

CITOLOGIJA - DIJAGNOSTIČKE I PROGNOŠTIČKE MOGUĆNOSTI U MALIGNIM BOLESTIMA DJECE

MELITA NAKIĆ*

Članak daje pregled mogućnosti citodijagnostike u ranom otkrivanju i dijagnosticiranju malignih bolesti, posebno u djece, te prognostičko značenje u terapijskom praćenju bolesnika. Obradene su citodijagnostičke metode uz suvremeno korištenje novih tehničkih mogućnosti na citološkim razmazima. Maligne bolesti dijele se na leukemije i limfome (hemoblastoze) i solidne tumore. U članku se iznose citodijagnostičke i klasifikacijske mogućnosti u djece s malignim bolestima. Ističu se dobre i loše strane ove dijagnostičke metode. Najpovoljniji rezultati u morfološkoj dijagnostici solidnih tumora u djece postižu se suradnjom i timskim radom citologa, pedijatra, patohistologa, onkologa, dječjeg kirurga i radiologa.

Deskriptori: MALIGNNE BOLESTI, CITODIJAGNOSTIČKE METODE, DIJAGNOZA, KLASIFIKACIJA

Maligne bolesti u stalnom su porastu. Najčešći su uzrok smrtnosti u djece do 14 godina života, te su na drugom mjestu iza nesretnih slučajeva. Maligne bolesti dijele se na hemoblastoze (leukemije i limfomi) i solidne tumore. U djece, maligne bolesti razlikuju se od onih u odraslih. Približno 50% čine leukemije i limfomi, a 50% solidni tumori. U odnosu na leukemije u odraslih u djece se češće javljaju akutne limfatičke od akutnih ne-limfatičkih leukemija. Danas su pojedini tipovi posebno akutnih limfatičkih leukemija i pojedinih solidnih umora izlječivi, stoga je važno malignu bolest rano prepoznati, dijagnosticirati i klasificirati, što je preduvjet odabira učinkovitih terapijskih protokola, a time i uspjeha terapije (1). U Tablici 1 prikazana je učestalost pojedinih malignih bolesti u djece.

Citologija se temelji na pretpostavci da svaki patološki proces pa tako i tumorski ima svoje karakteristične stanice pa se mišljenje, a često i dijagnoza, donosi proučavanjem izgleda pojedinačnih

stanica u nakupinama te međusobnog odnosa pojedinih staničnih elemenata pregledom cijelog razmaza. Citodijagnostika je metoda pomoću koje se nastoji doći do dijagnoze proučavanjem morfologije pojedinih stanica u obojenim razmazima. Dugi niz godina citologija se koristila kao dijagnostička mogućnost uglavnom u odraslih pacijenata. Međutim, tijekom vremena i praćenja prednosti citomorfološke dijagnostičke discipline, došlo je do njezine popularizacije i sve češće primjene posebno u pedijatrijskoj populaciji. Nakon najčešćeg korištenja citologije u analizi razmaza periferne krvi, punkata koštane srži, te likvora i ostalih izljeva, dolazi do sve prisutnijeg korištenja citologije u svim palpatorno povećanim tvorbama kao i u punkcijama koštanog sustava. Citologija tako, osim u dijagnozi i klasifikaciji akutnih leukemija sve je prisutnija i u dijagnozi solidnih tumora u djece.

CITODIJAGNOSTIČKE METODE

Citodijagnostičke metode dijele se na:

- eksfolijativne;
- aspiracijske;
- im-print (metoda otiska).

Eksfolijativnim metodama analiziraju se deskvamirane stanice i one koje su se iz tkiva izdvojile u ekskrate i sekrete. Ova metoda bavi se proučavanjem stanica u tekućinama. Aspiracijskom citodijagnostikom se analizira materijal dobiven punkcijom iz dubine različitih organa ili patoloških tvorbi. U materijalu dobivenom aspiracijom stanice su vrlo dobro sačuvane i na njima se lakše uočavaju morfološke pojedinosti. Im-print metoda, tj. metoda otiska je vrlo važna metoda i najčešće se upotrebljava pri intraoperativnom donošenju mišljenja o vrsti patološkog procesa. Ovaj je način ujedno najprikladniji za uspoređivanje s patohistološkim nalazom jer se iz istovjetnog materijala uzima citološki razmaz i radi patohistološka analiza.

Međutim, današnjim brzim napretkom novih tehničkih mogućnosti, materijal koji je dobiven punkcijom bilo na koji od navedenih načina može se koristiti za: pripremu razmaza za (citodijagnostiku, citokemijske analize, imunocitokemijske analize, kinetičke metode digitalnom analizom slike - "image analysis", molekularne tehnike, in situ hibridizacija, PCR in situ). Nadalje, materijal dobiven punkcijom može se koristiti za pripremu suspenzija za protočni citometar (fenotipizacija, određivanje proliferacijskih an-

*Klinika za dječje bolesti Zagreb

Adresa za dopisivanje:
Prof. dr. sc. Melita Nakić
Klinika za dječje bolesti Zagreb
10000 Zagreb, Klaićeva 16

Tablica 1.
Učestalost pojedinih malignih bolesti u djece

Table 1
Frequencies of specific malignant diseases
in children

Relativna učestalost malignih tumora u djece	%
Leukemija	30,9
Središnji živčani sustav	18,3
Limfomi (NHL, HL)	13,8
Simpatički živčani sustav	7,8
Tumori mekih tkiva	6,2
Tumori bubrega	5,8
Tumori kosti	4,7
Retinoblastom	2,5
Gonade	2,0
Jetra	1,3
Teratomi	0,4
Ostali	6,3

tigena, određivanje količine DNA), i za mikrobiološke pretrage bilo za direktnu analizu, kulturu i antibiogram te biološki pokus (2, 3).

Bez obzira kojom citodijagnostičkom metodom je dobiven materijal za citološku analizu, posebno u malignim bolestima on se boji metodom M.G.G., po May-Grunwald-Giemsu nakon što se razmazi osuše na zraku. Za donošenje odluka o citološkoj dijagnostici malignih bolesti prijeko je potrebno izvanredno poznavanje stanice, tkiva i organa. Kriteriji zloćudnosti procesa, prepoznaju se na osnovi izgleda i promjene jezgre, odnosa jezgre i citoplazme, rasporedu stanica u razmazu, posebno njihova nakupljanja u određene formacije, kao npr. formacije rozeta kod neuroblastoma. Citomorfološka dijagnoza leukemija gotovo da danas ne predstavlja dijagnostički ili diferencijalno dijagnostički problem bilo u odraslih ili u djece.

