

Współczesne sposoby cytologicznego badania płynu mózgowo-rdzeniowego w chorobach nowotworowych

Contemporary methods of cytological examination of the cerebrospinal fluid in neoplastic diseases

JÓZEF KAŁUŻA

Z Zakładu Neuropatologii Instytutu Neurologii CM UJ w Krakowie

STRESZCZENIE. *W artykule przedstawiono charakterystyczne cechy komórek nowotworowych, spotykanych w płynie mózgowo-rdzeniowym. Omówiono przyczyny znacznie większej efektywności badania cytologicznego płynu w przypadkach guzów przerzutowych niż w nowotworach pierwotnych o.u.n. Podano zasady identyfikacji komórek nowotworowych przy pomocy przeciwciał monoklonalnych. (red.)*

SUMMARY. *Characteristic features of neoplastic cells occurring in the cerebrospinal fluid are described. The reasons for a much higher efficacy of the cerebrospinal fluid cytological examination in cases of metastatic tumors than in primary tumors of the CNS are discussed. Principles of neoplastic cells identification by means of monoclonal antibodies are outlined (ed.).*

Słowa kluczowe: płyn mózgowo-rdzeniowy / diagnostyka / badanie cytologiczne
Key words: cerebrospinal fluid / diagnostics / cytological examination

Badanie cytologiczne płynu mózgowo-rdzeniowego jest stosunkowo łatwo dostępne, tanie i szybkie, spełnia zatem kilka wymogów stawianych w diagnostyce klinicznej. Chociaż może być to metoda powszechnie stosowana, wymaga ona spełnienia kilku warunków. Do tych zaliczamy przede wszystkim czas, jaki upływa od pobrania płynu mózgowo-rdzeniowego do momentu nastawiania płynu w urządzeniu osadowym, celem uzyskania odpowiedniej liczby komórek do badania. Kolejnym warunkiem, który powinien być dotrzymany jest ilość płynu mózgowo-rdzeniowego przekazywana do badania. Minimalna ilość płynu to 0,5 ml, co nie wyklucza większej ilości płynu, jeśli tylko jest możliwa do uzyskania. Większa ilość płynu potrzebna jest wówczas, gdy mamy trudności diagnostyczne i uważamy za konieczne wykonanie dodatkowych badań, takich jak różnicowane barwienie lub immunocytochemicznych.

Cały szereg wymienionych i innych warunków określa wydajność metody cytologicznego badania płynu mózgowo-rdzeniowego. Wydajność ta, jeśli chodzi o nowotwory ośrodkowego układu nerwowego, jest różnicowana i zależna od pochodzenia nowotworu. Zaznacza się bardzo wyraźnie różnica między nowotworami pierwotnymi a nowotworami przerzutowymi. Jakościowa ocena komórek nowotworowych w osadzie opiera się na następujących kryteriach:

- (a) tendencja komórek do tworzenia skupień
- (b) obecność komórek z kilkoma jądrami
- (c) duże lub liczne jąderka
- (d) stosunek plazmojądrowy przesunięty w kierunku jądra
- (e) wielokształtność jądra
- (f) zasadochłonność cytoplazmy.

Z codziennego doświadczenia wynika, że żadne z tych kryteriów z osobna nie może stanowić podstawy rozpoznania, które może jedynie być ustalone przy uwzględnieniu wszystkich kryteriów.

Nowotwory pierwotne

Wydajność metody cytologicznego badania płynu mózgowo-rdzeniowego w nowotworach pierwotnych, określana według piśmiennictwa i własnych doświadczeń na 17–30%, uzależniona jest od szeregu czynników wpływających na ostateczny wynik badania. Za główne czynniki należy uznać następujące.

(a) *Właściwości histoformatywne nowotworu.* Nowotwory pierwotne, wśród których guzy glejopochodne stanowią większość, złożone są w przeważającej liczbie z komórek tworzących wypustki protoplazmatyczne różnej długości i różnym stopniu rozgałęzienia. Tworzą one gęstą sieć, która zespala komórki ze sobą i utrzymuje je w dość ścisłym ze sobą połączeniu. W związku z tym, uwalnianie się komórek jest trudne i występuje rzadko. Wyjątek mogą stanowić nowotwory glejopochodne o subformach epitelooidalnych oraz nowotwory glejopochodne o skrajnym stopniu złośliwości, jak np. gąbczak wielopostaciowy, które ulegają częściowo martwicy. O ile nowotwory skrajnie złośliwe nie należą do rzadkości, o tyle subformy epitelooidalne są nowotworami rzadko występującymi.

(b) *Umiejscowienie.* Drugim czynnikiem jest topografia nowotworów glejopochodnych. Guzy pierwotne glejopochodne są najczęściej umiejscowione w pewnej odległości od przestrzeni płynowych, tzn. przestrzeni podpajęczynówkowej lub komór. Jeśli nawet nowotwór zbliża się do powierzchni zawoju, następnie przekracza granicę wyznaczoną przez naczyniówkę i penetruje przestrzenie, które zostały wymienione powyżej, a pilśni wypustek komórkowych utrudnia ich odrywanie się od macierzy nowotworowej.

