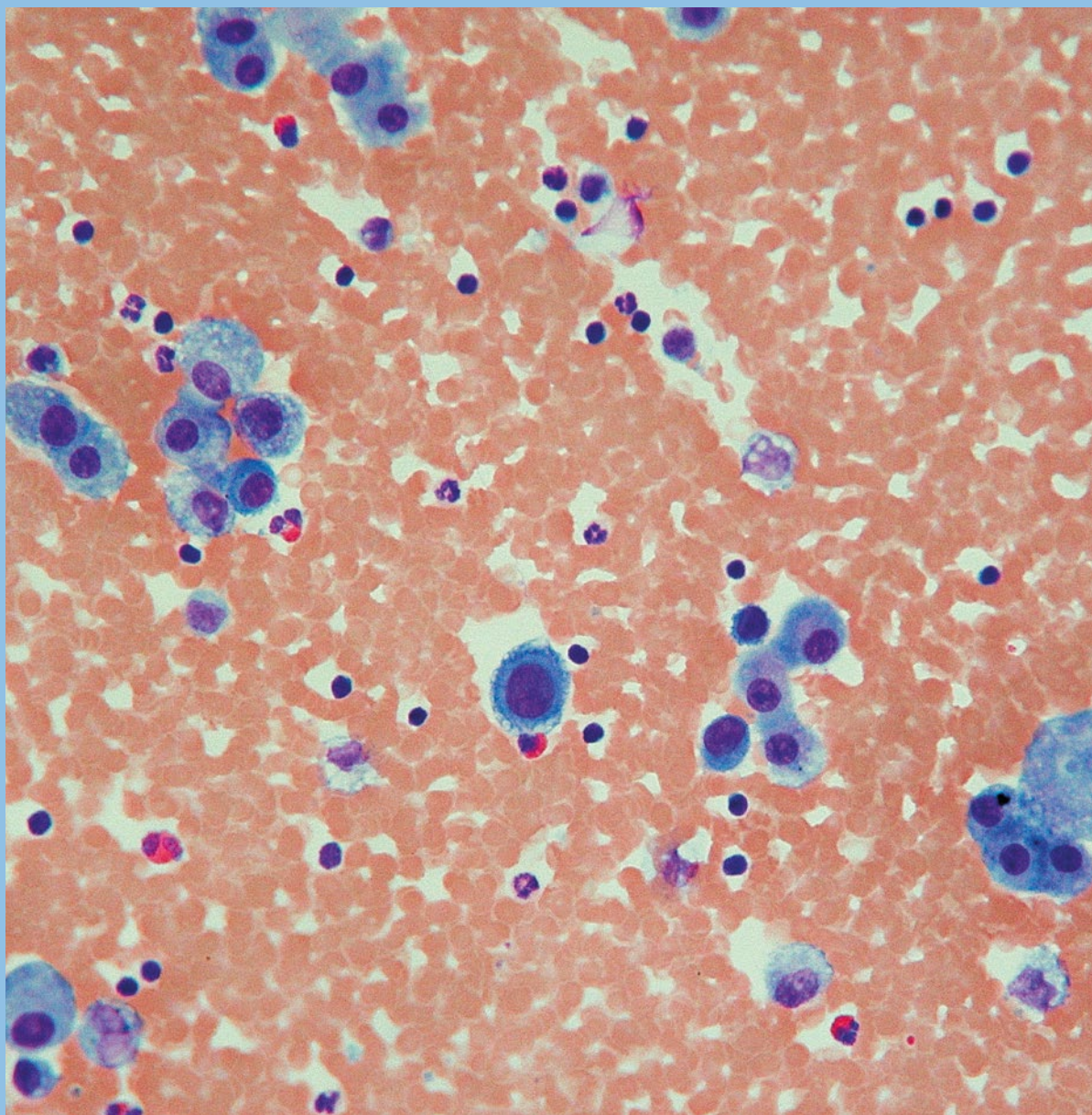




Citopatologija plevralnega izliva

Katja Adamič / Simona Gabrič / Izidor Kern
/ Mile Kovačević / Mitja Rot / Gregor Vlačić



Univerzitetna klinika za pljučne bolezni
in alergijo Golnik
Golnik 36, 4204 Golnik, Slovenija

T: 04/256 91 00 **F:** 04/256 91 17

E: tajnistvo@klinika-golnik.si

www.klinika-golnik.si

Citopatologija plevralnega izliva

Uredil Izidor Kern

Golnik, 2026

CIP - Kataložni zapis o publikaciji

Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

COBISS.SI-ID 230510851

ISBN 978-961-6633-66-6 (PDF)

Vsebina

	Izidor Kern
5	Uvod
	Margareta Strojan Fležar
6	Recenzija
	Izidor Kern
7	Plevralna votlina in mezotelna celica
	Katja Adamič
11	Klinična obravnava pacienta s plevralnim izlivom
	Izidor Kern, Mile Kovačević
17	Diagnostične kategorije
	Simona Gabrič
23	Laboratorijska obdelava vzorca plevralnega izliva
	Mitja Rot
29	Molekularna analiza vzorca plevralnega izliva
	Izidor Kern
33	Netumorska citopatologija plevralnega izliva
	Mile Kovačević
47	Maligni plevralni izliv – sekundarne neoplazme
	Gregor Vlačić
61	Mezotelna proliferacija in mezoteliom
69	Priporočena literatura

Uvod

Bolezni plevre so manj pogosta obolenja prsnega koša. Prizadetost plevre opazujemo velikokrat pri različnih sistemskih in pljučnih boleznih, neoplastičnih in neneoplastičnih, ki se lahko izraža s plevralnim izlivom, bolezenskim nabiranjem tekočine v plevralni votlini. V diagnostični obravnavi pacienta s plevralnim izlivom je citološki pregled vzorca ena od ključnih preiskav z visoko diagnostično občutljivostjo za ugotavljanje vzroka nastanka izliva. Plevralna punkcija ali torakocenteza je poseg, s katerim pridobimo vzorec plevralnega izliva. Gre za relativno preprost, minimalno invaziven, dostopen in ne drag poseg.

Citološko pregledovanje plevralnega izliva sega v 19. stoletje. Leta 1847 je Reinhardt opisal morfološke spremembe celic, ki jih je opazoval z mikroskopom v vzorcih plevralnih izlivov. Leta 1882 je Paul Ehrlich prvi opisal maligne celice v vzorcu plevralnega izliva. Do danes je strokovna literatura, ki obravnava citološko pregledovanje plevralnega izliva, zelo obsežna. Iskanje malignih celic v vzorcu plevralnega izliva, dokazovanje njihovega porekla in razlikovanje od netumorskih celic je z novejšimi pomožnimi metodami v citopatologiji postalo bolj zanesljivo ter prispeva k izboljšanju diagnostične občutljivosti in specifičnosti citološke preiskave. Mezotelna celica, ki leži na površini poprsnice (plevre) podobno kot v vseh drugih seroznih votlinah, se z razvojem plevralnega izliva lušči in pridobi širok spekter morfoloških sprememb, ki posnemajo različne maligne celice, zato predstavlja diagnostični izziv pri vsakodnevnem citološkem delu.

Diagnosticiranje plevralnega izliva je stopenjsko. Anamnezi in kliničnemu pregledu sledi slikovna diagnostika (ultrazvočni pregled, rentgensko slikanje in računalniška tomografija prsnega koša). S plevralno punkcijo dobimo vzorec plevralnega izliva za biokemične analize, mikrobiološke preiskave in citološki

pregled. Primarni namen citološkega pregleda je izključevanje oziroma potrjevanje neoplastične etiologije.

Pred dvajsetimi leti smo izdali prvo skripto o citologiji plevralnega izliva v slovenskem jeziku. Nova spoznanja in metode molekularne patologije, razvoj imunocitokemije, standardizacija postopkov, nedavno sprejeta mednarodna priporočila in razširitev uporabe celičnega bloka so nas spodbudili, da pripravimo novo izdajo skripte. Želimo si, da bi koristila vsem sodelavcem, ki pregledujejo vzorce plevralnega izliva.

Recenzija

Zbornik, ki so ga pripravili golniški patologi skupaj s kliniki in sodelavci iz njihovega laboratorija, je sistematičen pregled citopatologije plevralnega izliva, ki je dokaj pogost vzorec v citopatološkem laboratoriju, z vprašanjem na napotnici, ali so v vzorcu maligne celice. Po uvodnem delu je v zborniku nazorno prikazana mezotelna celica z različnih morfoloških vidikov. Sledi poglavje o klinični obravnavi bolnikov s plevralnim izlivom, ki podpre razumevanje nadaljnje diagnostične obravnave, vključno s citopatološko preiskavo. V diagnostičnih kategorijah je predstavljena golniška klasifikacija in primerjava z uveljavljenimi mednarodnimi klasifikacijami. Laboratorijska obdelava plevralnega izliva popelje bralca skozi vse faze od sprejema vzorca do oddaje preparatov patologu. Predstavi tudi dodatne metode, predvsem imunocitokemične, medtem ko so molekularne preiskave opisane v posebnem poglavju. Posebej je predstavljena netumorska citopatologija plevralnega izliva, ki ji sledi citopatologija malignih izlivov, tako sekundarnih, katerih razlog nastanka največkrat tiči v pljučih, sledijo zasevki karcinomov in drugih – neepitelijskih – malignomov iz različnih organov. Na koncu je predstavljen še mezoteliom kot najpogostejši primarni maligni tumor plevre.

Zbornik Citopatologija plevralnega izliva je bogato opremljen s slikovnim gradivom, ki je ključnega pomena za razumevanje citomorfoloških značilnosti normalnih in bolezensko spremenjenih celic.

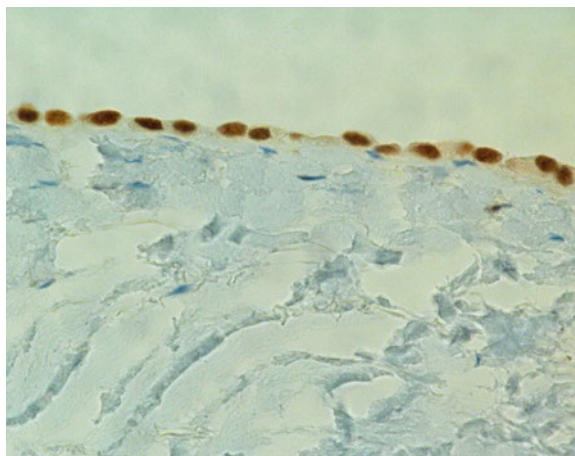
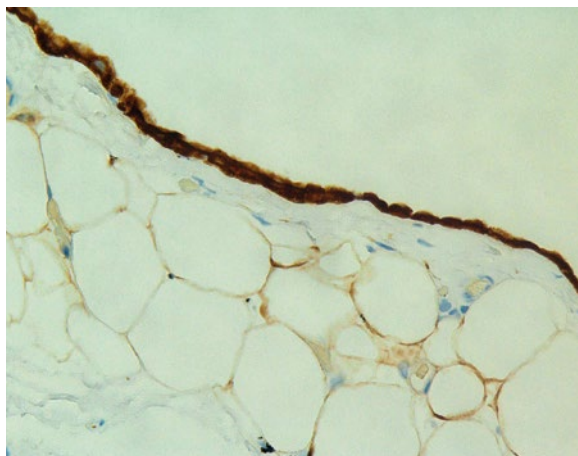
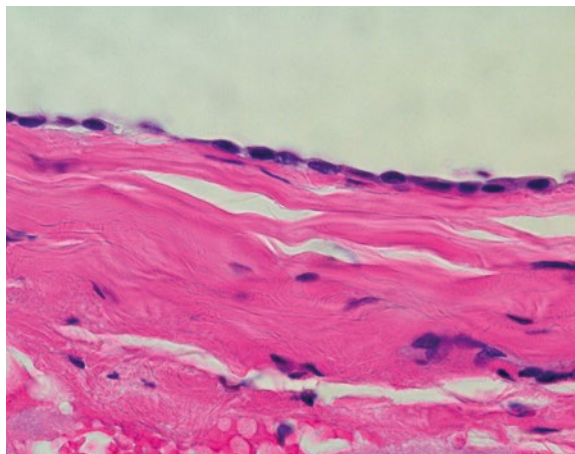
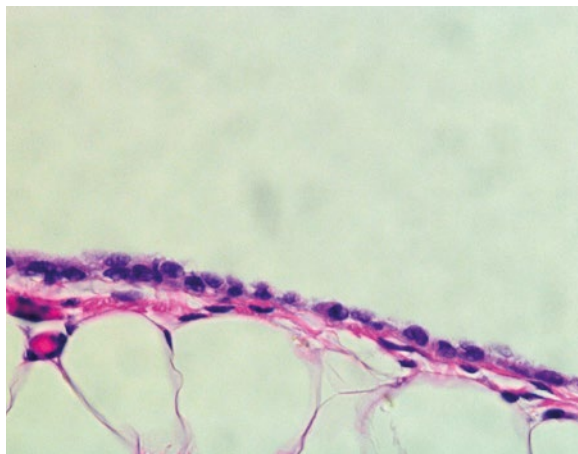
Avtorjem gre vsa pohvala za sodoben pregled in sistematično predstavitev citopatološke problematike plevralnih izlivov. Brez dvoma bo zbornik služil kot dragoceno učno gradivo ali pa najmanj kot prva informacija o področju citopatologije za vse zdravstvene delavce, ki prihajajo v stik z bolniki s plevralnim izlivom, bodisi v kliniki, ali pa v citopatološki diagnostiki, pa tudi za študente medicine na do- in podiplomskem študiju ter presejalcem in specializantom patologije, ki jih zanima področje citopatologije plevralnega izliva.

Plevralna votlina in mezotelna celica

Plevra (poprsnica) je tanka svetleča sklenjena serozna opna, ki ločeno pokriva pljučni krili (visceralni list, popljučnica) in notranjo steno prsne votline (parietalni list, porebrnica). Lista se stikata v predelu pljučnega hilusa. Plevra omejuje plevralni prostor, votlino, ki je široka 10 do 20 μm . Visceralna plevra je tanjša od parietalne, slednja je bolj vaskularizirana in ima bolečinsko nitje. Plevra je sestavljena iz površinskega sloja sploščenih ali kubičnih mezotelnih celic, ki ležijo na neprekinjeni bazalni membrani. Pod njo je sloj submezotelnega veziva (fibroblasti, kolagenska in elastična vlakna), v katerem so žile (krvne in limfne) in živci.

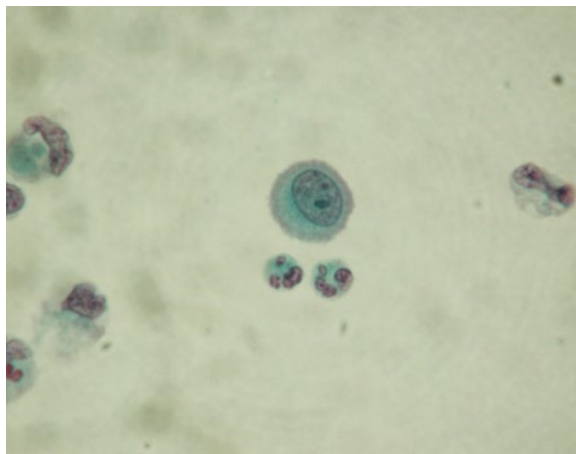
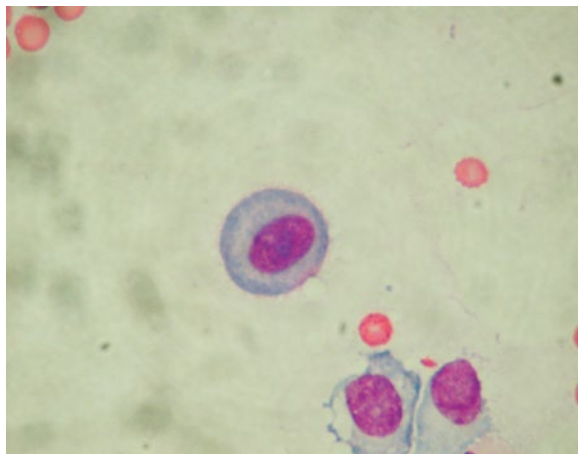
V plevralnem prostoru je majhna količina bistre brezbarvne tekočine, ki deluje kot lubrikant in omogoča drsenje pljuč med dihanjem s čim manjšim trenjem ob prsni steni. Volumen tekočine v plevralni votlini je 0,26 ml / kg telesne teže. Plevralna tekočina je filtrat predvsem parietalne plevre. Dnevno nastaja 700 ml tekočine. Plevralna tekočina se drenira večinoma skozi stomata, odprtine premera 2 do 12 μm v parietalni plevri, ki so neposredno povezana z limfnimi žilami. Plevralna tekočina je bogata s hialuronsko kislino in ima nizko koncentracijo proteinov (10–15 g / l). V plevralni tekočini so prisotne celice (91×10^3 celic / ml): makrofagi (75 %), posamične odluščene mezotelne celice in redkejši levkociti (25 %).

Plevra se razvije tekom embrionalnega razvoja iz celomske votline. Mezotelna celica je mezodermalnega porekla. Običajno ima epitelijsko morfologijo. Značilna je ekspresija dveh tipov intermediarnih filamentov: vimentina in keratina. Ultrastrukturno ima mezotelna celica na prosti površini dolge tanke mikrovile (3 μm) in debel sloj glikokaliksa (slika 6). Zanja je značilna fagocitna sposobnost. V tkivnih vzorcih so mezotelne celice sploščene in ležijo v enem sloju na bazalni membrani (slika 1). V citoloških vzorcih najdemo mezotelne celice posamične ali v manjših enoslojnih plakih, v katerih so dobro vidni medcelični prostori, imenovani »okenca« (slika 2 in 3). Mezotelna celica je srednje velikosti s premerom 15–30

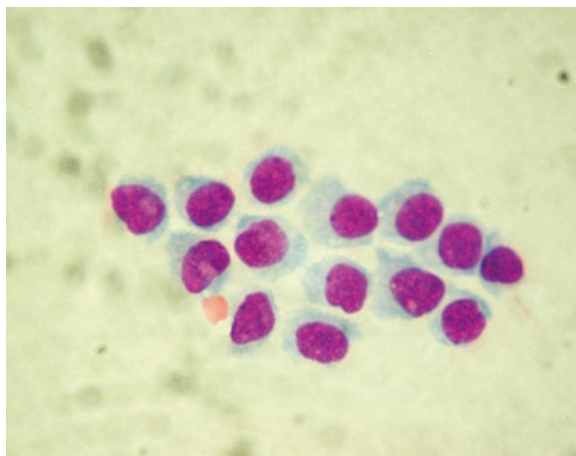
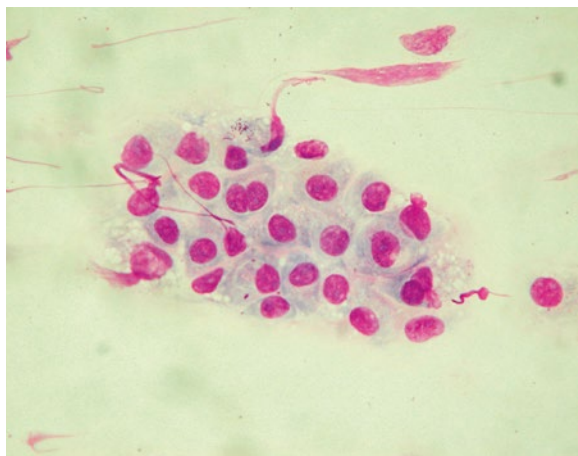


Slika 1a, b, c in d. Plevra s slojem mezotelnih celic (HE, kalretinin in WT1)

µm. Normalno je morfolologija unimorfna. So okrogle s centralno ali paracentralno ležečim jedrom. Na površini celice so mikrovili, ki zabrišejo celično mejo in celica spominja na kostanjevo ježico. Jedro je praviloma okroglo s premerom $\frac{1}{3}$ do $\frac{1}{2}$ velikosti celice. Jedrna membrana je tanka in enakomerna. Kromatinska struktura jedra je enakomerna, drobno zrničasta z manjšim, neizrazitim nukleolom. Posamične mitoze v mezotelnih celicah niso redkost (slika 5). Citoplazma je obilnejša, dobro omejena, nežna, bazofilna s perinuklearnim svetlejšim halojem v Giemsa



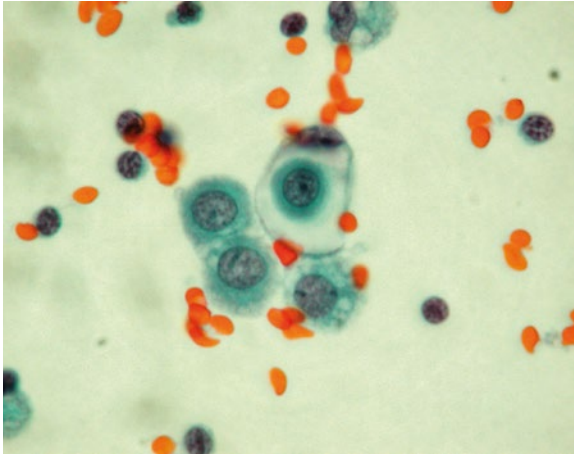
Slika 2a in b. Mezotelna celica v plevralnem izlivu (MGG, PAP)



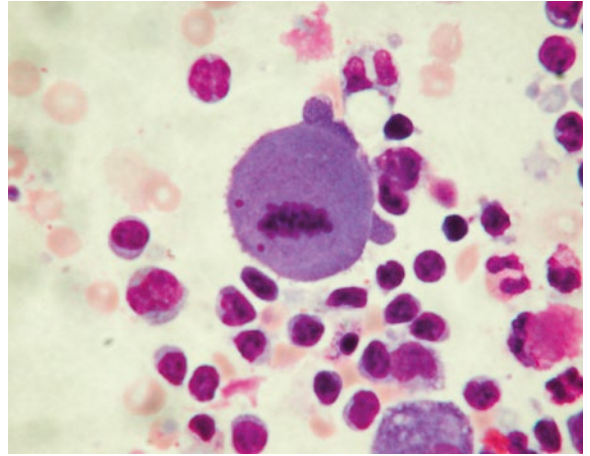
Slika 3a in b. Mezotelna celica v brisu biopsije plevre (MGG)

obarvanih preparatih. V Papanicolaou obarvanih preparatih je citoplazma zelena in gostejša ob jedru. Možen je celični kanibalizem (eritrociti, levkociti) (slika 4).

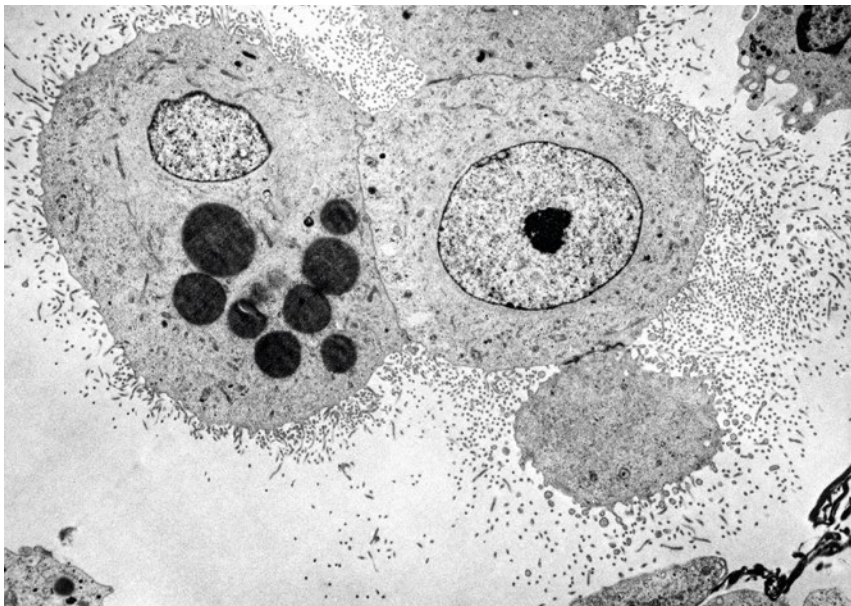
Imunofenotip mezotelne celice je vimentin pozitivno, keratin (npr. CK5/6) pozitivno, kalretinin pozitivno, HBME-1 pozitivno, mezotelin pozitivno, D2-40 pozitivno, HEG1 pozitivno, WT1 pozitivno.