CITOMORFOLOGIJA U DIJAGNOSTICI AKUTNIH LEUKEMIJA

Leukemije su maligne bolesti krvotvornih organa karakterizirane nekontroliranom proliferacijom, poremećenim

sazrijevanjem i oslobađanjem malignih leukocita. U djece, kao što je već rečeno, to su najčešća maligna oboljenja i čine približno 30 do 40% svih malignih bolesti dječje dobi (4). Leukemije se dijele na akutne limfatičke (ALL) i akutne nelimfatičke (ANLL). ALL su u djece češće i čine dominantnu skupinu, ANLL su rjeđe, dok njezine varijante čine preostale slučajeve. U djetinjstvu se može javiti i kronična mijeloička leukemija, no rjeđe od ostalih oblika, a kronična limfatička leukemija u djetinjstvu nije opisana (4, 5).

Citomorfološki nalaz razmaza periferne krvi i punktata koštane sadrži odlučujući su za dijagnozu leukemija. Naime, morfološke analize tkiva i stanica u svjetlosnom mikroskopu pružaju prvu i najvažniju informaciju za postavljanje dijagnoze. Morfološka dijagnoza akutnih leukemija je relativno jednostavna zbog izrazite karakterističnosti morfologije leukemijske stanice. Međutim, postavlja se pitanje jednostavnosti, a i pouzdanosti morfološke dijagnoze pojedinih tipova akutnih leukemija u njezinoj klasifikaciji. Danas se još uglavnom prema morfološkoj klasifikaciji leukemija postavlja prognoza bolesti, odabire protokol citostatske terapije i ostalih terapijskih zahvata, te evaluiraju rezultati liječenja. Zbog navedenih razloga potrebno je odabrati odgovarajuću morfološku klasifikaciju akutnih leukemija te odrediti njezinu reproducibilnost.

Danas je najprihvaćenija klasifikacija u većini hematoloških laboratorija u svijetu klasifikacija koju su 1976. godine predložili francusko-američko-britanski hematolozi, poznata pod nazivom FAB klasifikacija (6). Prema FAB klasifikaciji akutne leukemije (AL) se dijele u akutne limfatičke (ALL) i akutne nelimfatičke (ANLL). ALL se dijele u tri oblika L-1, L-2 i L-3, a ANLL u M-0, M-1, M-2, M-3, M-4, M-5, M-6 i M-7 oblik. Kriteriji za ovakvo svrstavanje stanica su: veličina stanice, izgled kromatina, oblik jezgre, nukleola te količina i bazofilija citoplazme. Morfološki opis stanica morao bi biti što objektivniji koristeći pri tome parametre koji se mogu reproducirati. Težnja svih citologa bila je jedinstvena klasifikacija uz jedinstvenu terminologiju, a to je postignuto prihvaćanjem FAB

klasifikacije. Na tablici 2 prikazana je morfološka klasifikacija akutnih leukemija (AL) prema FAB grupi.

U članku se opisuje morfologija najčešćih akutnih leukemija u djece tj. limfatičkih koje čine prema različitim autorima do 90% svih leukemija u djece, ističe se prognostičko značenje pojedinih tipova ALL, koje je od velikog značenja u odabiru terapijskih protokola te ishodu liječenja uz mogućnost izlječenja pojedinih tipova ALL.

L-1 tip akutne limfatičke leukemije sadrži slijedeće značajke: prevladavaju male stanice do dvostrukog promjera malog limfocita s minimalnim razlikama u veličini. Kromatin je homogen, nježno raspršen, mada može biti i nešto grublji. Oblik jezgre obično je pravilan, ali se mogu javiti i zarezane, udubljene ili preklapljene jezgre. Nukleoli najčešće nisu vidljivi, a ako postoje sitni su. Citoplazma je oskudna, a bazofilija nije uobičajena. Slika L-oblika ALL je vrlo homogena. Prema podacima iz literature i prema vlastitim istraživanjima L-1 tip ALL-a se najčešće susreće u djetinjstvu, premda neki autori iznose podatke o većoj učestalosti L-2 tipa u djetinjstvu.

L-2 tip ALL karakteriziran je velikim stanicama, većim od dvostrukog promjera malog limfocita s jako izra-

Tablica 2.
Morfološka klasifikacija akutnih leukemija
(AL) prema FAB grupi

Table 2
Morphologic classification of acute leukemias
(AL) according to FAB group

Skupina	Tip
ALL	L-1
	L-2
	L-3
AML	M-0
	M-1
	M-2
	M-3
	M-4
Eritroleukemija	M-5
Megakarioblastična	M-6
	M-7

ženom heterogenošću u veličini stanice i strukturi kromatina. Česte su velike nepravilnosti u obliku jezgre poput npr. preklapanja i zarezanosti. Nukleoli su gotovo uvijek prisutni i često su vrlo uočljivi. Citoplazma je obilnija, a njezina bazofilija varira, može biti izrazito naglašena, a u citoplazmi se mogu naći azurofilna zrnca (peroksidaza "POX" negativna). L-2 tip pruža izrazito heterogeno morfološku sliku.

L-3 tip ALL karakteriziran je velikim stanicama homogenog izgleda. Stanice sadrže gusti, fino zrnati kromatin. Jezgra je ovalna ili okrugla, a srednje obilna citoplazma potpuno okružuje jezgru. Jako je izražena bazofilija citoplazme. Stanice L-3 tipa ALL-a pokazuju visoki mitotski indeks, a gotovo uvijek je prisutna izrazita vakuolizacija citoplazme a često i jezgara. L-3 tip je homogen po svim svojim karakteristikama, a učestalost se kreće između 2 i 5%.

Čini se da bolju prognozu imaju slučajevi L-1 tipa ALL, zatim L-2, a lošiju prognozu imaju slučajevi L-3 tipa (4).

