

Histološke osobitosti zloćudnih tumora

Histological Characteristics of Malignant Tumours

Mara Dominis

Odjel za patologiju i citologiju KB Merkur

10000 Zagreb, Zajčeva 35

Sažetak Najveći broj zloćudnih tumora potječe od jedne jedine zloćudno promijenjene stanice - tzv. monoklonalne zloćudne stanice. Međutim, naslijeđena genska nestabilnost zloćudnih stanica, utjecaji mikrookoliša i makrookoliša vrlo brzo dovode do bioloških različitosti, tj. fenotipskih i genskih promjena zloćudnih stanica i njihovih metastaza, tj. heterogenosti zloćudnih stanica. Upravo je heterogenost zloćudnih stanica osnova teorije o nastanku metastaza prema kojoj samo najotpornije i najposobnije stanice mogu preživjeti, pa se zato metastaziranje može shvatiti kao kompeticija između subpopulacija tumorskih stanica u kojoj su stanice primarnog tumora pobjednice i nastavljaju život u metastazi. Pojednostavnjenom definicijom morfološko se razlikovanje dobroćudnih od zloćudnih tumora osniva na određivanju stupnja sličnosti tumora "roditeljskomu" tkivu, tj. tkivu podrijetla tumora. Tako definirani dobroćudni tumori histološki, citološki i dijelom funkcionalno gotovo u cijelosti odgovaraju "roditeljskomu" tkivu. Dobročudnost tumora potvrđuju i dodatna obilježja: neinvazivni rast, često stvaranje vezivne kapsule koja odvaja tumor od okolnoga zdravog tkiva, a najvažnije je obilježje da nema sklonosti metastaziranju.

Ključne riječi: tumor, stanica, histologija, citologija, karakteristike

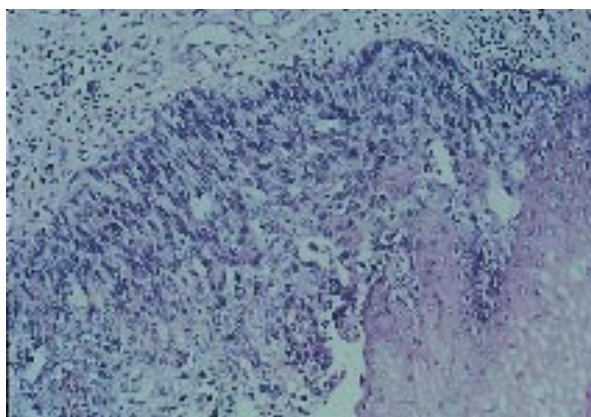
Summary Almost all cancers originate from the malignant transformation of a single cell - clonal origin of tumours. However, the inherent genetic instability of malignant phenotype influenced also by micro- and macroenvironmental factors, leads to subpopulations of malignant cells with diverse biological characteristics and variations in their metastatic potential - tumour heterogeneity. The tumour heterogeneity has led to the concept that at each point in metastatic process only the most viable cells survive. Therefore, the metastatic process can be considered as a competition in which a population of cells within the primary malignant tumor ultimately prevails as a metastasis. Simple morphological classification is based upon resemblance to parent tissue. Benign tumours in general resemble cytologically, histologically and very frequently functionally the parent tissue. Furthermore many benign tumours are circumscribed by connective tissue capsule, however some are not (i. e. Polyps, hepatic adenoma, etc). Nevertheless, the definition of benign tumours is based in their inability to invade adjacent tissue and to metastasize.

Key words: tumour, cell, histology, cytology, characteristics

Zloćudne tumore obilježava značajna morfološka i funkcionalna različitost od "roditeljskog" tkiva (1, 2, 3, 4).

