

ЭТАПЫ ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ (С ПРИМЕНЕНИЕМ ИЦХ) ВЫПОТНЫХ ЖИДКОСТЕЙ

**К.С. ПАВЛЮК¹, М.Г. ЛЕОНОВ^{2,3}, А.В. АКОБЯН¹, Т.В. СИНИЦКАЯ¹,
О.В. ГОСПИРОВИЧ¹, Е.А. АРТЕМОВА¹, Ж.Б. ЕЛЕУБАЕВА⁴**

¹ГБУЗ «Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница №1 им. проф. С.В. Очаповского», Краснодар, Российская Федерация;

²ГБУЗ «Онкологический диспансер №3», Новороссийск, Российская Федерация;

³ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет», Краснодар, Российская Федерация;

⁴АО «Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии», Алматы, Республика Казахстан

АННОТАЦИЯ

Актуальность: Цитологические критерии опухолей в выпотных жидкостях связаны с определенными субъективными трудностями, одной из которых является дифференциальная диагностика клеток пролиферирующего мезотелия и клеток аденокарциномы.

Цель исследования – повышение информативности цитологической диагностики в условиях многопрофильной больницы.

Методы: За период 2018-2021 гг. цитологическому исследованию было подвергнуто 10 082 образца выпотных жидкостей серозных полостей (плевральной – 8 166 (81%), абдоминальной – 1 512 (15%), перикардальной – 404 (4%)). Проводилось микроскопическое исследование традиционных препаратов, в сложных диагностических случаях выполнялось иммуноцитохимическое (ИЦХ) исследование.

Результаты: Традиционный цитологический метод анализа выпотных жидкостей показал наличие метастатических поражений серозных полостей у женщин в 672 случаях (58%), главным образом за счет прогрессирования рака молочной железы (26%). У мужчин в основном регистрировались плевриты за счёт метастазирования аденокарциномы легкого – 266 случаев (23%). Применение ИЦХ исследования повышало диагностическую точность цитологического метода с 62% до 93% и специфичность с 95% до 99%.

Заключение: Разработан алгоритм проведения ИЦХ исследований, отличающихся по количеству используемых панелей моноклональных антител для определения гистологической формы и органа – источника опухоли. В конкретных случаях проведения ИЦХ исследований с 2-3 моноклональными антителами может быть вполне достаточно для подтверждения гистологической формы опухоли. При необходимости, можно выполнить дополнительные ИЦХ исследования без значительных потерь времени на получение результатов.

Ключевые слова: иммуноцитохимия (ИЦХ), моноклональные антитела, злокачественные новообразования, плевральная жидкость, асцитическая жидкость, традиционная цитология, жидкостная цитология.

Актуальность: Значимость цитологического исследования в современной медицине бесспорна. В отличие от гистологического оно выполняется не на тканевом, а на клеточном уровне. Клиническая цитология отличается от других методов клинической лабораторной диагностики тем, что ее целью является выявление атипичных клеток с установлением цитоморфологического диагноза при неопухолевых и опухолевых процессах. Определение на клеточном уровне признаков злокачественности экссудатов связана с некоторыми трудностями, а именно, субъективными, одной из которых является дифференциальная диагностика клеток мезотелия с признаками пролиферации и клеток, подозрительных по принадлежности к аденокарциноме. Выраженная реактивность серозного покрова полостей, десквамация и регенеративная способность мезотелия обуславливают большое разнообразие клеточного состава.

Необходимо отметить и тот факт, что нередко злокачественные клетки в экссудатах серозных полостей не удается обнаружить даже при поздних стадиях заболевания в силу недостаточного их количества в исследуемом материале [1]. В последнее время широкое внедрение метода жидкостной цитологии и иммуноцитохимического (ИЦХ) исследо-

вания позволило значительно снизить фактор субъективизма [2].

