

Principle of surgical pathology
& Basic immunohistochemistry studies for surgeon

เรียบเรียงโดย นพ.ศิริวิชญ์ บุญวิวัฒนาการ

บรรยายโดย อ.รศ.นพ.ศุภฤกษ์ ปรีชายุทธ

อาจารย์ผู้ควบคุม อ.พญ.กนิษฐา สกลประภากรกิจ

การให้บริการด้านพยาธิศัลยกรรม (surgical pathology) เป็นส่วนหนึ่งของการให้บริการด้านพยาธิกายวิภาค โดยช่วยให้การวินิจฉัยโรคจากอวัยวะหรือส่วนของอวัยวะตั้งแต่ชิ้นเนื้อขนาดเล็กที่ได้จากการเจาะหรือตัดผ่านกล้อง โดยอาศัยการตรวจด้วยตาเปล่าและการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ รวมถึงการใช้เทคนิคอื่นๆ เช่น อิมมูโนฮิสโตเคมีและอณูชีวโมเลกุลเพื่อช่วยวินิจฉัย

การที่ศัลยแพทย์เข้าใจหลักการเบื้องต้น โดยเฉพาะการเตรียมส่งส่งตรวจให้ถูกต้อง จะช่วยให้ได้การวินิจฉัยที่รวดเร็วและสมบูรณ์ ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจอันได้แก่

1. ของเหลว หรือเนื้อเยื่อที่นำออกจากผู้ป่วย อาจยกเว้นเส้นผมหรือเล็บที่นำออกเนื่องจากเหตุผลด้านความสวยงาม
2. Products of conception
3. วัสดุการแพทย์ชนิดฝังถาวร เช่น ลิ้นหัวใจเทียม
4. วัตถุแปลกปลอมที่นำออกจากร่างกาย เช่น กระสุน

กระแสนงาน (workflow) ของการให้บริการด้านพยาธิวิทยาศัลยกรรม มีดังนี้

- การตรวจด้วยตาเปล่าและการส้อมตัดชิ้นเนื้อ
- การให้คำปรึกษาระหว่างผ่าตัด (intraoperative consultation หรือ frozen section)
- การเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อฝังในบล็อกพาราฟิน
- การผลิตสไลด์และการย้อมสี
- การตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์
- การตรวจพิเศษต่าง ๆ เช่น การย้อมฮิสโตเคมี อิมมูโนฮิสโตเคมี การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
- การรายงานผลการวินิจฉัยขั้นสุดท้าย
- การปรึกษาและการขอทบทวนผลการวินิจฉัย