Slika 4. Kanibalizem mezotelnih celic (PAP)



Slika 5. Mitoza v mezotelni celici (MGG)



Slika 6. Ultrastrukturna podoba mezotelne celice

Katja Adamič

Klinična obravnava bolnika s plevralnim izlivom

Uvod

V plevralnem prostoru je na vsaki strani hemitoraksa 15 ml tekočine, ki stalno kroži; dnevno se resorbira 300–350 ml tekočine. Plevralni izliv nastane kot posledica povečanega nastanka in/ali zmanjšane resorbcije plevralne tekočine. Plevralni izliv lahko nastane tudi zaradi premika proste tekočine iz zunajplevralnih struktur preko patoloških povezav.

Vzrokov plevralnega izliva je več kot 60, v 75% pa izliv nastane zaradi štirih vzrokov: karcinom (27%), srčno popuščanje (21%), okužba – parapnevmonični izliv (19%) in tuberkuloza (9%). Rezultati Klinike Golnik iz l. 2011 so pri 433 bolnikih odkrili kot najpogostejše vzroke za plevralni izliv maligno bolezen pri 35.5% (karcinoza pri 19.4%), srčno popuščanje 21.7%, parapnevmonični 21.2%, tuberkulozni plevritis pri 3.7%.

Klinični simptomi

Najpogostejši simptomi bolnikov s plevralnim izlivom so dispneja, kašelj in plevritična prsna bolečina. Bolečina je pogosto navzoča le na začetku bolezni, ko je prisoten manjši izliv, kasneje tekočina loči lista plevre in bolečine izzvenijo.

Diagnostični postopki

Prva diagnostična preiskava je običajno rentgenska slika prsnega koša. Na posterioanteriornem posnetku je zaznati plevralni izliv, ko ga je okoli 200 ml, na stranskem posnetku pa okoli 50 ml. Najboljša preiskava za detekcijo, oceno in označitev

mesta plevralne punkcije plevralnega izliva je ultrazvok, ki zazna tudi plevralne izlive manjše od 50 ml.

Večini pacientov z novonastalim plevralnim izlivom je potrebno izvesti torakocentezo, ki je lahko diagnostična ali ob večjih plevralnih izlivih sočasno tudi terapevtska. Izjema so obojestranski plevralni izlivi, ki bi bili klinično lahko transudati v sklopu znane kronične bolezni. Tu najprej zdravimo osnovno bolezen in v primeru, ko ni značilnega poteka oziroma odgovora na zdravljenje, opravimo torakocentezo.

Priporočeno je odstraniti največjo možno varno količino izliva, saj s tem zagotovimo maksimalno olajšanje dispneje, pridobimo podatke o zmožnosti razpenjanja pljuč in čimbolj podaljšamo čas do ponovne razbremenilne punkcije. Večina priporočil priporoča odstranjevanje do 1500 ml tekom ene torakocenteze, pomembna je prekinitev razbremenjevanja v primeru pojava bolečine in/ali tiščanja v prsnem košu. Ob sočasnem merjenju plevralnih tlakov, s katerim tekom plevralne punkcije merimo plevralne tlake in njihovo dinamiko upada, lahko varno odstranimo tudi do 5000 ml, poleg tega pa nam krivulje upada tlakov z odstranjenim volumnom razkrijejo ujeta pljuča. Ta postopek imenujemo plevralna manometrija.

Osnovne preiskave plevralnega izliva so določanje pH, biokemične preiskave (LDH, proteini, glukoza), mikrobiološke in mikobakteriološke preiskave ter citološka preiskava. Ostale preiskave, na katere lahko pošljemo plevralni izliv so določanje trigliceridov, holesterola, hilomikronov, amilaze, hemoglobina, hematokrita, kreatinina.

Izgled plevralnega izliva nam namiguje diagnozo: krvav – malignom ali hematoraks; gnoj in neprijeten vonj – empiem; moten – parapnevmonični; zelenkasto obarvan – revmatoidni artritis; delčki hrane – ruptura požiralnika; z žolčem obarvan – biliarna fistula; mlečni – hilotoraks ali pseudohilotoraks; izgled ribje omake – ruptura amebnega abscesa.

Z Lightovimi kriteriji ločimo transudat in eksudat. V eksudatu je razmerje med proteini v plevralnem izlivu in proteini v serumu več kot 0,5, ali razmerje med LDH v plevralnem izlivu in LDH v serumu več kot 0,6, ali pa LDH v plevralnem izlivu nad $\frac{2}{3}$ zgornje normalne vrednosti serumskega LDH.

Transudati	Eksudati
Srčno popuščanje	Maligne bolezni
Jetrna ciroza	Parapnevmonični izliv
Hipoalbuminemija	Tuberkuloza
Peritonealna dializa	Pljučna embolija
Hipotiroidizem	Revmatoidni artritis in druge avtoimune bolezni
Nefrotski sindrom	Azbestna prizadetost plevre
Konstriktivni perikarditis	Pankreatitis
Urinotoraks	Dresslerjev sindrom po srčnem infarktu, po premostitveni operaciji koronarnih arterij
Meigsov sindrom	Sindrom rumenih nohtov
	Limfatične nepravilnosti (npr. Limfangioleiomiomatoza)
	Zdravila (metotreksat, amiodaron, fenitoin, nitrofurantoin, β -blokatorji)
	Glivične okužbe
	Paragonimiasa
	Sindrom ovarijske hiperstimulacije
	Stanje po zdravljenju z radioterapijo
	Družinska mediteranska vročica

Tabela 1. Vzroki nastanka plevralnega izliva

Limfocitni plevralni izlivi	Nevtrofilni plevralni izlivi	Eozinofilni plevralni izlivi
Tuberkuloza (> 80 %)	Parapnevmonični izliv	Parapnevmonični izliv
Limfom	Pljučna embolija	Z zdravili povzročen plevritis
Kronični revmatski plevritis	Akutna tuberkuloza	Eozinofilna granulomatoza s poliangiitisom
Sarkoidoza	Benigna azbestna bolezen plevre	Limfom
Pozni izliv po CABG		Pljučni infarkt
		Parazitarne okužbe
		Maligna obolenja

Tabela 2. Najpogostejši vzroki plevralnega izliva glede na citološko opredelitev

Diuretična terapija pri srčnem popuščanju in cirozi jeter lahko poviša vrednost proteinov in LDH v plevralnem izlivu, zato je plevralni izliv lahko lažni eksudat. V tem primeru nam je v pomoč povišana vrednost NT-proBNP – povišana vrednost nad 1500 pg / ml poveča verjetnost, da gre za plevralni izliv v sklopu srčnega popuščanja. Pomagamo si lahko tudi z gradientom proteinov in albuminov v serumu in plevralnem izlivu, pri vrednostih nad 2,5 g / dl za proteine in nad 1,2 g / dl za albumine gre za eksudat.

S citološkim pregledom potrdimo eventuelno maligno bolezen. Za citološko preiskavo svetujejo čimvečjo količino plevralnega izliva. Pri določenih malignomih se lahko iz plevralnega izliva opravijo tudi dodatne preiskave prediktivnih markerjev. Senzitivnost citološkega pregleda pri različnih malignih boleznih variira od manj kot 10 do več kot 90 %. Pri karcinozi zaradi raka pljuč je skupna poročana senzitivnost torakocenteze 63 %, druga torakocenteza dvigne senzitivnost še za 22 %, dodatne torakocenteze ne izboljšajo senzitivnosti. Senzitivnost pri raku ovarijskega je > 90 %, pri mezoteliomu pa < 10 %. Senzitivnost je pri vzorcih manjših od 75 ml pomembno odvisna od volumna.

Diferencialna citološka slika nam malo pripomore v diagnostiki.

Nižji pH je posledica večje metabolne aktivnosti v plevri. V klinični praksi je najpomembnejša meritev pH pri parapnevmoničnem izlivu, vrednost pod 7,2 kaže na zapleten potek, ki zahteva čimprejšnjo izpraznitev plevralnega izliva ali vstavitve torakalnega drena.

Zelo nizko vrednost glukoze pod 1,6 mmol / l najpogosteje vidimo pri revmatoidnem artritisu in empiemu.

Povišana vrednost amilaze v plevralnem izlivu nad normo v serumu ali razmerje med vrednostjo v plevralnem izlivu in v serumu nad 1,0 postavi sum na akutni pankreatitis, pankreatično psevdocisto, rupturo požiralnika, ektopično nosečnost ali maligno bolezen plevre.

Hematotoraks potrdimo, če je v plevralnem izlivu vrednost hemoglobina ali hematokrita nad 50 % serumske vrednosti. Hematotorakse, ki jih ocenimo do 300 ml in se ne večajo, bolnik je stabilen, lahko spremljamo. Pri ostalih je potrebna vstavitve torakalnega drena. Hemodinamsko stabilnega bolnika, pri katerem je količina izliva po drenu pod 1500 ml v 24 urah ali pod 200 ml v 3 urah, spremljamo. Pri hemodinamsko nestabilnem bolniku, kjer po drenu v 24 urah priteče več kot 1500 ml izliva oziroma več kot 200 ml / h v 3 urah potrebujejo kirurško oskrbo. Hematotorakse, ki bi bili lahko posledica rupture anevrizme aorte ne dreniramo.

Mikrobiološke preiskave vključujejo preiskave na bakterije, glive in mikobakterije. Pri infektivnih plevralnih izlivih identificiramo patogen v dobrih 50%, možnosti se povečajo, če vzorce shranjujemo v stekleničkah za hemokulture, sočasno odvzamemo tudi hemokulture in uporabimo amplifikacijske teste nukleinskih kislin. Za ugotavljanje tuberkuloznega plevritisa so v nekaj urah dostopni rezultati direktnih razmazov barvanih po Ziehl-Neelsenu, na rezultate izolacije mikobakterij pa je potrebno počakati še 6 tednov. Senzitivnost se pomembno poveča, če v laboratorij dostavimo vsaj 30 ml izliva. Glive in viruse določamo le v izbranih primerih, saj so redki povzročitelji infektivnega plevralnega izliva pri imunokompetentnem pacientu.

Pri eksudativnih plevralnih izlivih opravimo CT prsnega koša s kontrastnim sredstvom, pred tem izpraznimo plevralni izliv, da se prikažejo strukture v pljučih in so hkrati bolj vidne plevralne nepravilnosti.

Torakoskopija je osnovna diagnostična metoda pri nepojasnjenih plevralnih eksudatih, terapevtska pa pri plevrodezi malignih plevralnih izlivov in razrešitvi kompliciranih parapnevmoničnih izlivov.

CT ali UZ vodena punkcija suspektnih sprememb na plevri je indicirana takrat, ko torakoskopija ni možna ali je kontraindicirana zaradi slabega kliničnega stanja bolnika.

Slepa igelna biopsija parietalne plevre ima diagnostično vrednost pri bolnikih, ki zaradi slabega kliničnega stanja niso kandidati za torakoskopijo in z njo želimo izključiti predvsem okužbo z mikobakterijami.

PET CT loči med benigno in maligno boleznijo plevre. Lažno pozitiven je lahko pri vnetju ali stanju po plevrodezi.

Video asistirana kirurgija ima mesto pri nepojasnjenih eksudatih, kjer je visok sum na maligno bolezen plevre.

Zaključek

Kljub vsem zgoraj naštetim diagnostičnim postopkom okoli 30 % eksudativnih plevralnih izlivov po torakoskopiji ostane etiološko nepojasnjenih z diagnozo nespecifični plevritis. Večina ima v sledenju benignen potek, plevralni izliv se resorbira in se ne nabira več. Pri okoli 10-20 % pa kasneje potrdimo maligno bolezen, še posebno pri bolnikih z azbestno boleznijo plevre. V spremljanju smo posebno pozorni na vztrajajočo plevralno bolečino, ponavljanje plevralnega izliva in radiološke spremembe na plevri, ki so suspektne za maligno obolenje. V teh primerih ponavljamo plevralno biopsijo.

Diagnostične kategorije

Ustreznost vzorca plevralnega izliva

Citološki pregled vzorca plevralnega izliva ima pomembno mesto v diagnostični obravnavi pacienta s plevralnim izlivom.

Za vzorce plevralnega izliva ni možno zanesljivo opredeliti kriterijev ustreznosti. Ustrezen vzorec pomeni, da so celice ohranjene in da je dobro laboratorijsko obdelan (centrifugiranje, priprava preparatov, fiksacija, barvanje). Citološki preparat mora imeti enakomerno razporejene celice v enem sloju brez medsebojnega prekrivanja, kar omogoča enostavno pregledovanje. K ustreznosti pomembno prispeva standardizirana laboratorijska obdelava vzorca.

Kakšen je optimalni volumen vzorca plevralnega izliva za citološki pregled, s katerim zagotavljamo ustrezno občutljivost metode? Preprost odgovor je, čim večji volumen vzorca, tem boljši je izplen preiskave. Na splošno velja, da večji kot je volumen vzorca, večja je verjetnost potrditve malignosti. Glede volumna vzorca je priporočeno odvzeti 50–75 ml. V primeru terapevtske, razbremenilne plevralne punkcije ali drenaže plevralnega prostora za citološke preiskave pošljemo celotni dobljeni volumen tekočine. Vzorci plevralnega izliva, ki so manjši od 50 ml, so ravno tako primerni za citološko preiskavo. Ni določenega najmanjšega volumna, ki bi bil še ustrezen. Tudi v vzorcih z 1 ml lahko potrdimo maligno etiologijo plevralnega izliva.

Klinika Golnik	IAC in ASC
Mnenje o malignosti	The International System
Nereprezentativno	Nediagnostično
Negativno	Negativno za malignost
Sumljivo	Sumljivo
Pozitivno	Maligno
Nejasno	Atipija nedoločenega pomena

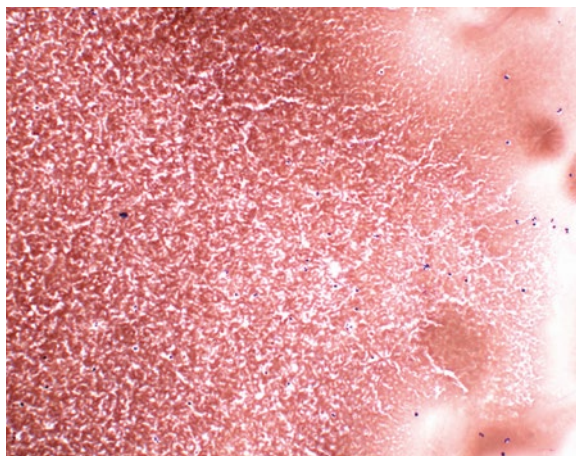
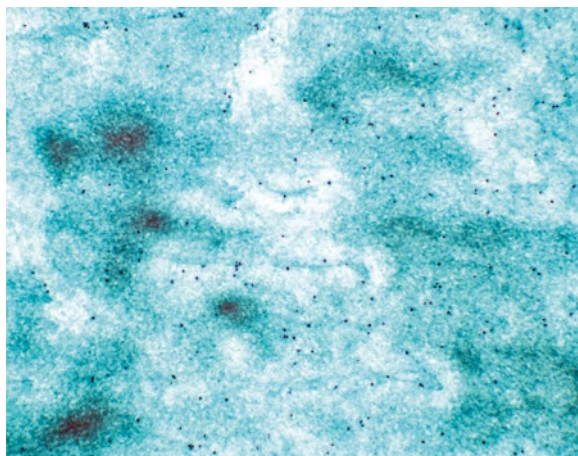
Tabela 3: Diagnostične kategorije plevralnega izliva

Diagnostične kategorije

Mednarodno uveljavljene diagnostične kategorije (International Academy of Cytology, American Society for Cytopathology) pri plevralnem izlivu so:

- 1 – nediagnostično,
- 2 – negativno za malignost,
- 3 – atipija nedoločenega pomena,
- 4 – sumljivo,
- 5 – maligno.

V Laboratoriju za citologijo Klinike Golnik je že desetletja uveljavljen sistem diagnostičnih kategorij, imenovan »mnenje o malignosti«, ki se uporablja za vse vrste citoloških vzorcev. Sistem »mnenje o malignosti« ima pet kategorij: nereprezentativno, negativno, sumljivo, maligno in nejasno (tabela 3).



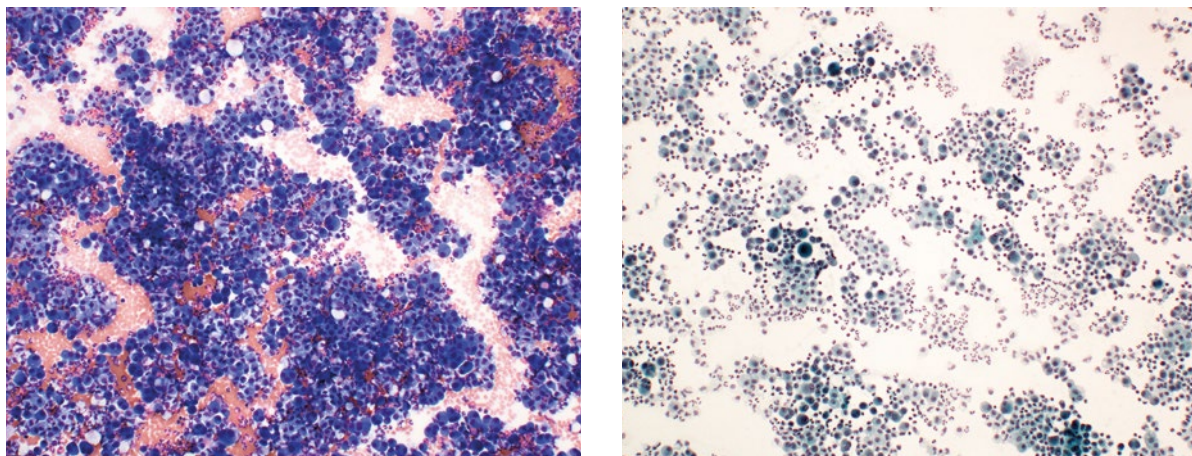
Slika 7a in b. V vzorcu je prisotna le periferna kri – nerepresentativno (PAP, MGG)

Diagnostična kategorija nerepresentativno (nediagnostično)

Tako opredelimo tiste vzorce plevralnega izliva, pri katerih ni možno z minimalno gotovostjo oceniti morfoloških sprememb. Interpretacija citološke slike ni zanesljiva. Največkrat gre za vzorce, ki so zelo krvavi, acelularni ali so celice razpadle.

Včasih je lahko sama narava patološkega procesa vzrok za nediagnostičen vzorec, ker celice niso ohranjene. Vzroki za nerepresentativne vzorce plevralnega izliva so lahko posledica odvzema, pri katerem pride do kontaminacije s krvjo, če preiskovalec nabode interkostalno žilo (slika 7). Tudi kontaminacija s površine kože med punkcijo je vzrok nerepresentativnosti (ultrazvočni gel, ploščate epitelne celice, smukec). Na nediagnostičnost vplivata predolg čas transporta in neustrezna temperatura med transportom.

V primeru nerepresentativnega vzorca plevralnega izliva je potrebna klinično patološka korelacija in odločitev o morebitni ponovitvi punkcije.

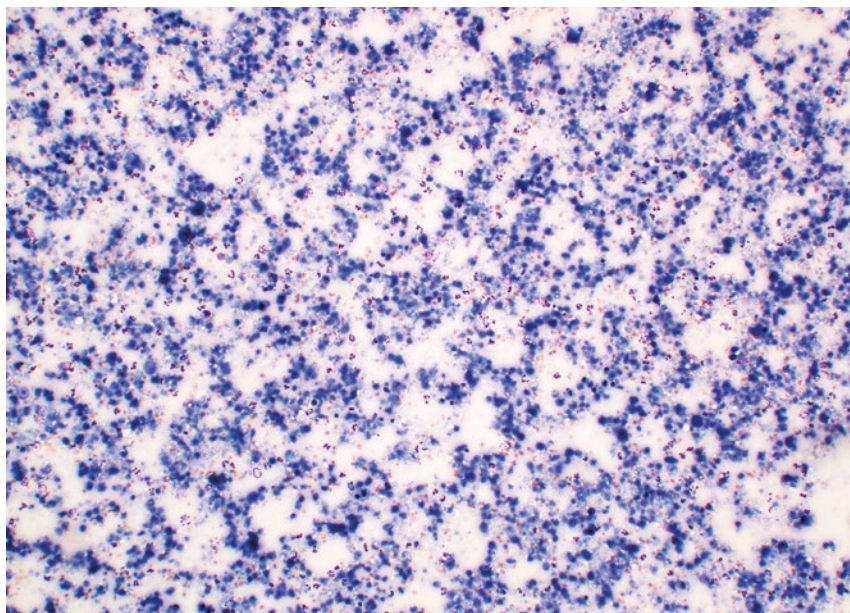


Slika 8a in b. V vzorcu vidimo mezotelne celice, histiocite in vnetnice – negativno (MGG, PAP)

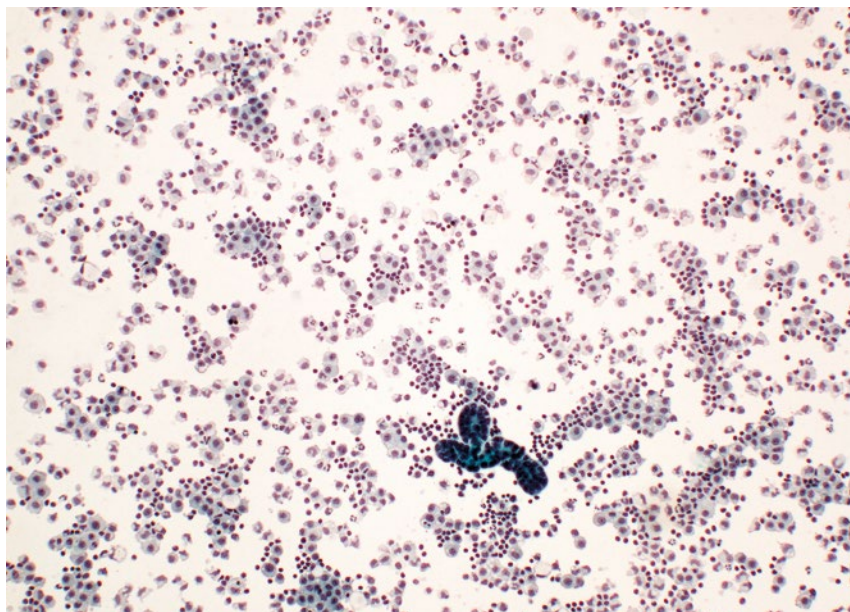
Diagnostična kategorija negativno

Gre za vzorce, ki jih glede malignosti opredelimo kot negativne in so najpogostejši med vsemi vzorci plevralnih izlivov. V vzorcu ne identificiramo malignih ali atipičnih celic. V teh primerih je potrebno iskati vzrok nastanka plevralnega izliva v neneoplastičnih bolezenskih procesih. Glede na biokemično določene Lightove kriterije tovrstne plevralne izlive delimo na transudate in eksudate. Z omenjenimi kriteriji zelo dobro korelira koncentracija celic. Meja med transudatom in eksudatom je postavljena pri koncentraciji 1000 celic / μl . Pri pregledovanju negativnih vzorcev najdemo mezotelne celice z ohranjeno normalno morfologijo, lahko reaktivno spremenjene ali degenerirane, kar lahko predstavlja težavo pri interpretaciji. Poleg mezotelnih celic in histiocitov so prisotne različne vnetnice v različnih deležih (slika 8). Delež posamičnih vnetnic lahko prevladuje in govorimo o nevtrofilnih (> 50 % nevtrofilcev), eozinofilnih (> 10-20 % eozinofilcev) ali limfocitnih (> 70 % limfocitov) eksudatih. Večina eksudatov je sicer mešanoceličnih. Pri citološko za malignost negativno opredeljenih vzorcih plevralnega izliva je tveganje za maligno etiologijo približno 20 %.