Akutna nediferencirana leukemija definirana je morfološki i citokemijski kao proliferacija nediferenciranih stanica, periodic acid Schiff - (PAS) negativnih, POX negativnih i alfa-naftil-acetat esteraza - (NASDA) negativnih. Dijagnoza akutnih nediferenciranih (AUL) temelji se na primjeni citokemijskih reakcija. Učestalost ove leukemije je 2 do 3%. Međutim, neke od ovih leukemija mogu se uključiti u ALL zbog sličnosti stanica limfoblastima, a posebice ako su PAS negativne. Ove leukemije, ako se prati klinički tijek, ponašaju se slično limfatičkim i praktički reagiraju na isti terapijski protokol. Ima autora koji zbog loše prognoze izdvajaju ovaj oblik leukemije iz grupe ALL, premda većina hematologa smatra da je akutna nediferencirana leukemija ekvivalent akutnoj limfatičkoj leukemiji.

Poznato je, da je akutna leukemija heterogena bolest s obzirom na različito kliničko ponašanje, citološke i imunološke parametre, te s obzirom na prognozu bolesti. Upravo zbog te heterogenosti pokušava se najprije u morfologiji, zatim u citokemiji, danas sve više u području

imunologije i citogenetike, otkriti dijagnostičke mogućnosti da se što bolje upozna stanica koja je maligno alterirala. Kako se u djece radi u više od 90% slučajeva o akutnoj limfatičkoj leukemiji (ALL), u pedijatrijskoj dijagnostici najprihvatljivija je upravo FAB klasifikacija, premda je ova klasifikacija i u dijagnozi i klasifikaciji leukemija u odraslih naišla na jedinstvenu primjenu (6, 7).

Na temelju prognostičkih kriterija već u početku bolesti prije terapije nastoji se podijeliti bolesnike s ALL na prognostički povoljnu, tzv. "standardnu" i prognostički nepovoljnu "riziko" grupu. Svrha ove podjele je, da se u bolesnika svrstanih u "riziko" grupu primijeni agresivnija terapija. Dakle jedan od važnih prognostičkih faktora je klasifikacija akutnih limfatičkih leukemija (ALL). Naime, uvođenjem kemoterapije u liječenju AL u djece uvidjelo se da postoje dva oblika AL. Jedan oblik, osjetljiv na terapiju koji odgovara ALL i drugi otporan na terapiju, a koji morfološki odgovara akutnoj mijeloičkoj leukemiji i njezinim varijantama. Oblik osjetljiv na terapiju, tj. ALL je i najčešći u dječjoj dobi i čini više od 90% svih slučajeva AL u djece. Na osnovi podataka o preživljavanju djece bolesne od ALL, te stvarnim izgledima i za liječenje ove djece ovakav pristup je opravdan. Dakle, FAB klasifikacijom služe se brojni autori ne samo zbog dijagnostike, već i pri određivanju trajanja remisije i preživljavanja bolesnika liječenih različitim citostatskim protokolima.

Prognostičko značenje morfoloških klasifikacija odavno je uočeno. Glavni prigovor ovom načinu predviđanja tijeka i ishoda bolesti je subjektivnost i slaba reproducibilnost. Predviđanje tijeka bolesti na osnovama morfološke dijagnostike pa tako i FAB klasifikacije proistekla su iz dugogodišnjeg kliničkog iskustva, a prognostička im je vrijednost potvrđena na velikom broju bolesnika. Zbog jasno određenih morfoloških kriterija FAB klasifikacija pruža vrlo visok stupanj reproducibilnosti, što je među ostalim dovelo do upotrebe ove klasifikacije bilo da se radi o djeci ili odraslima gotovo u svim hematološkim centrima svijeta.

Citomorfološka analiza razmaza periferne krvi i punktata koštane srži bojenih prema Pappenheimu May-Grunwald-Giemsom (MGG) ostala je najjednostavnija, uvijek pristupačna, a ujedno prva i osnovna analiza u postavljanju dijagnoze leukemija. Međutim, citokemijske metode koje omogućuju vizualizaciju enzima ili nekog drugog spoja u stanici, omogućavaju bolje upoznavanje sastava i funkcije staničnih struktura te precizniju identifikaciju stanica. Citokemijske metode danas su sastavni dio rutinskih analiza leukemijskih stanica (3, 4). Naravno, važne su one citokemijske reakcije, koje omogućuju otkrivanje specifičnih razlika kod morfološki sličnih stanica. U dijagnozi akutnih leukemija najčešće se koriste slijedeće citokemijske reakcije: peroksidaza (POX), periodična acid Schiff (PAS), alfa-naftil-acetat-esteraza (NASDA), kisela fosfataza i beta glukuronidaza.

Pozitivna peroksidaza karakteristična je za stanice koje odgovaraju morfološkom tipu mijelocitnih i promijelocitnih leukemija, pozitivna peroksidaza-esteraza karakteristična je za mijelomonocitnu vrstu akutnih leukemija, a pozitivna esteraza za monocitnu leukemiju. Pozitivna PAS reakcija kao i nediferencirani citokemijski tip akutnih leukemija karakteristične su uglavnom za limfoblastične leukemije. Čini se, da je za pozitivitet PAS reakcije odgovoran glikogen u stanici. PAS reakcija je pozitivna u određenom broju limfoblasta u većini ALL. Čini se da i supstancije u stanici poput glikolipida i glikoproteina mogu također dati pozitivnu PAS reakciju. Smatra se, da zbog ovog razloga PAS reakciju uvijek valja nadopuniti primjenom dijastaze. PAS reakcija je vrijedna nadopuna citomorfologiji i klasifikaciji ALL, međutim prognostička vrijednost ove citokemijske reakcije nije sa sigurnošću utvrđena.