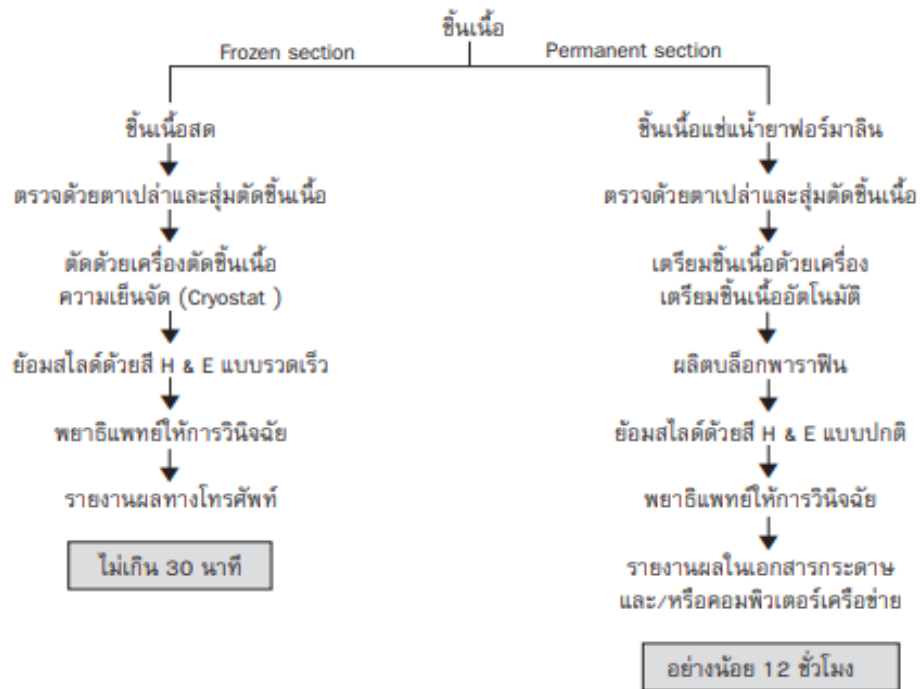


Fig. 1 กระบวนการพยาธิวิทยาศัลยกรรม

หลักการทั่วไปที่สำคัญทางพยาธิศัลยกรรมการส่งสิ่งตรวจ ไปคำขอส่งตรวจทางพยาธิวิทยา

ข้อมูลที่สำคัญประกอบไปด้วย

- ข้อมูลระบุตัวผู้ป่วย (patient identification) เช่น ชื่อ นามสกุล เพศ อายุ เลขโรคพยาบาล
- ชื่อแพทย์ผู้ส่งตรวจหรือแพทย์ผู้เกี่ยวข้องที่ให้ข้อมูลผู้ป่วยเพิ่มเติมได้
- วันและเวลาที่ทำการตรวจ เนื่องจากระยะเวลาการแช่ในน้ำยาที่สั้นหรือนานเกินไป อาจทำให้เกิดผลลบลวงได้
- ประวัติผู้ป่วยที่เกี่ยวข้องกับสิ่งส่งตรวจ
- ข้อมูลของสิ่งส่งตรวจ เช่น อวัยวะหรือส่วนใดของอวัยวะ ข้าง รวมถึงจุดประสงค์การผ่าตัด เช่น ชิ้นส่วนเต้านมที่ตัด เพื่อต้องการลดขนาด พยาธิแพทย์อาจไม่จำเป็นต้องส้อมตัดแบบมพเรียงเต้านมก็ได้
- ข้อมูลอื่นๆ ที่อยากแจ้งเพื่อให้พยาธิแพทย์รับทราบ เช่น ความเร่งด่วน หรือต้องการชิ้นเนื้อกลับมาด้วย เป็นต้น

การแช่ในน้ำยารักษาสภาพชิ้นเนื้อ มีจุดประสงค์ดังนี้

- คงสภาพของเนื้อเยื่อ โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ทำให้เกิด autolysis ต่างๆ
- ทำให้เนื้อเยื่อแข็งขึ้น เหมาะกับการตัดเป็นชิ้นเล็กๆ
- ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและราชนิดต่างๆ
- ช่วยทำให้เนื้อเยื่อติดสีย้อมดีขึ้น

หลักการแช่ชิ้นเนื้อ

- น้ำยาควรมีปริมาตร 10-20 เท่าของปริมาตร
- ชิ้นเนื้อขนาดใหญ่หรือมีเยื่อหุ้มควรผ่าเปิดเพื่อให้น้ำยาซึมเข้าชิ้นเนื้อได้อย่างทั่วถึง โดยทั่วไปน้ำยาจะซึมเข้าเนื้อเยื่อในอัตรา 1 มิลลิเมตร/ชั่วโมง และความลึกไม่เกิน 10 มิลลิเมตร โดยถ้าชิ้นเนื้อชิ้นใหญ่แนะนำให้ผ่าเปิดในแนวเดียวกันแต่ไม่ขาดออกจากกันและเว้นระยะประมาณ 1 เซนติเมตร ควรล้างคราบเลือด สิ่งตกค้างต่างๆให้หมดก่อนแช่น้ำยา
- ควรแช่ชิ้นเนื้อในน้ำยารักษาสภาพอย่างน้อย 6-8 ชั่วโมง
- ระบุข้อมูลที่สามารถบอกที่มาของชิ้นเนื้อมากับภาชนะส่งสิ่งส่งตรวจ