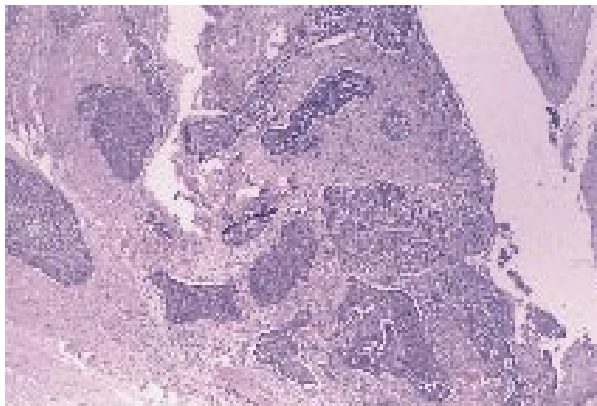
Osnovne histološke karakteristike zloćudnosti tumora:

1. **anaplazija** - nemogućnost diferencijacije zloćudnih stanica, očituje se atipijama (slika 1):
 - a) veličine i oblika stanica i jezgara (polimorfizam, bizarni oblici, tumorske orijaške stanice)
 - b) strukture kromatina jezgara (hiperkromazija, grudasti kromatin),
 - c) oblika i broja nukleola.
2. **mitotska aktivnost** - obično je povećana u zloćudnim tumorima, ali broj mitozu nije uvijek presudan za povećanu sposobnost metastaziranja. Tako u nekih tumora (npr. glatkomišićnog tkiva) već i malen broj mitozu upućuje na zloćudnije i agresivnije ponašanje tumora.
3. **invazija** - potvrda malignog potencijala tumorske mase. Neki tumori (npr. polipi debelog crijeva ili pločasti karcinom grla maternice) tek invazijom okoline dobivaju atribut zloćudnosti (slika 2).



Slika 1. Sluznica jednjaka. Vidi se dio normalne sluznice i dio karcinoma s anaplazijom stanica. HE, x90.

4. **metastaze** - definitivni dokaz zloćudnosti tumorskog rasta. Katkad, tek pojava metastaza upućuje na zloćudnu bolest i nalaže mukotrpno otkrivanje primarnog tumora.



Slika 2. Sluznica i stijenka jednjaka. Tumorne stanice u žarištima u stijenci jednjaka. HE, x90.

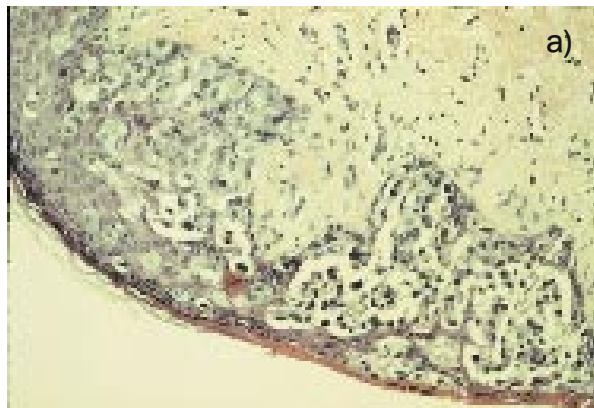
Najčešće se iz metastaze ne može prepoznati podrijetlo tumora, stoga su potrebne dodatne metode kojima se pokušava definirati stanični tip tumora. Metastaze su vrlo često građene od slabo diferenciranih ili gotovo potpuno nediferenciranih stanica, tako da je teško razlikovati epitelnu od mezenhimalne tumorske proliferacije. Slična se dilema pojavljuje i u dijagnostici primarnih tumora. Stanično podrijetlo bilo primarnih bilo metastatskih tumora nema samo akademsko značenje, nego je od velike važnosti za klinički tijek bolesti i izbor najdjelotvornije terapije. Kako tumorske i normalne (zdrave) stanice posjeduju slične ili iste biljege (u citoplazmi ili na površini stanice) ili imaju sposobnost otpuštanja nekih biljega u krv/tjelesne tekućine, ta se karakteristika obilno iskorištava u pokušaju određivanja progenitorske tumorske stanice (5). Treba, međutim, jasno naglasiti da ne postoji strogo specifični tumorski biljeg koji bi definitivno omogućio razlikovanje benigne od maligne bolesti.

