

RAK ŻOŁĄDKA. MORFOLOGIA

ANNA NASIEROWSKA-GUTTMEJER, PRZEMYSŁAW MAJEWSKI, MAŁGORZATA MALINOWSKA

1. Wprowadzenie

Rozpoznanie raka żołądka w większości przypadków można ustalić na podstawie badania mikroskopowego. Badanie histopatologiczne zwykle polega na ocenie preparatu barwionego hematoxyliną i eozyną (HE). Jednak w części przypadków wskazane jest zastosowanie dodatkowych metod histochemicznych (na przykład celem wykrycia produkcji śluzu w komórkach), immunohistochemicznych (celem oceny ekspresji markerów komórkowych) lub molekularnych (aby określić mutacje genów istotne dla terapii celowanej). Wynik badania patomorfologicznego oraz ocena endoskopowa zmiany wraz z badaniami obrazowymi pozwalającymi określić kliniczny stopień zaawansowania choroby, jakimi są badania radiologiczne, ultrasonograficzne i tomografia komputerowa, stanowią podstawę do wdrożenia optymalnej dla pacjenta metody leczenia. W każdym przypadku należy również uwzględnić dane kliniczne, wywiad dotyczący przebiegu choroby, współistniejące schorzenia, terapie lekami, na przykład niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi, oraz wyniki wcześniejszych badań histopatologicznych.

Rozpoznanie raka żołądka ustala patomorfolog na podstawie badania materiału pobranego metodami endoskopowymi w postaci małej biopsji (wycinka) lub metodami minimalnie inwazyjnymi, takimi jak endoskopowe wycięcie śluzówkowe (*endoscopic mucosal resection* – EMR) lub endoskopowa dysekcja podśluzówkowa (*endoscopic submucosal dissection* – ESD), śródoperacyjnego badania skrawków mrożonych lub materiału operacyjnego otrzymanego w wyniku całkowitej lub częściowej resekcji żołądka. W każdym wymienionym przypadku istnieją odmienne wskazania, ograniczenia i wytyczne diagnostyczne. Z uwagi na szeroki dostęp chorych z rakiem żołądka do diagnostyki zarówno przed-, jak i pooperacyjnej celowe wydaje się przyjęcie powszechnie akceptowanych zasad i procedur w ustalaniu rozpoznania histopatologicznych. Jednolity sposób opracowania raportu histopatologicznego z jednej strony prowadzi do poprawy jakości diagnostyki patomorfologicznej, z drugiej zaś strony jest bezpieczną i obiektywną podstawą wyboru przez onkologa odpowiedniej i najbardziej skutecznej terapii.

2. Materiał diagnostyczny uzyskany metodami endoskopowymi i operacyjnymi

Rodzaj materiału diagnostycznego, jaki patomorfolog otrzymuje do badania, determinuje sposób jego przygotowania i oceny mikroskopowej. W każdym przypadku

istnieją wskazania i wytyczne do określenia klinicznie przydatnych cech histopatologicznych.

2.1. Mała biopsja endoskopowa

Mała biopsja endoskopowa jest podstawowym badaniem diagnostycznym w rozpoznawaniu raka gruczołowego żołądka i stanowi podstawę różnicowania z innymi zmianami, zarówno nowotworowymi, jak i nienowotworowymi rozwijającymi się w błonie śluzowej żołądka [1].

Zalecane jest, aby w każdym przypadku lekarz wykonujący gastrobiopsję, przesyłając pobrany wycinek do badania patomorfologicznego, dołączył do skierowania informację o ewentualnych wcześniej wykonywanych badaniach diagnostycznych.

W biopsji endoskopowej należy określić następujące stany patologiczne:

- zwykle zapalenie błony śluzowej bez ryzyka rozwoju raka,
- przewlekłe zapalenie zanikowe obarczone ryzykiem rozwoju raka,
- zmiany przedrakowe (neoplazja śródnabłonkowa),
- raka inwazyjnego.

Trudne do oceny dla patomorfologa są zwłaszcza łagodne, zapalne, owrzodzone guzy ze zmianami regeneracyjnymi błony śluzowej żołądka wywołane długotrwałą terapią lekową (na przykład w przebiegu choroby reumatoidalnej), nacieki chłoniaka i raka niezróżnicowanego, drobnokomórkowego. Diagnostyka różnicowa wymaga od patomorfologa dużego doświadczenia oraz wdrożenia dodatkowych metod badawczych.

Kolejnymi zmianami do różnicowania w biopsji endoskopowej są wysoko dojrzałe nowotwory neuroendokrynne (*neuroendocrine neoplasm* – NET, NEN) i nowotwory podścieliskowe (*gastrointestinal stromal tumors* – GIST), które zawsze wymagają wykonania badań immunohistochemicznych potwierdzających ich histogenezę. Należy podkreślić, że wynik badania histopatologicznego wraz z określeniem indeksu proliferacyjnego Ki67/MIB1 w nowotworach typu NEN może być podstawą do oceny zakresu wycięcia zmiany.

Aktualna klasyfikacja dysplazji/neoplazji śródnabłonkowej została opracowana przez Światową Organizację Zdrowia (*World Health Organization* – WHO) w 2010 r. [1]. Według niej terminy „dysplazja” i „neoplazja śródnabłonkowa” są synonimami i oba mogą być używane, bez preferencji żadnego z nich. Według WHO [1] powyższe zmiany dzielą się na następujące kategorie:

- wynik negatywny dla neoplazji śródnabłonkowej/dysplazji,

- nieokreślona neoplazja śródnabłonkowa/dysplazja,
- małego stopnia neoplazja śródnabłonkowa/dysplazja,
- dużego stopnia neoplazja śródnabłonkowa/dysplazja,
- wewnątrzśluzówkowy inwazyjny nowotwór/wewnątrzśluzówkowy rak.

Ostatnio międzynarodowy zespół patologów i klinicystów opracował wytyczne do diagnostyki i leczenia zmian przedrakowych w odniesieniu do raka żołądka [2]. Celem ich jest ustalenie kryteriów podziału chorych na grupy ryzyka rozwoju raka żołądka. Zgodnie z opracowanymi zaleceniami zapalenie zanikowe oraz metaplasja powinny być stopniowane według ich stadium zaawansowania. Chorzy ze zmianami o wysokim stopniu nasilenia powinni być traktowani podobnie jak chorzy z dużym ryzykiem rozwoju raka żołądka. Podkreślenia wymaga, że określenie wskazań do leczenia i monitorowania pacjentów w poszczególnych grupach ryzyka ściśle wiąże się z rozpoznaniem histopatologicznym uwzględniającym stopień zaawansowania zapalenia zanikowego błony śluzowej żołądka, metaplazji jelitowej i dysplazji. Ustalenie precyzyjnego rozpoznania przez patologa wymaga ścisłej współpracy z endoskopistą. Wycinki z błony śluzowej żołądka pobierane celem oceny stopnia nasilenia zaniku powinny pochodzić z miejsc powszechnie akceptowanych jako krytyczne: dwa wycinki z trzonu i jeden z kąta (umieszczone w jednym naczyniu) oraz dwa wycinki z odźwiernika (umieszczone osobno w drugim naczyniu). Każde naczynie należy opisać zgodnie z topografią pobranej biopsji. Informacja o liczbie i miejscu pobrania wycinków z podejrzanych zmian oraz umieszczenie materiału biopsyjnego na bibule w płaszczyźnie prostopadłej do powierzchni wycinka, tak aby można było ocenić na przekroju całą grubość błony śluzowej, są kluczowe dla ustalenia rozpoznania histopatologicznego. Nieprawidłowe położenie materiału uzyskanego z biopsji endoskopowej może także spowodować błędną interpretację struktur mikroskopowych przez patomorfologa.

W ostatnich latach, w dobie terapii celowanej molekularnie, biopsja endoskopowa z raka żołądka stała się przydatna do badania zaburzeń genu *HER2* zarówno metodami immunohistochemicznymi, jak i molekularnymi.

Materiał pobrany podczas małej biopsji endoskopowej bada się w całości, utrwalając go w 10-procentowej zbuforowanej formalinie i zatapiając w parafinie. Nie zaleca się krojenia taśmowo kolejnych przekrojów. Wskazane jest skokowe krojenie, tzw. trzymowanie bloczka parafinowego, oraz pozostawienie części materiału do badań dodatkowych.

W biopsji endoskopowej określany jest typ histologiczny raka żołądka i stopień jego dojrzałości oraz typ wg klasyfikacji Laurena (jelitowy, rozlany lub mieszany) [3]. Należy jednak zwrócić uwagę, że mały wycinek z guza, z uwagi na heterogenność mikroskopową raka żołądka, może nie być reprezentatywny dla masy całego nowotworu. Ostateczna diagnoza może być dopiero postawiona po badaniu histopatologicznym całego guza.