Enzim kisela fosfataza pokazao se korisnim u identifikaciji T-limfoblasta, koji se morfološkim značajkama mogu pouzdano razlikovati od ne-T, ne-B i B-limfoblasta. Nalaz kisele fosfataze pozitivan je u 30-70% T-limfoblasta, 10-20% B-limfoblasta, te manje od 10% u ne-T i ne-B limfoblasta. Ultrastrukturalna ispitivanja su pokazala da se granula kisele

Tablica 3
 Relativna učestalost solidnih tumora u djece
 Table 3
 Relative frequency of solid tumors in children

Solidni tumori u djece	relativna učestalost %
Neuroblastom	13
Ganglioneuroblastom	7
Wilmsov tumor	10,1
Retinoblastom	5,7
Rabdomiosarkom	7,9
Ewing sarkom	3,8
Osteosarkom	5,9
Hepatoblastom	1,5
Karcinom jetre	1
Teratom germinat krvnih stanica	2,7
Yolk-sac tumor	1,9
Thymom	2
Non-Hodgkin limfom	10
Hodgkin limfom	8,4
Ostali tumori	19,1

fosfataze u T-limfoblastima nalaze u Golgijevom aparatu i lisosomnim granulama u njegovoj neposrednoj blizini. Rijetka granulata kisele fosfataze u B, ne-T i ne-B limfoblastima nalaze se u citoplazmat-skim lisosomima a ne u Golgijevom aparatu. Izgleda, da visok sadržaj ovog enzima u T-limfoblastima, može biti odraz osobina limfocita timusnog porijekla ili razlike u kinetici proliferacije T, B, ne-T i ne-B limfoblasta. Naime, poznato je, da se na mitotske stimulanse povisuje sadržaj kisele fosfataze u T-limfocitima za vrijeme premitotske faze, pa se pretpostavlja da otpuštanje lisosomnih enzima ima značajnu ulogu u procesu blastičke transformacije i mitoze. Čini se da to potvrđuju i klinički podaci, jer je u bolesnika s T-ALL agresivniji tijek bolesti i općenito lošija prognoza (3, 6, 7).

Na osnovi citokemijskih reakcija ALL se dijele u: ALL PAS tip, ALL ne-diferencirani tip te ALL kiselu fosfatazu tip. Čini se da je prognostički najlošija ALL fosfataza tip. Morfološka FAB klasifikacija upotunjena citokemijskim

analizama vrlo je pouzdana i relativno jednostavna metoda u postavljanju dijagnoze akutne leukemije i u odraslih i u djece.

Današnje mogućnosti imunološke fenotipizacije akutnih leukemija imaju dijagnostički značaj, često pomažu u diferencijalnoj dijagnozi dvojbjenih slučajeva (pojava nekoliko klonova maligno izmijenjenih stanica). Naime, imunofenotipizacija leukemijskih stanica omogućuje potvrdu morfološke dijagnoze, brzu i točnu klasifikaciju, što pomaže u odabiru ispravnog liječenja bolesnika (8, 9). Imunofenotipizacija je posebno važna u djece s akutnom mijeloidnom leukemijom gdje ova metoda ima i potvrdnu dijagnostičku ulogu, a posebno je nezaobilazna za dijagnozu nezrelih M-0, eritroidnih E-6 i megakrioblastnih M-7 oblika leukemije. Nova imunološka klasifikacija AL razlikuje i miješane ili bifenotipske akutne leukemije (BAL), koje se trebaju razlikovati od ostalih oblika ALL i AML s koekspresijom biljega (9, 10). Cilj novih istraživanja koja su u ti-

jeku jest stvaranje imunološke klasifikacije AL na temelju bioloških osobitosti podvrsta AL i istraživanja njihova prognostičkog značaja.

ULOGA CITOLOGIJE U SOLIDNIH TUMORA DJECE

Uspjeh liječenja pojedinih solidnih tumora ovisi o rano postavljenoj dijagnozi, preciznoj klasifikaciji tipa tumora i proširenju stadija bolesti (11). Danas se strategija terapijskih protokola pojedinih tumora uvelike mijenja, te se nakon postavljene dijagnoze pristupa kemoterapiji ili zračenju, kako bi se tumorska masa smanjila odnosno uništila. Time se u većini slučajeva operativni zahvat ograničava na kasnije uklanjanje već reducirane tumorske mase, a izbjegava se veliki često mutilirajući kirurški zahvat. S obzirom na takav pristup u liječenju pojedinih solidnih tumora u djece, ne dolazi se odmah na početku liječenja do materijala za histološku analizu, koji zbog niza razloga može u to vrijeme biti kompromitiran, pa je citološka punkcija i analiza, kad god je to moguće za pacijenta, najbolji način za rano otkrivanje tumorske bolesti i postavljanje dijagnoze.

Jednako tako citologija je kao minimalno agresivna metoda važna za verifikaciju metastaza solidnih tumora ili rasapa u tjelesnim tekućinama (likvor, pleuralni izljev, ascites) čime se olakšava točnije utvrđivanje stadija bolesti i daljnjeg liječenja (11-14). Zbog navedenih razloga, citodijagnostika solidnih tumora u djece vrlo je važna metoda u rano otkrivanju tumorske bolesti, a zbog bezopasnosti zahvata, te jednostavnosti primjenjiva je u većini centara koji se bave tumorskom problematikom.

U morfološkoj dijagnostici solidnih tumora prednost ima histološka metoda pretrage. Međutim, citološke pretrage, posebno aspiracijska (ubod tankom iglom) može biti od velike koristi. Ova metoda je možda zbog tehničkih razloga insuficijentnija kod koštanih tumora (premda kod nekih kao npr. osteosarkoma daje izvanredne rezultate), a djelomično i kod teratoma koji su građeni od više različitih tkiva. Kao što je naglašeno, ipak ova metoda daje točnu dijagnozu i kod koštanih tumora, posebno

osteosarkoma i Ewing-ovog sarkoma, a histološkom analizom dobiva se preciznija analiza tipova samog tumora kao i rasprostranjenost tumorskog procesa (5, 15, 16).

Manjkavost u citomorfološkoj analizi materijala dobivenog punkcijom je i u tome, što se ne može dobiti uvid u odnos karakteristika svih sastojnih tkiva. S druge pak strane, punkcijskom iglom može se dospjeti u tumorske procese trbušne šupljine, prsnog koša, čime se izbjegava veći operativni zahvat da bi se dobio materijal za histološku analizu. Citološka punkcija može se ponavljati i time pratiti dinamika procesa, posebno tijekom terapije. Na kraju, dijagnostička metastaza malignih tumora je važno područje citodijagnostike. Najtočniji podaci dobivaju se istodobno citološkom i histološkom analizom stanica i tkiva nekog tumora. Tada naime, dolazi do izražaja prednost jedne i druge dijagnostičke metode. Uspjeh citodijagnostike, a time i afirmacija medicinske citologije ovisi o:

- načinu dobivanja, pripremi i razmazu materijala na predmetna stakla;
- objektivnoj morfološkoj analizi (važnost stručne i savjesne pretrage razmaza);
- suradnji medicinskog citologa s kliničarima i patohistolozima.