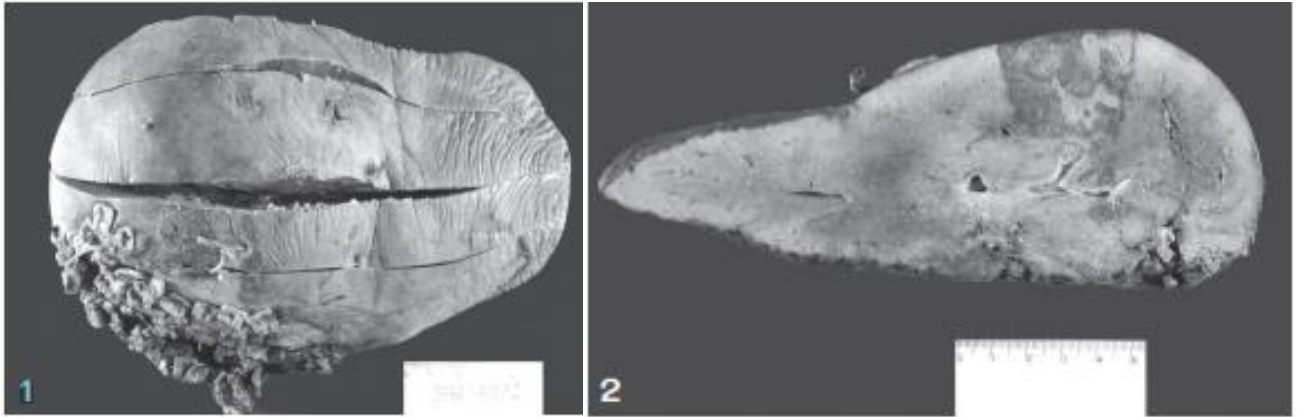


Fig. 2 ตัวอย่างชิ้นเนื้อตับจาก right hepatectomy สังเกตว่ารอยผ่าตามแนวนอนตื้น และห่างมากเกินไป (1) ทำให้น้ำยารักษาสภาพไม่สามารถซึมเข้าไปตรงกลางตับได้ (2) เห็นว่าสีเนื้อตับยังเป็นสีแดงสดอยู่

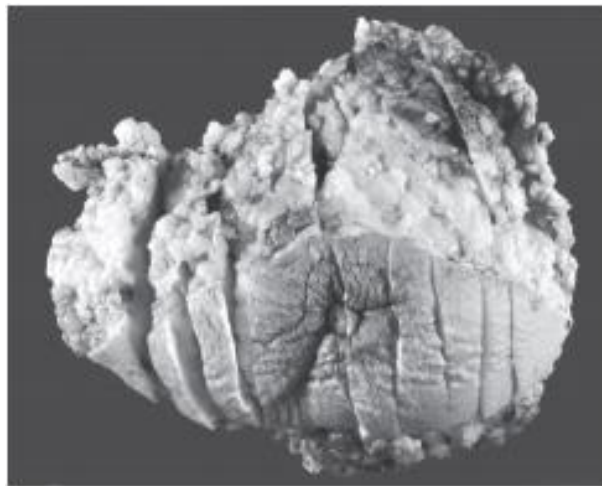


Fig. 3 ชิ้นเนื้อเต้านมจาก modified radical mastectomy ที่ได้รับการผ่าแนวขนานกันสม่ำเสมอ

Table 1 ชนิด และคุณลักษณะของน้ำยารักษาสภาพชิ้นเนื้อ

ชนิดของน้ำยารักษาสภาพ	สี	ชนิดของเนื้อเยื่อ	ข้อดี	ข้อเสีย
10% phosphate buffered formalin	ใส ไม่มีสี กลิ่นฉุน	ทุกชนิด	- นิยมใช้อย่างแพร่หลาย - ชิ้นเนื้อสามารถนำไปตรวจเพิ่มเติมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี และอณูชีวโมเลกุล บางอย่างได้ - เก็บได้นาน	- แอนติเจนในเนื้อเยื่อถูกทำลายเมื่อแช่ในน้ำยาเป็นเวลานาน - ทำลายสาย DNA และโปรตีนในเซลล์ทำให้การตรวจด้วยอณูชีวโมเลกุลบางอย่างไม่สามารถทำได้ - ไม่เหมาะสำหรับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน - ระคายเคืองต่อผิวหนัง เยื่อปอดและทางเดินหายใจ
2% glutaraldehyde	ใส ไม่มีสี	ทุกชนิดที่ต้องการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	- คงสภาพของเซลล์ได้ดีมาก	- ต้องเก็บในตู้เย็น 4 องศา - ซึมเข้าเนื้อเยื่อช้า ดังนั้น ควรตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดเล็กประมาณ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร
70-100% ethanol	ใส ไม่มีสี กลิ่นเย็น	ทุกชนิดโดยเฉพาะชิ้นเนื้อที่ต้องการตรวจหาผลึกกรดยูริก	- เหมาะกับเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจอณูชีวโมเลกุล - กำจัดทิ้งง่าย	- ไม่ค่อยนิยมใช้ - ซึมเข้าเนื้อเยื่อช้า
Bouin's solution	เหลือง กลิ่นฉุน เปรี๊ยะ	Hemopoietic and lymphoid tissue	- มองเห็นรายละเอียดของนิวเคลียสดีมาก - เมื่อย้อมด้วยสีมาตรฐาน (H&E) - มีคุณสมบัติละลายแคลเซียมจึงนิยมใช้ในการรักษาสภาพชิ้นเนื้อไขกระดูก	- ทำให้ชิ้นเนื้อแข็ง หด และอาจทำให้เซลล์ผิดรูป - ต้องล้างชิ้นเนื้อเพื่อกำจัดเอา picric acid ออกก่อนนำชิ้นเนื้อเข้าสู่กระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อ
Hollande's solution	เขียว กลิ่นฉุน	Gastrointestinal tract	- เช่นเดียวกับ Bouin's solution แต่คงสภาพของเม็ดเลือดแดง eosinophils และ endocrine cell ได้ดีกว่า	- ทำลายสาย DNA ทำให้การตรวจด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุลบางอย่างไม่สามารถทำได้ - เช่นเดียวกับ Bouin's solution