Negativni vzorci plevralnih izlivov so predstavljeni v poglavju Netumorska citopatologija plevralnega izliva.



Slika 9. Celice kažejo nakazane znake malignosti, vendar so degenerirane – sumljivo (MGG)



Slika 10. V vzorcu so zelo redki skupki atipičnih (verjetno malignih) celic. Število atipičnih celic je premajhno za dodatne preiskave (ICK) – sumljivo (PAP)

Diagnostična kategorija sumljivo

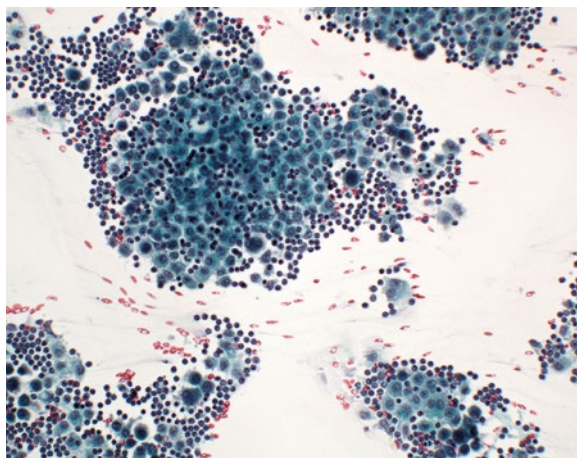
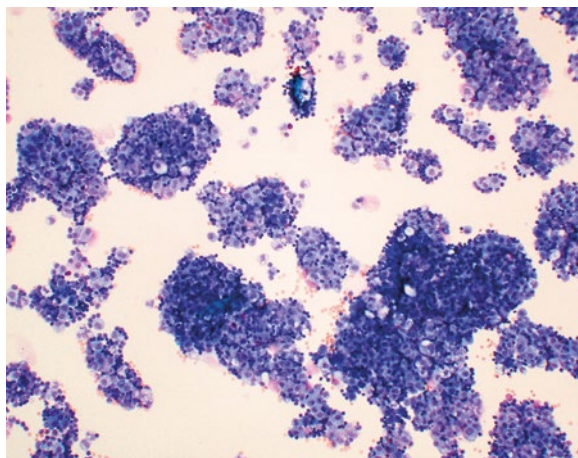
O sumljivem plevralnem izlivu govorimo v primeru, da so celice dovolj ohranjene za zanesljivo diferenciacijo ali pa degenerirane z nakazanimi znaki malignosti (slika 9). Lahko gre tudi za jasno maligne celice, ki so maloštevilne in jih ni možno natančneje opredeliti (slika 10). Kot sumljive opredelimo tudi vzorce, kateri so ustrezni za kasnejše dodatne preiskave (imunocitokemija, pretočna citometrija), s katerimi lahko natančneje opredelimo naravo procesa. V tem primeru vzorec opredelimo kot sumljiv le v preliminarinem izvidu.

Diagnostična kategorija nejasno (atipija nedoločenega pomena)

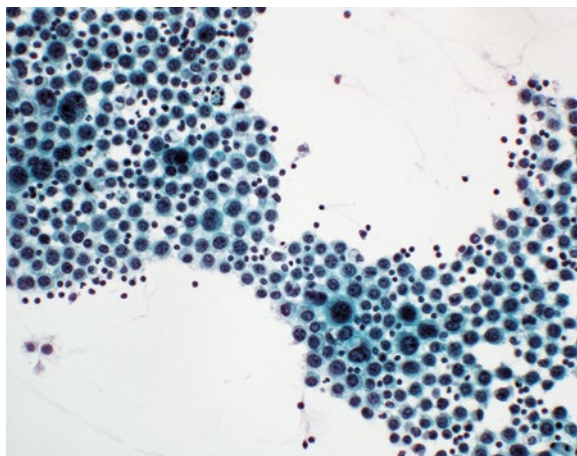
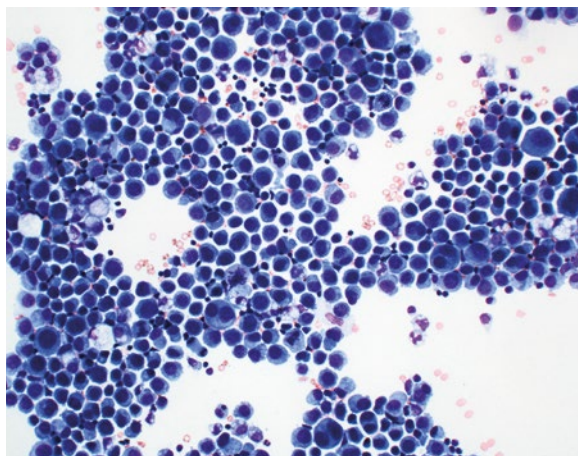
O nejasnem plevralnem izlivu govorimo v primeru, da so v vzorcu prisotne celične atipije, ki jih ne moremo natančneje opredeliti, vendar morfološko ne kažejo jasnih znakov malignosti (slika 11). O nejasnem vzorcu govorimo tudi v primeru prisotnosti nekroze (ni možno natančneje opredeliti vzroka za nekrozo – lahko tumor, vnetje, drugo). Kategorija nejasno ima zelo nizko klinično reproducibilnost, ker ne opredeli procesa v plevralni votlini. Zato se ji je treba izogibati in jo uporabljati edino v primerih, ko ne moremo z dodatnimi preiskavami natančneje opredeliti narave procesa v plevralnem izlivu.

Diagnostična kategorija pozitivno (maligno)

O pozitivnem (malignem) plevralnem izlivu lahko govorimo le v primeru, da je v vzorcu dovolj ohranjenih celic za zanesljivo diferenciacijo. V vzorcu mora biti prisotno zadostno število celic, ki kažejo jasne znake malignosti. Znaki malignosti se v plevralnih izlivih lahko nekoliko razlikujejo kot v ostalih citoloških in histoloških vzorcih. Celice so večinoma napihnjene, okroglaste, z obilnejšo citoplazmo (slika 12). Porušenega razmerja jedro/citoplazma v korist jedra pogosto ne opazimo, zlasti pri sekundarnih neoplazmah. Predvsem gre za spremembo strukture citoplazme, možne znake diferenciacije (poroženevanje, pigment). Pomembna je tudi sprememba oblike jeder, sprememba debeline membrane in struktura kromatina.



Slika 11a in b. V vzorcu so številne atipične mezotelne celice, ki so lahko ali reaktivne ali neoplastične – diagnoza: Nejasno glede malignosti (MGG, PAP)



Slika 12a in b. V vzorcu so številne celice z jasnimi znaki malignosti – pozitivno (MGG, PAP)

Laboratorijska obdelava plevralnega izliva

Na citološko diagnozo vplivajo poleg same analitske faze (laboratorijska obdelava), ki mora biti standardizirana in kontrolirana na več nivojih, v večji meri dejavniki, na katere nimamo vedno vpliva. To je predanalitska faza izven laboratorija, ki obsega odvzem in transport vzorca. Zato mora laboratorij poskrbeti za jasna navodila glede odvzema in transporta vzorca plevralnega izliva.

Plevralni izliv za citološki pregled je odvzet v sterilne vakuumске epruvete z zelenimi zamaški, ki vsebujejo antikoagulant Li-heparin. Zaželjena je čim večja količina (priporočeno > 50 ml) zato je lahko izliv odvzet direktno v brizgo ali večjo posodo/drenažni sistem brez dodanega antikoagulanta. Vzorec mora biti dostavljen v laboratorij čim prej po odvzemu, na sobni temperaturi in ustrezno zaščiteno. V primeru zakasnelega transporta se vzorec hrani v hladilniku.

Vzorec sprejmemo v laboratorijski informacijski sistem (LIS), s čimer dobi protokolno številko (unikatna laboratorijska identifikacijska oznaka), ki zagotavlja sledljivost in ga spremlja v vseh stopnjah citološke preiskave, vse do izvida. S sistemom črtnih in QR kod zmanjšamo možnost napak.

Pogoj za sprejem vzorca v laboratorij je skladnost ustrezno označenega vzorca (epruvete, različne transportne posode) in pravilno izpolnjene pripadajoče napotnice. Napotnica je dejansko stiskana napotitev v elektronski obliki v LIS.

Po sprejemu vzorca v laboratorij izmerimo dobljeno količino in izliv makroskopsko opišemo:

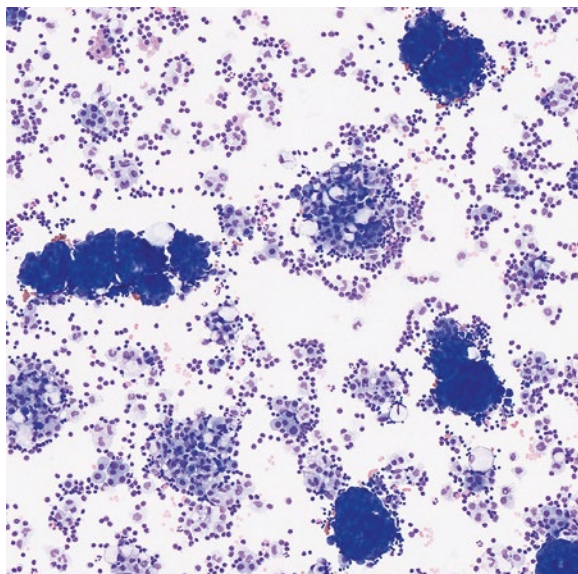
- bister, moten, gost
- prozoren, bel, rumen, oranžen, zelen, rjav, rdeč (krvav, močno krvav)
- vlecljiv, gnojen, smrdeč

Citološka analiza vzorca pleuralnega izliva obsega:

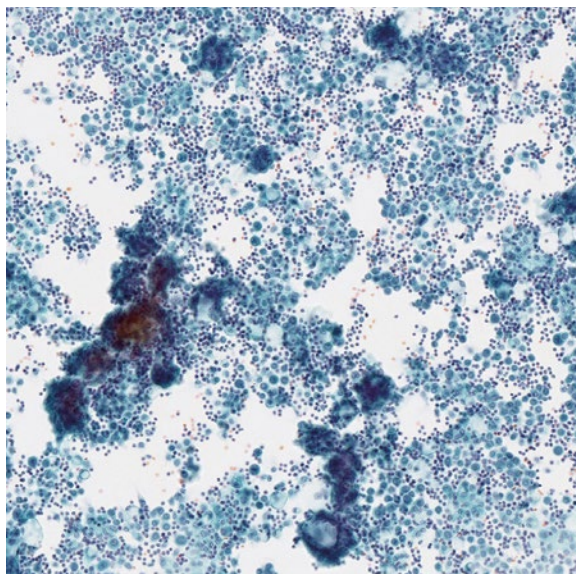
- določanje koncentracije celic z jedrom
- ugotavljanje malignosti
- diferenciacijo celic.

Celice preštejemo v $1\ \mu\text{l}$ po metodi za štetje levkocitov v Neubauerjevi komori. Koncentracija celic z jedrom je citološki kriterij pri ločevanju med transudatom in eksudatom. Mejna vrednost je 1000 celic / μl .

Iz tekočinskega vzorca nato pripravimo trajne citološke preparate za mikroskopski pregled. S citocentrifugo pripravimo citospine, kjer se celice zaradi delovanja centrifugalne sile usedajo direktno na objektno steklo. Pomembna je predvsem hitrost citocentrifugiranja, ker celice različno hitro, odvisno od velikosti, sedimentirajo (5 minut pri 1250 obratih / min). Pri nižjih hitrostih se manjše celice (limfociti) počasneje usedajo na objektno steklo, zato pride do neenakomerne razporeditve, kar vpliva na diferenciacijo celic. Posušene, na zraku fiksirane citospine pobarvamo po metodi May-Grünwald Giemsa (MGG) (slika 13). Citospine fiksirane v Delaunay-u pobarvamo po metodi Papanicolaou (PAP) (slika 14).



Slika 13. Citospin, MGG



Slika 14. Citospin, PAP

Zaradi različnih prednosti MGG in PAP uporabljamo rutinsko obe barvanji. Prednost PAP metode je v dobro vidnih jedrih in kromatinski strukturi, diferencialnem barvanju in transparentnosti citoplazme. Dobro so vidne poroženele celice in ohranjene celice v detritusu in sluzi. V MGG so dobro vidni citoplazma in granule v njej, celice limfatičnega porekla in hemopoeze.

Mikroskopski pregled obsega ugotavljanje malignosti in diferenciacijo celic. V primeru malignih plevralnih izlivov celic ne diferenciramo. Diferenciacija celic je v pomoč pri določitvi etiologije plevralnega izliva v primeru negativnega plevralnega izliva. Izberemo ustrezna področja z enakomerno razporejenimi celicami in pod 40x povečavo objektiva določimo na sto celic deleže limfocitov, histiocitov, nevtrofilnih, eozinofilnih in bazofilnih granulocitov, plazmatk in mezotelnih celic. Na diferenciacijo celic vplivajo izkušnje. Težave so pri mononuklearnih celicah (mlajša mezotelna celica, mlajše limfatične celice, histioci), zato so potrebni jasni morfološki kriteriji. Na diferenciacijo celic vpliva tudi način priprave citološkega vzorca. Zaradi enakomerne razporeditve celic je bolj zanesljiva diferenciacija v citospinih kot v razmazih sedimenta.

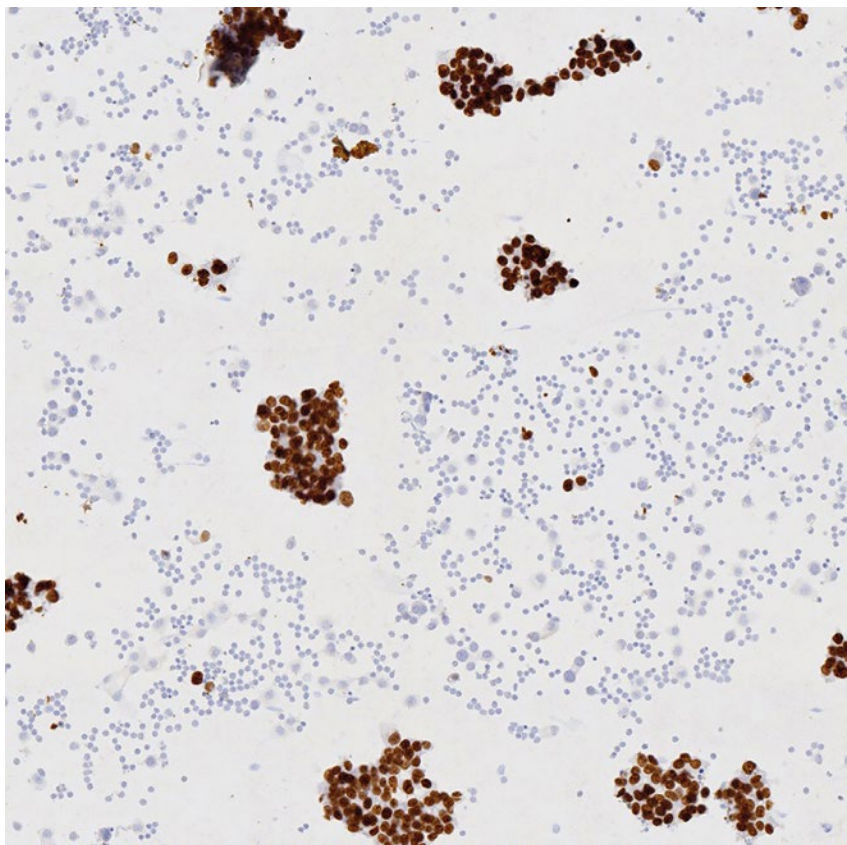
Mikroskopski pregled preparatov poteka dvostopenjsko. Presejalec (citoskriner) izvede diferenciacijo, označi spremembe, atipične/maligne celice ter v LIS opiše svoje mnenje.

Kadar citološke diagnoze ne moremo postaviti le na osnovi citomorfoloških značilnosti s pomočjo rutinsko obarvanih citospinov po MGG in PAP, patolog v drugi stopnji naroči morebitne dodatne preiskave.

Za primer dodatnih preiskav, preostanek vzorca po rutinski obdelavi hranimo v hladilniku (2 do 8°C) še tri dni po avtorizaciji izvida.

Z dodatnimi citokemičnimi barvanji na zraku fiksiranih razmazih lahko prikažemo:

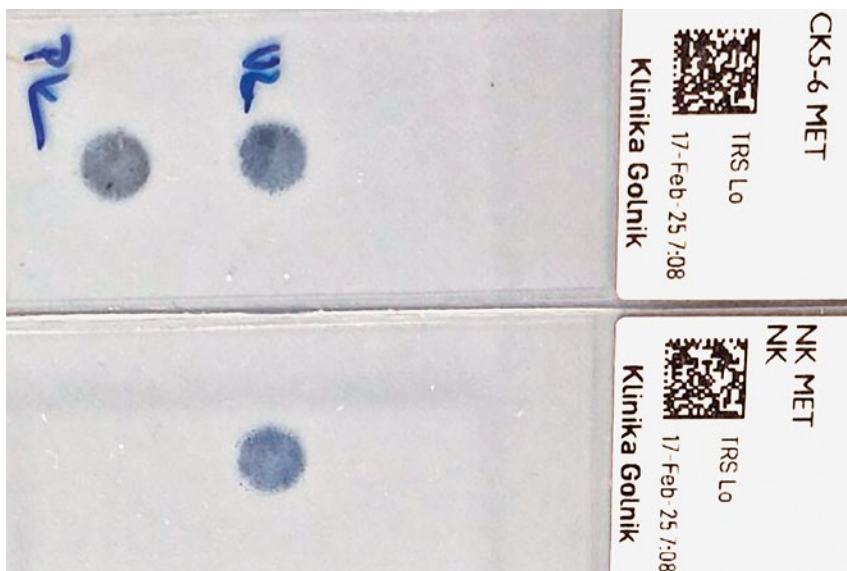
- acidorezistenčne bacile
- glikoproteine, mukopolisaharide
- lipide
- bakterije
- glivice



Slika 15. TTF-1 pozitivna jedrna reakcija v malignih celicah, Dako Omnis

Imunocitokemično barvanje (ICK) je pomembno pri razreševanju vprašanj: maligni/nemaligni, primarni/sekundarni maligni izlivi in določevanju izvora malignoma. Velik pomen v zadnjih desetih letih ima dokazovanje prediktivnih markerjev pljučnega raka.

Princip ICK je dokazovanje različnih antigenov s pomočjo specifičnih protiteles direktno na citoloških razmazih. Barvanje izvedemo lahko le na PAP pobarvanih razmazih in na razmazih fiksiranih v metanolu. Jedrne antigene lahko dokažemo le na razmazih fiksiranih v metanolu, ki jih naknadno kontrastiramo s hematoksilinom (npr. TTF-1) (slika 15). ICK izvajamo na imunobarvalcih, pri čemer mora vsak laboratorij validirati svoje postopke.

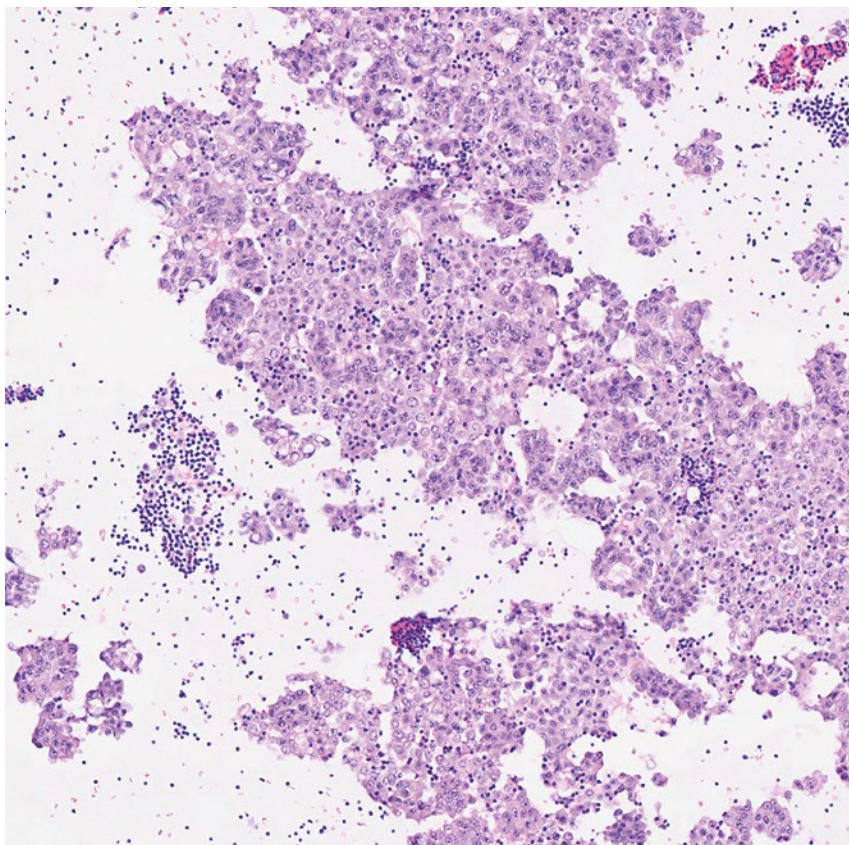


Slika 16. ICK CK5/6, na istem preparatu pozitivna kontrola in vzorec ter na svojem preparatu negativna kontrola

Citospine za ICK pripravimo iz celične suspenzije, dobljene po predhodnem spiranju primarnega vzorca s tekočino za ohranjanje celic (npr. Gelaspan®). S tem speremo beljakovine v plevralnem izlivu, ki lahko povzročajo nespecifično barvanje, kar otežuje interpretacijo.

Interpretacija ICK je zanesljiva le na preparatu, ki vsebuje dovolj morfološko dobro ohranjenih in diagnostično pomembnih reprezentativnih celic. Zelo pomembna je uporaba pozitivnih in negativnih kontrol, ki so pripravljene in fiksirane na enak način kot preiskovani vzorec. S pozitivnimi kontrolami preverjamo pravilnost postopka in aktivnost posameznega protitelesa. Z negativnimi kontrolami pa nespecifično vezavo reagentov na komponente v vzorcu.

V zadnjih dveh letih izvajamo ICK na metanol fiksiranih citospinih, kjer sta vzorec in pozitivna kontrola na istem preparatu (Slika 16). S tem omogočimo bolj zanesljivo interpretacijo in zmanjšamo stroške ICK.



Slika 17. Citoblok iz vzorca plevralnega izliva, HE

Celični blok ali citoblok je citološki vzorec fiksiran v formalinu, vklopljen v parafin in s tem pripravljen za histološki pregled (Slika 17). Pripravimo ga lahko iz drobcev tkiva, krvnih strdkov ali sedimenta celičnih suspenzij.

Priprave citobloka se poslužujemo v primeru maloštevilnih diagnostično pomembnih celic, dodatnih imunohistokemičnih barvanj, nadaljnje molekularne diagnostike in arhiva vzorcev (»banka«).