Citomorfološka dijagnoza postavlja se na osnovi analize razmaza punktata tumorske tvorbe, ili pak, eksfolijativnim putem dobivenog materijala, nakon čega su učinjeni razmazi. Treći način dobivanja materijala je tzv. im-print metoda, tj. metoda otiskom (17-19). U tablici 3 prikazana je relativna učestalost solidnih tumora u djece.

Sve navedene solidne tumore moguće je dijagnosticirati jednom od citomorfoloških metoda, a korelacija s patohistološkim nalazom je vrlo visoka. Na slijedećim stranicama opisuju se citomorfološke osobine najčešćih solidnih tumora u djece (5, 15, 18). Sa citološkog aspekta, maligni tumori u djece mogu se podijeliti na one koji spadaju u skupinu "malih stanica" i na one koji spadaju u skupinu "velikih stanica".

U tablici 4 prikazani su maligni tumori prema veličini stanice.

Neuroblastom je česti solidni tumor dječje dobi. Čini otprilike 50% svih tumora koji se javljaju u prvom mjesecu života i oko 35% tumora koji se javljaju do druge godine života. Gotovo 80% neuroblastoma dijagnosticira se u djece mlađe od 5 godina. Ovaj tumor nastaje malignom transformacijom stanica neuralnog grebena (pojava tumora na različitim mjestima po tijelu). Neuroblastom je biološki vrlo neobičan tumor, kod kojeg su uočene spontane regresije ili one inducirane terapijom te diferencijacija u razne dobroćudne oblike (ganglioneuroblastom, ganglioneurom) (20, 21).

Citološke osobine neuroblastoma

Citološki se u većini slučajeva nalaze stanice kubičnog oblika s umjerenom anizokariozom i pleomorfizmom. Kromatin je gust, a mogu biti prisutni i mali nukleoli. Citoplazma je vrlo blijeda, i oskudna, iako može biti i umjereno obilna. Stanice se karakteristično grupiraju u formacije "rozeta". Međutim, stanice pojedinih neuroblastoma mogu biti izrazito blastičnog tipa. Kada se radi o ganglioneuroblastomu citoplazme mogu

biti bazofilnije, stanice također formiraju "rozete" ili "pseudorozete" u kojima se ističe i nepodijeljenost stanice. Ponekad je prisutna jaka vakuolizacija citoplazme. Kod neuroblastoma prisutna je i različito obilna karakteristična ružičasta intracelularna masa, koja kod ganglioneuroblastoma nedostaje.

S obzirom da je neuroblastom jedan od najčešćih solidnih tumora u djece, i da pruža mogućnost uspješnog ozdravljenja, ovisno o stadiju u kojem se otkrije, citomorfologija ima veliku važnost u otkrivanju neuroblastoma, kao i njegovih udaljenih metastaza. Nedavni je napredak u molekularnoj biologiji i citogenetskoj tehnologiji značajno povećao mogućnost otkrivanja genetske alteracije u stanicama neuroblastoma.

Danas se citološki razmazi ovog tumora mogu koristiti za vrlo zahtjevne tehnike kao što se FISH (fluorescence in situ hybridization) kojom se otkrivaju translokacije, delecije, inverzija i amplifikacija. Pomoću ove metode istražujemo N-myc amplifikaciju, poremećaj kromosoma 1, koji npr. imaju veliko prognostičko značenje u neuroblastoma. Pomoću "protočne citometrije" (Flow cytometry) može se također na citološkim razma-

Tablica 4.
Maligni tumori prema veličini stanice

Table 4
Malignant tumors according to cell dimension

Maligni tumori djece prema veličini stanice	
Maligni tumori "malih stanica"	Maligni tumori "velikih stanica"
akutne leukemije	osteosarkom
NHL (tip malih stanica)	astrocytom
Ewing sarkom	ependymom
neuroblastom	glioblastom multiforme
meduloblastom	HL
pineoblastom	NHL (tip velikih stanica)
retinoblastom	hepatocelularni karcinom
nephroblastom	germinom
hepatoblastom	endodermalni sinus tumor
PNET	rhabdomyosarcom
pancreatoblastom	pancreatoblastom
rhabdomyosarcom	embrionalni karcinom

Tablica 5.
Citomorfološka neuroblastoma

Table 5
Cytomorphology of neuroblastomas

Neuroblastom - citomorfološka
hipercelularni razmazi s brojnim individualnim malim stanicama, uz pojedine vrlo zgusnute nakupine jezgara
nakupine golih jezgara često se vide
stanice neuroblastoma imaju ovalne ili lagano nepravilne jezgre s vrlo finim granuliranim kromatinom i malim neupadljivim nukleolima, te različitim količinom citoplazme, pojedine stanice pokazuju diskretne citoplazmatske izdanke
ganglijske stanice mogu biti binuklearne, multinuklearne, mogu sadržavati grubo granulirani kromatin i prominentne nukleole
Homer-Wright rozete gotovo uvijek prisutne

zima analizirati količina DNA, koja razlikuje tumore s vrijednosti u diploidnoj (2n), triploidnoj (3n) i tetraploidnoj (4n) regiji. Rezultati su pokazali da je triploidija češća u djece do 1 godine života i u I, II i IV-S stadiju bolesti i da je bolji prognostički znak, za razliku od neuroblastoma s DNA indeksom u 2n i 4n te starijoj životnoj dobi i lošijem prognostičkom odgovoru na terapiju (20). U tablici 5 prikazana je citomorfološka neuroblastoma.

Citološke osobine osteosarkoma

Osteosarkom pokazuje u pravilu izrazito polimorfnu morfološku sliku. Vrlo fina kromatinska struktura isprva izgleda gruba, zbog multiplog preklapanja stanica. Citoplazma je pjenušava i vakuolizirana. Jezgre su ovalne, s gusto granuliranim kromatinom. "Gigantske"

stanice sadrže jezgre različitih veličina (21-23). U tablici 6 prikazane su citomorfološke osobine osteosarkoma.