การระบุทิศทางของสิ่งส่งตรวจ (specimen orientation)

การระบุทิศทางของชิ้นเนื้อมีความจำเป็นในการอ้างอิงสถานะของขอบว่ามีเซลล์มะเร็งเหลืออยู่หรือไม่ เช่น การตัดเต้านมที่มีมะเร็ง มะเร็งที่ผิวหนัง/เยื่อที่ผ่าตัดแบบ wide excision หรือส่วนของลำไส้ โดยแนะนำให้ใช้ไหมชนิดเดียวกัน เย็บในทิศที่ตั้งฉากกัน โดยให้ความยาวแตกต่างกันหรือจำนวนแตกต่างกัน เช่น ระบุ superior margin ด้วยไหมเส้นยาว และระบุ lateral margin ด้วยไหมเส้นสั้น เป็นต้น

การตรวจด้วยตาเปล่า (Gross examination)

หลักการโดยทั่วไปของการตรวจชิ้นเนื้อด้วยตาเปล่าคือพยาธิแพทย์จะบันทึกลักษณะภายนอก ขนาดและ/หรือน้ำหนักชิ้นเนื้อ บรรยายรอยโรคที่พบทั้งขนาด สี ลักษณะหน้าตัด รวมทั้งระยะห่างจากขอบ กรณีเป็นมะเร็งพยาธิแพทย์จะสัณฐานชิ้นเนื้อจากก้อนมะเร็ง ขอบของการผ่าตัดทั้งหมด เนื้อเยื่อปกติที่อยู่ข้างเคียงกับก้อนมะเร็งและต่อมน้ำเหลืองถ้าได้รับการเลาะออกมาด้วย ดังจะเห็นได้ว่าการระบุทิศทางมีส่วยช่วยให้การตรวจด้วยตาเปล่ามีประสิทธิภาพมากขึ้น ในบางครั้งการปรึกษาระหว่างศัลยแพทย์และพยาธิแพทย์ก่อนก็มีความสำคัญในการวินิจฉัยโรคบางชนิด เช่น กลุ่ม congenital myopathy จะวินิจฉัยได้โดยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี โดยที่ชิ้นเนื้อไม่แช่น้ำยามาก่อน หลังจากที่ได้ชิ้นเนื้อหลังจากการสัณฐานแล้ว พยาธิแพทย์จะบรรจุชิ้นเนื้อเหล่านี้ลงในตลับเพื่อส่งห้องปฏิบัติการนำเข้าเครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ ใช้เวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง ก่อนที่ชิ้นเนื้อจะพร้อมทำเป็นบล็อกพาราฟินและตัดเป็นสไลด์เพื่อที่จะให้วินิจฉัยในขั้นตอนสุดท้ายต่อไป

การให้คำปรึกษาระหว่างผ่าตัด (intraoperative consultation or frozen section)

คือการนำชิ้นเนื้อส่งพยาธิแพทย์ตรวจระหว่างการผ่าตัดเพื่อตัดสินแนวทางการผ่าตัดต่อไป

จุดประสงค์

1. ยืนยันการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งหรือไม่ใช่มะเร็ง
2. จำแนกชนิดมะเร็งบางกลุ่มที่การผ่าตัดไม่ใช่การรักษาหลัก เช่น lymphoma
3. ประเมินสถานะของ margin
4. ประเมินการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลือง
5. ยืนยันชิ้นเนื้อที่ตรวจด้วยตาเปล่าลำบาก เช่น ต่อมน้ำลายไทรอยด์