2.2. Zmiany w całości usuwane za pomocą metod endoskopowych

Polipy oraz zmiany płaskie lub płasko-wyniosłe z wczesnym rakiem żołądka to zmiany usuwane w całości meto-

dami endoskopowymi minimalnie inwazyjnymi, takimi jak endoskopowe wycięcie śluzówkowe (*endoscopic mucosal resection* – EMR) lub endoskopowa dysekcja podśluzówkowa (*endoscopic submucosal dissection* – ESD). Do tradycyjnych wskazań do usuwania zmian w całości w jednym bloku metodą EMR należą makroskopowo typ wyniosły bez owrzodzenia, o średnicy poniżej 2 cm i typ jelitowy raka wg Laurena. Dodatkowo bierze się pod uwagę obecność zatorów z komórek raka w świetle naczyń chłonnych i krwionośnych. Wymieniane parametry są jednak pomijane w wypadku użycia technik ESD. Bogate doświadczenia japońskie oraz coraz częściej europejskie [4–6] pozwalają rozszerzać wskazania do wycięcia metodą dysekcji podśluzówkowej do następujących: 1) raka wewnątrzśluzówkowego typu jelitowego bez owrzodzenia niezależnie od wielkości, 2) raka wewnątrzśluzówkowego typu jelitowego z owrzodzeniem o średnicy poniżej 3 cm, 3) raka podśluzówkowego typu jelitowego o średnicy poniżej 3 cm z inwazją poniżej 500 μm . Zalecenia koreańskie dopuszczają ESD również w przypadku raka śluzowokomórkowego (*signet-ring cell carcinoma*) wielkości poniżej 2,5 cm i bez inwazji naczyń limfatycznych. Wymienione kryteria mają zapewnić usunięcie wczesnego raka żołądka metodą mało inwazyjną z minimalnym ryzykiem wznowy i powstania przerzutów do węzłów chłonnych. Poza opisanymi wytycznymi do wykonania ESD wymieniane są inne zmiany, istotne z klinicznego punktu widzenia, do wycięcia metodami endoskopowymi. Zaliczają się do nich: dysplazja, podśluzówkowe guzki typu podścieliskowego (GIST) i wysoko dojrzałe nowotwory neuroendokrynne typu 1.

Materiał po endoskopowej dysekcji podśluzówkowej należy rozpiąć na płytce korkowej, drewnianej lub parafinowej i utrwalić w 10-procentowej zbuforowanej formalinie. Następnie należy go w całości pokroić, a kolejne przekroje zbadać mikroskopowo. Raport histopatologiczny w przypadku zmian w żołądku usuwanych metodami EMR i ESD uwzględnia ocenę marginesu bocznego w obrębie błony śluzowej i marginesu w głębi, uznając odległość 2 mm za margines doszczętny mikroskopowo (R0). W razie trudności w ocenie ognisk mikroinwazji można zastosować metodę immunohistochemiczną z przeciwciałem przeciwko keratynie, która pozwala wykryć pojedyncze rozproszone komórki raka.

2.3. Badanie śródoperacyjne skrawków mrożonych

Przydatność badania śródoperacyjnego skrawków mrożonych w czasie resekcji pierwotnych lub przerzutowych raków żołądka jest dyskutowana w różnych ośrodkach klinicznych. Rzadko się zdarza, aby pierwotne rozpoznanie raka żołądka ustalano na podstawie diagnostyki małych, incydentalnych zmian w wątrobie, guzków sieci lub jajnika podejrzanych o przerzuty tego nowotworu. W niektórych szpitalach wykonuje się ocenę marginesu chirurgicznego żołądka z rakiem. W przypadku typu rozlanego raka z obecnością rozproszonych małych grup lub pojedynczych komórek naciekających w rozproszeniu podścielisko, łatwo jest jednak je pominąć w preparacie mrożonym. Dlatego też badanie skrawków mrożonych z marginesu chirurgicznego ma ograniczenia w interpretacji mikroskopowej.

2.4. Materiał operacyjny pobrany z żołądka z rakiem

Materiał operacyjny pobrany z żołądka z rakiem pochodzi z całkowitej lub częściowej dystalnej i proksymalnej resekcji żołądka (gastrektomii całkowitej lub częściowej). Przedstawione poniżej wytyczne do badania makroskopowego i mikroskopowego uwzględniają standardy japońskie, europejskie i amerykańskie [3, 7–9].

2.4.1. Utrwalenie materiału

Przygotowanie materiału operacyjnego do wykonania badania histopatologicznego wymaga zastosowania prawidłowego utrwalacza i optymalnego czasu utrwalania. W celu odpowiedniego przygotowania usuniętego żołądka z guzem należy go rozciąć wzdłuż przedniego brzegu krzywizny większej, rozpiąć na płytce korkowej lub innej i włożyć do pojemnika z 10-procentową zbuforowaną formaliną na 8 godzin do maksymalnie 48 godzin. Po 24 godzinach wskazane jest zdjęcie go z płytki celem utrwalenia od strony surowicówki. Jeżeli rozcięcie żołądka wzdłuż krzywizny większej nie jest możliwe ze względu na obecność guza w tym miejscu, to należy przeciąć ścianę żołądka łukiem dookoła guza lub wzdłuż przedniego brzegu krzywizny mniejszej. Mar-

gines proksymalny i dystalny oraz ewentualny naciek raka w obrębie surowicówki należy oznaczyć tuszem.

2.4.2. Badanie makroskopowe

Badanie makroskopowe usuniętego żołądka wraz z rakiem polega na określeniu następujących parametrów:

1. Wymiarów materiału operacyjnego: długości żołądka (wzdłuż krzywizny większej i mniejszej), długości przełyku i/lub dwunastnicy, jeżeli narządy te nadesłano do badania.

2. Lokalizacji guza w żołądku w okolicy:





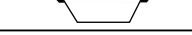
- wpustu, dna, trzonu, części odzwiernikowej,
- krzywizny większej, krzywizny mniejszej,
- ściany przedniej i ściany tylnej żołądka.

3. Największego wymiaru guza.

4. Makroskopowego typu guza.




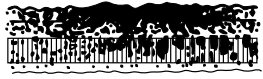
Rak żołądka ze względu na stopień zaawansowania i głębokość naciekania dzieli się na dwie główne kategorie: raka wczesnego i zaawansowanego. Rak wczesny jest ograniczony do błony śluzowej i/lub podśluzowej, niezależnie od stanu węzłów chłonnych. Rak zaawansowany nacieka co najmniej warstwę mięśniową ściany żołądka oraz tkanki otaczające. Typ makroskopowy wczesnego raka żołądka został określony w klasyfikacji *Japanese Research Association for Gastric*

Tabela I. Makroskopowe typy wczesnego raka żołądka [7]

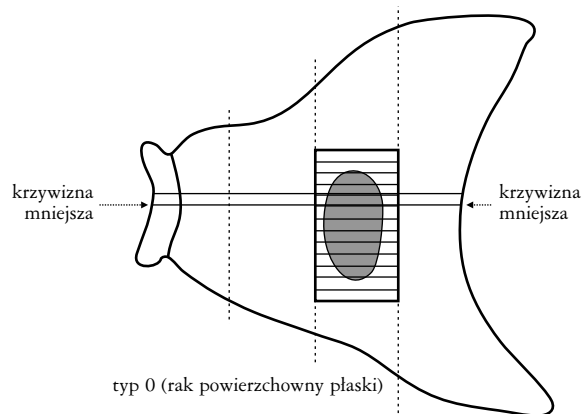
MAKROSKOPOWY TYP WCZESNEGO RAKA ŻOŁĄDKA	SCHEMAT WCZESNEGO RAKA ŻOŁĄDKA
Typ 0 I: polipowaty uniesiony	typ 0 I:  typ uniesiony
Typ 0 IIa: powierzchniowy uniesiony	typ 0 IIa:  typ powierzchniowy uniesiony
Typ 0 IIb: płaski	typ 0 IIb:  typ płaski
Typ 0 IIc: powierzchniowy zagłębiony	typ 0 IIc:  typ powierzchniowy zagłębiony
Typ 0 III: zagłębiony	typ 0 III:  typ zagłębiony

Reprinted by permission from Japanese Gastric Cancer Association: Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric Cancer* 2011; 14: 101-112.

Tabela II. Makroskopowy typ zaawansowanego raka żołądka [7]

MAKROSKOPOWY TYP ZAAWANSOWANEGO RAKA ŻOŁĄDKA	SCHEMAT ZAAWANSOWANEGO RAKA ŻOŁĄDKA
Typ 1: guz polipowaty, zwykle na szerokiej podstawie	typ 1 
Typ 2: guz owrzodziały z wyraźnie odgraniczonymi, uniesionymi brzegami podminowującymi błonę śluzową	typ 2 
Typ 3: guz owrzodziały bez wyraźnie odgraniczonych brzegów, naciekający otaczającą ścianę wraz z błoną śluzową	typ 3 
Typ 4: guz rozlegle naciekający, śródścienny (<i>limitis plastica</i>), bez zaznaczonego brzegu, zazwyczaj bez obecności ewidentnych owrzodzeń	typ 4 

Reprinted by permission from Japanese Gastric Cancer Association: Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric Cancer* 2011; 14: 101-112.