Citološke osobine Ewing-ovog sarkoma

Citološki se nalaze lagano polimorfni okrugli nukleusi. Ukoliko su stisnuti zajedno, imaju poligonalan oblik. Kromatin je lagano retikulogranuliran, a nukleusi mali, najčešće nevidljivi. Citoplazmatske vakuole mogu biti jako naznačene (24, 25). U tablici 7 prikazane su citomorfološke osobine Ewing-ovog tumora.

Citološke osobine rhabdomyosarkoma

Ovaj tumor je prilično teško citološki dijagnosticirati zbog histološke različitosti dosad opisanih tipova. Međutim, citološka dijagnoza je moguća, a upravo

neke podudarnosti sa stanicama Ewingovog sarkoma, limfoblastima i mijeloblastima moguće je citološki lakše prepoznati i na taj način odlučiti o dijagnozi. Citokemijsko bojenje PAS reakcijom također je pomoć u dijagnostici ovog tumora, jer je PAS reakcija izrazito pozitivna u rhabdomyosarkomu (mišićne stanice sadrže veliku količinu glikogena), dok su morfološki slične stanice neuroblastoma, malignog fibrocitnog histiocitoma, fibrosarkoma i sinovijalnog sarkoma obično negativne.

Stanice mogu pokazivati anizokariizu u razmazima, mogu biti grupirane u nakupine, ili se nalaziti pojedinačno. Nadalje, citološka karakteristika nekih tipova rhabdomyosarkoma je bizarnost i poliploidija stanica s vrlo uočljivim modrim nukleolom različite veličine. Ponekad se nalaze izrazito velike stanice ("gigantski tip") s vrlo uočljivim karakteristično zamagljenim nukleolima. Citoplazma može biti sivkastoplava i izrazito vakuolizirana (26).

Citološke osobine Wilms-ovog tumora

Citološke osobine Wilmsovog tumora su slijedeće: sa citomorfološkog stajališta ovaj tumor je sličan mikrocelularnom karcinomu pluća, Ewingovu tumoru, neuroblastomu, te slabije diferenciranom retikulosarkomu. Klinički podaci, dob bolesnika, lokalizacija u lumbalno regiji, pomažu nam u isključivanju prethodno navedenih tumora. Wilmsov tumor je karakteriziran monotonim, poligonalnim stanicama. Kromatin je zgusnut, granuloretikularan. Citoplazma je u većini slučajeva oskudna i transparentna, ili slabije vidljiva. Katkada je sivoplava i vakuolizirana. U stanicama Wilmsovog tumora mogu se naći i mitoze, ali npr. rjeđe nego kod retikulosarkoma. Stanice mogu biti formirane u guste nakupine, no ipak u kompaktnim sličnim grupama češće pokazuju tendenciju formiranja rozeta ili girlanda (5, 18).

Citološke osobine fibrosarkoma

Ovaj tumor pokazuje izraziti polimorfizam stanica. Tumor je nediferenciran, prisutna je anizokarioza. Čest nalaz je fin i zgrušani kromatin, te više mitoti-

Tablica 6.
Citomorfološke osobine osteosarkoma

Table 6
Cytomorphologic characteristics of osteosarcoma

Osteosarkom - citomorfološka
stanice su ili pojedinačno raspršene ili se nalaze u nakupinama
izražen pleomorfizam u veličini stanica/umjerene veličine do izrazito velikih, različita izgleda
česta multinuklearnost stanica
jezgre su obično ovalne, ali mogu biti pleomorfne, kromatin je gust, nukleoli mogu biti vrlo izraženi
mitoze česte
citoplazma je obilna, može biti fino granulirana
metakromatski obojeni osteoid prisutan je u staničnim nakupinama ili izolirano

Tablica 7.
Citomorfološke osobine Ewing-ovog tumora

Table 7
Cytomorphologic characteristics of Ewing tumor

Ewing sarkom - citomorfološka
izrazita celularnost razmaza
stanice su pretežno pojedinačno raspršene u razmazu, ili se grupiraju u manje nakupine
izgled stanica je monoton (male okrugle stanice 2 do 3 puta veličine zrelog limfocita), vrlo fragilne
uniformne okrugle do ovalne jezgre, vrlo finog granuliranog kromatina, nukleoli mali ili odsutni
česte citoplazmatske vakuolarne promjene
mitoze česte

čkih oblika. Citoplazma je lagano vakuolizirana, a glavni tip stanica naglašeno je elipsoidan. Česti nalaz prisutnih neutrofila ukazuje na češću upalnu reakciju.

Citološke osobine limfoblastičnog limfoma

Limfoblastični limfom se najčešće javlja u djece s NHL. Nalaze se brojne limfoblastične stanice, bez tendencije grupiranja, izrazito nježnog rahlog kromatina, koji može mjestimice biti kondenziran i retikularan, a jezgre pokazuju prisutnost nukleola. Stanice su velike, a mogu pokazivati umjerenu anizokariozu, dok citoplazma može biti oskudna ili obilnija, modre do sivomodre boje, često izrazito vakuolizirana.

Citološke osobine Hodgkin limfoma

Za citološku dijagnozu HL neophodan je citološki nalaz Reed-Stenbergove stanice, koja pokazuje izraziti polimorfizam u veličini stanice, broju nukleola, građnji kromatina i obilnosti citoplazme, nalaz Hodgkin stanice s iznimno prominentnim nukleolom. U pravilu su stanice izrazito velike, prisutni su brojni nukleoli, jezgra je izrazito reznjasta.

Kako je ponekad vrlo teško zbog izrazite embrionalnosti malignih tumora u djece, prepoznati pojedine tumore posebno u skupini "malih tumorskih stanica", citološki kriteriji koji obuhvaćaju; grupiranje jezgara, nukleoli, ganglijske stanice, neuropil, citoplazmatske vakuole, citoplazmatski izdanci, Homer-Wright-ove rozete, tubuli-cjevčice, lim-

foglandularna tjelešca, makrofagi, matrix-osnova, fibrozni matrix, vretenasto oblikovane stanice, tamna citoplazma, kariorektične stanice, uz dobru suradnju s kliničarom, te poznavanje dobi djeteta i lokalizaciju tumorskog procesa pomažu nam u donošenju ispravne dijagnoze.