В связи с этим очень важно организовать оптимальный менеджмент в морфологических и клинко-диагностических (КДЛ) лабораториях, установить цитологические критерии дифференциальной диагностики опухолей при исследовании выпотных жидкостей и разработать алгоритм проведения ИЦХ исследований. Признаки атипичности клеток при различных поражениях перекрещиваются с признаками злокачественности, что создает определенные трудности в идентификации природы поражения и может служить причиной ложноположительного или ложноотрицательного цитологического диагноза [3, 4].

Задача цитолога – донести до клинициста информацию о том, как важно соблюдать и выполнять пакет инструкций, сформированный в цитологическом отделе КДЛ, который представляет алгоритм направления биологического материала, приготовления цитологических препаратов. А также, проведения микроскопического исследования и интерпретации полученных результатов.

Цель исследования – повышение информативности цитологической диагностики в условиях многопрофильной больницы.

Материалы и методы: Работа выполнена на базе Центра грудной хирургии (ЦГХ) ГБУЗ «НИИ – ККБ №1 им. проф. С.В. Очаповского» в КДЛ. За период 2018–2021 гг. цитологическому исследованию было подвергнуто 10 082 выпотные жидкости серозных полостей (плевральной – 8 166 (81%), абдоминальной – 1 512 (15%), перикардиальной – 404 (4%)) пациентов, находящихся на обследовании в поликлинических и других стационарных отделениях больницы по поводу подозрения на наличие злокачественного новообразования органов грудной клетки (чаще рака легкого).

Перед проведением пункции серозных полостей для оценки распространенности опухолевого процесса всем пациентам выполнялось комплексное обследование с использованием лучевых (ультразвуковое сканирование, рентгенологическое, КТ, МРТ) и других диагностических методов. Пункции серозных полостей с диагностической и/или лечебной целью выполняли врачи-хирурги по общепринятым методикам.

К полученной выпотной жидкости добавляли антикоагулянт (раствор цитрата натрия 5% в расчёте 5 мл на 100 мл жидкости или гепарин 1 мл (5 000 МЕ) на 500 мл жидкости). При этом весь полученный экссудат направляли для исследования в КДЛ. На первом преаналитическом этапе исследования медицинским лабораторным техником оценивали физико-химические свойства, наличие осад-

ка до и после центрифугирования на обычной центрифуге. Стеклопрепараты для ИЦХ исследования готовили двумя методами: жидкостным (с использованием предметных стекол с поли-L-лизинным покрытием) на цитоцентрифуге Cytospin 4 и традиционным. Полученные микропрепараты фиксировали по методу Май-Грюнвальда и окрашивали по Романовскому-Гимзе.

На аналитическом этапе проводили микроскопическое исследование традиционных препаратов, в сложных диагностических случаях выполняли ИЦХ исследование с использованием панели моно- или поликлональных антител различных фирм-производителей. Чаще всего использовали следующие панели антител: к общим цитокератинам (AE1/AE3), эпителиальному антигену Ber-EP4, раково-эмбриональному антигену (РЭА), эпителиальному мембранному антигену (ЭМА), мезотелиальному антигену HBME-1, Vimentin, Calretinin, Mesotelin, тиреоидному фактору транскрипции-1 (ТТФ-1), цитокератинам (СК) 7, 20, 5/6, Napsin, CA-125, маркеру опухоли Вильмса (WT-1).

Результаты:

Как видно из Таблицы 1, в 2020 г. количество цитологических исследований в КДЛ уменьшилось на 34% в сравнении с 2019 г. Это связано с эпидемиологическими ограничениями, обусловленными новой коронавирусной инфекцией COVID19. В 2021 г. количество исследований увеличилось на 12% в сравнении с 2020 г.

Таблица 1 – Количество проведенных цитологических исследований в КДЛ ГБУЗ «НИИ – ККБ №1 им. проф. С.В. Очаповского» (2018-2021 гг.)