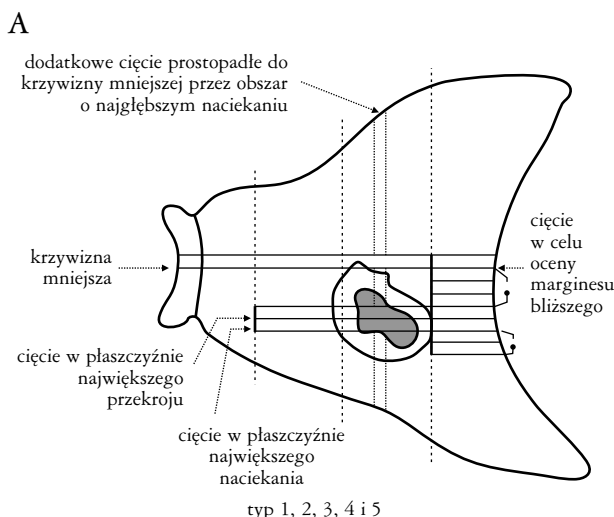


Rycina 1. Sposób pobrania wycinków we wczesnym raku żołądka. Schemat pokazuje konieczność wykonania kolejnych przekrojów przez makroskopowo podejrzany obszar o nacieku raka i zbadanie pobranych wycinków w całości [7]

Reprinted by permission from Japanese Gastric Cancer Association: Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric Cancer* 2011; 14: 101-112.

Cancer dla stopnia zaawansowania T1 nowotworu w klasyfikacji TNM. W tabelach I i II przedstawiono makroskopowe typy wczesnego i zaawansowanego raka żołądka. Na szczególną uwagę zasługuje typ 0 III raka wczesnego, w którym nacieki raka ograniczony jest do brzegów owrzodzenia. W rzadkich przypadkach wycinek pobrany podczas biopsji endoskopowej z brzegu owrzodzenia może zawierać cały nacieki raka, a w materiale operacyjnym, mimo dokładnego i seryjnego zbadania całego guza, można nie wykryć nowotworu. Cechą tą wczesny rak żołądka różni się od podobnego typu 0 III powierzchniowego raka przełyku, gdy nacieki raka stwierdza się również w dnie owrzodzenia.

Szczególną postać stanowi typ 4 zaawansowanego raka żołądka, który rozległe i szeroko szerzy się śródściennie, zajmując często całą grubość ściany narządu. W począt-



Rycina 2A. Sposób wykonania przekrojów przez guz w płaszczyźnie największego i najgłębszego przekroju wraz z pobraniem wycinków. W celu zbadania marginesu proksymalnego należy wykonać cięcia prostopadłe do linii chirurgicznego odcięcia żołądka oraz zbadać je seryjnie [7]

Reprinted by permission from Japanese Gastric Cancer Association: Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric Cancer* 2011; 14: 101-112.

kowych stadiach rozwoju ta postać raka może być łatwa do przeoczenia w badaniu endoskopowym, a powierzchniowo pobrane wycinki nie będą zawierały tkanek nowotworu. W przypadkach tych brzeg guza jest niemożliwy do oceny i dlatego w niektórych ośrodkach klinicznych w trakcie operacji wykonuje się badania śródoperacyjne celem dokładniejszej oceny resekcyjności nowotworu. W zaawansowanym stadium rak równomiernie nacieka ścianę żołądka, znacznie zwężając jego światło.

5. Przybliżoną głębokość nacieku nowotworowego w ścianie żołądka z określeniem warstw ściany żołądka objętych tym naciekiem i stwierdzeniem, czy nacieki obejmują tkanki otaczające żołądek.

6. Stan marginesu proksymalnego i dystalnego z zaznaczeniem, czy marginesy są zajęte przez proces nowotworowy, i podaniem odległości marginesu od nacieku nowotworowego.

7. Opis zmian na powierzchni surowicówki z zaznaczeniem ich tuszem.

8. Stan, lokalizację i liczbę węzłów chłonnych z określeniem liczby powiększonych węzłów chłonnych podejrzanych o przerzuty nowotworowe.

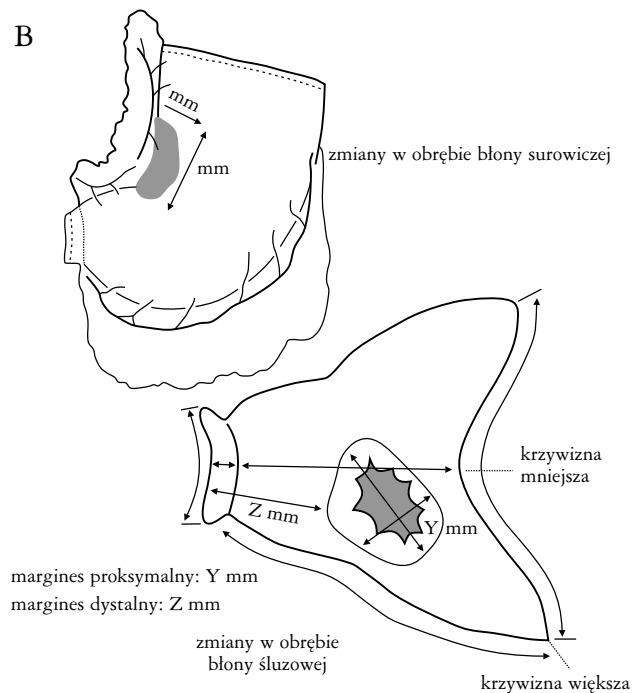
9. Stan sieci mniejszej, większej i otaczających tkanek.

10. Opis śledziony, jeżeli jest obecna w materiale operacyjnym.

2.4.3. Określenie miejsc i minimalnej liczby pobranych wycinków

W celu ustalenia pełnego rozpoznania histopatologicznego patomorfolog zobowiązany jest do pobrania następujących wycinków z materiału pooperacyjnego:

- margines proksymalny;
- margines dystalny;



Rycina 2B. Sposób zbadania zmian w obrębie surowicówki oraz pobrania wycinków ze zmian w otaczającej błonie śluzowej [7]

- c) margines radialny (zawsze oznaczony tuszem), który w żołądku stanowią tkanki miękkie niepokryte otrzewną w najbliższym sąsiedztwie najgłębszego nacieku raka. W żołądku jedynymi marginesami radialnymi mogą być również marginesy w obrębie sieci mniejszej (więzadła wątrobowo-dwunastnicze i wątrobowo-żołądkowe) oraz krzywizny większej;
- d) przynajmniej 3 wycinki z guza zawierające:
- najgłębszy naciek w ścianie żołądka,
 - najbliższy naciek od strony marginesu proksymalnego/dystalnego,
 - zajęcie surowicówki,
 - zajęcie marginesu obwodowego w guzach wpustu;
- e) węzły chłonne (ważna jest liczba usuniętych węzłów chłonnych – minimum 15) mogą być usunięte w grupach przez chirurga i przysłane w oddzielnych pojemnikach lub w jednym bloku z żołądkiem;
- f) jeżeli usunięta jest śledziona, to należy pobrać dodatkowo węzły chłonne wnęki śledziony;
- g) wycinki ze ściany żołądka spoza guza;
- h) wycinki z innych zmian w błonie śluzowej i/lub ścianie żołądka.

Ryciny 1., 2A i 2B przedstawiają sposoby pobrania wycinków w raku wczesnym i zaawansowanym żołądka [7].

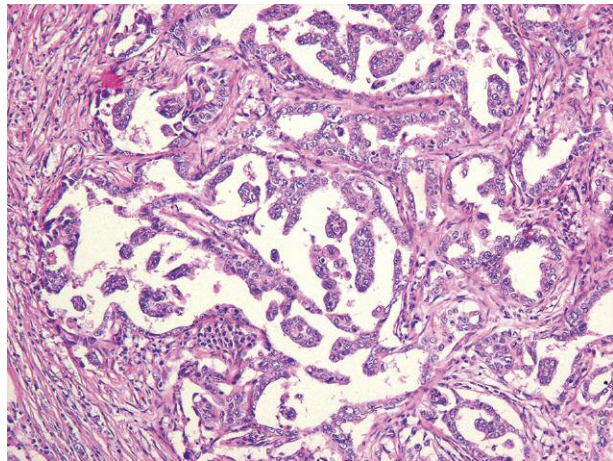
2.4.4. Zasady badania mikroskopowego materiału operacyjnego

W badaniu mikroskopowym materiału operacyjnego należy określić typ histologiczny i stopień dojrzałości wg klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia (*World Health Organization* – WHO), typ histologiczny wg Laurena, stopień kliniczno-patologicznego zaawansowania raka wg systemu pTNM AJCC/UICC oraz stopień resekcyjności R [1].