Apsolutno je potrebno, gdje god je to moguće, učiniti patohistološku analizu, kako bi se potvrdila citološka dijagnoza ili isključila (27). Međutim, postoje brojne situacije u kojima je poželjna bilo aspiracijska bilo ekfolijativna citologija. Važno je spoznati i prihvatiti da ova dva srodna morfološka modaliteta nisu u natjecanju jedan s drugim, već prilično često komplementarni jedan drugome u obradi, posebno malignih bolesti u pravcu dijagnoze ili diferencijalne dijagnoze. Posebno mjesto u citološkoj dijagnozi solidnih malignih tumora u djece zauzima pedijatrijska intraoperativna citodijagnostika-citopatologija (IOC) zbog velike pomoći kirurgu u prosudbi nastavka i tipa operativnog zahvata, a zbog razloga što su i malobrojna istraživanja na tom području pokazala uspjeh ove metode, te visok stupanj korelacije s patohistološkom dijagnozom (28).

IOC se lako izvodi, korisno dopunjuje histološku dijagnozu, za koju ipak treba dulje vremensko razdoblje. Ova metoda osim što je od koristi kirurgu, koristi i patologu jer mu daje opću, ali katkad i posebnu informaciju o prirodi lezije. Ponekad je dobiveni materijal iznimno oskudan, a učinjena citološka analiza pomoći će patologu u usmjeravanju i odabiru raspoloživih dijagnostičkih metoda kako bi se došlo do precizne dijagnoze

i klasifikacije tumorske bolesti. Sigurno, da je optimalno kada se može učiniti iz istog uzorka citološka i histološka analiza, jer je tada stupanj korelacije izdanih dijagnoza najoptimalniji.

Naime, najtočniji podaci dobivaju se istodobno citološkom i histološkom analizom stanica i tkiva nekog tumora. Dakle, maligni tumori u djece često predstavljaju zbog citološke nediferenciranosti dijagnostički, diferencijalno-dijagnostički i prognostički problem, a teško ih je i klasificirati. Ovo naročito vrijedi za tzv. embrionalne tumore (blastome). I granica između benignih i malignih tumora u dječjoj dobi se katkada može teško odrediti, što povlači za sobom opasnost da se maligni tumor previdi, ili da se dijete podvrgne nepotrebnom i škodljivom liječenju. Tumori djeteta su, za razliku od tumora u odraslih osjetljiviji na zračenje i kemoterapiju, pa su rezultati pojedinih tipova tumora bolji.

Dijagnoza tumorske bolesti postavlja se citomorfološkim, histološkim, citogenetskim, imunološkim i kliničkim pretragama biopsijom i/ili kirurškom ekscizijom, Rtg pretragama, pregledom koštane srži itd. Koriste se sve raspoložive suvremene dijagnostičke mogućnosti. Svi se solidni tumori, uz manje razlike ovisne o specifičnosti pojedinog tumora, svrstavaju prema proširenosti, težini i kliničkoj slici bolesti u nekoliko stadija. U stadiju I tumor je oštro ograničen te se operacijom može ukloniti. U stadiju II tumor je zahvatio više regija, a u stadiju III i IV tumor zahvaća i druge organe ili je generaliziran. Kod mnogih malignih solidnih tumora već u času postavljanja dijagnoze uz primarni tumor razvile su se limfnim putovima ili hematogeno brojne mikro- ili makro- metastaze (u okolini tumora ili u udaljenim tkivima i organima).

Terapija se, ovisno o stadiju tumorske bolesti, razlikuje i kod istog tumora; prognoza i dužina preživljavanja bolesnika, a i mogućnost izlječenja, ovisne ponajprije o ispravnoj procjeni stadija bolesti, točnoj dijagnozi i dobroj strategiji liječenja. Liječenje tumorskih bolesti djeteta zahtijeva multidisciplinarni pristup; zbog toga je najbolje da se liječenje provodi u centrima za liječenje tumor-

skih bolesti u kojima uz odgovarajuću opremu i osoblje djeluju i posebno educirani timovi stručnjaka. Pri izboru načina liječenja bolesti odlučuju i biokemijske osobine tumorskih stanica; neobično je važno opće stanje bolesnika i poznavanje načina djelovanja antitumorskih lijekova.

Citodijagnostika ima sigurno značajno mjesto u dijagnozi malignih bolesti bilo da se radi o hemoblastozama ili solidnim tumorima. Gotovo svi solidni tumori u djece mogu se dijagnosticirati jedinom od citodijagnostičkih metoda (28). Naravno, kod nekih tumora su rezultati bolji, a kod nekih još uvijek nisu zadovoljavajući. Ponekad je citodijagnostika jedina moguća dijagnostička metoda zbog izrazito uznapredovale tumorske bolesti, te lošeg kliničkog stanja djeteta, koje ne bi podnijelo operativni zahvat za dobivanje bioptičkog materijala (4, 5, 17, 18, 27, 28). Dijagnoza tumorske bolesti u djece zahtijeva kooperativni multidisciplinarni pristup pedijatra, citologa, patohistologa, radiologa i dječjeg kirurga.

Prognoza bolesnika s tumorskom bolesti ovisi o citološkim i histološkim osobinama tumora, dobi bolesnika u času postavljanja dijagnoze i proširenosti bolesti. Šanse bolesnika za ozdravljenje povećavaju se iz godine u godinu. Rano otkrivena bolest, precizno postavljena dijagnoza i klasifikacija preduvjet su uspjeha terapijskih protokola u održavanju duljine remisije u bolesnika s tumorskom bolesti, a u nekih tipova tumorske bolesti i ozdravljenja.

Zaključak

- citomorfološkom metodom moguće je postaviti dijagnozu hemoblastoze i solidnih tumora ili ukazati na njih;
- citomorfološka metoda je brza, jednostavna, relativno neopasna i bezbolna metoda koju je moguće učiniti u većini laboratorija;
- citomorfološkim nalazima materijala dobivenog jednom od citomorfoloških metoda, moguće je pratiti dinamiku tumorskog procesa, posebno tijekom terapije, kao i uspjeh terapijskih protokola;

- citomorfološkom metodom moguće je otkriti recidiv tumora kao i udaljene metastaze;
- velika vrijednost citomorfološke metode je u obradi intraoperativno dobivenog materijala;
- korelacija s patohistološkom dijagnozom je vrlo visoka.