ข้อจำกัดของการให้คำปรึกษาระหว่างผ่าตัด

1. ปัญหาจากการสัณฐานเนื้อด้วยเวลาที่จำกัด เมื่อจำนวนชิ้นเนื้อชิ้นใหญ่หรือขนาดชิ้นเนื้อใหญ่ อาจทำให้สัณฐานเนื้อหรือสัณฐานเนื้อไม่เพียงพอโดยเฉพาะรอยโรคขนาดเล็ก เช่น หย่อม invasive carcinoma ใน intraductal carcinoma
2. การวินิจฉัยแยก follicular adenoma และ follicular carcinoma
3. Bone tissue เนื่องจากต้องนำไปผ่านกระบวนการ decalcification ก่อน
4. Cystic ovarian tumor
5. ปัจจัยรบกวนจากผลึกน้ำแข็งในชิ้นเนื้อ

การผลิตสไลด์ถาวร (Permanent section or Paraffin-embedded section)

ชิ้นเนื้อที่ผ่านเครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติจะถูกนำไปฝังในบล็อกพาราฟิน และถูกตัดด้วยมีดพิเศษที่เรียกว่า microtome จนได้ชิ้นเนื้อที่มีความบางเพียง 4-6 ไมครอนเพื่อวางบนสไลด์กระจกและนำไปย้อมสี Hematoxylin and eosin โดยสี hematoxylin ให้สีน้ำเงิน/ม่วงย้อมติดส่วนที่มีความเป็นกรด คือนิวเคลียส ต่างกับ eosin ที่ให้สีแดง/ชมพูติดส่วนที่เป็นเบสคือ ไซโทพลาสซึม

การวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาขั้นสุดท้าย

ชั้นเนื้อที่รับการเตรียมแบบฟลิตสไลด์ถาวรจะมีรายละเอียดของเซลล์และเนื้อเยื่อที่ดี โดยการวินิจฉัยแยกโรคต่างๆ อาศัยหลักการเดียวกับโรคทางคลินิกคือ รอยโรคจะถูกจำแนกเป็นกลุ่มตามสาเหตุ เช่น การอักเสบ การติดเชื้อ เนื้อเยื่ออยู่ผิดที่ hamartoma หรือเป็นเนื้องอก โดยอาศัยอาการทางคลินิกที่สำคัญของผู้ป่วยประกอบการวินิจฉัย ในบางครั้งกรณีที่คำวินิจฉัยของพยาธิแพทย์ไม่สอดคล้องกับอาการทางคลินิก แนะนำให้ปรึกษาเพื่อขอทบทวนผลคำวินิจฉัยเสมอ

ลักษณะทางจุลพยาธิที่สำคัญในการวินิจฉัยมะเร็ง มีดังนี้

- การสูญเสียโครงสร้างปกติของเนื้อเยื่อในอวัยวะนั้นๆ
- การเจริญเติบโตของเซลล์ไม่เป็นระเบียบ
- การลุกลามไปยัง เนื้อเยื่อ/อวัยวะ/หลอดเลือด/หลอดน้ำเหลืองข้างเคียง
- เนื้อตาย
- การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้แก่ ขนาดและรูปร่างของเซลล์มีความแตกต่างกัน (pleomorphism) เซลล์มีการพัฒนาตนเองน้อยลง (diminished degree of differentiation)
- นิวเคลียสผิดปกติ (nuclear atypia) ได้แก่ นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้น สัดส่วนนิวเคลียสต่อไซโตพลาสซึมเพิ่มขึ้น ของนิวเคลียสขรุขระ โครมาตินในนิวเคลียสดกสีเข้มและไม่สม่ำเสมอ เห็นนิวคลีโอลัสชัดเจน
- การแบ่งตัวของเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้น รวมทั้งพบการแบ่งตัวที่ผิดปกติ (atypical mitosis)

ชนิดของมะเร็งที่พบบ่อย

1. Carcinoma in situ คือเซลล์ที่มีความผิดปกติ มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็งแต่ยังไม่ลุกล้ำไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง เช่น ยังอยู่ใน epidermis หรือ mucosa ตัวอย่าง ductal carcinoma in situ CINIII Bowen's disease intramucosal carcinoma bronchoalveolar carcinoma
2. Squamous cell carcinoma เซลล์มีการจัดเรียงตัวเป็นผืน มี intercellular bridgesระหว่างเซลล์ เซลล์มีรูปร่างหลายเหลี่ยม ไซโตพลาสซึมสีชมพูอมส้มแสดงถึงเคราตินที่สะสมไว้