Цитологический материал	2018		2019		2020		2021	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
Всего исследований	48 308	100	47 403	98	31 911	66	38 030	78

Ретроспективный анализ результатов морфологического исследования, полученных с 2019 по 2021 гг., показал, что традиционным цитологическим методом в выпотных жидкостях у женщин метастатические поражения серозных полостей (плевральной и абдоминальной) диагностировались чаще – 672 случая (58%) от общего количества метастатических поражений серозных полостей, главным образом за счет прогрессирования рака молочной железы (26%). Иммуноцитохимическая картина в сравнении с ИГХ при метастазах рака молочной железы отражена на ри-

сунке 1. У мужчин метастатические плевриты были обусловлены в основном метастазированием аденокарциномы легкого – 266 случаев (23%). Иммуноцитохимическая картина при метастазах рака легкого отражена на рисунке 2.

По морфологической структуре аденокарцинома выявлялась чаще (в 75 (54,3%) случаях), чем плоскоклеточный рак (35 (25,36%)). Остальные гистологические формы представлены меньшим числом наблюдений: мелкоклеточный рак легкого (16 (1,59%), нейроэндокринные опухоли (12 (8,7%)) (Таблица 2).

Таблица 2 – Верификация первичной опухоли легких, диагностированной цитологическим и ИЦХ исследованиями, подтвержденной данными патогистологического и иммуногистохимического исследований

Плоскоклеточный рак	Аденокарцинома	Мелкоклеточный рак	НЭО	Всего
35 (25,36%)	75 (54,35%)	16 (11,59%)	12 (8,70%)	138 (100%)

В представленной Таблице 2 на цитологическом материале, полученном из опухолей легкого, лимфатических узлов средостения и плевры, сопоставлены данные рутинного цитологического материала и ИЦХ исследования с результатами гистологии и иммуногистохимического исследования, что позволило оценить точность цитологического и ИЦХ исследований при опухолях различного гистогенеза.

Наибольшие трудности дифференциальной диагностики клеток возникали при воспалительных процессах, так как в большинстве случаев мезотелий приобретает признаки атипии, полиморфизма, что может вызвать ошибочное предположение о наличии опухоли.

Во всех случаях при цитологическом заключении «Злокачественное новообразование» проводилось ИЦХ исследование с использованием СК AE1/AE3

и/или CD 45 (LCA) и Vimentin. При положительной экспрессии Cytokeratin AE1/AE3 и отрицательной Vimentin цитолог делал заключение: «Злокачественное новообразование эпителиальной природы». В этих случаях выполнялось ИЦХ исследование с антигенами TTF1 (маркер для ADC легкого и рака щитовид-

ной железы). В случае экспрессии TTF1(+) и тиреоглобулина (-) делалось заключение: «Аденокарцинома легкого». Необходимо помнить, что тиреоглобулин в клетках опухоли легкого всегда отрицательный. В случае экспрессии TTF1 (+) при тиреоглобулине (+) цитологическое заключение: «Рак щитовидной железы».