(c) *Stosunek nowotworu do otoczenia.* Jest trzecim czynnikiem wpływającym na wydajność stosowanej metody badawczej. Nowo-

twory pierwotne glejopochodne mają przeważnie wzrost naciekowy, który determinuje nieostrą granicę w stosunku do otoczenia. Właściwości morfologiczne komórek ograniczają w znacznym stopniu uwalnianie się ich do przestrzeni płynowych. Niektóre z tych nowotworów, jak np. wyściółczaki, mają częściowo ekspansywny charakter wzrostu. Ich zewnętrzna powierzchnia jest zbita i chociaż nie ma ona torebki, również nie sprzyja uwalnianiu się komórek. Podobnymi cechami odznaczają się nowotwory łagodne, jak oponiaki i nerwiaki, które wprawdzie nie mają własnej torebki, jednak posiadają cechy cytologiczne ograniczające w znacznym stopniu uwalnianie się komórek. Ponieważ powierzchnia tych guzów jest utworzona z gęsto ułożonych komórek o układzie stykowym, stanowi ona ostrą granicę w stosunku do otoczenia nie dopuszczając do uwalniania się komórek do przestrzeni płynowych.

Nowotwory przerzutowe

W przeciwieństwie do guzów pierwotnych, guzy przerzutowe są częściej rozpoznawane na podstawie badania cytologicznego płynu. Wydajność metody określa się w dość szerokich granicach w zależności od laboratorium, w którym badanie się przeprowadza, ale zawsze jest ona wyższa w porównaniu z guzami pierwotnymi mózgu. W nowotworach przerzutowych częstość rozpoznania waha się w granicach od 55 do 85%. Podobnie, jak w przypadku guzów pierwotnych i w nowotworach przerzutowych, pewne czynniki wpływają na wydajność metody.

(a) *Właściwości histologiczne przerzutu.* Ogniska przerzutowe nowotworów spoza o.u.n. są zwykle dość dobrze odgraniczone od otoczenia, chociaż macierz przerzutu jest do tego stopnia martwiczo zmieniona, że przypomina treść ropną. Ten wygląd stanowi nieraz źródło trudności makroskopowej oceny guza. Komórki nowotworowe ogniska przerzutowego, które znalazło się w o.u.n. na drodze hematogennej, ułożone są na zewnątrz ogniska i nie posiadają tych cech zespolenia, które są właściwe komór-

kom glejowym. W związku z tym, komórki te o wiele łatwiej uwalniają się od nekrotyzującej macierzy nowotworu, tym bardziej, że na obrzeżu ogniska są komórki żywotne o bardzo dobrze zachowanej strukturze.

(b) *Umiejscowienie*. Ogniska przerzutów nowotworowych są pochodzenia hematogenego. Ich umiejscowienie zależne jest od gęstości i topografii naczyń. W związku z tym najczęściej umiejscowione są w korze lub na granicy kory i istoty białej. Takie rozmieszczenie predysponuje je do łatwiejszego stykania się z przestrzeniami płynowymi, co przyczynia się do znacznie częstszego wysiewania się komórek nowotworowych do tych przestrzeni.

(c) *Stosunek do otoczenia*. Jak już opisano w punkcie poprzednim, nowotwory są zwykle dość ostro odgraniczone od otoczenia, są też przyczyną znacznego obrzęku kolateralnego. Mimo ostrego odgraniczenia komórki nowotworów przerzutowych nieporównywalnie łatwiej odrywają się od macierzy i przedostają się do przestrzeni płynowych lub do krwiobiegu. To powoduje, że są one najczęściej obecne w osadzie płynu mózgowo-rdzeniowego, tym samym przyczyniają się do zwiększenia prawdopodobieństwa prawidłowego rozpoznania cytologicznego. Są jednak schorzenia nowotworowe, które odbiegają swoim przebiegiem i sposobem szerzenia się od wyżej opisanych. Są to schorzenia proliferacyjne układowe, do których zaliczamy białaczki i chłoniaki. Odrębne omówienie tych dwóch grup nowotworów uzasadnione jest innym sposobem ich wzrostu i koniecznością określenia ich fenotypów, co ma ważne znaczenie dla leczenia pooperacyjnego.

W *białaczkach* badanie cytologiczne płynu mózgowo-rdzeniowego ma na celu najczęściej udzielenie odpowiedzi, czy proces proliferacyjny szerzy się również w o.u.n. Badanie to jest zazwyczaj częścią badań kontrolnych potrzebnych dla ustalenia, czy objawy kliniczne w postaci objawów oponowych pochodzą od nacieku białaczkowego, czy też są następstwem odczynu nekrotok-

sycznego opon w przebiegu leczenia. W jednym i w drugim przypadku badanie może być bardzo pożyteczne dla dalszego postępowania klinicznego.

W przypadku *chłoniaków* o.u.n. badanie cytologiczne może być badaniem wstępnym, które stanie się podstawą dalszego postępowania diagnostycznego i leczniczego.