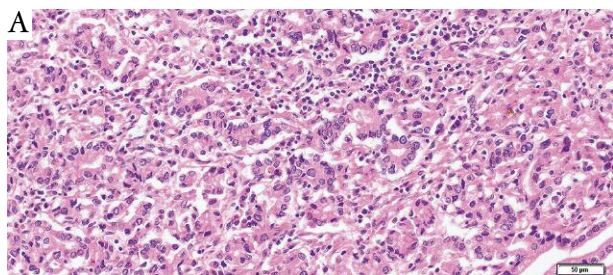
Typ histologiczny raka żołądka:

- rak gruczołowy (*adenocarcinoma*):
 - rak gruczołowy brodawkowy (*papillary adenocarcinoma*) (ryc. 3.),
 - rak gruczołowy cewkowy (*tubular adenocarcinoma*) (ryc. 4.),
 - rak gruczołowy śluzowy (*mucinous adenocarcinoma*) (ryc. 5.),
 - rak o małej spoistości, w tym rak śluzowokomórkowy i inne warianty (*poorly cohesive carcinoma including signet ring cell carcinoma and other variants*) (ryc. 6.),

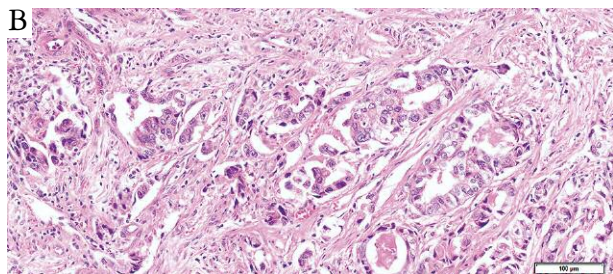
- rak gruczołowy mieszany (*mixed adenocarcinoma*) (ryc. 7.);
- rak gruczołowo-płaskonabłonkowy (*adenosquamous carcinoma*);
- rak z naciekiem limfocytarnym w podścielisku (rak rdzeniasty) [*carcinoma with lymphoid stroma (medullary carcinoma)*] (ryc. 8.);



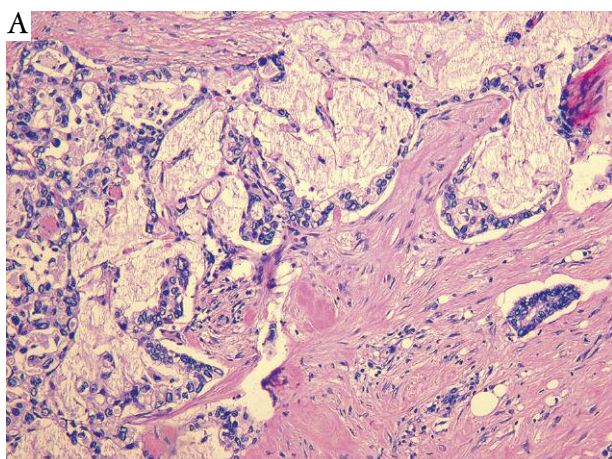
Rycina 3. Rak gruczołowy brodawkowy, HE



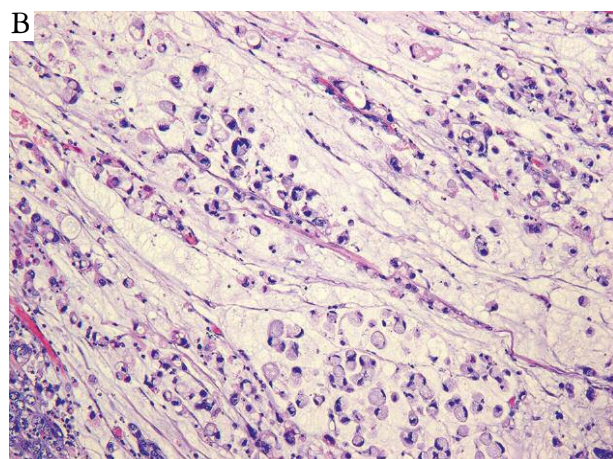
Rycina 4A. Rak cewkowy G1, HE



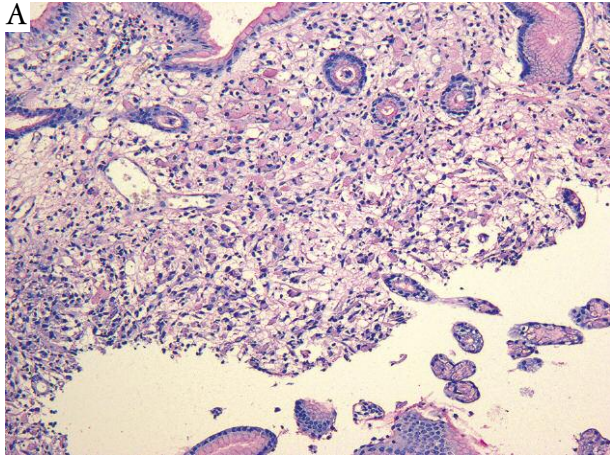
Rycina 4B. Rak gruczołowy G2 typ jelitowy, HE



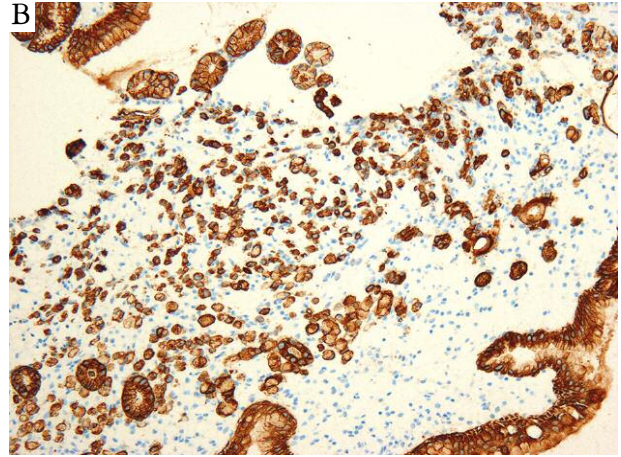
Rycina 5A. Rak gruczołowy śluzowy, barwienie mucikarminem



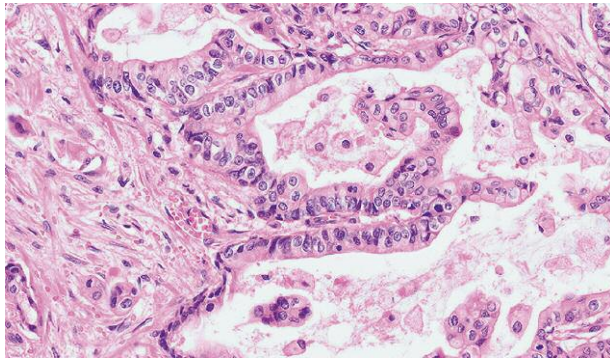
Rycina 5B. Rak gruczołowy śluzowy z komórkami sygnetowatymi, HE



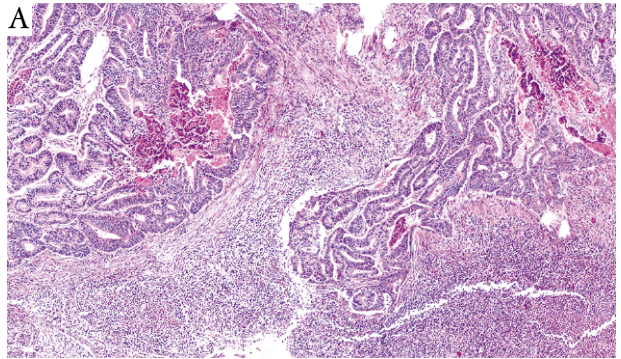
Rycina 6A. Rak bez kohezji (*signet ring cell carcinoma*). Barwienie mucikarminem na obecność śluzu



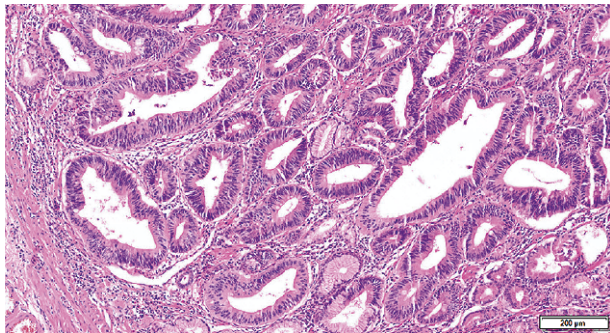
Rycina 6B. Rak bez kohezji. Barwienie immunohistochemiczne z przeciwciałem przeciwko keratynie



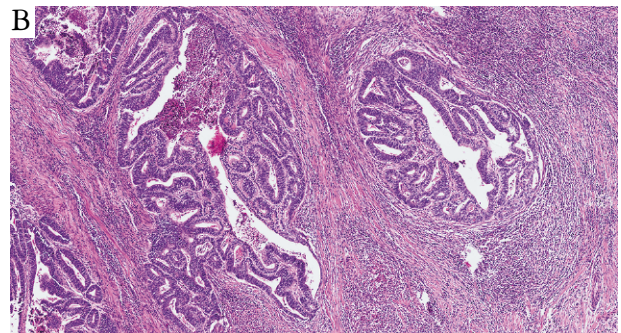
Rycina 7. Rak gruczolowy, typ mieszany (*mixed adenocarcinoma*) G2, HE



Rycina 8A. Rak gruczolowy z naciekiem limfocytarnym, HE



Rycina 9. Rak gruczolowy typ jelitowy Lauren 1, HE



Rycina 8B. Rak z naciekiem limfocytarnym, HE

- rak gruczolowy podobny do wątrobowokomórkowego (*hepatoid adenocarcinoma*);
 - rak płaskonabłonkowy (*squamous cell carcinoma*);
 - rak niezróżnicowany (*undifferentiated carcinoma*).
- W tabelach III, IV i V przedstawiono charakterystykę typów histologicznych raka żołądka.

Stopień dojrzałości (zróżnicowania) raka żołądka

Określenie stopnia histologicznej złośliwości (stopnia zróżnicowania) nowotworu dotyczy wg klasyfikacji WHO z 2010 r. jedynie raków gruczolowych cew-

kowych i brodawkowatych. W wypadku innych typów histologicznych raka żołądka klasyfikacji tej się nie stosuje. W tabeli VI przedstawiono kryteria oceny stopnia dojrzałości (zróżnicowania) raka gruczolowego żołądka [1].