Epitelni tumori (karcinomi) obilježeni su konstantnom ekspresijom nekih biljega, što daje mogućnost određivanja podrijetla tumorskih stanica i u slučajevima kada su te stanice slabo diferencirane. Većina sadržava intermedijarne filamente - citokeratine (slika 3). Dezmozoplakin, netopljivi protein dezmosoma (dodirnih mjesta između epitelnih stanica) povezan je s citokeratinom i također je dobar biljeg epitelnih neoplazma.

Zloćudne stanice karcinoma prostate pokazuju ekspresiju prostatičnog specifičnog antigena (PSA) i u većini slučajeva imaju sposobnost lučenja prostatične kisele fosfataze. Stanice karcinoma debeloga crijeva pokazuju ekspresiju karcinoembrionalnog antigena (CEA - carcinoembrionic antigen), a karcinomi štitnjače ekspresiju tireoglobulina i u nekim suptipovima kalcitonina. Sijalinizirani oblik Lewisova antigena (CA 19-9) pozitivan je u nekim slučajevima karcinoma gušterače i zloćudnih tumora gastrointestinalnog trakta (GI-trakt).

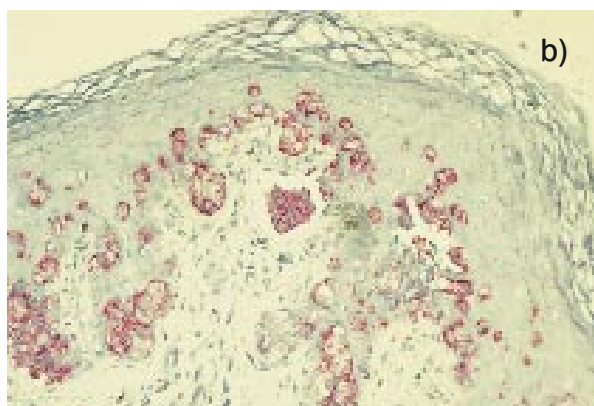
CA 125 je relativno dobar biljeg karcinoma jajnika, a nuklearni receptori estrogena i progesterona za karcinom dojke.

U diferencijalnoj dijagnozi između melanoma (osobito nepigmentiranog tipa) i tumora slične morfologije, rabi



Slika 3. a) Pagetova bolest dojke. HE, x90.

b) Citokeratin, CK 19, x90



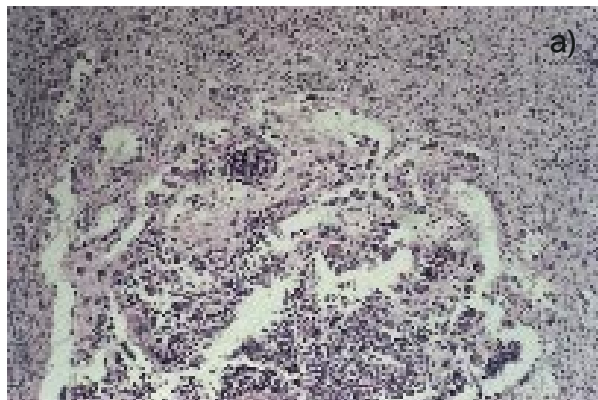
se standardna imunohistokemijska "formula" koja govori u prilog melanoma: citokeratin negativan, S-100 protein pozitivan, HMB 45 pozitivan i melan-A pozitivan.

Neuroendokrini tumori, osim što su citokeratin pozitivni, sadržavaju neurosekretorna zrnca - kromogranin, sinaptofizin i neuronespecifičnu enolazu (NSE) (slika 4). Međutim, svi su ti receptori nespecifični, pa se može primijeniti dodatna suptipizacija specifičnim peptidima ili hormonima koje luče takvi tumori, npr. gastrin, inzulin, glukagon i ACTH.

