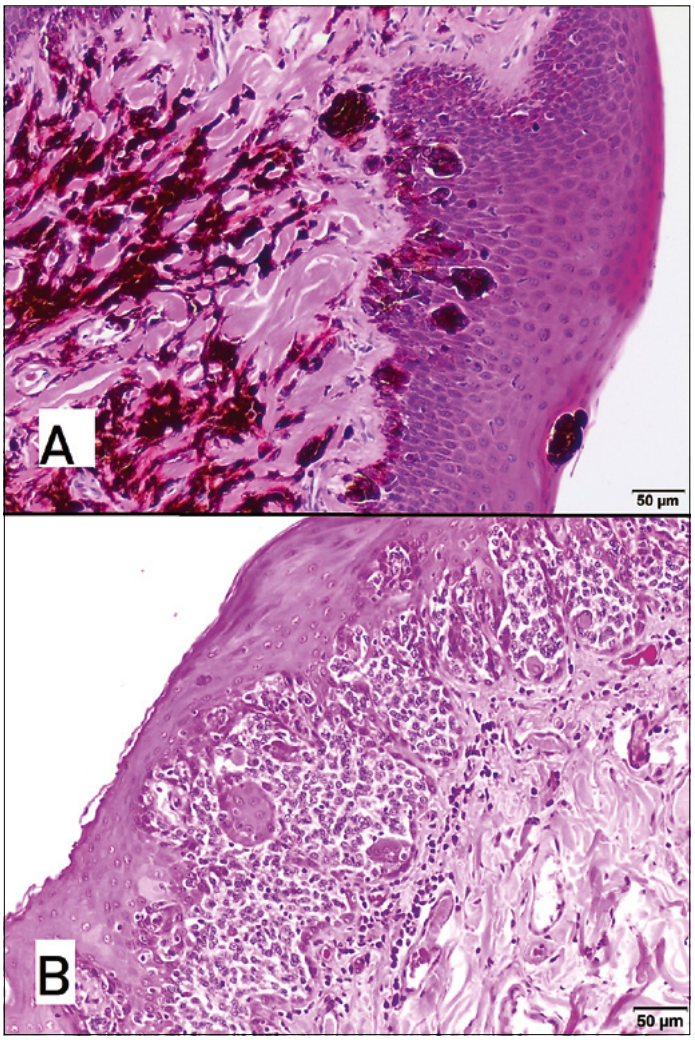
Tabela 1. Czynniki rokownicze możliwe do oceny w badaniu histopatologicznym w przypadku czerniaków jamy ustnej i warg u psów (opracowano na podstawie 2, 9, 18). Opis w tekście

Parametr	Prognozy pozytywne	Prognozy negatywne
MC	<4 /10 HPF 90% psów żyje dłużej niż rok	≥4 /10 HPF 80% psów nie przeżywa roku, mediana przeżycia – 4 miesiące
Atypia jądrowa	<30% komórek	≥30% komórek
Ki67	<15% wybarwionych jąder komórkowych	≥15% wybarwionych jąder komórkowych

Czynniki rokownicze dla czerniaków warg i obwodowych odcinków kończyn feet and lips melanoma

Spangler i Kass (9) jako oddzielną, wspólną grupę rokowniczą czerniaków u psów wyróżnili guzy zlokalizowane na błonie śluzowej warg i na skórze obwodowych odcinków kończyn (poniżej stawu nadgarstkowego/ stępu, tzw. grupa „feet/ lips"). Jednak podział ten nie utrwalił się w aktualnych podręcznikach onkologii weterynaryjnej (2, 3). W przypadkach czerniaków zlokalizowanych na wargach jedynie 38% nowotworów daje wznowy i przerzuty, a nowotwór jest przyczyną śmierci u 30% psów (9). Chociaż guzy melanocytarne zlokalizowane na wargach zazwyczaj wykazują histologiczne cechy złośliwości (są z punktu widzenia histologicznego czerniakami) to rzadziej niż czerniaki jamy ustnej dają wznowy i przerzuty, co prawdopodobnie wynika z ich „korzystnej" lokalizacji, dzięki czemu są szybko zauważane przez właścicieli i wcześnie poddawane resekcji chirurgicznej (9). Opracowano trzy parametry negatywne rokowniczo dla tej grupy guzów.

- Pierwszym jest zaawansowany wiek psów.
- Drugim parametrem określonym w tym badaniu jest wartość MC (wartość graniczna 5 i powyżej mitoz/ 10 HPF), która jest negatywnie skorelowana z czasem przeżycia badanych psów.
- Trzecim negatywnym prognostycznie parametrem w tym badaniu była aktywność graniczna komórek nowotworowych (ang. junctional activity – obecność komórek nowotworowych na granicy naskórka ze skórą właściwą lub nabłonkiem z błoną podśluzową; ryc. 14; 9).



Ryc. 14. Obraz histologiczny dwóch przypadków czerniaka jamy ustnej z widoczną „aktywnością graniczną", na ryc. A bogaty w melaninę czerniak o niskiej złośliwości histologicznej, a na ryc. B czerniak amelanotyczny o wysokiej złośliwości. Barwienie hematoksylina-eozyna, powiększenie 100×

Co powinno się znaleźć w wyniku badania histopatologicznego czerniaka jamy ustnej u psa?