Stopień kliniczno-patologicznego zaawansowania nowotworu

W ramce na stronie s34 przedstawiono kryteria oceny stopnia zaawansowania raka żołądka wg siódmego wydania klasyfikacji pTNM AJCC/UICC [1, 9].

Tabela III. Często spotykane typy histologiczne raka żołądka

<p>Rak gruczołowy brodawkowy (<i>papillary adenocarcinoma</i>) (ryc. 3.) najczęściej jest nowotworem o wysokim stopniu dojrzałości, zbudowanym z palczastych wydłużonych rozrostów pokrytych gruczołowymi komórkami nowotworowymi z włóknisto-naczyniowym podścieliskiem. Komórki nowotworowe mają tendencję do utraty polarności.</p> <p>W części guzów oprócz utkania brodawkowego występuje również utkanie cewkowe. Brzeg nacieku nowotworowego jest w większości przypadków ostro odgraniczony. W utkaniu nowotworu często stwierdza się ostry lub przewlekły naciek zapalny.</p>
<p>Rak gruczołowy cewkowy (<i>tubular adenocarcinoma</i>) (ryc. 4.) jest zbudowany z gruczołowych cewek nowotworowych częściowo rozgałęzionych o różnej średnicy. Stopień atypii komórkowej waha się od małego do dużego. Nisko dojrzały wariant gruczołowego raka cewkowego można nazwać rakiem litym. W tym typie nowotworu obserwujemy włóknienie podścieliska (desmoplazję) o różnym stopniu nasilenia.</p>
<p>Rak gruczołowy śluzowy (<i>mucinous adenocarcinoma</i>) (ryc. 5.) cechuje się obfitym wydzielaniem śluzu, również do podścieliska, i jest zbudowany z komórek gruczołowych i pozakomórkowych jeziorok śluzu. W celu rozpoznania tego nowotworu niezbędne jest stwierdzenie obecności śluzu pozakomórkowego na ponad 50% obszaru nacieku nowotworowego. Rak gruczołowy śluzowy może zawierać w swoim utkaniu nieliczne rozproszone komórki śluzowe sygnetopodobne.</p>
<p>Rak o małej kohezji (<i>poorly cohesive carcinoma</i>) zbudowany jest z izolowanych lub tworzących małe grupy komórek raka. Ten typ nowotworu obejmuje raka śluzowokomórkowego z licznymi sygnetowatymi komórkami (ryc. 6.). Rozpoznanie tego typu raka jest możliwe, gdy naciek z nowotworowych komórek śluzowych stanowi powyżej 50% utkania. W raku śluzowokomórkowym naciekowi nowotworowemu często towarzyszy znaczne włóknienie (desmoplazja) w głębszych warstwach ściany żołądka. Innymi wariantami tego typu nowotworu są guzy zbudowane z komórek przypominających histiocyty, komórki plazmatyczne lub limfocyty. W innym wariantcie komórki nowotworowe zawierają silnie eozynofilną cytoplazmę lub nieregularne, dziwaczne jądra. Niekiedy ten typ nowotworu zbudowany jest z różnych wyżej opisanych wariantów histologicznych.</p>
<p>Rak gruczołowy mieszany (<i>mixed adenocarcinoma</i>) w swoim utkaniu stanowi połączenie raka określanego jako rak gruczołowy cewkowy lub brodawkowy i raka śluzowokomórkowego lub innego typu raka o małej spoistości.</p>

Tabela IV. Rzadko spotykane typy histologiczne raka żołądka

<p>Rak gruczołowo-płaskonabłonkowy (<i>adenosquamous carcinoma</i>) stanowi mieszaninę utkania raka gruczołowego i płaskonabłonkowego. Raki tego typu zlokalizowane w okolicy wpustu winny być szczególnie dokładnie przebadane, czy nie jest to rak przelicy (połączenia przelicykowo-żołądkowego) naciekający żołądek. W zaawansowanych przypadkach może to być trudne.</p>
<p>Rak z naciekiem limfocytarnym w podścielisku (rak rdzeniasty) [<i>carcinoma with lymphoid stroma (medullary carcinoma)</i>] jest to niezróżnicowany nowotwór z obfitym naciekiem limfocytarnym (rak rdzeniasty z limfocytami w podścielisku), przypominający analogiczny nowotwór nosogardzieli z podobnym, w większości przypadków, występowaniem antygenów wskazujących na infekcję wirusem Epsteina-Barr.</p>
<p>Rak gruczołowy podobny do wątrobowokomórkowego (<i>hepatoid adenocarcinoma</i>) to rak wykazujący zarówno różnicowanie gruczołowe, jak i „hepatoidne” oraz „enteroblastyczne” cewkowe i brodawkowe z komórkami jasnymi. Połowa przypadków wykazuje obecność α-fetoproteiny (AFP). Komórki „hepatoidne” zawierają glikogen, kule szkliste, czasem nawet żółć. Nowotwór ma zazwyczaj masywny, guzowaty typ wzrostu, wczesnie nacieka naczynia, rokowanie jest złe.</p>
<p>Rak płaskonabłonkowy (<i>squamous cell carcinoma</i>) nie odbiega w swojej strukturze od raków płaskonabłonkowych w innej lokalizacji.</p>
<p>Rak niezróżnicowany (<i>undifferentiated carcinoma</i>) to nowotwór zawierający w swoim utkaniu poniżej 5% struktur gruczołowych, a pozostałe komórki nowotworowe nie wykazują żadnych cech histoforformatywnych pozwalających na określenie ich pochodzenia. Wcześniej ten typ nowotworu określano jako G4.</p>

Tabela V. Podział raka żołądka według Laurena

PODZIAŁ RAKA ŻOŁĄDKA WEDŁUG LAURENA
Typ I – rak jelitowy, ograniczony, zawierający w swoim utkaniu głównie elementy raka gruczołowego o różnym stopniu dojrzałości (ryc. 9.)
Typ II – rak rozlany zawierający powyżej 50% utkania raka o małej spoistości, w tym raka śluzowokomórkowego i inne jego warianty
Typ III – postać mieszana zawierająca w swoim utkaniu zarówno elementy raka gruczołowego o różnym stopniu dojrzałości, jak i raka o małej spoistości, w tym raka śluzowokomórkowego i inne jego warianty

Tabela VI. Ocena stopnia zróżnicowania (dojrzałości) raka gruczołowego żołądka (G)

OCENA STOPNIA ZRÓŻNICOWANIA (DOJRZAŁOŚCI) RAKA GRUCZOŁOWEGO ŻOŁĄDKA
Raki gruczołowe o wysokim stopniu dojrzałości G1 zawierające w swoim utkaniu powyżej 95% struktur gruczołowych
Raki gruczołowe o pośrednim stopniu dojrzałości G2 zawierające w swoim utkaniu 50–95% struktur gruczołowych
Raki gruczołowe o niskim stopniu dojrzałości G3 zawierające w swoim utkaniu 5–50% struktur gruczołowych

Klasyfikacja zaawansowania patologicznego pTNM dla raka żołądka (VII edycja)

OCENA GŁĘBOKOŚCI NACIEKU NOWOTWOROWEGO (pT)

pTX	– nie można ocenić guza pierwotnego
pT0	– nie stwierdzono guza pierwotnego
pTIS	– rak przedinwazyjny (śródnabłonkowe nowotworzenie dużego stopnia)
pT1	– guz ograniczony do błony śluzowej i podśluzowej:
pT1a	– naciek raka obecny wyłącznie w błonie śluzowej
pT1b	– naciek raka obecny w błonie śluzowej i podśluzowej
pT2	– naciek raka obecny w mięśniówce właściwej
pT3	– naciek raka obecny w warstwie podsurowicówkowej
pT4	– guz przekraczający surowicówkę lub naciekający struktury sąsiadujące:
pT4a	– naciek przekracza surowicówkę (otrzewną trzewną)
pT4b	– naciek obejmuje sąsiadujące struktury

Uwaga 1. Naciek raka poza mięśniówką właściwą, w więzadle żołądkowo-jelitowym lub żołądkowo-wątrobowym lub sieci większej bądź mniejszej, bez perforacji otrzewnej zaliczany jest do pT3.

Jeżeli widoczna jest perforacja otrzewnej trzewnej pokrywającej te struktury, to guz klasyfikowany jest jako pT4a.

Uwaga 2. Do sąsiadujących narządów zaliczamy: śledzionę, poprzecznicę, wątrobę, przeponę, trzustkę, ścianę jamy brzusznej, nadnercza, nerki, jelito cienkie, przestrzeń zaotrzewnową.

Śródścienne naciekanie dwunastnicy i przełyku klasyfikowane jest jako najgłębszy naciek w tych strukturach, włączając żołądek.

OCENA REGIONALNYCH WĘZŁÓW CHŁONNYCH (pN):

pNX	– nie badano węzłów chłonnych
pN0	– nie stwierdzono przerzutów nowotworowych w węzłach chłonnych
pN1	– przerzuty nowotworowe w 1–2 węzłach chłonnych
pN2	– przerzuty nowotworowe w 3–6 węzłach chłonnych
pN3	– przerzuty nowotworowe w 7 lub więcej węzłach chłonnych
pN3a	– przerzuty nowotworowe w 7–15 węzłach chłonnych
pN3b	– przerzuty nowotworowe w 16 lub więcej węzłach chłonnych

Uwaga. W aktualnej klasyfikacji TNM kontrowersyjne zmiany: drobne guzki nowotworowe w tkance łącznej, klasyfikowane są jako przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych, jeżeli mają „postać i gładki zarys jak węzeł chłonny”. Guzki o nieregularnym zarysie klasyfikowane są wg kategorii pT.