Badania immunocytochemiczne

W pewnym odsetku przypadków określenie rodzaju nowotworu na podstawie badania cytologicznego napotyka na duże trudności. Komórki wysiewając się do przestrzeni płynowych ulegają pod względem morfologicznym pewnemu ujednoliceniu. Wynika to z tego, że komórki przybierają kształt okrągły niezależnie od posiadanego uprzednio kształtu, np. jak w nowotworach pierwotnych glejowego pochodzenia, w których komórki mają liczne wypustki plazmatyczne. Takie zuniformizowanie stwarza trudności rozpoznawcze. Wówczas należy włączyć do sposobów analizy różnicowej metody immunocytochemiczne. Jeśli takie postępowanie uznamy za potrzebne, musimy przewidywać, że materiał cytologiczny uzyskany w drodze sedymentacji jest materiałem przeznaczonym wyłącznie dla jednego sposobu badania. Przewidując kilka różnych metod badawczych należy płyn umieścić na kilku szkiełkach podstawowych, albo posłużyć się błonami półprzepuszczalnymi, które możemy podzielić i w ten sposób zwiększyć liczbę preparatów przeznaczonych do różnych badań. Do takiego postępowania zmuszają nas najczęściej nowotwory umiejscowione wewnątrz kanału kręgowego lub przy kanale kręgowym. Rodzaj przeciwciał i możliwości ich wykorzystania do rozpoznania różnicowego poszczególnych rodzajów nowotworów umieszczono w tabl. 1. Jak wynika z tego zestawienia, zastosowanie odpowiednich przeciwciał umożliwia dokładniejsze określenie pochodzenia komórek nowotworowych i tym samym dokładnego rozpoznania nowotworu. Ma to istotne znaczenie dla dalszego prowadzenia leczenia.

Tablica 1. Rodzaj i obecność antygenów w najczęściej rozpoznawanych guzach o.u.n.
(wg Paulusa, za [1], z modyfikacjami)

Rodzaj guza/antygen	Vim	GFAP	Des	CK	EMA	S-100	Synap	NSE
Astrocytoma	+++	+++	+	+/-	-	+++	-	-
Glioblastoma	+++	+++	+	+/-	-	++	-	+/-
Oligodendroglioma	+	+	+	+/-	-	++	-	-
Ependymoma	+	+++	-	+	+	+	-	-
Medulloblastoma	+	+	+	+/-	-	+	+++	+++
Meningeoma	+++	+/-	+/-	++	+	+	-	-
Hemangiopericytoma	+++	+/-	+	+/-	+/-	++	-	-
Hemangioblastoma	+++	+/-	+	+/-	+/-	++	+	-
Neurinoma	+++	+	+	+	+/-	+++	-	-
Przerzut raka	++	-	+/-	+++	+++	+/-	-	-

Vim – wimentyna, GFAP – kwaśne włókienkowe białko, Des – desmina, CK – cytokeratyna, EMA – antygen nabłonkowy, S-100 – białko S-100, Synap – synaptofizyna, NSE – enolaza neuronalna

+, ++, +++ stopień nasilenia odczynu

+/- odczyn niepewny lub w pojedynczych komórkach

- brak odczynu

Badania immunocytochemiczne, które obecnie mają duże znaczenie dla przeprowadzenia rozpoznania różnicowego opierają się na założeniu, że komórki poszczególnych rodzajów nowotworów mają antygeny, które tylko im są właściwe. Własności antygenowe mogą posiadać różne elementy strukturalne komórki, np. elementy cytoszkieletu, różne enzymy lub inne drobiny, które są właściwe tylko niektórym komórkom. Oznaczenie tych antygenów przy użyciu swoistych przeciwciał pierwotnych pozwala na odkrycie obecności antygenów, a w konsekwencji na charakterystykę komórek stanowiących utkanie guza. Antygeny oznaczane w komórkach nowotworowych mają nie tylko służyć jako znaczniki określające cechy charakterystyczne komórki, które pozwalają na ocenę rodowodu komórki nowotworowej, lecz także ułatwiają ocenę stopnia ich aktywności proliferacyjnej. Jeśli oznaczenie ostatnio wymienionych antygenów jest możliwe, to

wynik takiego badania może mieć wartość prognostyczną. Badania immunocytochemiczne mogą służyć również jako wstępne rozpoznanie właściwości antygenowych komórek nowotworowych i pozwalać na ocenę stopnia heterogenności składu komórkowego guza. Dalsze badania molekularne mogą dokładniej scharakteryzować fenotyp tych komórek i pomóc w ustaleniu właściwego leczenia pooperacyjnego.

Jak z powyższego wynika, badanie cyto logiczne płynu mózgowo-rdzeniowego może nie tylko pomóc w szybkim ustaleniu właściwego rozpoznania, ale przyczynić się także do właściwego dalszego postępowania leczniczego.

PIŚMIENNICTWO

1. Peiffer J., Schröder J.M. (red.): *Neuropathologie*. Springer Berlin, Heidelberg, New York 1995.