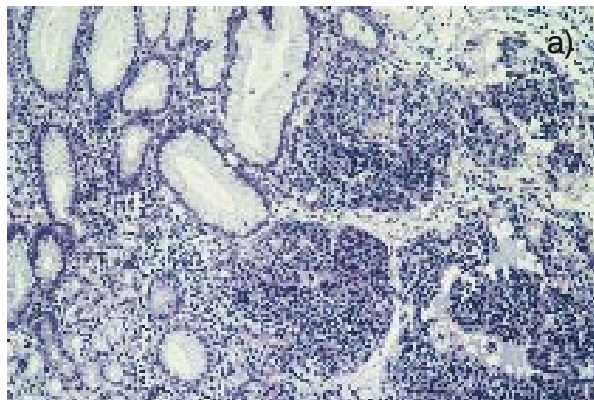
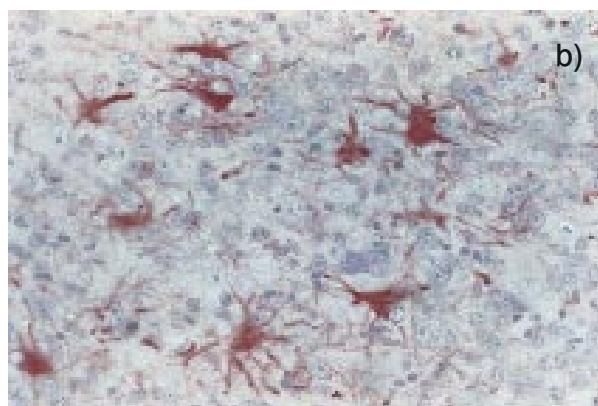
Tumori mekih tkiva sadržavaju intermedijarni filament - vimentin (slika 5). Međutim, protutijelo na vimentin daje pozitivitet i s intermedijarnim filamentima koji su dio epitelnih stanica, što znači da nije specifičan za mezenhimske stanice. Za točnu dijagnozu tih tumora potrebno je odrediti druge biljege (npr. dezmin za mišićne stanice, faktor VIII i CD34 za endotelne stanice, neurofilament i glijalni fibrilarni kiseli protein za stanice ovojnice živaca i glije).

Biljezi za limfome i leukemije grupirani su u CD skupine (CD - cluster of differentiation). U pravilu svi su pozitivni na leukocitni zajednički - "common" antigen (LCA) ili CD45. Međutim, postoje i brojni biljezi za razlikovanje T i B-limfocita te stadije diferencijacije tih stanica.

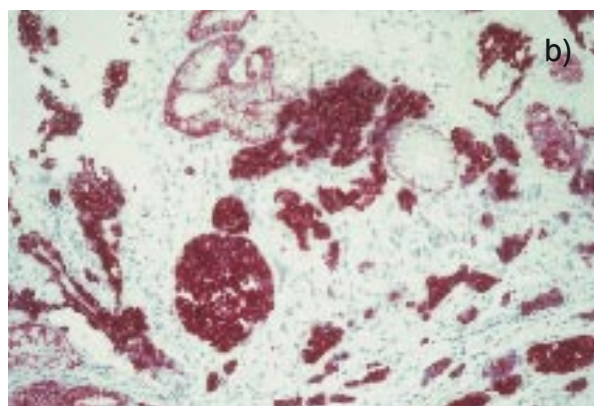
Neki tumori mogu biljege otpuštati u krv. Serumski biljezi nisu specifični za "bolest ili tumor", ali se praćenje



Slika 4. a) Ganglioneuroblastom, HE, x90
b) Vimentin, x120



Slika 5. a) Karcinoid želuca, HE, x90
b) Kromogranin, x90



njihovih vrijednosti u serumu iskorištava kao važan parametar uspješnosti kirurškog zahvata i/ili provedene terapije. Najpoznatiji su: alfa-fetoprotein (pozitivan u nekim tumorima jetrenih stanica i tumorima testisa), CEA (već spomenuti biljeg nekih karcinoma debelog crijeva), CA 19-9 i CA 125 (u nekim tumorima gušterače, gastrointestinalnog trakta i jajnika) te beta-HCG (biljeg trofoblastične proliferacije).