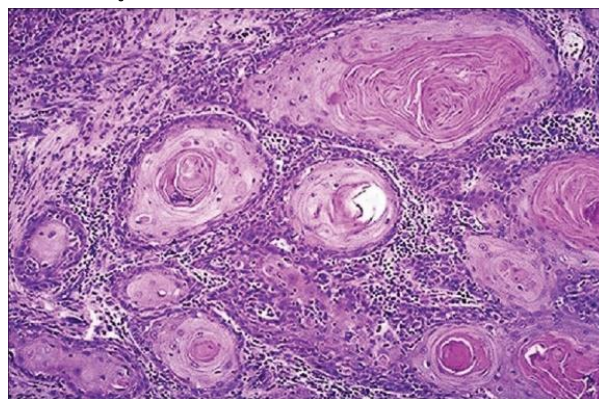


Fig. 4 Keratin pearl ของ squamous cell carcinoma

3. Adenocarcinoma เซลล์มีการจัดเรียงตัวกันเป็นท่อ ต่อม หรือ papillary

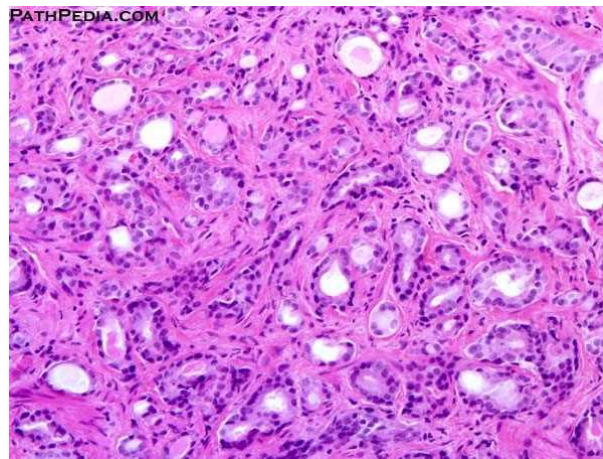


Fig. 4 Adenocarcinoma

4. Melanoma เซลล์มีขนาดใหญ่ นิวคลีโอลัสเด่นชัด และลักษณะที่สำคัญที่พบได้บ่อยคือ มีเมลานินในไซโตพลาสซึม

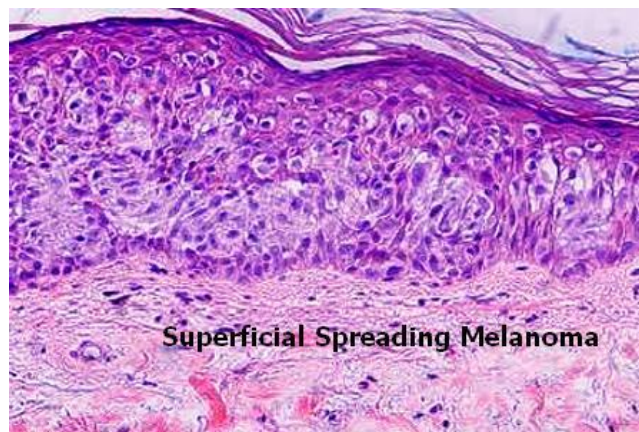


Fig. 5 Superficial spreading melanoma

5. Lymphoma เซลล์ที่พบ พบได้ตั้งแต่ลักษณะเหมือน lymphocyte ทั่วไปได้ไปจนถึง large epitheloid cell

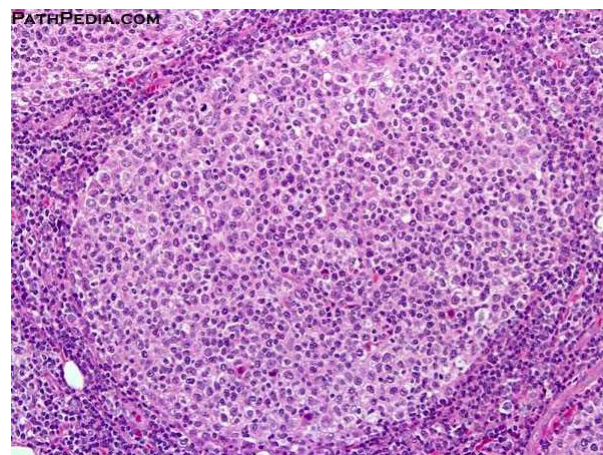


Fig. 6 Lymphoma

6. Sarcoma ลักษณะโดยมากพบเป็น spindle cells โดยสามารถมีต้นกำเนิดจากอวัยวะต่างๆ เช่น muscle, vascular, neural or adipocyte