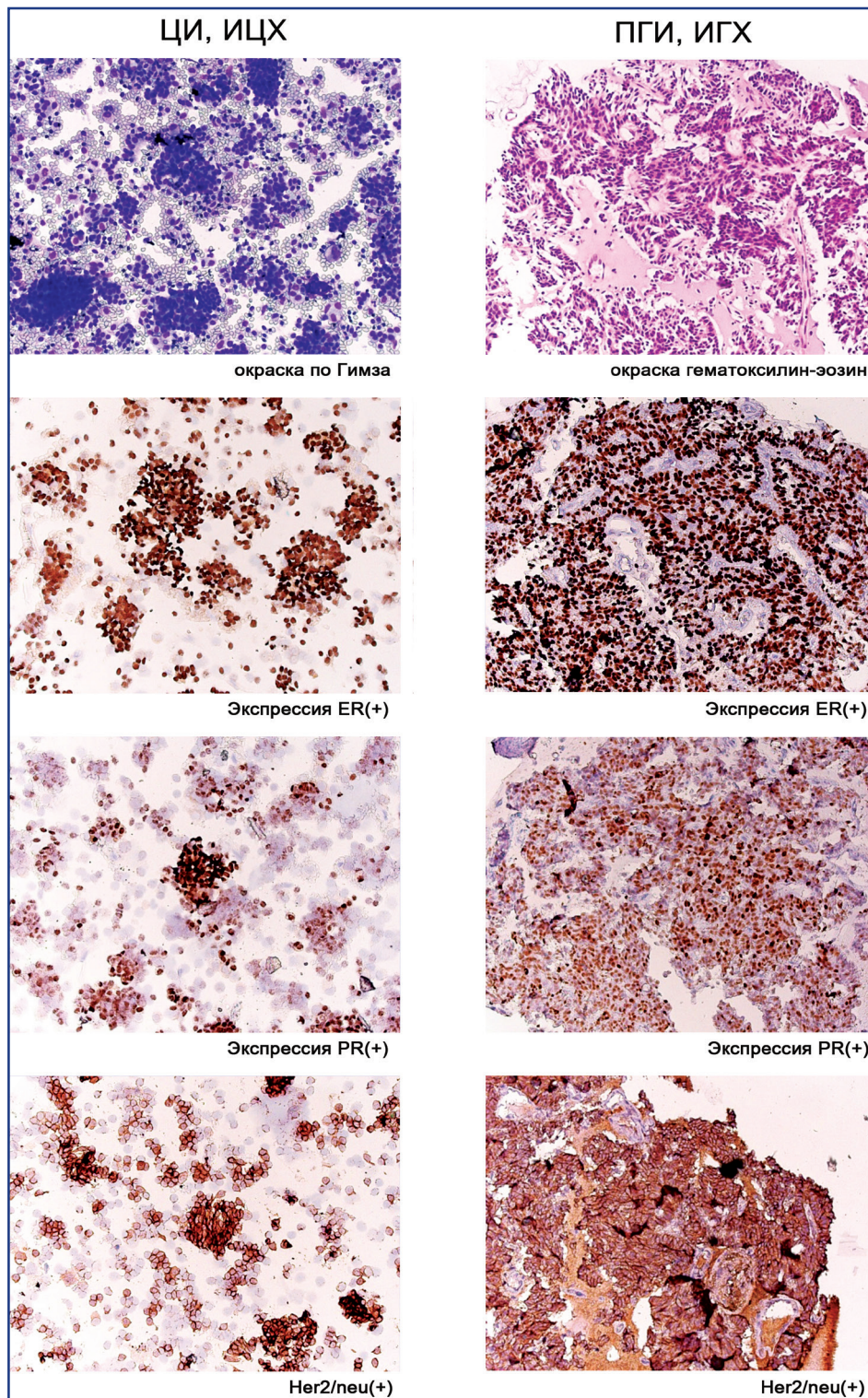


Рисунок 1 – ИЦХ исследование: метастазы рака молочной железы, ×10

В результате проведенного морфологического исследования 5 800 экссудатов, собранных за последние три года, в 20% случаях выпотная жидкость в сероз-

ных полостях была обусловлена наличием злокачественного процесса, в 30% – воспалительным генезом и в 35% – лимфоидным характером (таблица 3).