Elektronska mikroskopija (EM) još je jedna dodatna metoda u otkrivanju podrijetla slabo ili nediferenciranih tumora, tj. u razlikovanju nediferenciranih epitelnih od mezenhimalnih neoplazma ili limfoma. Tako npr. rutinskim mikroskopom nije moguće uočiti tzv. "junkcionalni" kompleks - tipičan za epitelne stanice, vrlo rijedak u mezenhimalnim stanicama i negativan u limfomima, pa je EM važna upravo u dijagnostici ovih tipova tumora, iako je nešto dugotrajnija i zahtjevnija metoda.

Invazija i metastaziranje dvije su stalne značajke zloćudnih tumora (6, 7).

Ti se procesi zbivaju u nekoliko koraka:

- a) invazija kroz bazalnu membranu,
- b) infiltracija ekstracelularnog matriksa,
- c) penetracija u krvne i limfne žile,
- d) mogućnost "preživljenja" u cirkulaciji,
- e) neoangiogeneza - uvjet bez kojeg metastaza ne može preživjeti.

Maligni su tumori u svom početku lokalizirani u organu/epitelu, u kojem ili iz kojega počinju proliferirati. Sve dok je bazalna membrana očuvana, radi se o tzv. *carcinoma in situ*. Tek prodorom kroz bazalnu membranu (8) nastaju preduvjeti za direktnu invaziju i mogućnost metastaziranja (9, 10, 11). Međutim, neki zloćudni tumori, zbog svoje lokalizacije, ne šire se izvan organa u kojem nastaju (tumori SŽS), ali infiltriraju u okolinu i time ugrožavaju vitalne centre.

U procesu invazije sudjeluju brojne atehzijske molekule na površini tumorskih stanica. Njihova ekspresija ovisi o:

1. tipu tumora,
2. klonu tumorskih stanica,
3. proširenosti metastatskog procesa.

Najvažnije atehzijske molekule su integrini, imunoglobulinska "supergene" obitelj molekula, kaderini i katenini (12, 13). Pored atehzijskih molekula važnu ulogu u invaziji imaju i citokini, od kojih je najvažniji autokrini mobilizirajući faktor (AMF). Proteolitički enzimi, osobito proteaze (14), imaju odlučujuću ulogu u degradiranju sastavnica bazalne membrane, što je prvi korak u procesu invazije tumorskih stanica.

Nakon invazije, tumorske se stanice mogu širiti u udaljene organe. U tom procesu također postoje ključni momenti: 1. invazija u cirkulaciju (oko 0,1% tumorskih stanica dovoljno je za početak stvaranja nove kolonije tumorskih stanica), 2. "izlazak" tumorskih stanica iz

cirkulacije te početak lokalne invazije i rasta tumora. Za lokalni rast tumora bitni su autokrini faktori, faktori rasta i najvažniji faktor angiogeneze. Ako se ne uspostavi angiogeneza, tumorske stanice mogu preživjeti kratko vrijeme i doseći veličinu 1 do 2 mm, ali nakon toga odumiru. Proces angiogeneze počinje u netumorskom tkivu domaćina i istovjetan je morfološkom procesu normalnog cijeljenja rane. Angiogeneza tumora (15, 16) - neoangiogeneza može se dogoditi u različitim vremenskim fazama rasta tumora, a uvjetovana je fenotipskim i genotipskim promjenama unutar samih tumorskih stanica. Nije sasvim jasno je li osnovni poticaj za početak angiogeneze hipoksija tkiva domaćina u kojem su se naselile tumorske stanice ili angiogeni faktori koje luče tumorske stanice ili jedno i drugo. U svakom slučaju djelovanje može biti direktno na endotelne stanice krvnih žila ili se radi o stimulaciji upalnih stanica (17) koje onda svojim produktima potiču stvaranje krvnih kapilara.

Metastaza se definira kao implantat - usadak tumorskih stanica u udaljeni organ/e od primarnog mjesta nastanka tumora. Invazivno svojstvo tumorskih stanica omogućuje prodor u krvožilni i limfni sustav, što olakšava i ubrzava širenje tumora (1, 18).