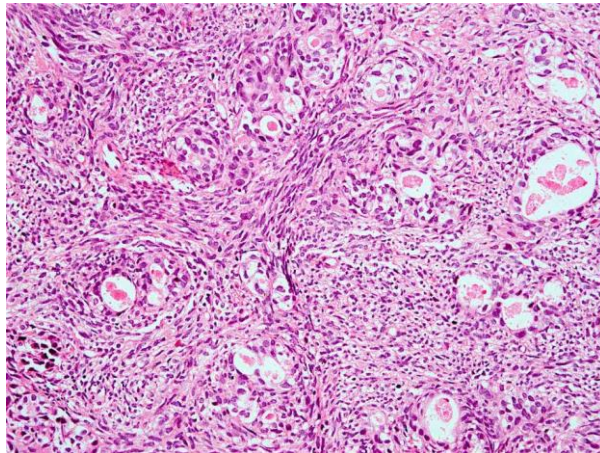


Fig. 7 Sarcoma : spindle cell type

7. Neuroendocrine tumor ลักษณะเด่นคือเป็น nest หน้าตาเซลล์คล้ายๆกัน (monotone)

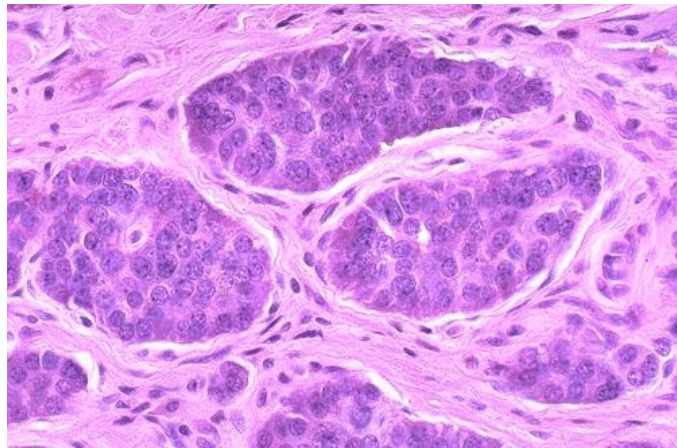


Fig. 8 NET (Neuroendocrine tumor)

การย้อมพิเศษด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry)

การย้อมพิเศษเหล่านี้มีความจำเพาะสูงเนื่องจากอาศัยหลักการของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่มีอยู่ในเนื้อเยื่ออย่างจำเพาะกับแอนติบอดีชนิดต่างๆ ที่เติมลงไป การใช้ประโยชน์ที่พบบ่อยคือ

1. จำแนกชนิดของเนื้องอก เช่น lymphoma เป็นชนิด B-cell หรือ T-cell
2. บอกตำแหน่งของมะเร็งที่พบว่ากระจายมาจากที่ใด
3. แยกแยะรอยโรค in situ กับ invasive
4. พยากรณ์โรค เช่น Ki-67
5. ทำนายการตอบสนองต่อการรักษาจำเพาะ เช่น KIT, ER, PR, HER2/neu

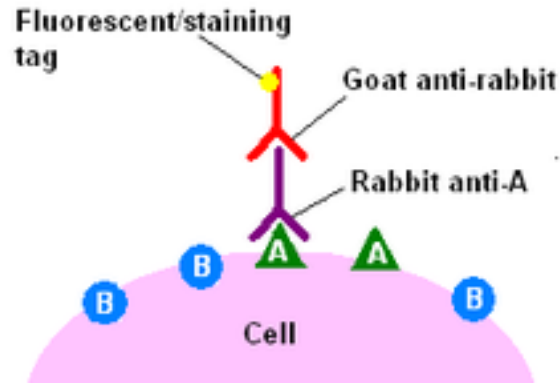


Fig. 9 Immunohistochemistry function

บ่อยครั้งที่มีการพบเซลล์มะเร็งแบบแพร่กระจาย แต่ไม่ทราบสาเหตุ (Cancers of unknown primary : CUP) ส่วนมากมักพบใน lymph node, peritoneum, lung, bone, liver, skin, adrenal gland, brain ซึ่งในอดีตจะรักษาด้วยการให้ empirical chemo โดย prognosis ก็ไม่ค่อยดีนัก อย่างไรก็ตามในปัจจุบันด้วยวิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมีทำให้เราสามารถระบุต้นเหตุของมะเร็งได้ โดยชนิดที่พบบ่อย คือ AdenoCa (Well diff, Mod diff), AdenoCA (Poorly diff), Squamous cell CA และ undifferentiation neoplasm