PRZERZUTY NOWOTWOROWE ODLEGŁE (pM)

pM0	– nie stwierdzono przerzutów odległych
pM1	– obecne odległe przerzuty nowotworowe

Uwaga. Węzły chłonne jamy brzusznej, takie jak pozatrzustkowe, krezkowe, okołoaortalne, klasyfikuje się jako M1. Przerzuty do wątroby i wszczepy otrzewnowe również klasyfikowane są jako M1.

Tabela VII. Kryteria oceny resekcyjności raka żołądka

OCENA RESEKCYJNOŚCI RAKA ŻOŁĄDKA – KLASYFIKACJA R
Symbol R0 oznacza całkowitą makroskopową i mikroskopową resekcję z brakiem nacieku nowotworowego w marginesie proksymalnym, dystalnym i radialnym
Symbol R1 oznacza mikroskopowo stwierdzany naciek raka w marginesie proksymalnym i/lub dystalnym i radialnym
Symbol R2 oznacza makroskopowo i mikroskopowo stwierdzany naciek raka w marginesie proksymalnym i/lub dystalnym i radialnym

Tabela VIII. Kryteria mikroskopowej odpowiedzi raka na leczenie przedoperacyjne

OCENA ODPOWIEDZI RAKA NA LECZENIE PRZEDOPERACYJNE
Stopień 0 – brak nacieku raka w preparacie nadesłanym do badania
Stopień 1. – znaczna odpowiedź na leczenie z obecnością nielicznych komórek nowotworowych w preparacie nadesłanym do badania
Stopień 2. – średnia odpowiedź na leczenie z obecnością umiarkowanej liczby komórek nowotworowych w preparacie nadesłanym do badania
Stopień 3. – brak lub mała odpowiedź na leczenie z nieznaczną redukcją lub brakiem redukcji nacieku nowotworowego w preparacie nadesłanym do badania

Tabela IX. Czynniki prognostyczne i predykcyjne w zaawansowanym miejscowo raku żołądka

1. Głębokość naciekania ściany żołądka wg klasyfikacji pTNM UICC/AJCC
2. Naciekanie surowicówki pT4 Niezależny czynnik prognostyczny wiążący się z 5-letnim przeżyciem poniżej 50%
3. Margines proksymalny i dystalny żołądka wg klasyfikacji R Istotny czynnik prognostyczny i predykcyjny oraz podstawa oceny jakości leczenia chirurgicznego Przypadki R1 lub R2 traktowane są jako leczone nieradykalnie
4. Typ histologiczny raka wg klasyfikacji WHO i Laurena Typ rozlany świadczy o złym rokowaniu, wiąże się z rozległym śródściennym naciekiem raka i trudnym do oceny makroskopowo marginesem
5. Liczba i stan regionalnych węzłów chłonnych Pięcioletnie przeżycie radykalnie zmniejsza się wraz ze wzrostem liczby węzłów chłonnych z przerzutami i wynosi 46% w przypadku zajęcia od 1 do 6 węzłów chłonnych oraz 30% w przypadku 7–15 węzłów chłonnych z przerzutami Minimalna liczba 15 węzłów chłonnych w preparacie operacyjnym świadczy o jakości wykonanej operacji

Dodatkowo w klasyfikacji pTNM stosuje się następujące oznaczenia:

- pT (m)NM – liczne guzy,
- rTNM – guz nawrotowy stwierdzany, kiedy udokumentowany jest okres bez obecności nacieku nowotworowego,
- aTNM – guz stwierdzany w trakcie autopsji.

Ocena marginesów chirurgicznych

Kolejnym elementem rozpoznania histopatologicznego w wypadku raka żołądka jest ocena resekcyjności guza wg klasyfikacji R, w której dla raka żołądka przyjęto kryteria przedstawione w tabeli VII.

W celu uzupełnienia informacji podanych w tabeli VIII należy dodać, że jeśli guz zlokalizowany jest we wpuszcie, to ocenia się margines obwodowy (*circumferential surgical resection margin* – CRM) w obrębie dolnego odcinka przełyku wg klasyfikacji raka przełyku. Jeżeli guz (naciek raka, ogniska depozytowe w tkankach miękkich lub przerzuty w węzłach chłonnych) znajdują się w odległości mniejszej niż 1 mm od CRM, to ten margines jest określany jako mikroskopowy naciek (R1). Patomorfolog poza określeniem resekcyjności guza (klasyfikacja R) powinien podać (w milimetrach) odległość nacieku nowotworowego od linii cięcia.

Inne czynniki prognostyczne oceniane w preparatach barwionych hematoksyliną i eozyną

W badaniu histopatologicznym powinno się również uwzględnić inne prognostyczne cechy, takie jak: inwazję naczyń krwionośnych i limfatycznych oraz nacieki nowotworowe wzdłuż naczyń i nerwów.

Jeżeli pacjent przed zabiegiem chirurgicznym był leczony metodami neoadiuwantowymi, patomorfolog powinien opisać morfologiczne rezultaty leczenia i określić odpowiedź na leczenie wg kryteriów przedstawionych w tabeli VIII.

3. Czynniki predykcyjne w raku żołądka

3.1. Rak żołądka zaawansowany miejscowo leczony operacyjnie bez chemioradioterapii przedoperacyjnej

Czynniki prognostyczne i predykcyjne dzielą chorych ze względu na konieczność zastosowania lub odstąpienia od leczenia uzupełniającego w postaci adiuwantowej chemioradioterapii. Dlatego też tak ważna jest prawidłowa ocena materiału operacyjnego oraz współpraca z chirurgiem, warunkująca jakość badania histopatologicznego. Kluczowa jest ocena patomorfologiczna operacyjnie usuniętego narządu wraz z guzem, którą przedstawiono powyżej. Klinicznie przydatne czynniki prognostyczne i predykcyjne w raku żołądka leczonym operacyjnie przedstawiono w tabeli IX.

3.2. Rak żołądka zaawansowany miejscowo leczony operacyjnie oraz chemioradioterapią przedoperacyjną

W wypadku osób z rakiem żołądka leczonych przed operacją, po chemioradioterapii przedoperacyjnej, wyma-

Tabela X. Kryteria odpowiedzi raka żołądka na chemioradioterapię przedoperacyjną

STOPIEŃ REGRESJI RAKA	INTERPRETACJA
0 – całkowita regresja	brak komórek raka
1 – odpowiedź średniego stopnia (<i>moderate response</i>)	pojedyncze komórki lub małe ich grupy
2 – odpowiedź małego stopnia (<i>minimal response</i>)	grupy komórek raka otoczone włóknistym podścieliskiem
3 – odpowiedź słaba lub brak odpowiedzi (<i>poor response</i>)	minimalny efekt lub jego brak, rozlany naciek raka bez zmian po leczeniu

Wyttyczne wg *National Comprehensive Cancer Network (NCCN) version 2.2012 Gastric Cancer z uwzględnieniem wytycznych College of American Pathologists (www.cap.org)*

ga się dodatkowo określenia odpowiedzi terapeutycznej nowotworu na leczenie. Kryteria tej oceny przedstawiono w tabeli X.

3.3. Rak żołądka wymagający adiuwantowej chemioradioterapii

Chorzy z rakiem żołądka kwalifikowani są do radiochemioterapii na podstawie źle rokujących mikroskopowych czynników prognostycznych w materiale operacyjnym lub już w momencie rozpoznania jako pacjenci z nieoperacyjnym i nieresekcyjnym nowotworem, wymagający leczenia paliatywnego. Należy podkreślić, że na terapię uzupełniającą kierowani są chorzy leczeni chirurgicznie, ale w sposób nieradykalny, z resekcją żołądka typu R1 lub R2, lub gdy nie ma podanych przez patologa marginesów chirurgicznych w raporcie histopatologicznym. Również zbyt mała liczba węzłów chłonnych zweryfikowanych w materiale operacyjnym powoduje traktowanie pacjentów jako leczonych nieradykalnie. Rokowanie wymienionej grupy chorych, mimo stosowania chemioradioterapii, jest jednak nadal niepomyślne, a mediana przeżycia wynosi 11 miesięcy. U części pacjentów z nieresekcyjnym zaawansowanym rakiem żołądka z przerzutami nadzieję budzi terapia celowana trastuzumabem (Herceptin), przeciwciałem monoklonalnym ukierunkowanym na zewnątrzkomórkową domenę receptora HER2 z klasyczną chemioterapią. W badaniu klinicznym III fazy ToGA Trial (2009 ASCO) wykazano wzrost mediany przeżycia chorych do 16 miesięcy.