LITERATURA

1. Teracini B. Aetiology and Epidemiology U: Voute PA, Barret A, Lemerle L, ur. Cancer in children. Berlin-heidelberg: Springer Verlag, 1986; 3-11.
2. Kardun I. Klinička (neginekološka) citologija u svakodnevnoj praksi (tečaj trajnog medicinskog usavršavanja-Med. fakultet), knjiga sažetaka, Zagreb, 1998; 10-8.
3. Cardoso P Lopes. Atlas of clinical cytology. The Netherlands, 1973.
4. Nakić M. Imunološka klasifikacija akutnih limfatičkih leukemija u djece u korelaciji s citomorfološkom i citokemijskom klasifikacijom. Medicinski fakultet Zagreb (Disertacija), 1983; 156.
5. Grgić Z, Nakić M. Citomorfologija u dijagnostici dječjih malignih bolesti. Arh ZMD 1983; 26: 45-7.
6. Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton D, Garlinick HR, Sultan C. The morphological classification of acute lymphoblastic leukemia: concordance among observers and clinical correlations. Br J Haematol 1976; 47: 353-562.
7. Catovsky D, Galetto J, Okos A, Miliami E, Galton AG. Cytochemical profile on N and T leucemic lymphocytes with special reference to acute lymphoblastic leukemia. J Clin Patol 1974; 27: 761-71.
8. Tomonaga M. New classification of leukemia. Rinso Byori 2001; 115: 45-53.
9. Batinić D. Imunološka fenotipizacija akutnih leukemija dječje dobi. Paediatr Croat 1997; 41 (Supl 1): 83-9.
10. Finlay JL, Hann HWL. Tumor markers U: D'Angio GJ, Sinniah D, Medows AT, Ewans EA, Pitchard J. Practical Pediatric Oncology, New York: Willey-Liss, 1992; 16-24.
11. Mott MG. The Presentation, Management and Prognostic Solid Tumors of Childhood, Topics in Pediatrics, Hematology and Oncology. London:PH Moris Jones, Royal College of Physicians, 1979; 51-67.
12. Grancy P, Finklestein JZ. Neuroblastoma pediatric therapy. New York: Carl Pochedly, 1979; 125-47.

13. Neifeld JP. Neuroblastoma, Pediatric Tumors of the Genitourinary tract. New York: Liss Inc, 1980; 95-113.
14. Čepulić M, Abramović V, Nakić M, Golubić-Čepulić B, Javorović B. Najnovija dostignuća i naša iskustva u kirurškoj terapiji plućnih metastaza u djece. Arh ZMD 1987; 31: 277-89.
15. Nakić M. Citološka dijagnostika solidnih tumora u djece. Jug Pedijatr 1991; 34: 1-4.
16. Nakić M, Čepulić M, Petković I, Leniček J, Stepan J. Cytology in diagnosis of solid malignant tumors and lung metastases in children. Acta Cytologica 1994; 38 (4): 647.
17. Nakić M, Stepan J, Čepulić M, Petković I, Leniček J. Advantages of exfoliative Cytology Analysis in the Diagnosis of malignant Lymphoma in Children. Acta Cytologica 1994; 38 (4): 648.
18. Nakić M, Stepan J, Petković I, Čepulić M, Leniček J. Cytology in diagnostics of malignant tumors in children. Medical Pediatric Oncology 1995; 25 (4): 137.
19. Frostad B, Marinsson T, Damifors C, Tani E, Falkmer V, Kogner P. Fine needle aspiration for rapid genotyping of neuroblastoma using FISH and image cytometry. Medical Pediatric Oncology 1988; 31 (4): 291.
20. Nakić M, Čepulić M, Petković I, Stepan J, Milić Ž, Vrdoljak J. Advantages of Cytologic Analysis in the Diagnosis of Neuroblastoma in Children. Medical Pediatric Oncology 1988; 31 (4): 356.
21. White VA, Fanning CV, Ayala AG, Raymond AK, Carrasco CH, Murray JA. Osteosarcoma and the role of fine needle aspiration. A study of 51 cases. Cancer 1988; 62: 1238-46.
22. Layfield LJ, Glasgow BJ, Anders KH, Mirra JM. Fine-needle aspiration cytology of primary bone lesions. Acta Cytol 1987; 31: 177-84.
23. Perlman EJ, Dickman PS, Askin FB, Grier HF, Misre JS. Ewing's sarcoma-routine diagnostic utilisation of MIC 2 analysis. A Pediatric Oncology Group/Children's cancer Group Inter-group Study. Hun Pathol 1994; 25: 304-7.
24. Nakić M, Čepulić M, Petković I, Stepan J, Milić Ž, Leniček J. Fine needle aspiration cytology (FNAC) in diagnosis of osteosarcoma and Ewing's sarcoma. Medical Pediatric Oncology 1996; 27 (4): 309.
25. Mauer E, Harold M. Rhabdomyosarcoma. Pediatric Cancer Therapy, ed Carl Pochedly, New York, 1979; 71-85.
26. Čepulić M, Nakić M, Čepulić E. Solidni maligni tumori u dječjoj dobi. U: Turić M, Kolarić K, Eljuga D, ur. Klinička onkologija, Zagreb: Globus, 1996; 813-21.
27. Bloustein P, Silverberg SG. Rapid cytologic examination of surgical specimens. Pathol Ann 1977; 12: 251-78.

28. Liu FJ, Duben-Von Laufen JL, Bishop ML.
Tumor markers. Clinical Chemistry. Philadelphia: 1985; 495-504.

Summary

CYTOLOGY - DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC POSSIBILITIES IN MALIGNANT DISEASES IN CHILDREN

M. Nakić

The paper gives a review of the possibilities of cytodiagnostic in the early detection and diagnostics of malignant diseases especially in children and prognostic importance in therapeutic follow-up of the patients. An analysis is made of cytodiagnostic possibilities and prognostic significance in children with acute leukemia and children with a solid tumor. The good and bad points of these diagnostic methods are emphasized. The most satisfactory results of these medical diagnostic disciplines in the morphological diagnostics of leukemia and solid tumors in children are achieved by cooperation and teamwork of the cytologist, histopathologist, pediatrician, oncologist, surgeon and radiologist.

Descriptors: MALIGNANT DISEASE, CYTODIAGNOSTIC METHODS, DIAGNOSIS, CLASSIFICATION