Opisani so številni postopki. V našem laboratoriju pripravljamo citoblok iz sedimenta primarnega vzorca ali celične suspenzije. Uporabljamo HistoGel™,

komercialno pripravljen gel na vodni osnovi, ki je trden pri sobni temperaturi in se utekočini pri 60 °C.

Na sediment, predhodno fiksiran v formalinu, dodamo utekočinjen HistoGel™, počakamo, da se strdi, nato strdek z vzorcem prenesemo v biopsijsko kasetko in vklopimo v parafin.

Vzorec za molekularno diagnostiko je ustrezna celična suspenzija v Gelaspanu®, ki vsebuje zadostno količino tumorskih celic za diagnostiko. Potrebna količina je od 0,2 do 0,5 ml celične suspenzije. Za analizo prosto plavajoče DNA uporabimo supernatant (8 ml). V primeru kasnejše preiskave svežo celično suspenzijo in supernatant zamrznemo in hranimo pri -20 °C.

V letu 2024 smo izvedli imunocitokemično barvanje na 13 % plevralnih izlivov. Od 910 plevralnih izlivov (od tega skoraj polovico iz zunanjih ustanov) so pozitivni vzorci predstavljali 17 %, negativni 76 %, 4 % je bilo sumljivih in 0,2 % nejasnih primerov.

Ali drugače povedano, za imunocitokemijo smo se odločili v 65 % pozitivnih vzorcev, v 26 % sumljivih primerov, v 1 % negativnih in 50 % nejasnih vzorcev.

Neuporabni ali neustrezni vzorci so acelularni, prisoten je celični razpad ali so močno krvavi. V takšnih primerih citološka opredelitev procesa ni zanesljiva tako glede prisotnosti malignih celic kot tudi štetja in diferenciacije celic. V standardiziranih pogojih laboratorijske obdelave in nadzoru predanalitskih dejavnikov je delež tovrstnih vzorcev < 5 %, v našem laboratoriju v letu 2024 je bilo 2,3 %.

Molekularne preiskave vzorca plevralnega izliva

Molekularne preiskave najpogosteje izvedemo za določitev prediktivnih označevalcev v vzorcu plevralnega izliva in so pomemben del klinično-onkološke obravnave pacienta. Iz vzorca plevralnega izliva je možno določiti onkogene mutacije iz nukleinskih kislin (DNK in RNK). Iz izolirane DNK določamo točkovne mutacije, delecije in insercije, prav tako pa tudi spremembe v številu kopij genov. Izolirana RNK nam omogoča detekcijo različnih genskih preureditev (fuzije, preskoki eksonov). Med trenutno najpomembnejše napovedne označevalce odgovora na zdravljenje pljučnega nedrobnoceličnega karcinoma sodijo geni kot so: *EGFR*, *KRAS*, *ALK*, *ROS1*, *RET*, *BRAF*, *MET* in *NTRK*.

Predanalitična faza

Pred samo molekularno preiskavo je pomembno, da vzorec plevralnega izliva po sprejemu v laboratorij čim prej obdelamo, nato pa preostanek vzorca do postavitve diagnoze s strani patologa hranimo v hladilniku pri 2–8 °C. Po potrditvi morfološke diagnoze in naročilu molekularnega testiranja s strani patologa je potrebno pripraviti bodisi celično suspenzijo ali supernatant vzorca plevralnega izliva. Celično suspenzijo za molekularno testiranje pripravimo iz vzorca z dovolj visokim deležem tumorskih celic (> 10 % ali vsaj 100). Supernatant je primer vzorca tekoče biopsije, ki ga pripravimo v primeru nizkega deleža tumorskih celic. Tako celično suspenzijo kot supernatant pridobimo s pomočjo centrifugiranja. Za nadaljnji postopek potrebujemo vsaj 200 µl, oba pa je potrebno hraniti pri –20 °C. Pri shranjevanju lahko uporabimo tudi RNK-later, ki dodatno ščiti občutljivejšo molekulo RNK pred razgradnjo. V primeru celične suspenzije izoliramo iz tumorskih celic obe nukleinski kislini. Kadar uporabimo supernatant, izoliramo prosto tumorsko nukleinsko kislino.

Za izolacijo in kvantifikacijo nukleinskih kislin uporabljamo tako ročne kot avtomatizirane metode. Najpogostejše uporabljamo avtomatizirane metode izolacije nukleinskih kislin, kjer večino postopka opravi aparat (npr. Genexus Purification Unit, ThermoFisher Scientific, ZDA). Za ročno izolacijo nukleinskih kislin so na voljo različni komercialni reagenčni kiti (npr. QIAamp DNA mini kit, RNeasy® Plus Mini Kit, Qiagen).

Analitična faza

Po uspešno opravljeni izolaciji nukleinskih kislin, molekularno genetsko analizo opravimo bodisi z metodo verižne reakcije s polimerazo (Real-Time PCR) ali sekvenciranja naslednje generacije (NGS). Metoda Real-Time PCR omogoča enogensko testiranje, saj zahteva za vsak gen svoj diagnostični test (npr. Cobas® EGFR Mutation Test V2 ali Cobas® KRAS Mutation Test, Roche, ZDA). Metoda NGS pomeni hkratno večgensko testiranje in pokriva različno širok nabor genov, odvisno od panela. V zadnjem času je to najbolj priporočena in uporabljena metoda za molekularno testiranje. Tehnologija omogoča odkrivanje točkovnih mutacij, delecij, insercij, genskih fuzij, sprememb števila kopij in drugih genetskih sprememb, ki so ključne za napoved odziva na tarčno terapijo. Prednost NGS pred drugimi metodami, kot je Real-Time PCR, je v širokem naboru genov, ki jih lahko analiziramo v enem samem testu, kar omogoča hitrejšo in bolj celovito obravnavo pacienta. Za rutinsko molekularno testiranje uporabljamo manjši panel genov (npr. Oncomine Precision Assay, ThermoFischer Scientific, ZDA). Tovrstni panel omogoča identifikacijo ključnih klinično relevantnih mutacij, vključno s tistimi, ki so povezane z odpornostjo na terapijo.

Z metodo fluorescenčne *in situ* hibridizacije (FISH) je možno v citoloških preparatih vzorca plevralnega izliva dokazovati genske preureditve. Homozigotna delecija 9p21 je značilna genska sprememba za mezoteliom s pogostnostjo 56–79 %. Za iskanje navedene genske spremembe lahko uporabimo večgenski komercialni test namenjen uporabi v citologiji urinov (UroVysion, Abbott, ZDA) ali pa specifični test z dvojno sondo, ki vključuje centromer 9 in regijo 9p21. Iste teste lahko uporabimo tudi za citobloke. Z metodo FISH je možno dokazovati *ALK* ali *ROS1* fuzije in pomnožitve specifičnih genov (npr. *HER2*, *MET*).

Posebnosti molekularne preiskave vzorcev plevralnih izlivov

Neinvazivnost: Pridobivanje plevralnega izliva je manj invazivno kot vzorčenje tumorja z invazivnim biopsijskim posegom, kar je še posebej pomembno pri bolnikih z napredovalo boleznijo ali slabim splošnim stanjem.

Možnost večkratnih testiranj: Ker plevralni izlivi pogosto vsebujejo tumorske celice ali prosto nukleinsko kislino, je mogoče iz enega vzorca opraviti več testiranj, kar omogoča dinamično spremljanje bolezni in odziva na zdravljenje.

Personalizirana medicina: Molekularna analiza omogoča prilagoditev zdravljenja glede na specifične mutacije, kar poveča verjetnost uspeha terapije in zmanjša nepotrebne stranske učinke.

Kljub številnim prednostim molekularne preiskave vzorcev plevralnih izlivov obstajajo tudi določene omejitve. Eden izmed glavnih izzivov je heterogenost vzorcev (porazdelitev neoplastičnih celic ni vedno enakomerna), kar lahko vpliva na rezultat testiranja. Prav tako lahko kontaminacija z normalno DNK iz krvnih celic vpliva na občutljivost testiranja. Zato je predanalitična obdelava vzorcev ključnega pomena za zanesljive rezultate.

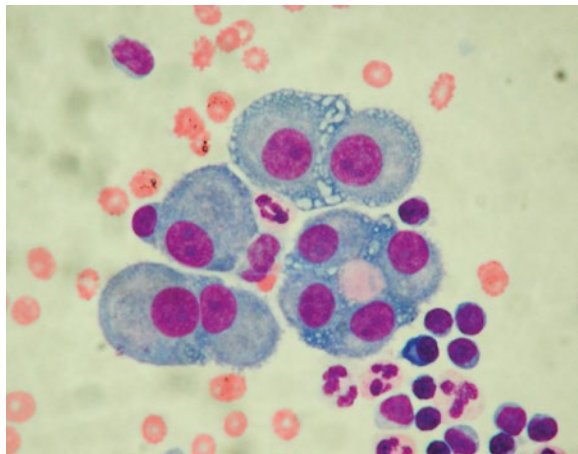
Netumorska citopatologija plevralnega izliva

S citološkim pregledovanjem plevralnega izliva ne iščemo samo malignih celic. Skušamo prepoznati tudi druge, neneoplastične vzroke nastanka plevralnega izliva. Z določitvijo celične koncentracije in diferenciranjem celic ugotavljamo tip in intenziteto vnetnega dogajanja. Včasih najdemo morfološke spremembe, ki so značilne za določene bolezni.

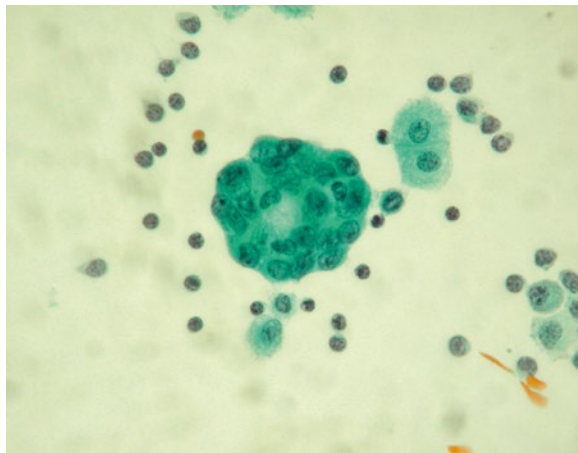
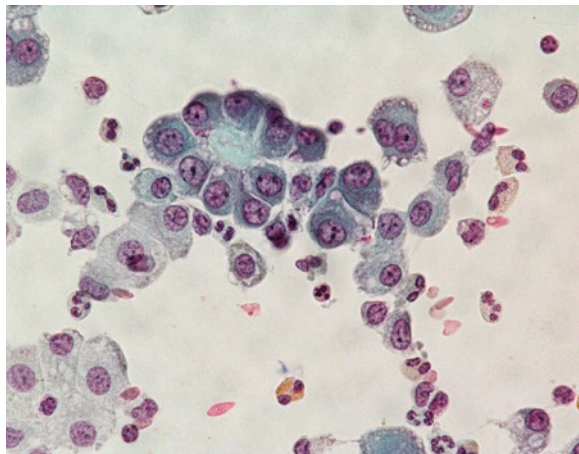
Reaktivna mezotelna celica

Mezotelna celica se izjemno hitro odzove na različne dražljaje. Posledično se njena morfolologija spremeni in govorimo o reaktivnih mezotelnih celicah. Mezotelne celice se zaradi številnih vzrokov lahko pomnožijo (hiperplazija), kar se odrazi v višjem deležu (> 10 %) mezotelnih celic v diferencialni sliki.

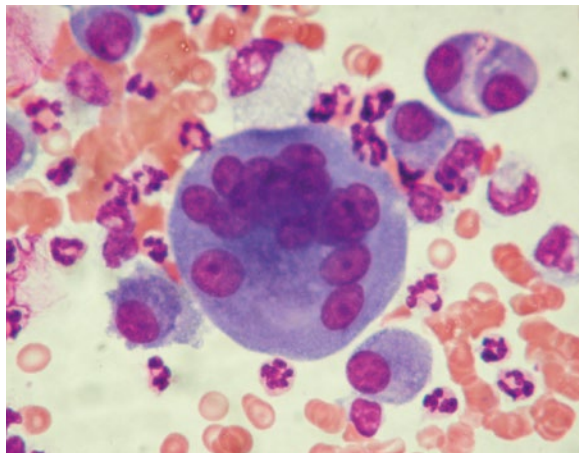
Pri pregledovanju citološkega preparata z reaktivnimi mezotelnimi celicami izstopa polimorfna populacija mezotelnih celic (različna oblika in velikost celic). V citoloških vzorcih so reaktivne mezotelne celice urejene posamično, v nizu, v tridimenzionalnih skupinah (morula), v plakih kot šahovnica ali mozaik ali v rozetah, kjer v centru enoslojne skupine najdemo acelularno vsebino (roza v MGG, zeleno v Papanicolaou), ki je kolagen tip III. Med celicami v skupinah so manjša »okenca« (sliki 18 in 19). Zelo značilne so dvojdrne celice (dvojčki) in posamične večje večjdrne celice (slika 19). Celice imajo intenzivno obarvano citoplazmo (slika 20), ki je lahko drobno vakuolizirana. Ta vakuolizacija zajame celotno citoplazmo ali pa je prisotna perinuklearno, kar imenujemo perinuklearni halo. Še posebej v PAS obarvanih preparatih je dobro viden sloj z mikrovili, zato daje celica vtis kostanjeve ježice. Jedro je povečano, povišano je razmerje med jedrom in citoplazmo in kromatin je svetlejši. Nukleol je pogosto zelo izrazit. Več je mitoz in celičnega kanibalizma. V dalj časa trajajočem plevralnem izlivu



Slika 18a in b. Reaktivne mezotelne celice (MGG, PAP)

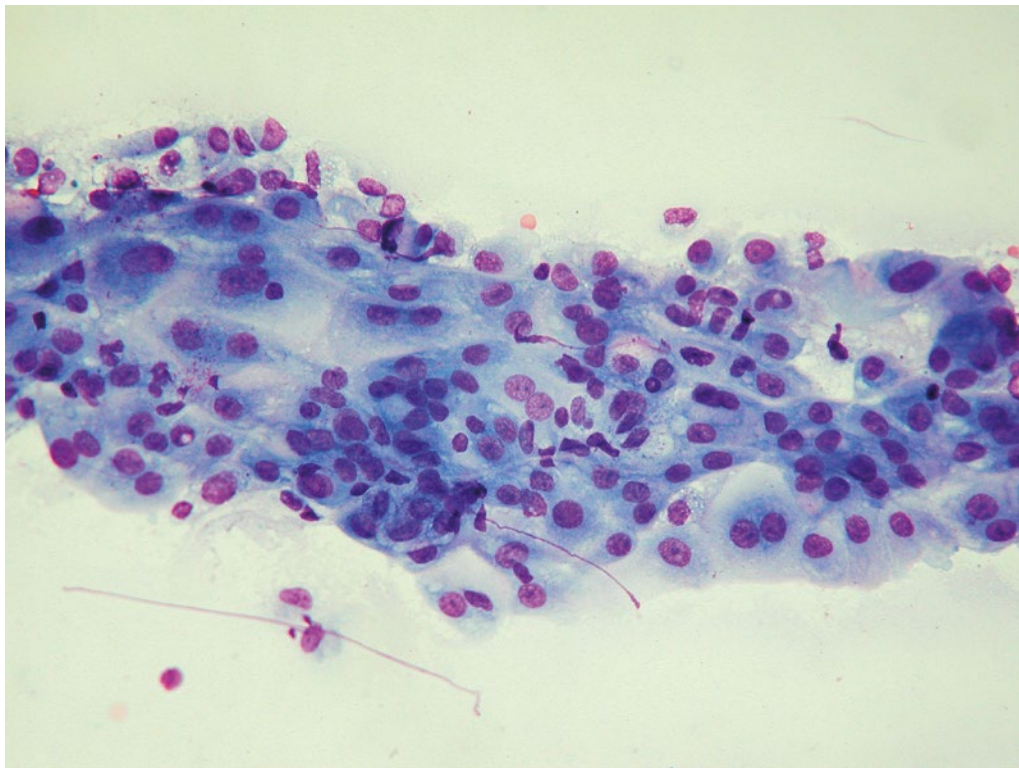


Slika 19a in b. Reaktivne večjedrne mezotelne celice (PAP, MGG)



se odluščene mezotelne celice lahko množijo. Podobno opazujemo pomnoževanje mezotelnih celic v vzorcu pleuralnega izliva v laboratoriju. V dneh po odvzemu vzorca narašča delež mezotelnih celic.

Reaktivno spremenjene mezotelne celice ohranjajo mezotelni imunofenotip: vimentin pozitivno, keratin pozitivno (npr. CK5/6), kalretinin pozitivno, HBME-1 pozitivno, HEG1 pozitivno, mezotelin pozitivno, D2-40 pozitivno, WT1 pozitivno.

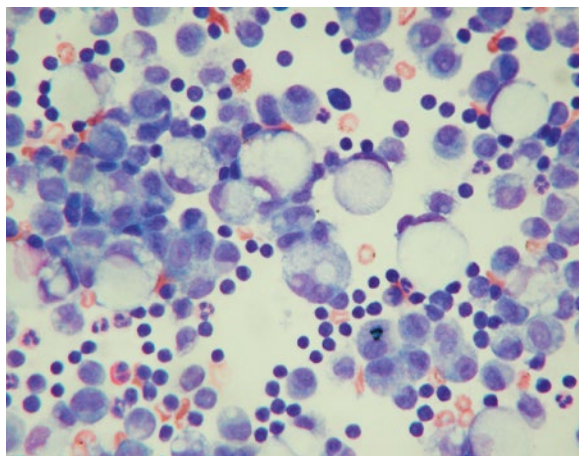
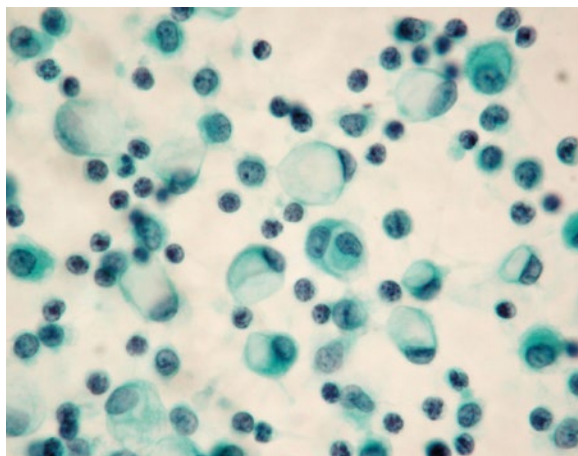


Slika 20. Reaktivne mezotelne celice v brisu biopsije plevre (MGG)

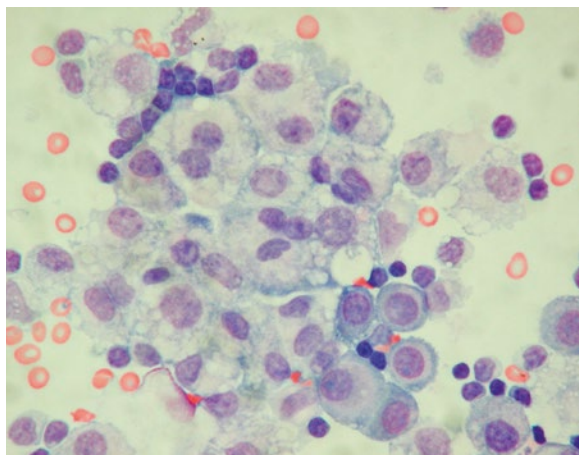
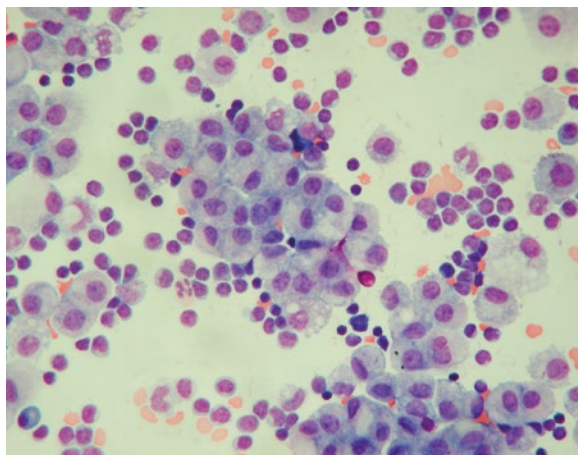
Njihovo neneoplastično, reaktivno proliferacijo dokazujemo z naslednjim imunoprofilom: dezmin pozitivno, p53 negativno, EMA negativno, najbolj zanesljivo pa z ohranjenim jedrnim izražanjem BAP1 in MTAP.

Diferencialno diagnostično predstavljajo tumorske celice največji problem. Na osnovi citomorfologije težko zanesljivo ločimo reaktivno (benigno) mezotelno celico od maligne mezotelne celice ali druge maligne celice.

Degenerirana mezotelna celica je večja in blede obarvana. Celica ima vakuolizirano citoplazmo, zato je lahko videti kot psevdopečatnica. Jedro je piknotično ali napihnjeno z zabrisano kromatinsko strukturo (slika 21).



Slika 21a in b. Degenerirane mezotelne celice (PAP, MGG)



Slika 22a in b. Histiociti (MGG)

Histiociti

Te celice so največkrat urejene posamično ali v rahlih skupkih. So srednje velikosti, nekoliko večje od normalne mezotelne celice, s premerom 20–40 μm . Običajno variirajo po velikosti. Njihovo jedro je okroglo ali ledvičasto in leži ekscentrično ali periferno. Lahko so dvo ali večjedrne celice. Kromatinska struktura jedra je drobno zrnata in ni nukleola. Celica je bolj nežno obarvana. Obilna citoplazma je dobro,

vzrok		bolezen
sistemski	↑ hidrostatski tlak	srčno popuščanje
	↓ koloidno-osmotski tlak	jetrna ciroza, nefrotski sindrom, kaheksija
lokalni	↑ kapilarna permeabilnost	plevritis, pljučnica, absces, pljučna embolija in infarkt, avtoimune bolezni, neoplazme
	↓ resorpcija	zasevki v mediastinalne bezgavke, pritisk na limfne žile - tumorji, granulomi

Tabela 4. Patofiziološki mehanizmi nastanka plevralnega izliva

včasih slabše omejena. Citoplazma je pogosto vakuolizirana (slika 22). Značilna je fagocitoza (eritrociti, levkociti, pigment, celični debris) in v takem primeru celico imenujemo makrofag (funkcijska definicija).

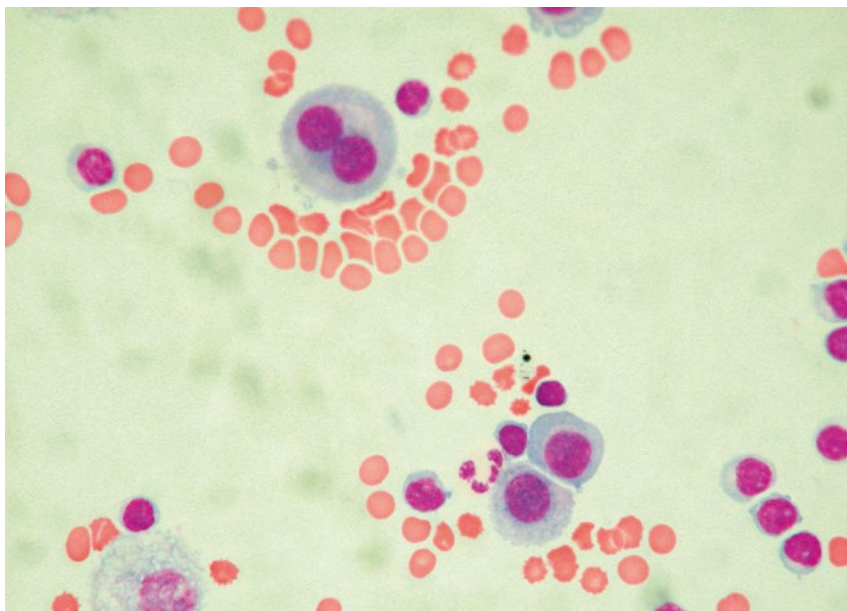
Plevralni izliv

Plevralni izliv je posledica neravnovesja med produkcijo in resorpcijo plevralne tekočine (tabela 4).