3.3.1. Ekspresja receptora HER2 w raku żołądka

Receptor HER2 należy do rodziny ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu. Amplifikacja genu *HER2* wiąże się z nadekspresją białka HER2. HER2 jest przezbłonowym receptorem o aktywności kinazy tyrozynowej, zaangażowanym w przewodzenie sygnałów prowadzących do indukcji wzrostu i różnicowania komórek. Trastuzumab ma zdolność do specyficznego wiązania się z domeną IV pozakomórkowej części białka HER2. Poprzez blokowanie receptora, hamuje nadmierną proliferację komórek, które wykazują jego nadekspresję. Receptor HER2 jest czynnikiem predykcyjnym

w odniesieniu do leczenia trastuzumabem raka żołądka. Nadekspresja receptora HER2 stwierdzana jest w 13–23% wszystkich przypadków raka żołądka, w 16–34% raków typu jelitowego wg Laurena i w 24–34% przypadków zmian usytuowanych w połączeniu przełykowo-żołądkowym.

Istotą oceny amplifikacji jest oznaczenie wskaźnika R (*ratio*), czyli stosunku liczby kopii genu *HER2* do liczby centromerów chromosomu 17, na którym gen ten jest położony. Ekspresja immunohistochemiczna białka HER2 (3+) oraz wskaźnik ISH > 2,2 z ekspresją HER2 określoną na 2+ lub 3+ świadczą o obecności amplifikacji genu *HER2*, która jest czynnikiem predykcyjnym terapii trastuzumabem osób chorych na raka żołądka. Ocena czynników predykcyjnych metodami immunohistochemicznymi i molekularnymi będących podstawą do zastosowania drogiej terapii celowanej wymaga doświadczenia osób wykonujących badania. Bardzo ważną jest także walidacja i kontrola jakości stosowanych metod. Zgodnie z zaleceniami światowymi powinien być prowadzony rejestr zakładów oraz pracowni histopatologicznych dokonujących oceny HER2, walidacja warunków pracy i stosowanych metod badawczych IHC i hybrydyzacji *in situ* oraz kontrola jakości wykonywanych badań.

Podstawą oceny jakości badania jest standaryzacja procedur badania, która uwzględnia:

- A. Przygotowanie materiału tkankowego.
- B. Wykonanie badania HER2 metodą immunohistochemiczną i/lub ISH.
- C. Ocenę ekspresji immunohistochemicznej HER2 lub badania ISH u chorych na raka żołądka lub połączenia przełykowo-żołądkowego.
- D. Walidację i kontrolę jakości badania statusu HER2 metodami IHC i ISH w raku żołądka.

Ad A. Materiał należy utrwalić w 10-procentowej zbuforowanej formalinie (wodny nasycony ok. 35–40-procentowy roztwór aldehydu mrówkowego (inaczej formaldehydu) zbuforowany do pH = 7,2) w czasie minimum 8 godz. i maksimum 48 godz.

Ad B. Wykonanie badania immunohistochemicznego wymaga standaryzacji protokołu metody i aparatury (wyposażenie pracowni). Do kolejnych etapów postępowania z materiałem tkankowym należą:

- odwodnienie i prześwietlenie, kolejno w etanolu i ksylenie,

Tabela XI. Kryteria oceny barwienia immunohistochemicznego HER2 z interpretacją

SKALA OCENY BARWIENIA IMMUNOPATOLOGICZNEGO RECEPTORA HER2 I JEJ INTERPRETACJA	
WYNIK	INTERPRETACJA
0, 1+	stan negatywny
2+	stan graniczny (wymaga dalszego postępowania diagnostycznego – ocena metodą hybrydyzacji <i>in situ</i>)
3+	stan pozytywny

Tabela XII. Ocena amplifikacji genu *HER2* i interpretacja wyniku

WSKAŹNIK R	OBECNOŚĆ AMPLIFIKACJI	INTERPRETACJA
< 1,8	brak amplifikacji genu <i>HER2</i>	stan negatywny
$1,8 \leq R \leq 2,2$	amplifikacja wątpliwa	stan graniczny – wymaga powtórzenia oceny amplifikacji
$R > 2,2$	amplifikacja genu <i>HER2</i>	stan pozytywny
w badaniu powtórnym przeprowadzonym metodą FISH $R \geq 2,0$	amplifikacja genu <i>HER2</i>	stan pozytywny

FISH – fluorescent *in situ* hybridization (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*)

Uwaga! W przypadku, gdy w badaniu amplifikacji genu *HER2* wskaźnik R wynosi 1,8–2,2 (stan graniczny), konieczne jest wykonanie powtórzonego badania.

W trakcie powtórzonego badania należy przeanalizować kolejnych co najmniej 20 komórek raka, najlepiej w innym fragmencie badanego skrawka lub na innym wycinku z guza; w tym przypadku za dodatni wynik badania amplifikacji genu *HER2* uznaje się wskaźnik $R \geq 2,0$. W stanach granicznych zaleca się dodatkowo ocenę liczby kopii genu *HER2*; zdaniem ekspertów stwierdzenie ponad 6 kopii genu *HER2* uważa się za wynik pozytywny, gdy liczba kopii jest mniejsza od 4 statusu genu *HER2* traktowany jest jako negatywny.

- zatopienie w parafinie w temp. 55–60°C,
- krojenie na skrawki ok. 4 μm,
- położenie skrawków na szkiełkach z właściwościami przylegania (*superfrost slides*, *poly-L-lysine-coated slides*),
- suszenie preparatów ze skrawkami przez 12–24 godz. w temperaturze pokojowej lub godzinę w 60°C,
- całkowite odparafinowanie i prześwietlenie w ksylenie w temperaturze pokojowej.

Walidacja metody oceny immunohistochemicznej HER2 wymaga:

A. Użycia komercyjnie dostępnych dwóch zestawów do IHC: Ventana anti-HER-2/*neu* Rabbit Monoclonal Primary Antibody kit (Ventana/Roche Tissue Diagnostics) i HercepTest (Dako). Inne przeciwciała nie są zalecane.

B. Wiarygodności i powtarzalności metody, na które składa się czas przechowywania ukrojonych preparatów (2–4 tygodnie), oraz uwzględnienia w technice odkrywania antygeny aktywacji endogennej biotyny jako nieswoistego tła reakcji.

C. Wykonania (z zastosowaniem tych samych warunków reakcji) kontroli dodatniej i ujemnej.

Ad C. Ocena statusu receptora HER2 jest domeną patomorfologa. Najpierw należy zastosować metodę immunohistochemiczną. W przypadkach problematycznych w immunohistochemii rekomendowane jest badanie FISH (*fluorescence in situ hybridization*) i SISH (*silver in situ hybridization*). Wynik pozytywny potwierdza amplifikacja genu *HER2*.

Na patomorfologu spoczywa odpowiedzialność za wybór właściwego skrawka tkankowego do badania ekspresji receptora HER2 (lub amplifikacji jego genu). Ze względu na heterogenny charakter odczynu na HER2 w komórkach raka żołądka w przypadku materiałów biop-

syjnych zalecane jest testowanie całego dostępnego materiału tkankowego. W przypadku materiałów operacyjnych patomorfolog winien wybrać do badania ekspresji HER2 wycinek tkankowy o najlepszej jakości (pozbawiony artefaktów), zawierający jak najmniejsze ogniska martwicy. W przypadku mieszanego histologicznego utkania guza do badania HER2 należy wybrać skrawki zawierające komponent raka typu jelitowego.

Kryteria oceny receptora HER2 w raku żołądka: Badanie immunohistochemiczne ekspresji HER2 wymaga zastosowania jakościowych i ilościowych akceptowanych standardowych kryteriów oceny reakcji w preparacie. Zaliczają się do nich: lokalizacja reakcji barwnej, liczba komórek z pozytywną reakcją, intensywność reakcji barwnej i powiększenie w mikroskopie świetlnym. W raku żołądka za prawidłową reakcję ekspresji HER2 uznawany jest błonowy odczyn obecny na powierzchni podstawno-bocznej lub bocznej komórki przy braku reakcji od strony światła gruczołów. Zasadnicza różnica w interpretacji badania IHC statusu receptora HER2 w raku żołądka w porównaniu z rakiem piersi polega na określeniu granicznej liczby komórek uznanych za reakcję pozytywną. Kryterium oceny pozytywnej reakcji IHC stanowi grupa co najmniej 5 komórek w biopsji endoskopowej raka żołądka oraz 10% komórek w materiale operacyjnym usuniętego nowotworu. Należy zaznaczyć, że w raku żołądka amplifikacja genu *HER2* nie zawsze koreluje z ekspresją ocenianą immunohistochemicznie. Wymieniane są przypadki, w których nie ma ekspresji HER2 lub jest ona oceniona na HER2 1+ i jednocześnie stwierdza się amplifikację genu *HER2*. Z kolei w części raków z ekspresją HER2 3+ nie stwierdza się am-