U pravilu tumorske stanice penetriraju u male krvne žile (venule i arteriole). Većina tumorskih stanica umire unutar cirkulacije, ali vrijedi pravilo - što više stanica uđe u cirkulaciju, to je veća vjerojatnost da će dio stanica preživjeti (19). U početnoj fazi metastaziranja, dok se ne stvore krvne kapilare (angiogeneza), tumorske stanice su "zalijepljene" na endotelne stanice ili bazalnu membranu. Tek kada se iz postojećih (*in situ*) krvnih žila počinju stvarati nove krvne žile (tumorska angiogeneza), metastaza postaje autonomna i može samostalno preživjeti (20). Imajući u vidu ovakav slijed događaja, jasno je zašto većina abdominalnih tumora metastazira u jetru (prodor u venu porte ili njezine ogranke) ili u pluća (prodor u sistemu cirkulaciju). Neke tumorske stanice su dovoljno otporne da prežive nepovoljne uvjete u mikrocirkulaciji, zaobiđu veće krvne žile i njihove ogranke te se nađu na neobičnim mjestima, npr. u mozgu ili koštanoj srži i tu stvaraju metastaze (dojka, prostata). Kako samo veliki limfni putovi imaju bazalnu membranu, tumorske stanice vrlo lako i brzo mogu prodrijeti u limfne kapilare i dalje u regionalne limfne čvorove. U početnoj fazi tumorske stanice ispunjavaju supkapsularne sinuse, a tek kasnije mogu infiltrirati preostale dijelove limfnog čvora. Katkad, tumorske stanice mogu zaobići regionalne limfne čvorove i naseliti se u udaljene limfne čvorove - radi se o tzv. "skip" metastazama. Isto tako neki tumori prvo metastaziraju u regionalne limfne čvorove iz faze embrionalnog života, a ne u one iz kasnijeg života. Npr., tumori testisa metastaziraju u intraabdominalne limfne čvorove, a ne u regionalne čvorove inguinuma.

Histološki stupanj i stadij proširenosti zloćudnih tumora

Svakom histološki dijagnosticiranom zloćudnom tumoru potrebno je, radi predviđanja biološkog ponašanja i

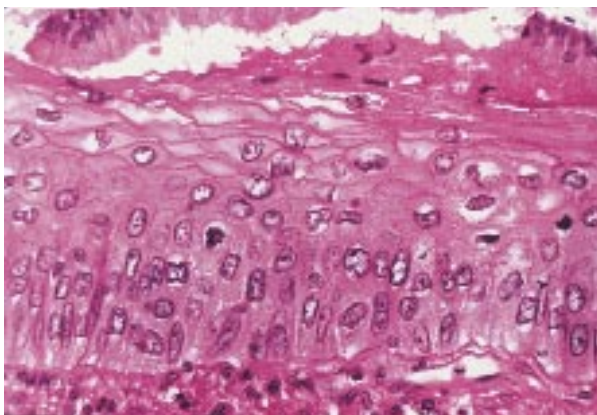
primjene najdjelotvornije terapije, odrediti stupanj diferenciranosti stanica (*grading*) i proširenost tumora u okolno tkivo ili izvan primarnog mjesta nastanka (*staging*) (21).

Tumorsko tkivo za histološku analizu moguće je dobiti različitim postupcima: biopsijom debelom iglom, ekscizijom, resekcijom ili ekstirpacijom cijelog organa. Stupnjevanje diferenciranosti tumorskih stanica moguće je odrediti u svim nabrojanim uzorcima, ali proširenost tumora samo u reseciranom dijelu ili cijelom ekstirpiranom organu, infiltriranom tumorom.

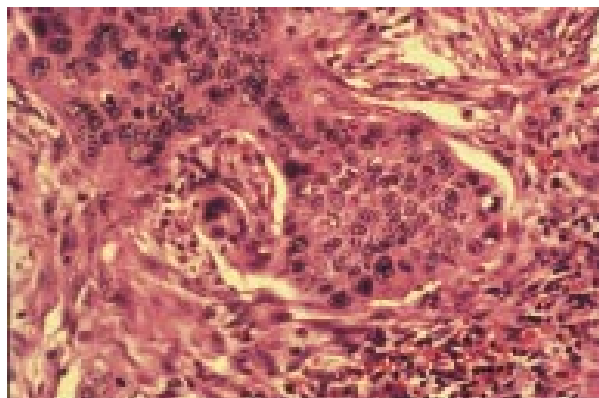
Za dijagnozu, određivanje stupnja diferenciranosti i stadija proširenosti zloćudnih tumora rabe se različite histološke tehnike:

1. *smrzavanje tkiva* - brza metoda, ali slabije kvalitete morfoloških detalja, služi za grubu orijentaciju o vrsti tumora (dobročudan/zloćudan) i u manjoj mjeri za određivanje stupnja diferenciranosti stanica. Najčešće se rabi u tijeku kirurških zahvata.
2. *parafinski blok i hemalaun/eozinsko bojenje* - standardni histološki preparati, trajno čuvaju morfologije tumora. U velikom broju slučajeva dostatna je metoda za ispravnu dijagnozu, stupanj diferenciranosti i proširenost tumora.
3. *histokemijsko bojenje* - dopunska metoda za točnije prepoznavanje pojedinih sastavnih dijelova tumorskog tkiva (npr. srebrna metoda - retikulinske niti, trikromne metode - vezivo, kongo crvenilo - amiloid). Korisna metoda u slučajevima kada standardna tehnika nije dovoljna za postavljanje točne dijagnoze.
4. *imunohistokemijska metoda i elektronska mikroskopija* - također dopunske metode o kojima je već bilo riječi.

U svakom patohistološkom nalazu mora se definirati: 1. **tip zloćudnog tumora** (karcinom/sarkom/limfom i sl.), 2. **biološko ponašanje tumora** (brzi rast, rano metastaziranje ili manje agresivno ponašanje), 3. **histološki stupanj anaplazije stanica** - obično se dijeli u tri kategorije: I. stupanj - dobro diferencirani tumori, II. stupanj - srednje dobra diferenciranost i III. stupanj - slabo diferencirani tumori (slika 6, 7, 8). Medutim, rabi se i stupnjevanje u više kategorija zbog dokazane razlike u

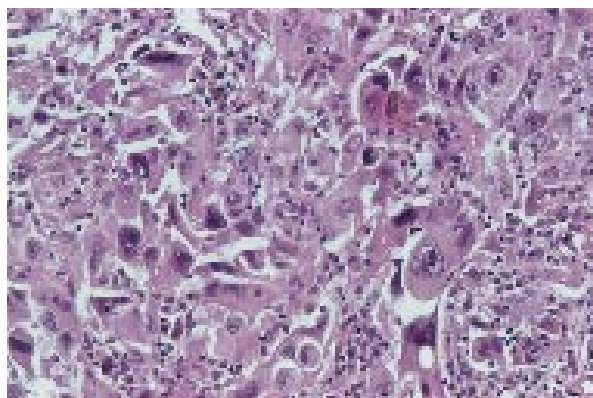


Slika 6. Sluznica grla maternice - gradus I, HE, x120



Slika 7. Sluznica grla maternice - gradus II, HE, x 120

prognozi, odabiru liječenja i odgovoru na terapiju (npr. tumori mokraćnog mjehura, dojke, grla maternice). 4. **patohistološki stadij zloćudnog tumora.** Samo se u reseciranom ili ekscirpiranom organu određuje veličina tumora, lokalna infiltracija u okolno tkivo, invazija kroz bazalnu membranu te postojanje metastaza u limfnim čvorovima. Ovaj parametar ima posebnu važnost za prognozu zloćudne bolesti, ali i za opseg kirurškog zahvata te planiranje dodatne terapije prije ili poslije operacije. Patohistološki nalaz zloćudnog tumora mora se nadopuniti kliničkim parametrima i tek tada možemo uistinu



Slika 8. Sluznica grla maternice - gradus III, HE, x120

govoriti o *kliničkom stadiju* zloćudne bolesti. Iako za neke tumore postoje odstupanja, najčešće upotrebljavani sustav određivanja zloćudnih bolesti je TNM sustav: T - tumor (veličina, lokalizacija, lokalna invazija), N - nodus (pozitivni regionalni ili udaljeni limfni čvorovi), M - metastaze (nalaz zloćudnih stanica u udaljenim organima) (22, 23). U nekih vrsta zloćudnih tumora klinički je stadij mnogo važniji od histološkog stadija (npr. morbus Hodgkin). Ipak, prognoza i ponašanje tumora danas se temelji na kombinaciji histološkog izgleda tumorskih stanica i rasprostranjenosti zloćudne bolesti u organizmu.