Pomembno je ločiti ali gre za transudat ali eksudat (tabela 5). Transudativni plevralni izliv se razvije zaradi spremenjenih sistemskih faktorjev, ki vplivajo na tvorbo in resorpcijo plevralne tekočine. Eksudat je posledica lokalnih sprememb plevralne površine in kapilar v področju nastajanja plevralne tekočine. Ko z biokemičnimi preiskavami ugotovimo, da gre za transudat, pri bolniku s plevralnim izlivom niso potrebne nadaljnje preiskave in ukrepanje je usmerjeno v zdravljenje osnovnega obolenja. Nasprotno pa pri ugotovljenem eksudatu stečejo dodatne preiskave. Diferenciacija celic v plevralnem izlivu je pomembna pri ugotavljanju vzroka nastanka izliva.

Transudat

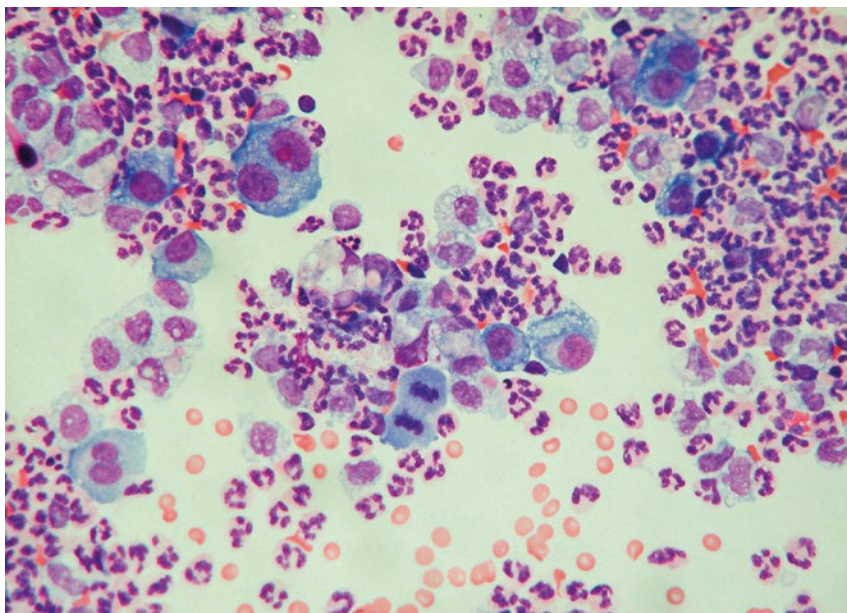
Makroskopsko je vzorec plevralnega izliva videti bister, voden, blede rumenkast. Z biokemično analizo dokažemo nizko koncentracijo proteinov.



Slika 23. Transudat, vidna je nizka celularnost (MGG)

kazalec	transudat	eksudat
Koncentracija proteinov (g / l)	<30	>30
<i>Razmerje koncentracij proteinov v plevralnem izlivu in serumu</i>	<0,5	>0,5
Specifična teža	<1016	>1016
LDH (μkat / l)	<3,3	>3,3
<i>Razmerje LDH v plevralnem izlivu in serumu</i>	<0,6	>0,6
<i>Razmerje LDH v plevralnem izlivu in zgornje normalne vrednosti v serumu</i>	< $\frac{2}{3}$	> $\frac{2}{3}$
Koncentracija celic v plevralnem izlivu (celice / μl)	<1000	>1000

Tabela 5. Laboratorijski kriteriji. V poševnem tisku so Lightovi kriteriji. O eksudatu govorimo, ko je izpolnjen najmanj eden od njih. Ob upoštevanju vseh Lightovih kriterijev za razmejitev transudatov od eksudatov v 99 % pravilno uvrstimo plevralni izliv.



Slika 24. Nevtrofilni eksudat, celularen vzorec, vidni so številni nevtrofilni granulociti in reaktivno spremenjen mezotel (MGG)

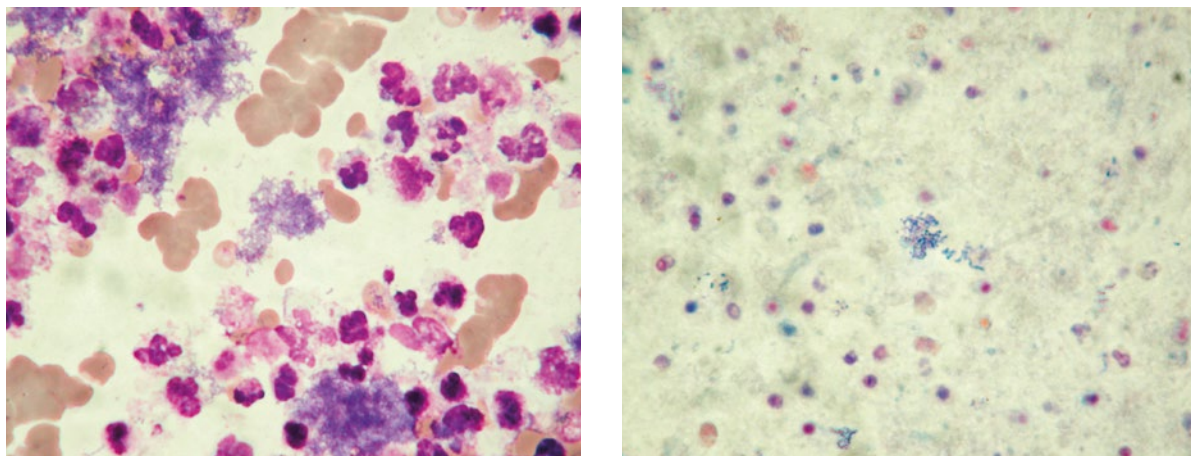
Citološki pregled razkrije nizko celularnost, degenerirane celice, prevladujejo histiociti, manj je mezotelnih celic, najdemo limfocite in manj kot 10 % nevtrofilcev (slika 23).

Najpogostejši sistemski vzroki za nastanek transudativnega plevralnega izliva so jetrna ciroza, srčno popuščanje, nefrotski sindrom, hipoproteinemija, konstriktivni perikarditis, sindrom zgornje votle vene, kaheksija ali peritonealna dializa (tabela 3).

Nevtrofilni eksudat

Makroskopsko je vzorec moten, rumenkast, lahko tudi rdeč (krvav) in nima vonja.

Biokemična analiza potrdi, da gre za eksudat z višjo koncentracijo celic ($< 10000\text{--}15000$ celic / μl), normalno koncentracijo glukoze, normalnim ali znižanim pH. Vzorec je mikrobiološko steril.



Slika 25 a in b. Empiem. V citoplazmi nevtrofilnih granulocitov so bakterije (Gram)

V diferencialni sliki prevladujejo nevtrofilci ($> 50\%$), mezotelne celice so degenerirane ali reaktivno spremenjene, na ozadju je celični drobir, prisotna je fagocitoza (slika 24).

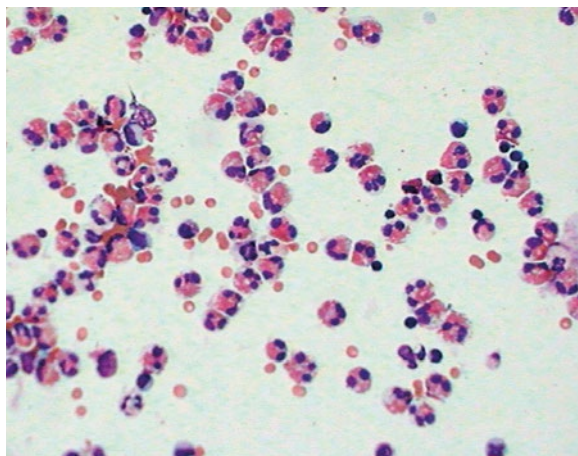
Etiologija nevtrofilnega eksudata so akutni procesi (bakterijska ali virusna pljučnica, pljučni absces, bronhiektazije), subfrenični absces, pankreatitis, inficiran pljučni infarkt (tabela 4).

Empiem

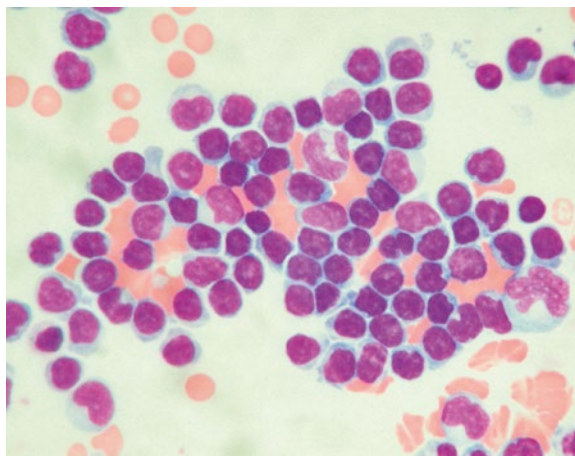
Makroskopsko je vzorec gost, gnojen, sivozelen in smrdeč.

O empiemu govorimo, ko gre za eksudat, z zvišano koncentracijo LDH, nižjo koncentracijo glukoze in znižanim pH. Običajno je empiem izjemno celularen ($> 20000\text{--}25000$ celic / μl). Z mikrobiološko preiskavo dokažemo povzročitelja. Najpogostejši povzročitelji so bakterije (po gramu pozitivni koki, anaerobi) in glivice.

Mikroskopsko najdemo bakterije ali glivice, najlažje z dodatnimi barvanji za prikaz mikroorganizmov (npr. Gram, Ziehl-Neelsen, Grocott). Izrazito prevladujejo degenerirani nevtrofilci ($> 90\%$), celice so razpadle, precej je celičnega debrisa in ozadje je nekrotično (slika 25).



Slika 26. Eozinofilni eksudat (MGG)



Slika 27. Limfocitni eksudat (MGG)

Empiem nastane kot zaplet pljučnice, pljučnega infarkta, pljučnega abscesa, subdiafragmalnih okužb ali perforacije požiralnika.

Eozinofilni eksudat

Makroskopsko je vzorec oranžen in moten.

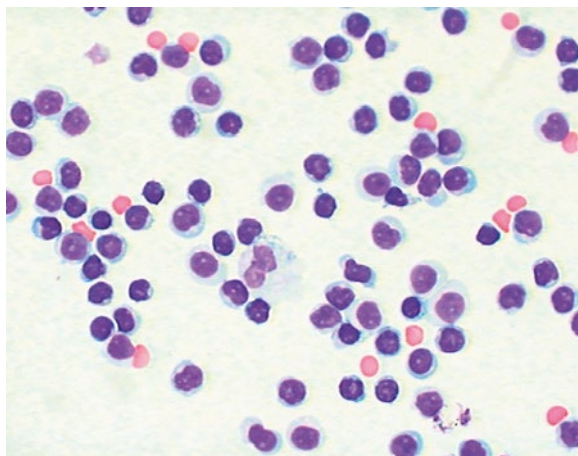
Biokemično gre za eksudat.

Mikroskopsko izstopajo eozinofilci (> 10–20 %). Izjemoma najdemo Charcot-Leydenove kristale. Mezotelne celice so reaktivno spremenjene in pomnožene. Zaradi degranulacije eozinofilcev so na ozadju drobna zrnca (slika 26).

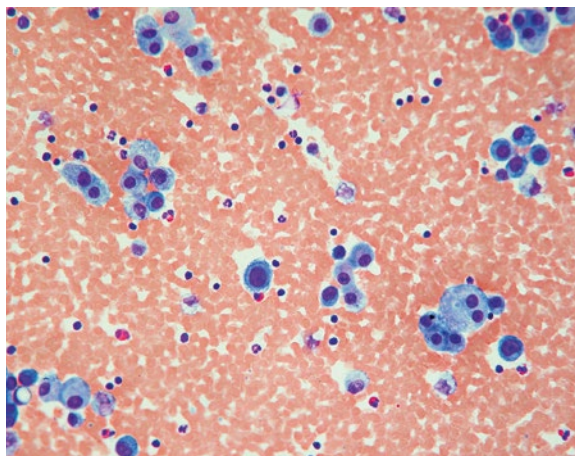
Do eozinofilnega eksudativnega plevralnega izliva pride zaradi pnevmotoraksa, krvavitve v plevralni prostor (poškodba, posegi, pljučni infarkt), okužbe s paraziti, pri sistemskih boleznih veziva, vpliva zdravil, eozinofilne granulomatoze s polianjiitidom in izpostavljenosti azbestu.

Limfocitni eksudat

Makroskopsko je vzorec moten.



Slika 28. Limfocitni eksudat pri tuberkulozi plevre (MGG)



Slika 29. Hematoraks. Vidni so številni eritrociti (MGG)

Biokemična analiza potrdi, da gre za eksudat.

V mikroskopski sliki prevladujejo mali limfociti (> 50–70 %). Gre za monomorfno citološko sliko z zreli limfociti, vmes so posamične mlajše limfatične celice in plazmatke (slika 27).

Najpogostejši vzroki limfocitnega eksudata so srčno popuščanje, kronična okužba, sistemske bolezni veziva, tuberkuloza. Diferencialno diagnostično prihaja v poštev limfoproliferativno obolenje, zato so smiselne dodatne preiskave (imunocitokemija, pretočna citometrija).

Tuberkuloza

Makroskopsko je vzorec običajno moten in rumenkast.

Biokemična analiza potrdi, da gre v primeru tuberkuloze plevre za eksudat z znižano koncentracijo glukoze in zvišano koncentracijo adenozin deaminaze.

Mikrobiološka preiskava potrdi okužbo z mikobakterijo.

Mikroskopsko najdemo limfocitni eksudat (> 70 % limfocitov), v katerem praviloma ni mezotelnih celic, plazmatk ali eozinofilcev (slika 28). Citološka slika je precej unimorfna. Pri tuberkuloznem plevritisu obstaja možnost nevtrofilnega eksudata in celo empiema. Z dodatnim barvanjem Ziehl-Neelsen ali molekularno preiskavo potrdimo okužbo z *M. tuberculosis*.

Hematotoraks (hemoragični eksudat)

Makroskopsko je vzorec krvav ali rjav pri starejši krvavitvi, v njem so koaguli.

Za diagnozo je ključnega pomena biokemična analiza krvavega vzorca plevralnega izliva, pri kateri najdemo povišan hematokrit in koncentracijo hemoglobina:

- hematotoraks – hematokrit izliva > 50 % vrednosti periferne krvi
- hemoragični eksudat – hematokrit 1-20 %
- nepomembno – hematokrit < 1 % (že 1 ml krvi obarva 1 l izliva rdečkasto, kar je pogosto pri punkciji)

Z mikroskopskim pregledom najdemo eritrocite, eritrofagijo in siderofage. Običajno gre za citološko sliko periferne venske krvi. Mezotelne celice, če so prisotne, so reaktivno spremenjene (slika 29).

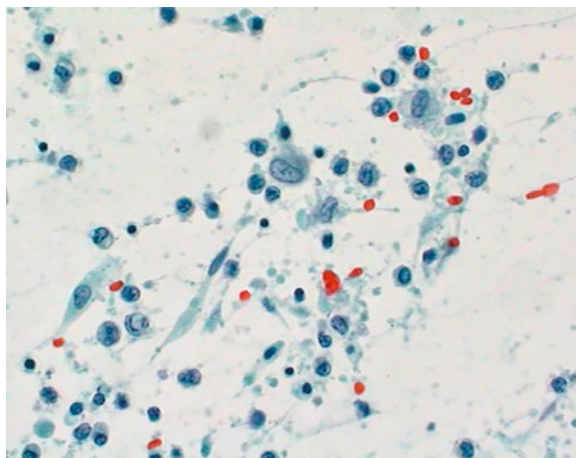
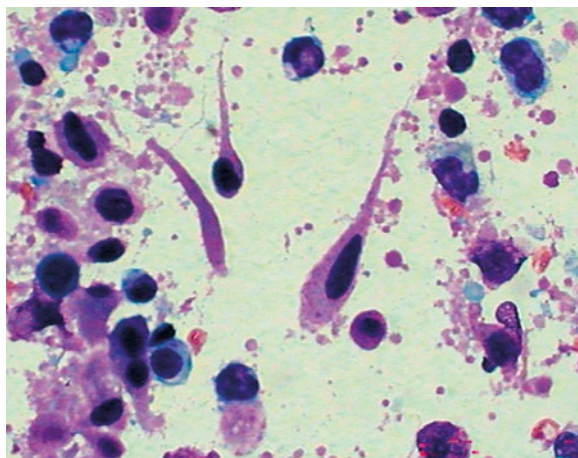
Najpogostejši vzrok je poškodba. Krvav izliv opazujemo po posegih, tudi pri pljučnem infarktu.

Revmatoidni artritis

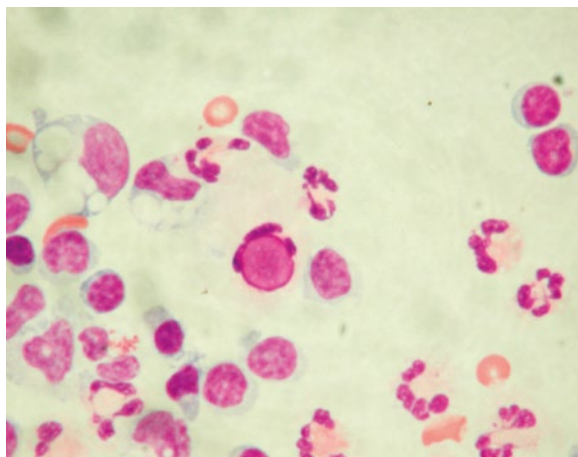
Makroskopsko je vzorec moten, gost, rumeno zelene barve.

Biokemična analiza potrdi, da gre za eksudat, z zvišano koncentracijo LDH, znižano koncentracijo glukoze, nižjim pH in zvišanim revma faktorjem.

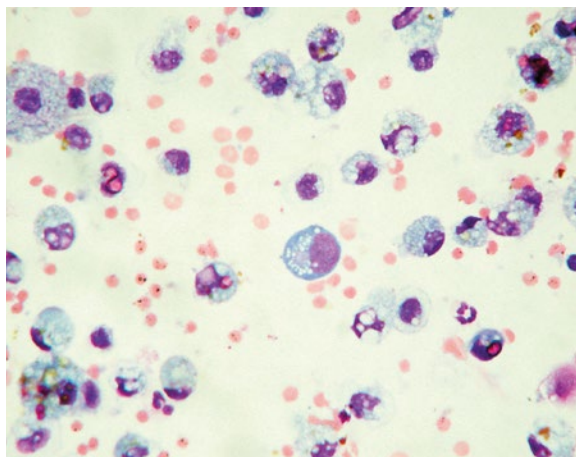
Mikroskopsko najdemo veliko zrnatega celičnega debrisa v obliki amorfnih eozinofilnih kroglastih tvorb premera 5-50 µm in holesterolne kristale. Vzorec je sprva bogat z nevtrofilci, kasneje prevladujejo limfociti. Značilne so vretenaste epiteloide celice, večjedrne celice in posamične bizarne celice, ki so imunocitokemično monocitnega porekla (CD68 pozitivne, keratin negativne) (slika 30). Citološka



Slika 30a in b. Revmatoidni artritis. Prisoten je debris, epiteloidne in bizarne celice (MGG, PAP)



Slika 31. Lupus eritematodes – LE celice (MGG)



Slika 32. Pankreatitis – nevtrofilni granulociti in makrofagi (MGG)

slika je značilna za revmatoidni plevritis in je lahko prva manifestacija revmatoidnega artritisa, pogosteje pri moških. Diferencialno diagnostično prihaja v poštev karcinoma plevre s skvamoznoceličnim karcinomom.

Sistemiški lupus eritematodes

Makroskopsko je vzorec bister in rumenkast.

Biokemično gre običajno za eksudat s pozitivnimi titri ANA in prisotnimi imunski kompleksi, ob tem je lahko nižja koncentracija glukoze.

Mikroskopsko odkrijemo LE (lupus eritematodes) celice z značilno nukleofagocitozo. V citološki sliki so prisotni nevtrofilci in limfociti. Najdemo hematoksilinska ali LE telesca, ki so okrogle goste homogene mase (slika 31).

Pankreatitis

Makroskopsko je vzorec moten in krvav.

Pri akutnem pankreatitisu gre za levostranski plevralni izliv, ki je eksudat z zvišano koncentracijo amilaze in lipaze.

Mikroskopsko izstopajo zelo reaktivno spremenjene mezotelne celice, v citološki sliki prevladujejo limfociti in nevtrofilci (slika 32).

Hilotoraks

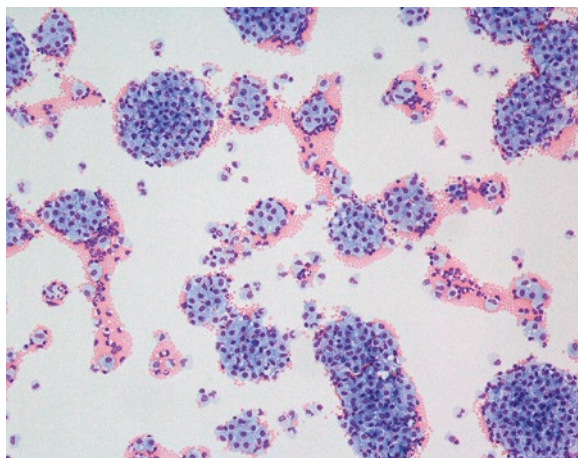
Makroskopsko je vzorec mlečen in moten. Tudi po centrifugiranju ostane moten.

Za hilotoraks sta značilno povišani koncentraciji holesterola in trigliceridov.

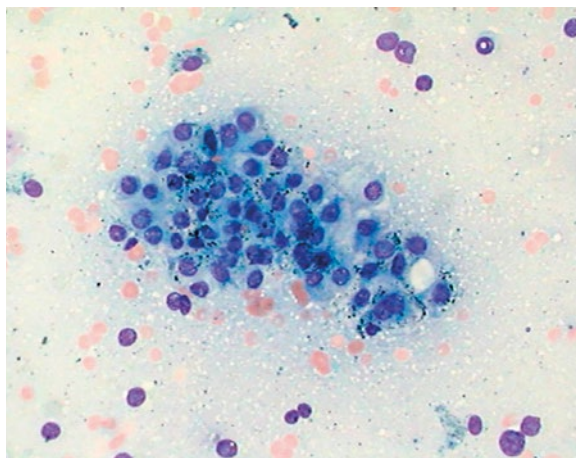
Mikroskopski pregled odkrije umazano ozadje in holesterolne kristale. Celice so degenerirane, prevladujejo limfociti. Histiociti so drobno vakuolizirani (slika 33). Z dodatnimi barvanji v njih dokažemo lipide.

Hilotoraks se razvije zaradi zapore limfne drenaže pri neoplazmah in limfangioleiomimotozi ali rupturi torakalnega duktusa po posegih.

Ločiti moramo psevdohilozni ali holesterolni izliv, ki je tudi mlečen z razpadlimi celicami. V tem primeru je posledica večletnega kroničnega izliva.



Slika 33. Hilotoraks – drobno vakuolizirani histiociti (PAP)



Slika 34. Hepatociti z žolčnim pigmentom – kontaminacija (MGG)

Ruptura požiralnika

Makroskopsko je vzorec moten.