Tabela XIII. Kryteria oceny receptora HER2 metodami IHC i ISH w raku żołądka

WYNIK	IHC KRYTERIA OCENY PREPARATÓW OPERACYJNYCH (DUŻE WYCINKI)	IHC KRYTERIA OCENY PREPARATÓW BIOPSYJNYCH (MAŁE WYCINKI)	STATUS HER2
0	brak odczynu lub reakcja barwna w błonach komórkowych w < 10% komórek raka	brak odczynu lub reakcja barwna w błonach komórkowych w < 5 komórek raka	ujemny
1+ (powiększenie 40×)	słaba reakcja barwna błonowa ≥ 10% komórek raka, reakcja błonowa o charakterze nieciągłym	słaba reakcja barwna błonowa niezależnie od procentu wybarwionych komórek (przynajmniej 5 komórek raka)	ujemny
2+ (powiększenie 10–20×)	słaba do średniej kompletna reakcja barwna błonowa, reakcja błonowa boczno-podstawna lub boczna w ≥ 10% komórek raka	słaba do średniej kompletna reakcja barwna błonowa, boczno-podstawna lub boczna niezależnie od procentu wybarwionych komórek, w ≥ 5 komórkach raka	niejednoznaczny, wymaga wykonania ISH*
3+ (powiększenie 2,5–5×)	silna, kompletna reakcja barwna błonowa, podstawno-boczna lub boczna ≥ 10% komórek raka	silna, kompletna reakcja barwna błonowa, podstawno-boczna lub boczna, niezależnie od procentu wybarwionych komórek, ≥ 5 komórek raka	dodatni

*w przypadku niejednoznacznego wyniku badania IHC status genu HER2 należy ustalić na podstawie badania ISH. Za dodatni wynik badania HER2-ISH uznaje się wskaźnik $R > 2,2$. Wskaźnik $R < 1,8$ oznacza wynik ujemny, a wskaźnik $1,8 \leq R \leq 2,2$ traktowany jest jako stan graniczny

Tabela XIV. Rekomendacje immunohistochemiczne według European Medicines Agency (J. Rüschoff, *Modern Pathology*, 2012; 1-14). Wytyczne do badania IHC

WYTYCZNE DO BADANIA IHC
Reprezentatywny materiał operacyjny lub odpowiedni z biopsji (6–8 wycinków). Jeśli wycinki zawierają martwicę, należy zbadać wszystkie żywe fragmenty tkankowe. Immunohistochemia jest pierwszą metodą do oceny statusu HER2.
HER2 pozytywny: IHC HER2/3+ lub IHC 2+/FISH+, lub IHC 2+/SISH+
Przypadki graniczne: – IHC1+/IHC2+ – ogniskowa i intensywna reakcja błonowa w < 10% komórek potwierdzona FISH lub SISH+ (obie metody podane w raporcie)
Należy używać jedynie zaaprobowanych (zwalidowanych) zestawów HER2.
Materiał operacyjny: całkowita, podstawno-boczna lub boczna reakcja w ≥ 10% komórek. Wycinki endoskopowe: całkowita, podstawno-boczna lub boczna reakcja w co najmniej 5 komórkach. Powiększenie mikroskopowe należy analizować razem z oceną punktową reakcji.

FISH – fluorescent in situ hybridization, SISH – silver in situ hybridization

Tabela XV. Rekomendacje immunohistochemiczne według European Medicines Agency (J. Rüschoff, *Modern Pathology*, 2012, 1-14). Kontrola jakości

KONTROLA JAKOŚCI
Zalecane jest używanie walidowanych kit-ów do IHC i testów hybrydyzacji <i>in situ</i> . Obligatoryjne są kontrole dodatnia i ujemna. Okres 5 dni jest zalecany do uzyskania całkowitej diagnozy, od momentu otrzymania materiału do badania do uzyskania wyniku. Interdyscyplinarne spotkania są wskazane w celu omawiania przypadków i aktualizacji wiedzy.
Rekomendowany jest wybór centralnego zakładu, pracowni do wykonywania badań oraz uczestniczenie wszystkich rekomendowanych zakładów i pracowni w programie kontroli jakości badań.

plifikacji genu. Dlatego też wykonanie oceny amplifikacji genu *HER2* w raku żołądka jest kluczowe do podjęcia leczenia. W tabelach XI i XII przedstawiono kryteria oceny barwienia immunohistochemicznego *HER2* i amplifikacji genu *HER2* wraz z ich interpretacją [10].

Ocena ekspresji receptora *HER2* metodą immunohistochemiczną i amplifikacji genu *HER2* metodą hybrydyzacji *in situ* (ISH) jest rekomendowana do stosowania w diagnostyce patomorfologicznej raka żołądka. Zawarta jest w raporcie histopatologicznym wg wytycznych Amerykańskiego Towarzystwa Patologów (*College of American Pathologist*), co przedstawiono w tabeli XIII [11, 12].

Oceniając status receptora *HER2* metodami IHC i ISH, należy zawsze przestrzegać omówionych wyżej standardowych kryteriów. Należy jednak być ostrożnym w interpretacji trudnych i dyskusyjnych przypadków z graniczną reakcją IHC, którą stwierdza się w następujących przypadkach:

1. 1+/2+ w barwieniu IHC.
2. Obecność artefaktycznego zabarwienia na brzegu wycinka.
3. Nieswoiste zabarwienie cytoplazmy komórek raka lub tkanki prawidłowej.
4. Heterogenność barwienia *HER2* w przypadkach operacyjnych z silną reakcją *HER2* przy powiększeniu $2,5 \times 5 \times w < 10\%$ komórek lub przy obecności małych ognisk raka IHC 3+.

Ad D. W lipcu 2010 r. międzynarodowy zespół patologów opracował wytyczne dotyczące diagnostyki i leczenia trastuzumabem osób z rakiem żołądka i rakiem połączenia przelykowo-żołądkowego z przerzutami. Wynik *HER2* pozytywny jest czynnikiem predykcyjnym w wyborze tej terapii. Za wynik pozytywny uznaje się ekspresję IHC *HER2* (3+) lub IHC *HER2* (2+) i potwierdzenie amplifikacji genu *HER2* metodami hybrydyzacji *in situ* FISH lub SISH. W tabelach XIV i XV przedstawiono wytyczne dotyczące badania i kontroli jakości oceny IHC ekspresji receptora *HER2* wg *European Medicines Agency* 2010 [13].

4. Podsumowanie

Rak żołądka jest rozpoznawany w Polsce w stadiach zaawansowanych i często są to nieresekcyjne guzy wymagające stosowania chemioterapii uzupełniającej. Dlatego też, aby poprawić przeżycie i jakość życia chorych, oczekuje się dalszego pogłębienia współpracy między patomorfologami i gastroenterologami w zakresie wykrywania dobrze rokujących postaci raka wczesnego, między patomorfologami i chirurgami onkologicznymi celem poprawy jakości leczenia i oceny mikroskopowej materiału operacyjnego oraz między patomorfologami, biologami molekularnymi i onkologami klinicznymi przy wyborze metod chemioterapii opierających się na czynnikach predykcyjnych.

Rozdział opracowano na podstawie zaleceń do diagnostyki mających rekomendację Polskiego Towarzystwa Patologów [14] i opierając się na klinicznym konsensusie raka żołądka [15].

Piśmiennictwo

1. Lauwers GY, Carneiro F, Graham DY, et al. Gastric carcinoma. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (eds). WHO Classification of tumours of the digestive system, 4th ed. IARC, Lyon 2010; 48-58.
2. Dinis-Ribeiro M, Areia M, de Vries AC, et al. Management of precancerous conditions and lesions in the stomach (MAPS): guideline from the European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE), European Society of Helicobacter Study Group (EHSO), European Society of Pathology (ESP), and the Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva (SPED). *Virchows Arch* 2012; 460: 19-46.
3. Okines A, Verheij M, Allum W, et al. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up On behalf of the ESMO Guidelines Working Group. *Ann Oncol* 2010; 21 Suppl 5: v50-v54.
4. Fujishiro M. Perspective on the practical indications of endoscopic submucosal dissection of gastrointestinal neoplasms. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4289-4295.
5. Akahoshi K, Akahane H. A new breakthrough: ESD using a newly developed grasping type scissor forceps for early gastrointestinal tract neoplasms. *World J Gastrointest Endosc* 2010; 16: 90-96.
6. Probst A, Pommer B, Golger D, et al. Endoscopic submucosal dissection in gastric neoplasia – experience from a European center. *Endoscopy* 2010; 42: 1037-1044.
7. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric Cancer* 2011; 14: 101-112.
8. Sano T, Aiko T. New Japanese classifications and treatment guidelines for gastric cancer: revision concepts and major revised points. *Gastric Cancer* 2011; 14: 97-100.
9. Washington K. 7th edition of the AJCC cancer staging manual: stomach. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 3077-3079.
10. Olszewski WP, Olszewski WT. Rola patomorfologa w doborze terapii ukierunkowanej na receptor czynnika wzrostu naskórka (EGFR) u chorych na nowotwory. *Onkol Prakt Klin* 2010; 6: 228-235.
11. Hofmann M, Stoss O, Shi D, et al. Assessment of a *HER2* scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 2008; 52: 797-805.
12. Ruschoff J, Dietel M, Baretton G, et al. *HER2* diagnostics in gastric cancer – guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch* 2010; 457: 2999-2307.
13. Ruschoff J, Hanna W, Bilous M, et al. *HER2* testing in gastric cancer: a practical approach. *Mod Pathol* 2012; 25: 637-650.
14. Majewski P. Rak żołądka. W: Zalecenia do diagnostyki histopatologicznej nowotworów. Nasierowska-Guttmejer A, Górnicka B (red.). Centrum Onkologii, Oddział Gliwice, Gliwice 2013; 91-98.
15. Kulig J, Wallner G, Drews M, et al. Polish Consensus of treatment of gastric cancer; Update 2013. *Pol Przegl Chir* 2013; 9: 544-562.