- Rozpoznanie z oceną histologicznej złośliwości (ocena subiektywna badającego).
- Wartość MC (sumaryczne liczba mitoz w 10/HPF).
- Ocena nasilenia atypii jądrowej.
- Zajęcie naczyń chłonnych (czynnik rokowniczo niekorzystny w badaniach Millanta i wsp.).
- Czystość marginesów histologicznych (parametr bez udokumentowanej wartości rokowniczej).
- Ocena ekspresji Ki67 (barwienie to nie wchodzi w zakres rutynowej oceny, wykonanie barwienia powinno być dodatkowo zlecone i jest dodatkowo płatne).

Piśmiennictwo

1. Goldschmidt M.H., Dunstan R.W., Stannard A.A., von Tscharner C., Walder E.J., Yager J.A.: Histological classification of epithelial and melanocytic neoplasms of the skin of domestic animals. W: *World Health Organization International Histological Classification of Neoplasms of Domestic Animals*, 2nd series, Volume III, pp. 38–40. Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC, 1998.
2. Munday J.S., Christiane V.L., Kiupel M.: Tumors of the alimentary tract. W: Meuten D.J.: *Tumors in Domestic Animals*. Wyd. 5, Wiley Blackwell, Ames, 2017, 515–524.
3. Goldschmidt M.H, Goldschmidt K. H..: Epithelial and melanocytic tumors of the skin. W: Meuten D.J.: *Tumors in Domestic Animals*. Wyd. 5, Wiley Blackwell, Ames, 2017, 123–131.
4. Przeździecki R., Czopowicz M., Sapierzyński R.: Accuracy of routine cytology and immunocytochemistry in preoperative diagnosis of oral amelanotic melanomas in dogs. *Vet. Clin. Pathol.* 2015, **44**, 597–604
5. Grimes J.A., Matz B.M., Christopherson P.W., Koehler J.W., Cappelle K.K., Hlusko K.C., Smith A.: Agreement between cytology and histopathology for regional lymph node metastasis in dogs with melanocytic neoplasms. *Vet. Pathol.* 2017, **54**, 579–587.
6. Smedley R.C., Spangler W.L., Esplin D.G., Kitchell B.E, Bergman P.J., Ho H.Y., Bergin I.L., Kiupel M.: Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: a comparative review of the literature and goals for future investigation. *Vet. Pathol.* 2011, **48**, 54–72.
7. Sarowitz B.N., Davis G.J., Kim S.: Outcome and prognostic factors following curative-intent surgery for oral tumours in dogs: 234 cases (2004 to 2014). *J. Small Anim. Pract.* 2017, **58**, 146–153.
8. Patnaik A.K., Mooney S.: Feline melanoma: a comparative study of ocular, oral, and dermal neoplasms. *Vet. Pathol.* 1988, **25**, 105–12.
9. Spangler W.L., Kass P.H.: The histologic and epidemiologic bases for prognostic consideration in canine melanocytic neoplasia. *Vet. Pathol.* 2006, **43**, 136–149.
10. Liptak J.M., Withrow S.J.: Oral tumors. W: Withrow S.J., Vail D.M.: *Withrows & MacEwen's Small Animall Clinical Oncology*, wyd. 4, Saunders Elsevier, St. Louis., 2007, 455–475.
11. Esplin D.G.: Survival of dogs following surgical excision of histologically well-differentiated melanocytic neoplasms of the mucous membranes of the lips and oral cavity. *Vet. Pathol.* 2008, **45**, 889–896.
12. Hahn K.A., DeNicola D.B., Richardson R.C., Hahn E.A.: Canine oral malignant melanoma: prognostic utility of an alternative staging system. *J. Sm. Anim. Pract.* 1994, **35**, 251–256.
13. Bergman P.J.: Canine oral melanoma. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 2007, **22**, 55–60.
14. Proulx D.R., Ruslander D.M., Dodge R.K., Hauck M.L., Williams L.E., Horn B., Price G.S., Thrall D.E.: A retrospective analysis of 140 dogs with oral melanoma treated with external beam radiation. *Vet. Radiol. Ultrasound* 2003, **44**, 352–359.
15. Millanta F., Fratini F., Corazza M., Castagnaro M., Zappulli V., Poli A.: Proliferation activity in oral and cutaneous canine melanocytic tumours: correlation with histological parameters, location, and clinical behaviour. *Res. Vet. Sci.* 2002, **73**, 45–51.
16. Kosovsky J. K., Matthiesen D. T., Marretta S. M., Patnaik A. K.: Results of partial mandibulectomy for the treatment of oral tumors in 142 dogs. *Vet. Surg.* 1991, **20**, 397–401.
17. Wallace J., Matthiesen D. T., Patnaik A. K.: Hemimaxillectomy for the treatment of oral tumors in 69 dogs. *Vet. Surg.* 1992, **21**, 337–341.
18. Bergin I.L., Smedley R.C., Esplin D.G., Spangler W.L., Kiupel M.: Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. *Vet. Pathol.* 2011, **48**, 41–53.
19. Iussich S., Maniscalco L., Di Sciuva A., Iotti B., Morello E., Martano M., Gattino F., Buracco P., De Maria R.: PDGFRs expression in dogs affected by malignant oral melanomas: correlation with prognosis. *Vet. Comp. Oncol.* 2017, **15**, 462–469.

Lek. wet. Katarzyna Kliczkowska-Klarowicz,
e-mail: katarzyna_kliczkowska@sggw.pl