Biokemično gre za eksudat z znižano koncentracijo glukoze in zvišano koncentracijo amilaze.

Z mikroskopskim pregledom dokažemo prisotnost ploščatega epitela in ostankov hrane.

Kontaminanti v vzorcu plevralnega izliva

V vzorcu plevralnega izliva pri mikroskopskem pregledu lahko odkrijemo keratin-ske luske in ploščate epitelne celice s površine kože, fibroците in skeletno mišična vlakna, hepatocite, pigmentirane makrofage in celice alveolarnega epitela. Kontaminanti so posledica posega, pri katerem aspiriramo celice stene prsnega koša ali pljuč oziroma z iglo nabodemo jetra (slika 34).

Maligni plevralni izliv – sekundarne neoplazme

Splošne morfološke značilnosti malignih celic

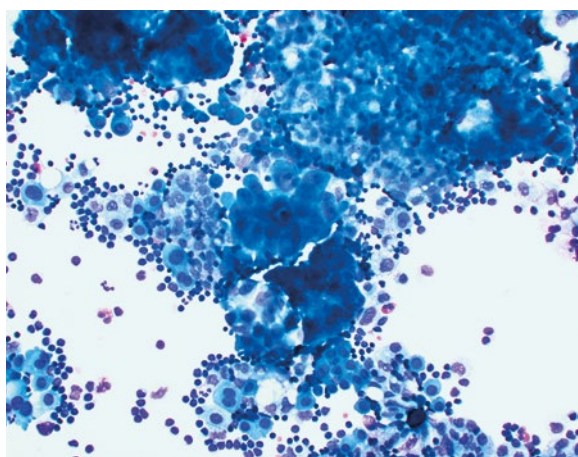
Morfologija malignih celic v plevralnem izlivu se nekoliko razlikuje od ostalih citoloških in histoloških vzorcev. Plevralni izliv predstavlja idealno gojišče, ki vsebuje vse elemente za rast in razmnoževanje celic. Morfologija celic v plevralnem izlivu je spremenjena. Celice so okroglaste, ponavadi z obilnejšo citoplazmo, zato ocena razmerja jedra in citoplazme ni vedno zanesljiva. Jedra imajo večinoma bolj ohranjeno morfologijo, z jasnimi značilnostmi malignih celic.

Pri opredelitvi malignega plevralnega izliva moramo biti pozorni na prisotnost tako imenovanih tujih celic (celic, ki ne sodijo v prostor seroznih votlin). Pozorni moramo biti tudi na morebitne znake diferenciacije celic kot so npr. poroženevanje, prisotnost vakuol, granul, inkluzij, pigmenta v citoplazmi. Ocena jeder lahko pomaga pri opredelitvi izvora tumorja (origa), ne igra pa odločilne vloge. Pri ocenjevanju upoštevamo obliko jedra, debelino in gladkost jedrne membrane, strukturo kromatina, prisotnost nukleolov ali inkluzij. Pri sekundarnih tumorjih opredelitev tipa neoplazme in origa le na osnovi morfologije malignih celic ni zanesljiva. Zato so imunocitokemična barvanja ključnega pomena za definitivno diagnozo.

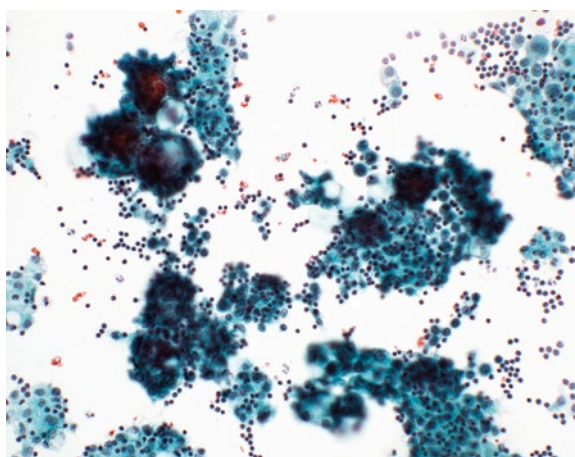
Plevra je lahko prizadeta tako s primarnimi kot s sekundarnimi tumorji. Od primarnih je najpogostejši maligni mezoteliom. Daleč najpogostejši sekundarni tumorji prisotni v plevralnem izlivu so karcinomi, od katerih so primarni pljučni na prvem mestu. Glede na morfologijo, so najpogostejši adenokarcinomi. Poleg tega v plevralnem izlivu lahko najdemo tudi neepitelijske tumorje kot so npr. melanomi, limfomi.

Adenokarcinom

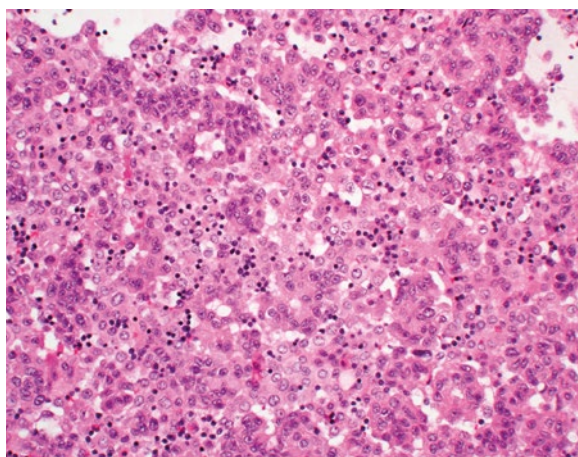
Adenokarcinomi v plevralnem izlivu kažejo podobne morfološke značilnosti ne glede na origo. Citoplazma je ponavadi nežna, lahko vsebuje vakuole ali granule. Jedra so pravilna, okroglasta ali ovalna, z nežno jedrno membrano. Kromatin je fin, lahko so prisotni nukleoli. Maligne celice lahko tvorijo tridimenzionalne skupine.



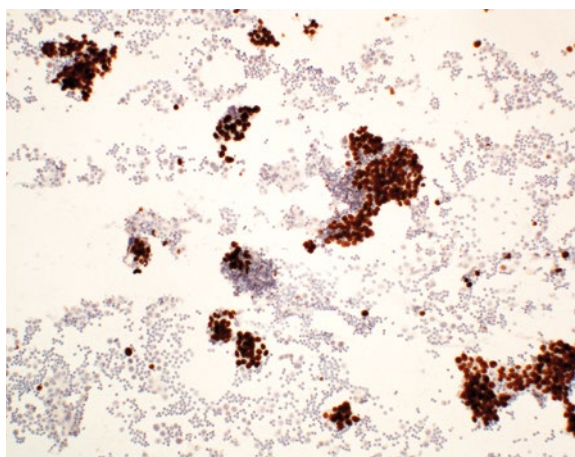
Slika 35. Adenokarcinom – pljuča, MGG



Slika 36. Adenokarcinom – pljuča, PAP

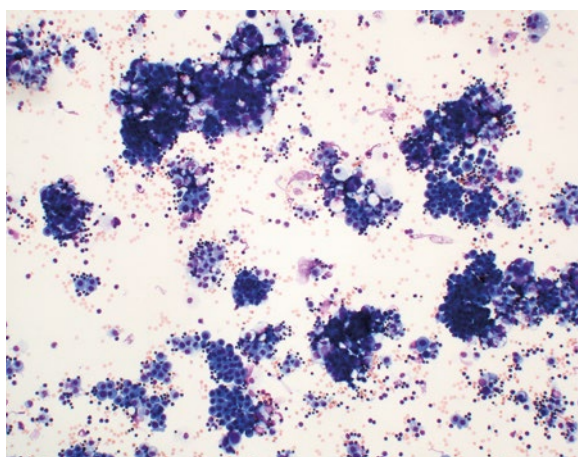


Slika 37. Adenokarcinom – pljuča, CB, HE

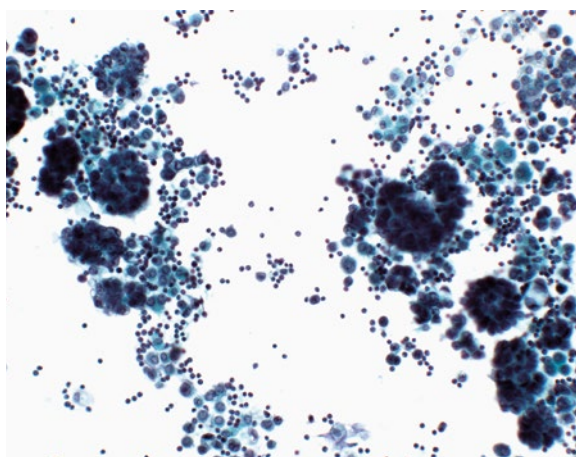


Slika 38. Adenokarcinom – pljuča, ICK, TTF1

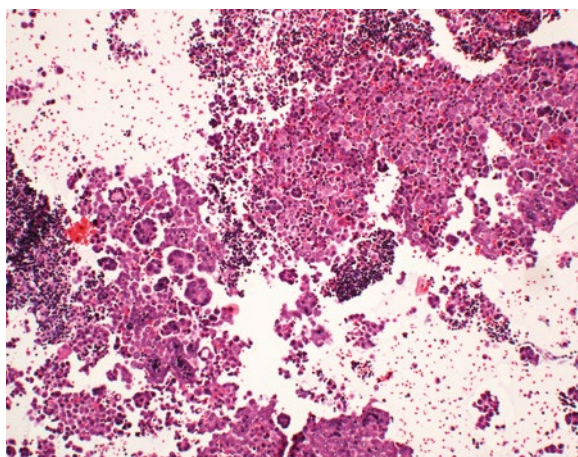
Morfološke značilnosti malignih celic pri adenokarcinomih iz različnih lokacij so zelo podobne, zato so klinični podatki zelo pomembni. Za potrditev diagnoze uporabljamo imunocitokemične preiskave, ki jih prilagajamo kliničnim podatkom. Uporabljamo označevalce, ki imajo visoko specifičnost (npr. TTF-1, GATA3, PAX-8, CDX-2, SATB2). Izogibamo se nespecifičnim adenokarcinomskim markerjem (npr. CK7, CK20, CK18, CK19, CEA) (slike 34 do 49).



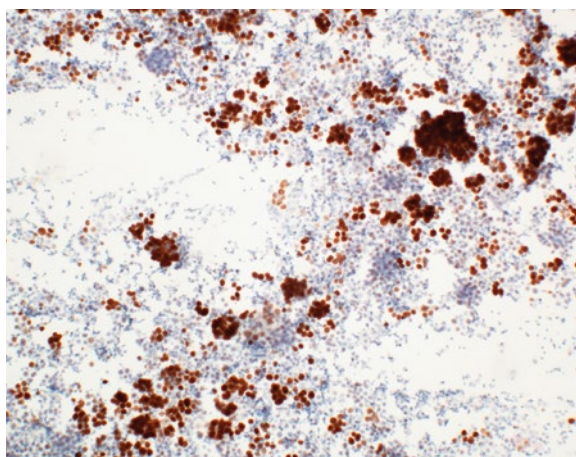
Slika 39. Adenokarcinom – dojka, MGG



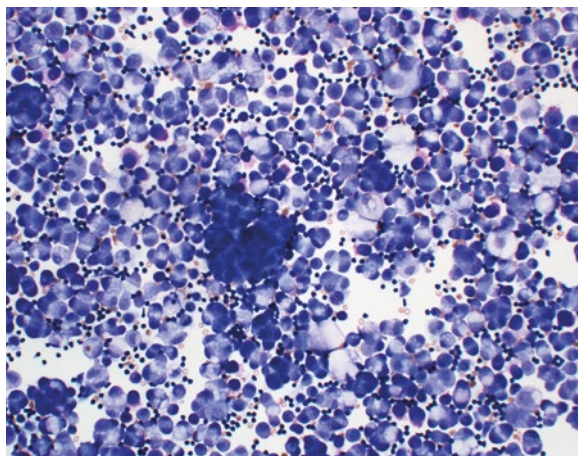
Slika 40. Adenokarcinom – dojka, PAP



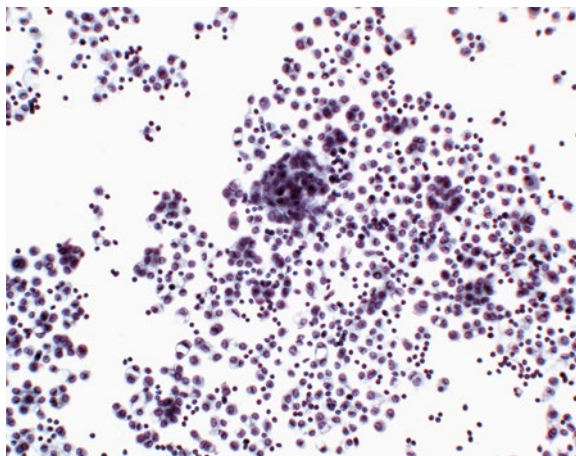
Slika 41. Adenokarcinom – dojka, CB, HE



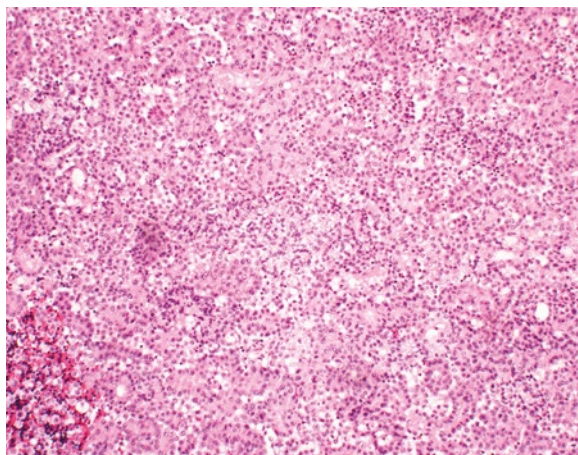
Slika 42. Adenokarcinom – dojka, ICK, GATA3



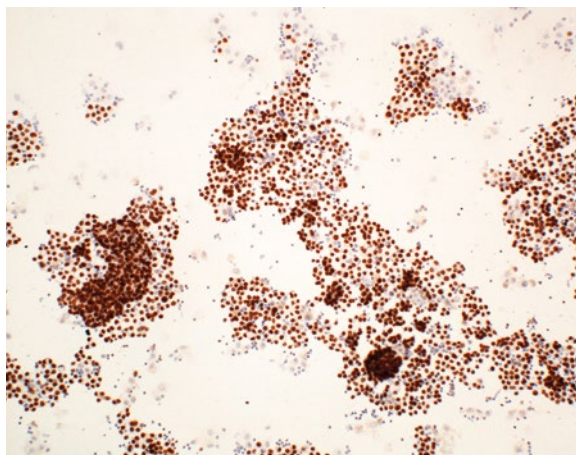
Slika 43. Adenokarcinom – rodila, MGG



Slika 44. Adenokarcinom – rodila, PAP



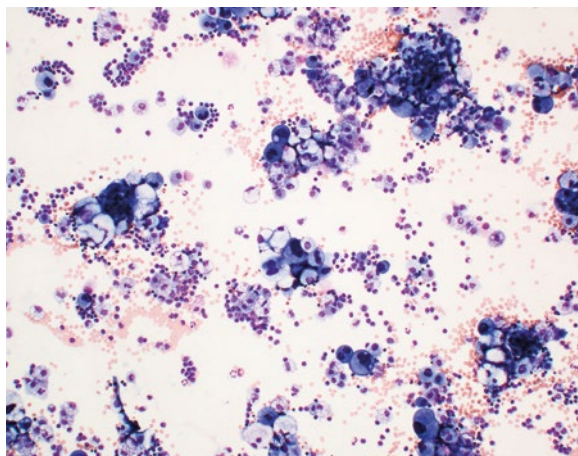
Slika 45. Adenokarcinom – rodila, CB, HE



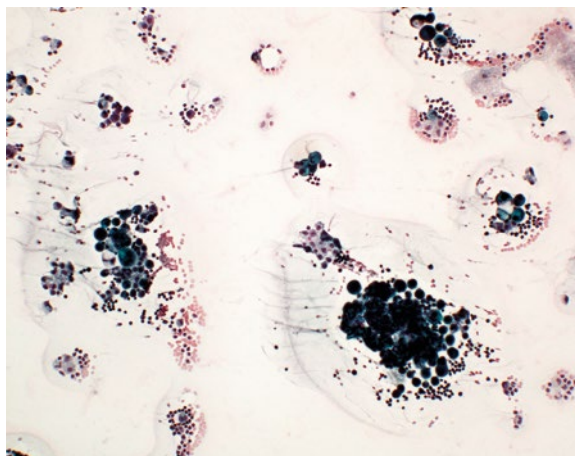
Slika 46. Adenokarcinom – rodila, ICK, PAX-8

CB – Citoblok

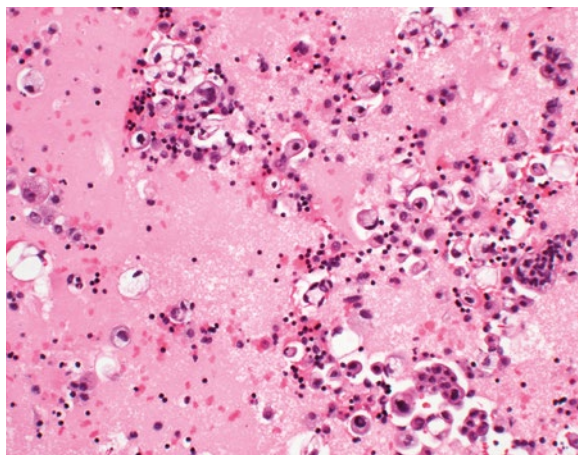
HE – Hematoksilin/eosin



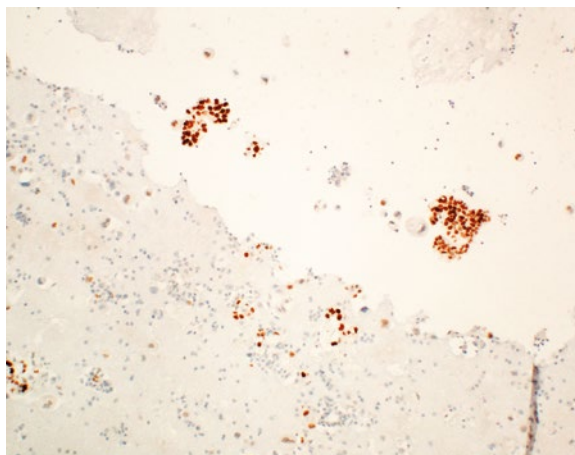
Slika 47. Adenokarcinom – prebavila, MGG



Slika 48. Adenokarcinom – prebavila, PAP



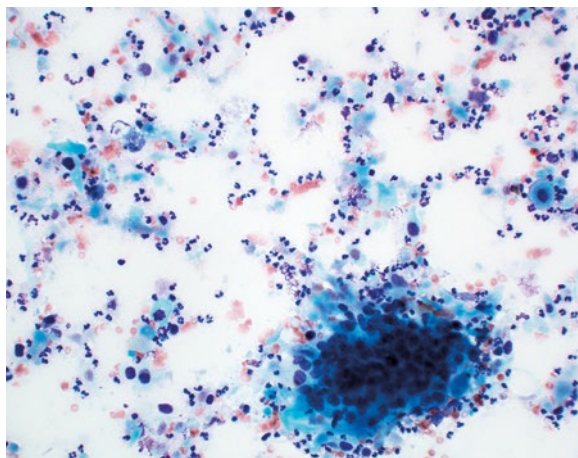
Slika 49. Adenokarcinom – prebavila, CB, HE



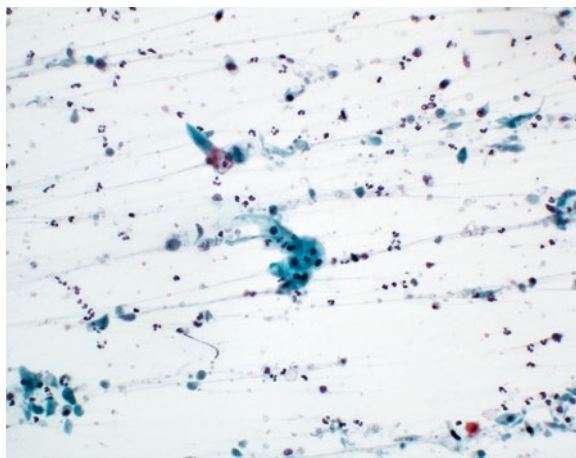
Slika 50. Adenokarcinom – prebavila, ICK, CDX-2

Skvamoznolični karcinom

Skvamoznolični karcinom ni tako pogosta najdba v vzorcih plevralnega izliva kot adenokarcinom. Karcinomske celice so ponavadi posamične, ovalne do poligonalne, z intenzivno bazofilno (azurno) citoplazmo (slika 51). V barvanju po Papanicolaou je le-ta intenzivno oranžna ali turkizna (slika 52). Jedra so ponavadi nepravilne oblike, hiperkromna, z grobim kromatinom. Z imunocitokemičnimi barvanji (p40)



Slika 51. Skvamoznocični karcinom, MGG



Slika 52. Skvamoznocični karcinom, PAP

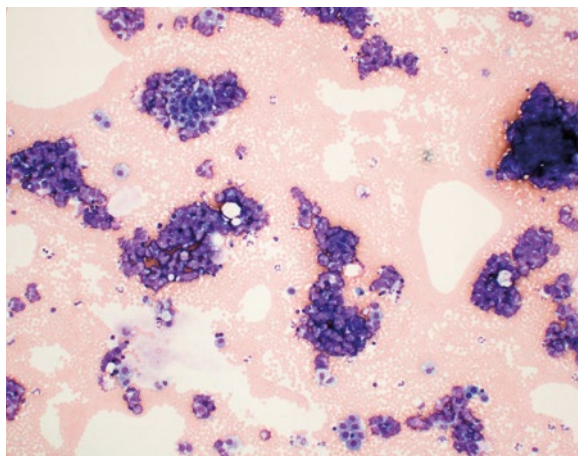
lahko potrdimo da gre za skvamoznocični karcinom. Origa skvamoznocičnega karcinoma na podlagi morfologije ni možno opredeliti. ICK barvanje na p16 (s HPV povezan karcinom) sugerira možnost origa v ORL regiji ali v rodilih.

Drobnocelični karcinom

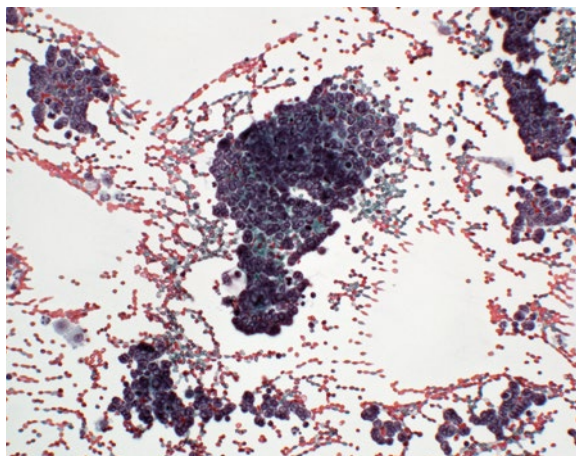
Origo drobnoceličnega karcinoma je najpogostejše v pljučih, zato ga relativno pogosto najdemo v vzorcih plevralnega izliva. Vidimo drobne, lahko poškodovane maligne celice s pičlo citoplazmo. Včasih je citoplazma nekoliko obilnejša kot v ostalih citoloških in histoloških vzorcih drobnoceličnega karcinoma, zaradi artefaktov v plevralnem izlivu. Jedra so hiperkromna z drobno zrničastim kromatinom. Prisotni so lahko tudi kompaktni skupki celic, v katerih je vidno vtiskovanje jeder (slike 53 in 54). Jedrni artefakti, ki so značilni za ostale citološke vzorce drobnoceličnega karcinoma, niso pogosto prisotni. Drobnocelični karcinom v plevralnem izlivu potrjujemo z imunocitokemičnimi preiskavami (nevroendokrini markerji: CD56 (slika 55), INSM1, Rb1 – izguba jedrnega izražanja, CK18 značilna točkasta reakcija (slika 56)).