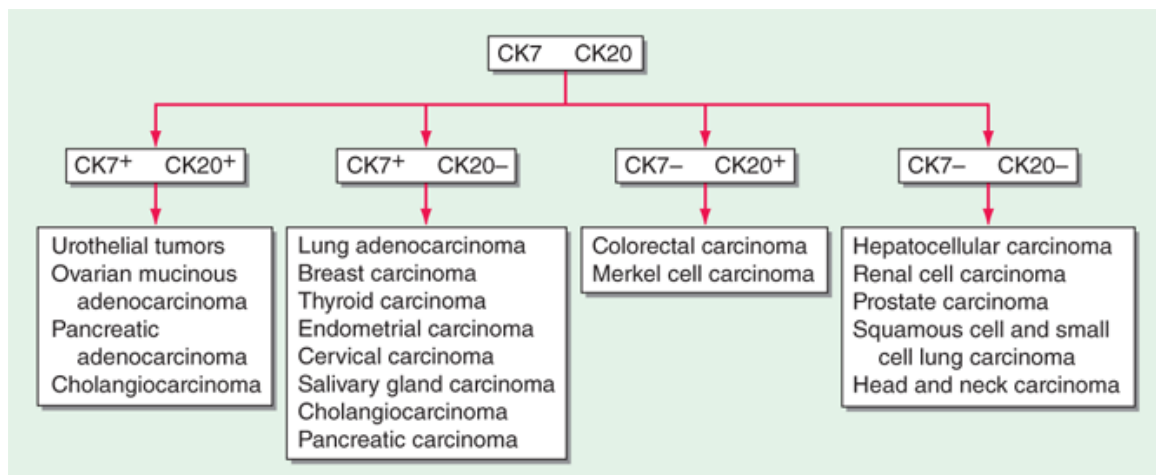


Fig. 10 Differentiation carcinoma type of immunohistochemistry

ในการค้นหาต้นเหตุของมะเร็งจากชิ้นเนื้อใดๆ พยาธิแพทย์มักเริ่มจากการย้อมด้วย CK7 และ CK20 หลังจากนั้นจึงนำผลมาประมวลเพื่อจัดกลุ่มวินิจฉัยแยกโรค ก่อนที่จะใช้ข้อมูลจากประวัติ การตรวจร่างกาย และรังสีวินิจฉัยในการตัดสินใจ ย้อมสีอื่นๆ เพื่อให้ได้การวินิจฉัยสุดท้ายมา

Table 2 CK7/CK20 screening tumor

CK7/CK20 screening for tumor primary			
7- / 20+	7+ / 20+	7+ / 20-	7- / 20-
Colon			
Stomach			
	Biliary tract		
	Pancreas		
		Lung	
		Ovary(non-mucinous)	
Ovary(mucinous)			
		Breast	
	Urinary tract		
		Endometrium/Endocervix	
			Prostate
			Kidney
			Liver
Additional IHC			
CEA, CDX-2	CEA, CK19, WT-1, Urothelin	CK19, TTF-1, WT-1, GCDFP- 15, ER, PR, Vimentin, P16	PSA, RCC, CD10, Hep Par-1

Table 3 ตัวอย่าง antibody ที่จำเพาะกับเซลล์มะเร็งต่างๆ

Antibody	Primary site
TTF-1	Lung Thyroid
Thyroglobulin	Thyroid (non-medullary)
PSA, PSAP	Prostate
CDX-2	Colorectal
Estrogen receptor, Progesterone receptor	Breast Female genital tract
GCDFP-15	Breast Adnexal skin Salivary gland
Hep Par-1	Hepatocellular carcinoma
Inhibin	Adrenal (Also sex cord stromal tumor)
Calretinin	Mesothelioma Adrenal (Also sex cord stromal tumor)
WT-1	Ovarian serous carcinoma Mesothelioma
Chromogranin, Synaptophysin, CD56	Neuroendocrine
PLAP, CD30, AFP	Germ cell tumor
AFP	Yolk sac tumor Hepatocellular carcinoma
CD5	Thymic carcinoma
CEA	Colon cancer
CK-19	Breast
Urothelin	Urothelial cell
Vimentin	Sarcoma
P16	Cervical cancer Oropharyngeal squamous cell carcinoma Pancreas