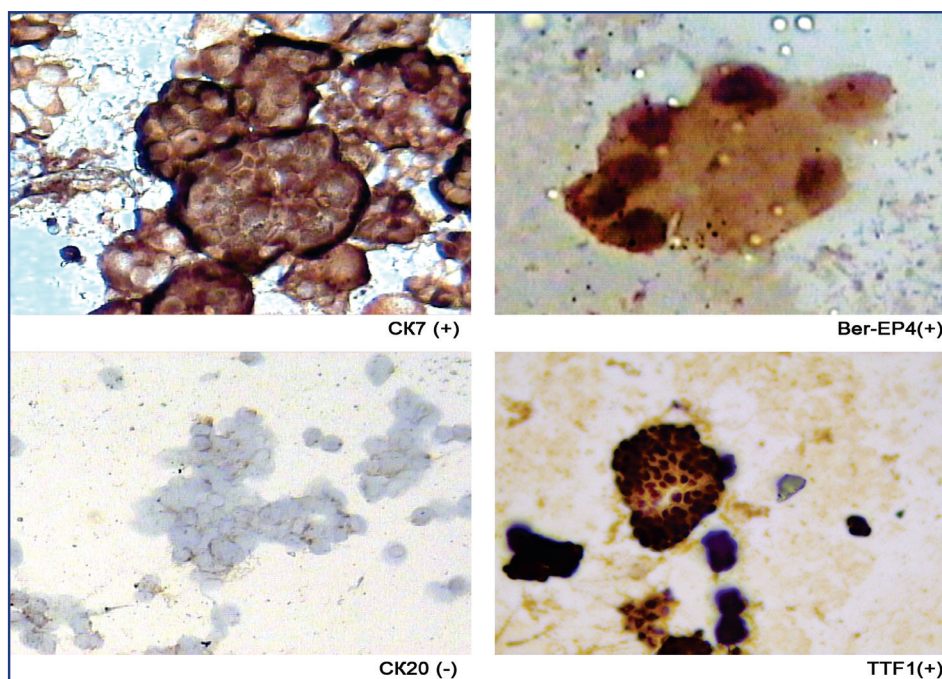


Рисунок 2 – ИЦХ исследование: метастазы аденокарциномы легкого

Таблица 3 – Морфологическая характеристика выпотных жидкостей (n=5800)

Характер выпота	Количество исследований	%
Выпот лимфоидного характера	2 030	35
Выпот воспалительного характера	1 740	30
Выпот с наличием клеток злокачественного новообразования	1 160	20
Прочие	870	15
Всего	5 800	100

Обсуждение: Таким образом, применение ИЦХ исследования в сложных случаях повышает диагностическую точность цитологического метода с 62% до 93% и специфичность – с 95% до 99%.

Необходимо отметить, что правильно классифицировать плевральный выпот по клеточному составу с использованием только цитологического исследования можно при туберкулезе легких; плеврите, обусловленном пневмонией; синдроме транссудата у пациентов с сердечно-сосудистой недостаточностью. Выпотная жидкость у пациентов с плевритами неопухолевой этиологии имеет мезотелиально-лимфоцитарный, гранулоцитарно-макрофагальный, макрофагально-гистиоцитарный клеточный состав.

Заключение: Цитологическое исследование транссудатов и экссудатов серозных полостей составляет важную часть в повседневной работе цитологической лаборатории и является одним из методов морфологической диагностики патологического процесса. Исследование выпотных жидкостей позволяет врачу получить информацию о патогенезе образования выпота, корректно выбрать тактику лечения и спрогнозировать динамику развития заболевания.

Сформированный продуктивный клинично-лабораторный диалог значительно повышает информативность цитологической диагностики. Проанализировав результаты использования различных

подходов, отличающихся по количеству используемых моно- или поликлональных антител панелей для определения гистологической формы и органной принадлежности опухоли, мы разработали алгоритм проведения ИЦХ исследования выпотных жидкостей. А именно: цитолог после просмотра материала, приготовленного традиционным методом, может принимать абсолютно взвешенные поэтапные решения о дальнейших диагностических действиях. В отдельных конкретных случаях проведения ИЦХ исследования с 2-3 антителами может быть вполне достаточно для определения гистологической формы опухоли и ее органной принадлежности, а при необходимости нужно выполнить дополнительные ИЦХ исследования без значительных потерь времени в получении результатов.

Список использованных источников:

1. Леонов М.Г. Цитологическая диагностика рака яичников: пособие для врачей / М.Г. Леонов, В.И. Новик, С.А. Беляева и соавт. – Краснодар: ООО «Три-Мил», 2016. – 28 с.
2. Egan A.M., McPhillips D., Sarkar S., Breen D.P. Malignant pleural effusion // QJM. – 2014. – Vol. 107 (3). – P.179-184. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hct245>
3. Борисова О.В. Современные возможности цитологического метода при исследовании экссудатов из серозных полостей: дис. ... канд. мед. наук. – Москва, 2010. – 194 с. <https://www.dissertat.com/content/sovremennye-vozmozhnosti-tsitologicheskogo-metoda-v-issledovanii-pleuralnykh-i-peritonealnykh>
4. Волченко Н.Н., Борисова О.В. Диагностика злокачественных опухолей по серозным полостям: цитологический атлас. – М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2017. – 144 с. <https://www.labirint.ru/books/559863/>