Drugi karcinomi

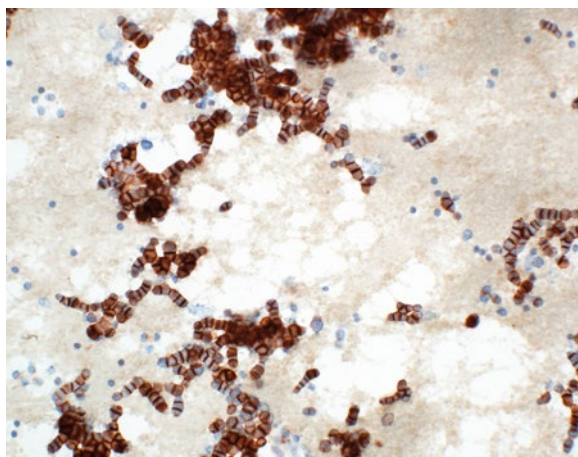
Tudi pri ostalih karcinomih so za opredelitev ključne imunocitokemične preiskave (slike 57 do 59).



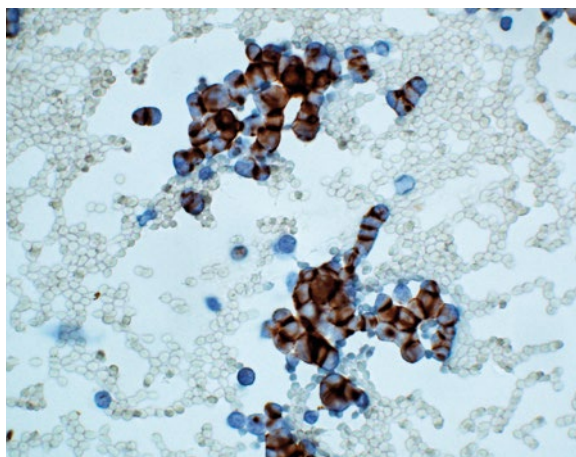
Slika 53. Drobnocelični karcinom, MGG



Slika 54. Drobnocelični karcinom, PAP



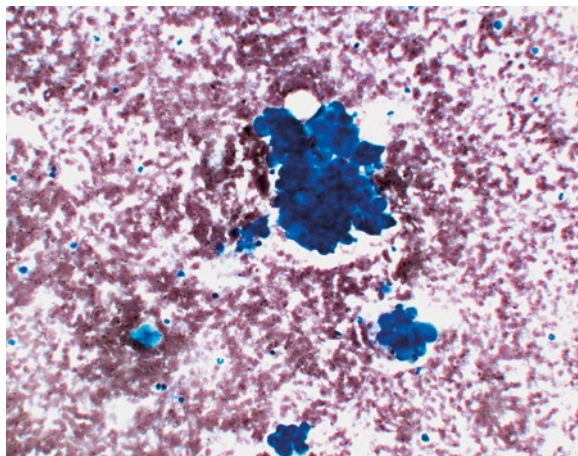
Slika 55. Drobnocelični karcinom, ICK, CD56



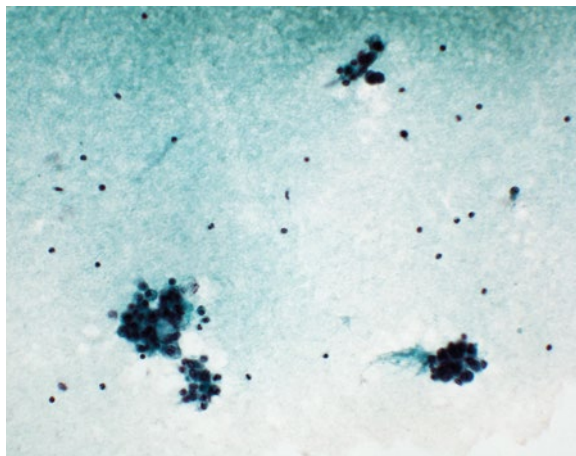
Slika 56. Drobnocelični karcinom, ICK, CK18

Melanom

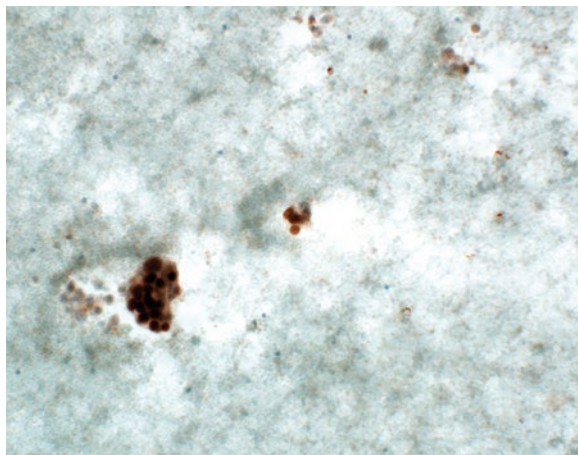
Melanomi veljajo za velike posnemovalce ('vsak tumor je lahko melanom'). Pogosto je prisoten izraziti pleomorfizem celic. Celice imajo dokaj intenzivno bazofilno citoplazmo, ki včasih vsebuje pigment rjavkaste barve. Jedra so tudi lahko pleomorfna, ponavadi z izrazitimi, eozinofilnimi nukleoli. Jedrna membrana je zadebeljena. Lahko so prisotne tudi dvo- in večjedrne celice (slike 60 do 62). Melanom



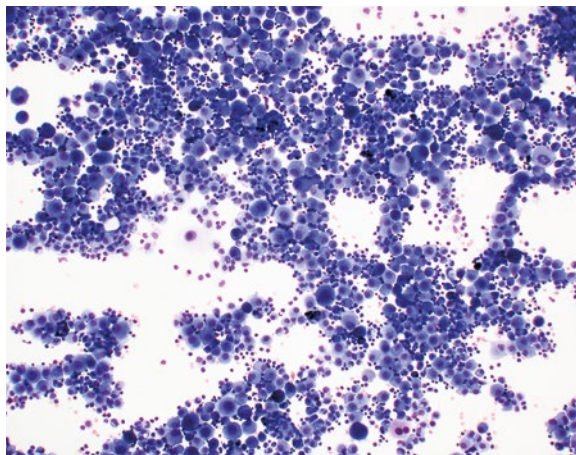
Slika 57. Karcinom ledvičnih celic, MGG



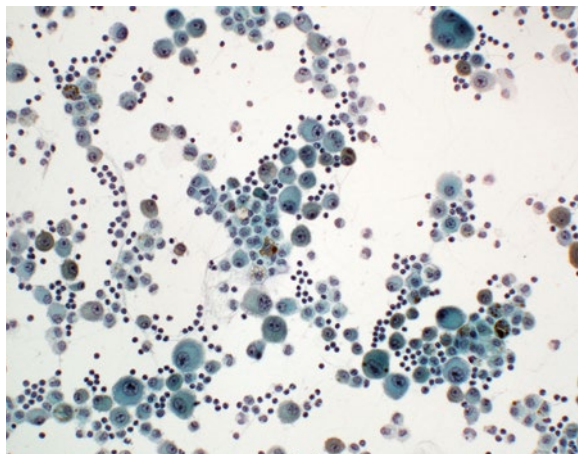
Slika 58. Karcinom ledvičnih celic, PAP



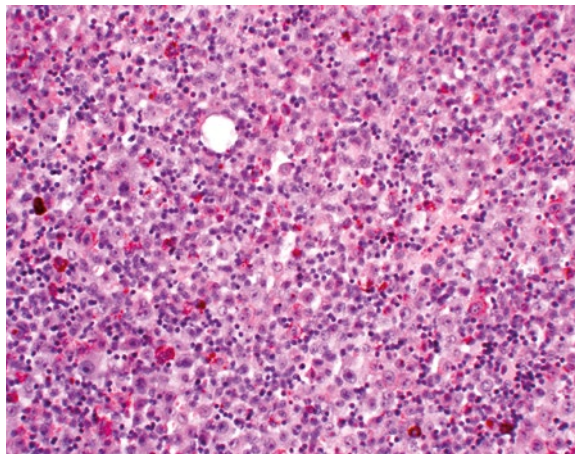
Slika 59. Karcinom ledvičnih celic, ICK, PAX-8



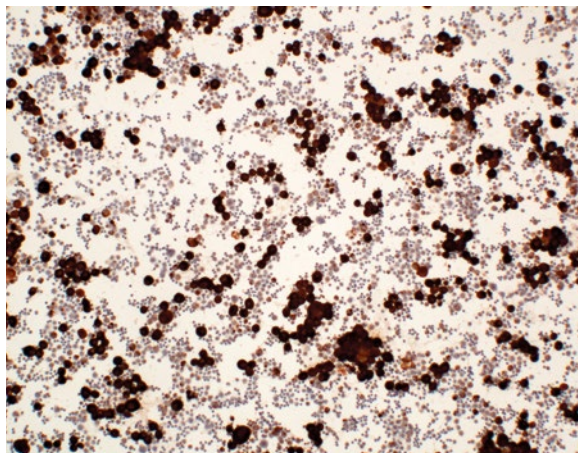
Slika 60. Melanom, MGG



Slika 61. Melanom, PAP



Slika 62. Melanom, CB, HE

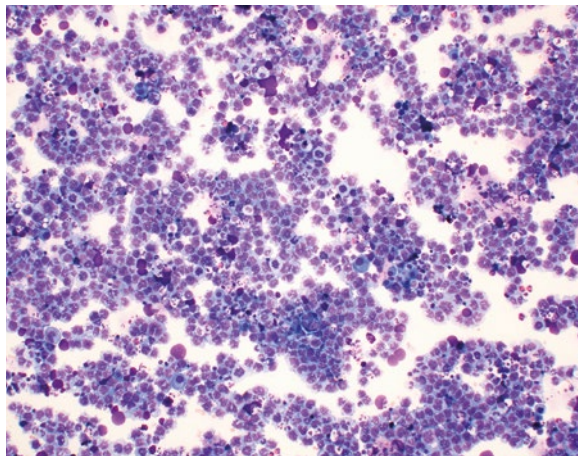


Slika 63. Melanom, ICK, HMB-45

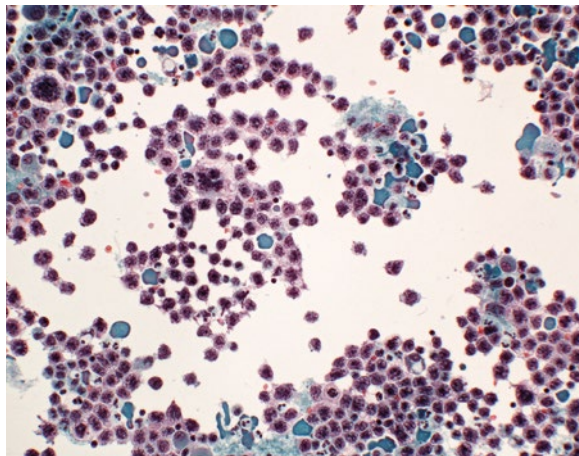
v plevralnem izlivu potrdimo z imunocitokemičnimi barvanji (S-100, SOX-10, HMB-45, MART-1) (slika 63).

Limfomi

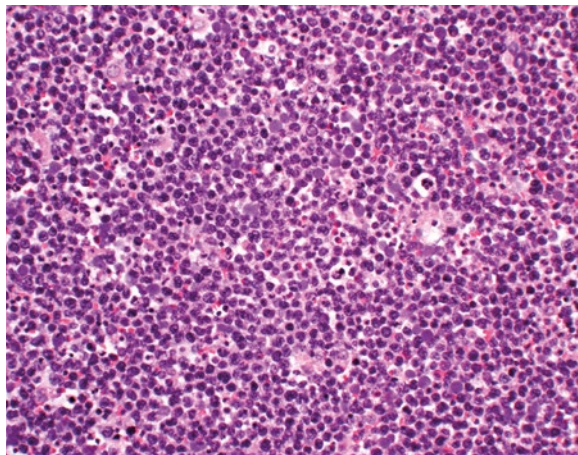
Številne limfatične neoplazme lahko prizadenejo tudi serozne votline. Plevralni izlivi ponavadi vsebujejo veliko število atipičnih limfatičnih celic. Morfološke značilnosti



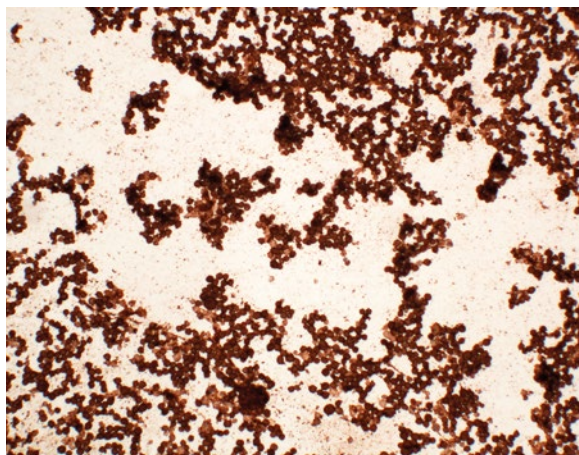
Slika 64. DVBCL, MGG



Slika 65. DVBCL, PAP

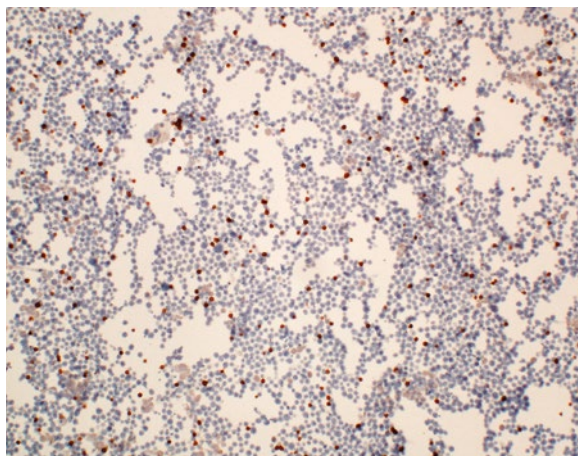


Slika 66. DVBCL, CB, HE

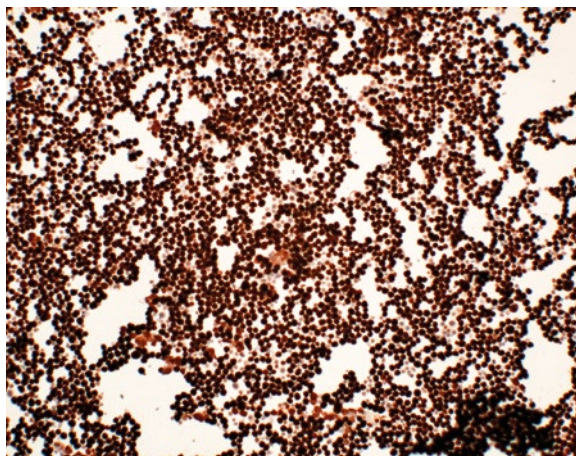


Slika 67. DVBCL, ICK, CD20

DVBCL – Difuzni velikocelični B celični limfom



Slika 68. DVBCl, ICK, CD3



Slika 69. DVBCl, ICK, Ki67

malignih/atipičnih limfatičnih celic so enake kot v citoloških in histoloških vzorcih limfomov iz drugih lokacij (slike 64 do 66). Drobnocelični limfomi predstavljajo poseben izziv, ker limfociti pogosto ne kažejo izrazitih atipij in jih večini težko razlikujemo od reaktivnih limfocitov. Pri opredelitvi limfocitnih populacij v plevralnem izlivu si pomagamo z imunocitokemičnimi barvanji (slike 67 do 69) in imunofenotipizacijo limfatičnih celic s pretočnim citometrom. Obstaja tudi redka oblika primarnega plevralnega velikoceličnega B celičnega limfoma – primarni efuzijski limfom.

Maligni plevralni izliv z neznanim origom

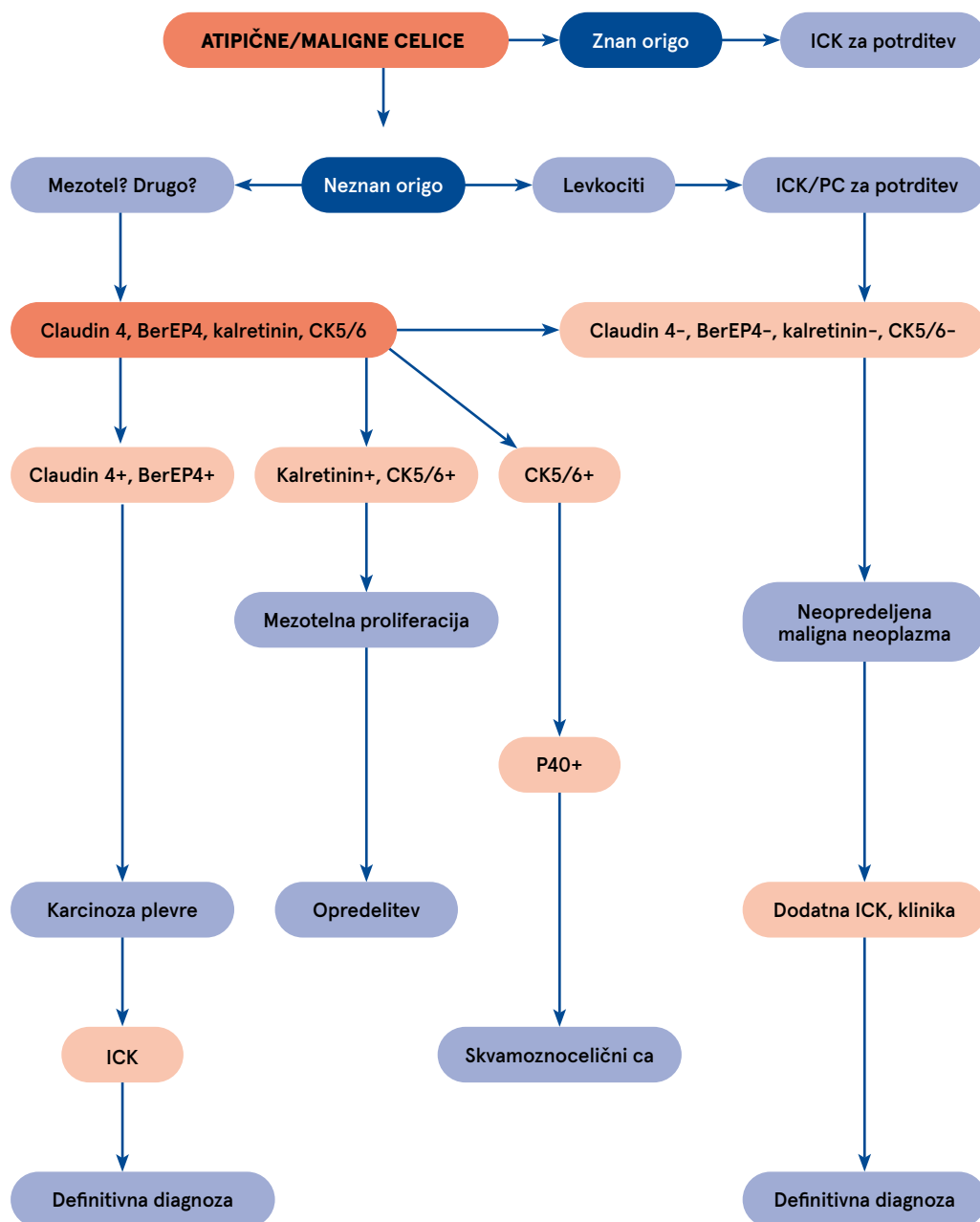
Klinični podatki in podatki slikovne diagnostike predstavljajo prvi korak pri opredelitvi origa pri malignem plevralnem izlivu. Iz različnih razlogov (vzorec je odvzet pred opravljeno ostalo diagnostiko, diagnostične preiskave so nekonkluzivne, drugi razlogi) kliničnih podatkov nimamo vedno na voljo. Zato vzorec obravnavamo kot maligni plevralni izliv z neznanim origom. Prvi korak je, da na podlagi morfologije in imunocitokemije opredelimo ali gre za sekundarno neoplazmo ali pa za mezotelno proliferacijo (tabela 6, slika 69). V tem primeru opravimo standardna imunocitokemična barvanja z dvema epitelnima in dvema mezotelnim markerjema. Ko se prepričamo, da ne gre za mezotelno proliferacijo, nadaljujemo z opredeljevanjem origa, z označevalci, ki so značilni za določene tipe tumorja ali pa za določene organe ali organske sisteme (tabela 7, slika 69).

Označevalci	Mezotel	Epitel
Claudin 4	Negativno	Pozitivno
BerEP4	Negativno	Pozitivno
MOC31	Negativno	Pozitivno
Kalretinin	Pozitivno	Negativno
CK5/6	neg/poz	neg/poz
D2-40	Pozitivno	Negativno
HEG1	Pozitivno	Negativno
WT1	Pozitivno	Negativno

Tabela 6. Imunocitokemični označevalci mezotelne in epitelne diferenciacije

Origo	Označevalci
Urotel	GATA3, CK7, CK20, uroplakin
Dojka	GATA3, ER, PR, SOX-10, GCDFP-15, mammaglobin
Prebavila	CDX-2, CK7, CK20, SMAD4
Ledvica	PAX-8, mRCC, CK7, CK20, KIT (CD117), CD10
Jetra	Arginase-1 (ARG1), glypican-3 (GPC3), HepPar-1
Pljuča (adenokarcinom)	TTF-1, napsin A
Rodila	PAX-8, ER, WT1, CK7, CK20
Prostata	NKX3.1, PSA, AMACR
Ščitnica	PAX-8, thyroglobulin, TTF1, CEA
Drobnocelični karcinom	CD56, INSM1, Rb1 izguba jedrnega izražanja
Priželjc	PAX-8, CD5, CD117 (KIT)
Melanom	SOX-10, S-100, HMB-45, MelanA, MITF

Tabela 7. Imunocitokemični označevalci za opredelitev origa pri malignem plevralnem izlivu



Slika 70. Algoritem za obravnavo malignega plevralnega izliva

Mezotelna proliferacija in mezoteliom

Normalna in reaktivna mezotelna celica

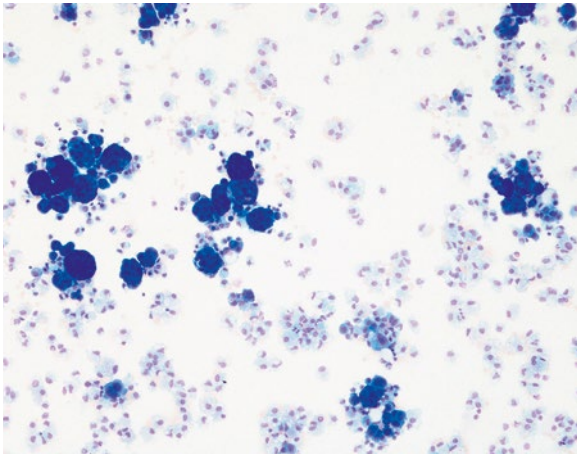
Normalne mezotelne celice so unimorfne, sploščene ali kubične oblike ter tvorijo en sam sloj na površini plevre. Vpliv različnih dejavnikov (krvavitev, vnetje, okužba, travma) vodi v morfološke spremembe, ki so lahko pestre in raznolike. Celice se lahko tudi pomnožijo (hiperplazija). Tako reaktivno spremenjene celice merijo do 50 μm .