Literatura

- LIOTTA LA, KOHEN EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001;411:375-9.
- KIRCHNER T, BRABLETZ T. Tumor patterning: analogies of neoplastic morphogenesis with embryogenesis. *Verhand Deutsch Ges Pathol* 2000;84:22-7.
- ISRAELES ED, ISRAELES LG. The cell cycle. *Stem Cell* 2001;19:88-91.
- EVAN GI, VOUSDEN KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001;411:342-8.
- CLASSON M, SETTLEMAN J. Emerging concept in tumor progression and therapy. *Sem Cancer Biol* 2000; 10: 393-7.
- KASSIS J, LAUFFENBURGER DA, TURNER T, WELLS A. Tumor invasion as dysregulated cell motility. *Sem Cancer Biol* 2001;11:105-17.
- RYU B, JONES J, HOLLINGSWORTH MA, HRUBAN RH, KER SE. Invasion-specific genes in malignancy: serial analysis of gene expression comparison of primary and passaged cancer. *Cancer Res* 2001;61:1833-8.
- OKADA Y. Tumor cell-matrix interaction: pericellular matrix degradation and metastasis. *Verhand Deutsch Ges Pathol* 2000;84:33-42.
- TLSTY TD. Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Sem Cancer Biol* 2001;11:97-104.
- POGANY G, TIMAR F, OLAH J, HARISI R, et al. Role of basement membrane in tumor cell dormancy and cytotoxic resistance. *Oncology* 2001;60:274-281.
- McCRAWLEY LJ, MATRISON LM. Tumor progression: defining the soil round tumor seed. *Curr Biol* 2001; 11: R25-7.
- GHO YS, KIM PN, LI HC, ELKIN M, KLEINMANN HK. Stimulation of tumor growth by human soluble intercellular adhesion molecule -1. *Cancer Res* 2001; 61: 4253-7.
- HIROHASHI S. Molecular aspects of adhesion-epigenetic mechanisms for inactivation of the E-Cadherin-mediated cell adhesion system in cancer. *Verhand Deutsch Ges Pathol* 2000;84:28-32.
- ROESSNER A, KRUGER S, KIDO A. Zellulare Proteasen und Invasion. *Verhand Deutsch Ges Pathol* 2000; 84:69-76.
- SEZER O, JAKOB C, NIEMOLLER K. Angiogenesis in cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:3299-301.
- Von BULOW C, HAYEN W, HARTMANN A, MUELLER-KLIESER W, et al. Endothelial capillaries chemotactically attract tumour cells. *J Pathol* 2001;193:367-376.
- HAUPTMANN S. Die Rolle der Entzündung bei Tumoringression. *Verhand Deutsch Ges Pathol* 2000;84:77-86.
- MATRISIAN LM, CUNHA GR, MOHLA S. Epithelial-stromal interactions and tumor progression: meeting summary and future direction. *Cancer Res* 2001;61:3844-6.
- ARIAS AM. Epithelial mesenchymal interaction in cancer and development. *Cell* 2001;105:425-31.
- EICHER D. Slow proliferation as a survival advantage: an attempt to resolve a paradox. *J Theoret Biol* 2001; 210:319-25.
- DAMJANOV I, CONRAN PB, GLODBLATT PJ. *Pathology*. Lippincott - Raven, 1968; 43-52.
- McKENNA RJ. Cancer staging. *Sem Surg Oncol* 1992; 8: 55-6.
- HENSON DE, RIES L, SHAMBAUGH EM. Survival results depend on staging system. *Sem Surg Oncol* 1992;8:57-61.