Reaktivne spremembe obsegajo velik spekter citoloških variacij. Lahko pride do povečanja in večjega števila jeder, nukleoli so bolj prominentni, oblika jeder se spremeni. Celice se lahko urejajo v manjše skupine ali celo v papilarne strukture (slika 71). Citoplazma je včasih vakuolizirana, jedro je potisnjeno na rob, kar da celicam videz pečatnic, zato jim v takem primeru rečemo psevdopečatnice. Zaradi svoje sposobnosti fagocitoze je v plevralnem izlivu včasih težko ločiti med histiociti in mezotelom. Če izključimo možnost malignega procesa na osnovi morfologije je natančna ločitev med obema manj pomembna.

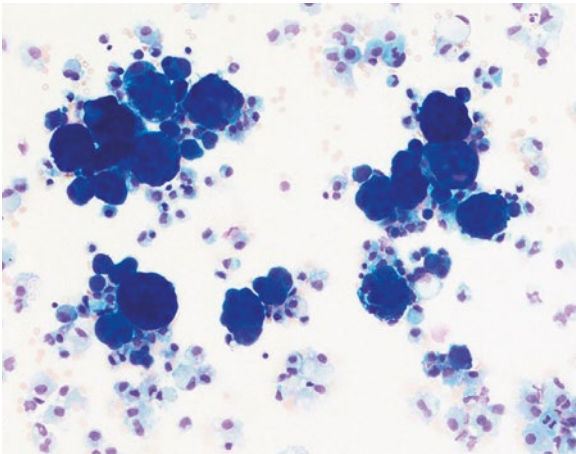
Ko se urejajo v manjše skupine so le-te okroglaste, mezotelne celice se navidezno razporedijo okoli centralno ležečega »roza jedra« (slika 72).

Atipična mezotelna proliferacija

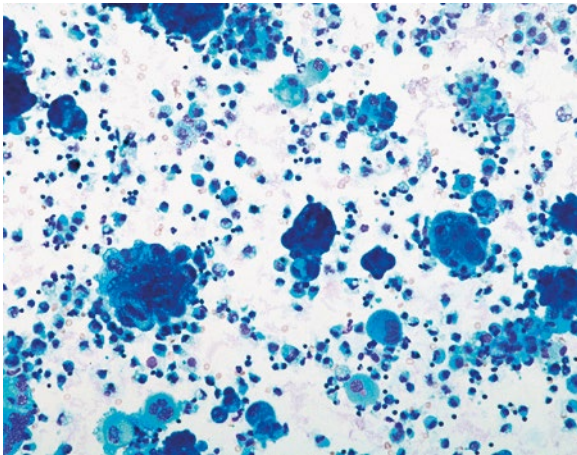
O atipiji govorimo, ko opazimo citomorfološke spremembe, ki presegajo prej opisane reaktivne spremembe. V prvi vrsti ocenjujemo razmerje velikosti med jedrom in citoplazmo, morebitno hiperkromazijo, makronukleole, grudast kromatin, bolj poudarjen pleomorfizem. Če so mezotelne celice večje, številnejše in tvorijo velike skupine moramo prav tako razmišljati o možnosti maligne mezotelne proliferacije in tak izliv obravnavati temu primerno (slika 73).



Slika 71. Skupine okroglastih unimorfnih celic, ki morfološko ustrezajo mezotelu (MGG)



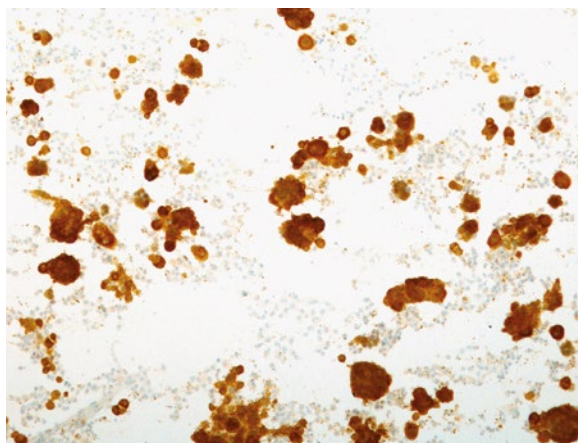
Slika 72. Urejanje celic v skupine okoli »roza jedra« (MGG)



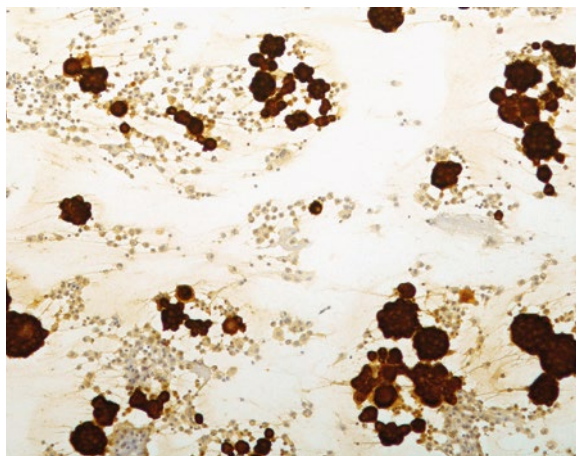
Slika 73. Večje skupine večjih mezotelnih celic z nepravilno oblikovanimi jedri (MGG)

Mezotelni	Epitelni
kalretinin	Claudin 4
CK5/6	Moc31
HEG1	BerEp4
WT1	CEA
D2-40	

Tabela 8. ICK označevalci za razlikovanje med epitelom in mezotelom



Slika 74. Mezotelne celice so pozitivne za kalretinin

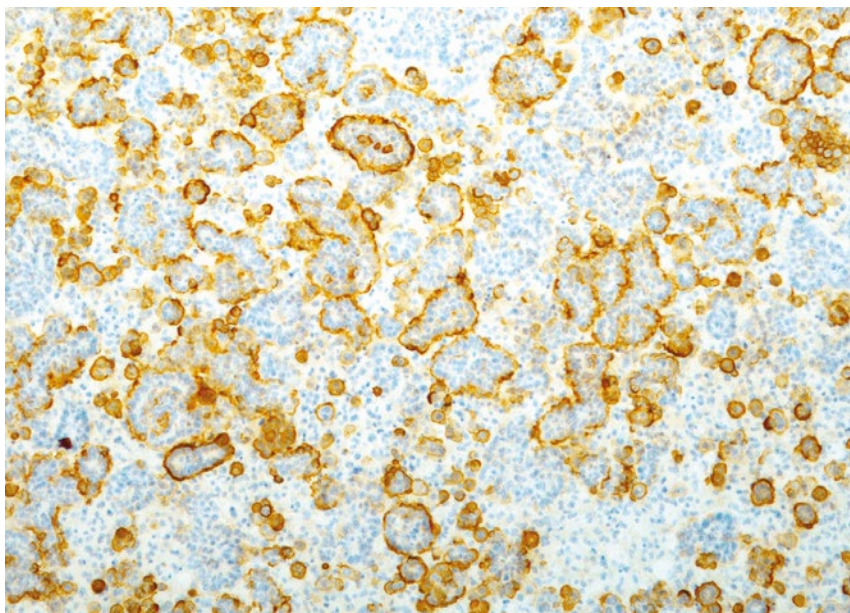


Slika 75. CK5/6 pozitivnost v mezotelnih skupinah

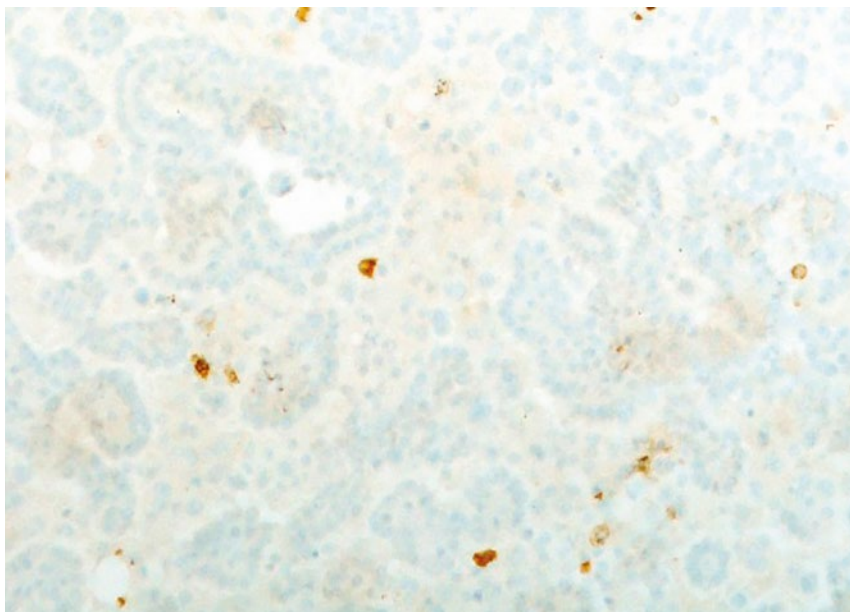
Zgolj citološka opredelitev mezotelne morfologije (prisotnost medceličnega okna, mikrovilusov itd, glej tudi poglavje 3) ni zadostna. Pri vzorcih z izraženo atipijo moramo dokazati mezotelno diferenciacijo. V ta namen se poslužujemo z imunocitokemičnimi barvanji. Za zanesljivo opredelitev moramo uporabiti vsaj dva mezotelna označevalca in dva nemezotelna oziroma epitelna označevalca. Med mezotelne označevalce štejemo kalretinin, CK5/6, HEG1, WT1, D2-40. Epitelni označevalci so med drugimi claudin 4, BerEp4, Moc31 (tabela 8). Za katero kombinacijo se bomo odločili je odvisno od izkušenj s posameznimi označevalci in njihovo dostopnostjo v laboratoriju.

Pri interpretaciji moramo upoštevati možnost nespecifične reakcije. Določeni označevalci namreč lahko označijo tako mezotelne kot karcinomske celice (npr. Moc31). V takih primerih lahko panel razširimo še z ostalimi zgoraj navedenimi označevalci.

CK5/6 je pozitiven v skvamoznoceličnem karcinomu, vendar izjemna redkost zasevanja teh tumorjev v plevro ter sočasna pozitivnost na kalretinin omogoča zanesljivo razlikovanje med mezoteliomom in karcinomom (sliki 74 in 75). V primeru dvoma lahko dodamo v panel še p40.



Slika 76. EMA je pozitivna v mezotelnih skupinah, kar kaže na maligno proliferacijo



Slika 77. Izguba izražanja dezmina v skupinah malignih mezotelnih celic

Če smo v plevralnem izlivu ocenili, da gre za atipične celice in smo imunocitokemično dokazali mezotelno diferenciacijo, lahko postavimo diagnozo »atipična mezotelna proliferacija« in svetujemo odvzem tkivnega vzorca za nadaljnjo diagnostiko.

V primeru, da imamo v laboratoriju možnost dodatnih imunocitokemičnih preiskav lahko le-te uporabimo za natančnejšo opredelitev procesa tudi v citološkem vzorcu. O tem bo govora v naslednjem podpoglavju.

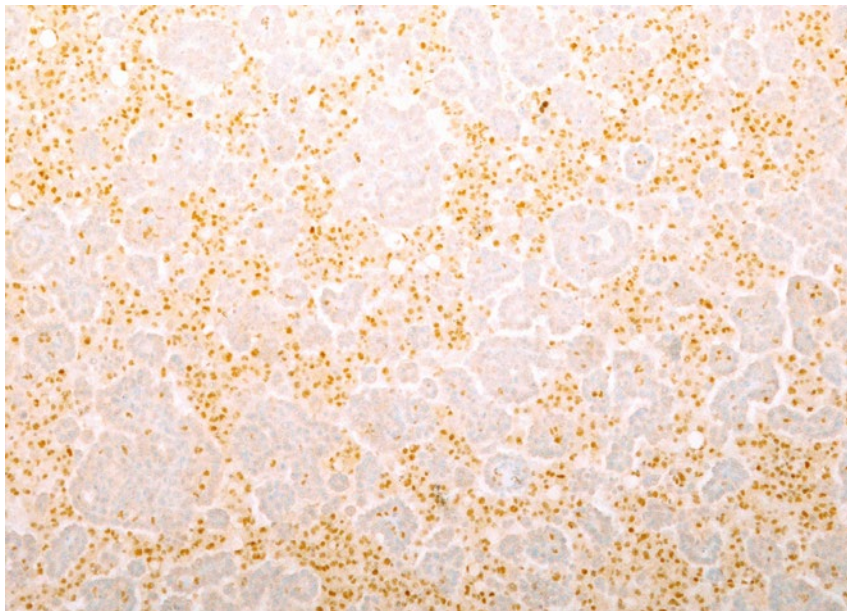
Mezoteliom

Mezoteliom je redek tumor (manj kot 2 % vseh tumorjev), vendar je najpogostejši primarni maligni tumor plevre. Svetovna incidenca je približno 30.000. Glavni dejavnik tveganja za razvoj mezotelioma je izpostavljenost azbestu. ZDA in EU so prepovedale uporabo azbesta, se pa ta še vedno uporablja v velikih količinah v številnih državah, kjer ni zakonskih omejitev (Rusija, Indija, Kitajska in druge).

Večino mezoteliomov diagnosticiramo v glavnem iz tkivnih vzorcev, vendar je danes možno postaviti skoraj enakovredno diagnozo tudi iz citološkega celičnega vzorca plevralnega izliva.

V histologiji je poleg diferenciacije glavni kriterij za opredelitev maligne mezotelne proliferacije invazija v mehka tkiva prsne stene. Tega seveda v citološkem vzorcu ne moremo oceniti, zato uporabimo dodatne označevalce. Nekoč smo uporabljali dezmin in EMA. EMA je pozitivna v malignih mezotelnih celicah, medtem ko je dezmin negativen (izguba izražanja v primerjavi z benignim mezotelom) (sliki 76 in 77).

Nekatere študije so dokazale visoko specifičnost in senzitivnost obeh markerjev (več kot 90 %). V zadnjem desetletju sta se dva nova markerja pokazala kot izjemno specifična (skoraj 100 %), vendar nekoliko manj senzitivna. BAP1 in MTAP se izražata v večini zdravih celic, v mezoteliomu pa je prisotna izguba izražanja. BAP1 (BRCA-1 associated protein) izražanje se izgubi s homozigotno delecijo 9p21 in genom CDKN2A. MTAP je gen, ki se nahaja v isti regiji in je pogosto izgubljen skupaj s CDKN2A. Glede na to, da je homozigotna delecija CDKN2A pogost dogodek pri razvoju mezotelioma, sta ta dva markerja zanesljiva pri dokazovanju malignosti mezotelnih celic.



Slika 78. Izguba jedrnega izražanja BAP1 v mezoteliomu



Slika 79. Izguba tako citoplazemskega kot jedrnega izražanja MTAP

BAP1 je jedrni označevalec in ocena je enostavna in zanesljiva (slika 78). Interpretacija MTAP je nekoliko zahtevnejša, saj lahko pride do izgube tako jedrnega kot citoplazemskega izražanja. Za opredelitev malignega procesa je dovolj, da pride do izgube barvanja v citoplazmi v vsaj 70 % mezotelnih celic (slika 79).

Z uporabo teh označevalcev lahko dopolnimo in nadgradimo našo diagnozo ter izvid izdamo kot »mezoteliom«. Žal je izguba teh markerjev prisotna v 65 % ali celo manjšem deležu vseh mezoteliomov, kar pomeni da ob pozitivnem (ohranjenem) BAP1 in MTAP je najbolj smiselno ostati pri diagnozi atipične mezotelne proliferacije.

V našem laboratoriju uporabljamo pretežno BAP1, saj je ohranjen v vseh normalnih celicah in je interpretacija izgube v mezotelu enostavnejša v primeru, da gre za zelo celularen vzorec, kjer so prisotne tudi druge celice (vnetnice) in je povečana možnost nespecifične reakcije citoplazemskih ali membranskih markerjev (dezmin, EMA itd.) v histiocitih ali v delno degeneriranih celic.

Vse omenjene preiskave lahko opravimo tudi v citobloku v primeru, ko imamo manj celularne vzorce ali če želimo imeti vzorec shranjen za morebitne kasnejše dodatne preiskave.

Klasifikacija mezotelnih tumorjev plevre

V peti izdaji WHO klasifikacije torakalnih tumorjev so tumorji plevre razvrščeni v naslednje kategorije:

- Adenomatoidni tumor plevre
- Dobro diferencirani papilarni mezotelni tumor plevre (angl. WDPMT).
- In situ mezoteliom
- Lokalizirani mezoteliom
- Difuzni mezoteliom

Adenomatoidni tumor je benigni, izjemno redek tumor, ki ga v citologiji ne moremo diagnosticirati. Enako velja tudi za dobro diferencirani papilarni mezotelni tumor plevre.

In situ mezoteliom je preinvazivna faza mezotelioma in se histološko kaže z blago atipijo mezotelnih celic in izgubo izražanja BAP1. Ponavadi ni proliferacije/hiperplazije mezotela, radiološko ni vidnih sprememb, prav tako torakoskopsko. Kaže se s ponavljajočimi plevralnimi izlivmi. Diagnoza je izključno histološka.

Lokalizirani in difuzni mezoteliom sta ekstrema spektra iste bolezni.

Ločimo tri histološke podtipe:

- Epiteloidni (najpogostejši)
- Bifazni
- Sarkomatoidni (redko, pogostejša izguba MTAP, redkeje BAP1)

V plevralnem izlivu večinoma ne moremo zanesljivo ločiti med oblikami, saj se morfološke značilnosti celic v tekočinskih vzorcih spremenijo, sarkomatoidni mezoteliom pa pogosto izgubi tudi mezotelne markerje, zato je bolj primerno opraviti podtipizacijo v tkivnem vzorcu.

Priporočena literatura

1. **American College of Surgeons Committee on Trauma.** ATLS®: Advanced Trauma Life Support® Student Course Manual. 10th ed. Chicago: American College of Surgeons; 2018.
2. **Arnold DT, de Fonseca D, Perry S, Morley A, Harvey JE, Medford A, et al.** Investigating unilateral pleural effusions: the role of cytology. *Eur Respir J.* 2018;52(5):1801254.
3. **Bedawi EO, Ricciardi S, Hassan M, Gooseman MR, Asciak R, Castro-Añón O, et al.** ERS/ESTS statement on the management of pleural infection in adults. *Eur Respir J.* 2023;61(2):2201062.
4. **Chandra A, Crothers B, Kurtycz D, Schmitt F.** The International System for Serous Fluid Cytopathology. Cham: Springer Nature; 2020.
5. **Gabrič S, Kaštelan D, Kern I, Eržen D.** Vpliv parametrov citocentrifugiranja na diferenciacijo celic. In: Kobe JM, editor. Zbornik strokovnih prispevkov 1. kongres tehnikov laboratorijske medicine; 2000 May 12–13; Čatež. Ljubljana: Slovensko združenje za klinično kemijo; 2000. p. 23–4.
6. **Grigoriadou GI, Esagian SM, Ryu HS, Nikas IP.** Molecular profiling of malignant pleural effusions with next generation sequencing (NGS): evidence that supports its role in cancer management. *J Pers Med.* 2020;10:206.
7. **Hooper C, Lee YC, Maskell N; BTS Pleural Guideline Group.** Investigation of a unilateral pleural effusion in adults: British Thoracic Society Pleural Disease Guideline 2010. *Thorax.* 2010;65(Suppl 2):ii4–17.
8. **Kalomenidis I, Light RW.** Eosinophilic pleural effusions. *Curr Opin Pulm Med.* 2003;9:254–60.
9. **Kern I, editor.** Citopatologija plevralnega izliva. Skripta tečaja citopatologije plevralnega izliva. Golnik: Bolnišnica Golnik, Klinični oddelek za pljučne bolezni in alergijo, Laboratorij za citologijo in patologijo; 2004.
10. **Kloboves Prevodnik V, Ledinek Ž, Rode A, Galjević G.** Plevralni, abdominalni in perikardialni limfocitni izliv. *Onkologija.* 2025;1:26–33.
11. **Kushwaha R, Shashikala P, Hiremath S, Basavaraj HG.** Cells in pleural fluid and their value in differential diagnosis. *J Cytol.* 2008;25:138–43.
12. **Li C, Kazzaz FI, Scoon JM, Estrada-Y-Martin R, Cherian SV.** Lymphocyte predominant exudative pleural effusions: a narrative review. *Shanghai Chest.* 2022;6:5–11.
13. **Light RW.** Pleural effusion. *N Engl J Med.* 2002;346:1971–7.
14. **Light RW.** Light's Pleural Diseases. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2013.
15. **Lin J, Gu Y, Du R, Deng M, Lu Y, Ding Y.** Detection of EGFR mutation in supernatant, cell pellets of pleural effusion and tumor tissues from non-small cell lung cancer patients by high resolution melting analysis and sequencing. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(12):8813–22.

Priporočena literatura

16. Meglič A, Adamič K, Dimitrić V, Nikolić V, Rozman A, Marc Malovrh M. Merjenje tlakov plevralnega prostora med razbremenilno punkcijo (plevralna manometrija) kot varna in objektivna metoda pri ocenjevanju vpliva plevralnega izliva na izražanje simptomov. *Zdrav Vestn.* 2022;91(3-4):91-9.
17. Mermolja M, Debeljak A, Rutar-Zupančič M. Štetje in diferenciacija celic v plevralnih izlivih. *Zdrav Vestn.* 1995;64:345-8.
18. Nemanič T, Rozman A, Adamič K, Marc Malovrh M. Biomarkers in routine diagnosis of pleural effusions. *Zdrav Vestn.* 2018;87:15-21.
19. Noppen M, de Waele M, Gucht KV, d'Haese J, Gerlo E, Vincken W. Volume and cellular content of normal pleural fluid in humans examined by pleural lavage. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:1023-6.
20. Porcel JM, Light RW. Pleural fluid analysis: are Light's criteria still relevant after half a century? *Clin Chest Med.* 2021;42:599-609.
21. Roberts ME, Rahman NM, Maskell NA, et al. British Thoracic Society guideline for pleural disease. *Thorax.* 2023;78:1143-56.
22. Rooper LM, Ali SZ, Olson MT. A minimum fluid volume of 75 mL is needed to ensure adequacy in a pleural effusion: a retrospective analysis of 2540 cases. *Cancer Cytopathol.* 2014;122(9):657-65.
23. Sorolla MA, Sorolla A, Parisi E, Salud A, Porcel JM. Diving into the pleural fluid: liquid biopsy for metastatic malignant pleural effusions. *Cancers (Basel).* 2021;13:2798.
24. Torous VF. How much is enough: investigation of pleural fluid cytology findings related to sample volume. *J Am Soc Cytopathol.* 2021;xx:1-8.
25. Unger T, Kirbiš Srebotnik I. Laboratorijske tehnike v patologiji. Ljubljana: iz družba za založništvo, izobraževanje in raziskovanje d.o.o.; 2024.

Citopatologija plevralnega izliva

Urednik zbornika

Izidor Kern

Avtorji

Katja Adamič, Simona Gabrič, Izidor Kern, Mile Kovačević, Mitja Rot,
Gregor Vlačič

Recenzentka

Margareta Fležar Strojan

Organizacijski odbor

Izidor Kern, Mile Kovačević, Gregor Vlačič

Oblikovanje

Maja Rebov

Organizator

Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik

Izdajatelj in založnik

Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik

Kraj in leto izdaje

Golnik, 2026

1. elektronska izdaja

Dostopno na

https://www.klinika-golnik.si/arhiv-gradiv-zbornikov/Zbornik-Citopatologija_plevralnega_izliva-2025

Zbornik je nastal v okviru tečaja Citopatologija plevralnega izliva, ki je potekal 15. marca 2025 na Golniku.

To delo je objavljeno pod licenco CC BY-NC 4.0.

© Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik

Tekst © Kern in avtorji, 2025