ТҰЖЫРЫМ

**ИЦХ КӨМЕГІМЕН ПЛЕВРАДАН ЭФФУЗИЯЛЫ СҰЙЫҚТЫҚТАРДЫ ЦИТОЛОГИЯЛЫҚ
ЗЕРТТЕУ КЕЗЕҢДЕРІ**

К.С. Павлюк¹, М.Г. Леонов^{2,3}, А.В. Аюбян¹, Т.В. Сеницкая¹, О.В. Госпинович¹, Е.А. Артемова¹, Ж.Б. Елеубаева⁴

¹«Ғылыми-зерттеу институты» – С.В. Очаповский атындағы №1 облыстық клиникалық ауруханасы» ГБУЗ, Краснодар, Ресей Федерациясы;

²«№3 онкологиялық диспансер» ГБУЗ, Новороссийск, Ресей Федерациясы;

³«Кубан мемлекеттік медицина университеті» Федералдық мемлекеттік бюджеттік жоғары оқу орны, Краснодар, Ресей Федерациясы;

⁴«Қазақ онкология және радиология ғылыми-зерттеу институты» АҚ, Алматы, Қазақстан Республикасы

Өзектілігі: Экссудатты сұйықтықтардағы ісіктердің цитологиялық критерийлері белгілі бір субъективті қиындықтармен байланысты, олардың бірі пролиферацияланатын мезотелий жасушалары мен аденокарцинома жасушаларының дифференциалды диагностикасы болып табылады.

Зерттеудің мақсаты – көпсалалы аурухана жағдайында цитологиялық диагностиканың ақпараттылығын арттыру.

Әдістері: 2018-2021 жылдар аралығы Цитологиялық зерттеуге 10 082 серозды қуыстар эффузиясы (плевра – 8 166 (81%), құрсақ қуысы – 1 512 (15%), перикардальды – 404 (4%)) жатқызылды. Дәстүрлі препараттарды микроскопиялық зерттеу жүргізілді, қиын диагностикалық жағдайларда ИЦХ зерттеуі жүргізілді.

Нәтижесі: Зерттеудің талдауы көрсеткендей, әйелдерде эффузия сұйықтығында дәстүрлі цитологиялық әдіспен 672 жағдайда (58%), негізінен сүт безі қатерлі ісігінің (26%) оршуіне байланысты серозды қуыстардағы метастатикалық зақымданулар, ал ерлерде, плеврит негізінен өкпенің аденокарциномасының метастазына байланысты болды – 266 жағдай (23%). ИЦХ зерттеулерін қолдану цитологиялық әдістің диагностикалық дәлдігін 62%-дан 93%-ға және ерекшелігін 95%-дан 99%-ға дейін арттырады.

Қорытынды: Гистологиялық пішінді және органды - ісік көзін анықтау үшін қолданылатын моноклональды антиденелердің панельдерінің санымен ерекшелігін ИЦХ зерттеулерін жүргізу үшін алгоритм әзірленді. Арнайы жағдайларда 2-3 моноклональды антиденелермен ИЦХ зерттеулері ісіктің гистологиялық түрін растау үшін жеткілікті болуы мүмкін және қажет болған жағдайда нәтижелерді алу үшін уақытты айтарлықтай жосалтпай қосымша ИЦХ зерттеулерін жүргізеді.

Түйінді сөздер: иммуноцитохимия (ИЦХ), моноклональды антиденелер, қатерлі ісіктер, плевра сұйықтығы, асциттік сұйықтық, дәстүрлі цитология, сұйықтық негізіндегі цитология.

ABSTRACT

**STAGES OF CYTOLOGICAL EXAMINATION
(USING IMMUNOCYTOCHEMICAL EXAMINATION) OF EFFUSION FLUIDS**

K.S. Pavlyuk¹, M.G. Leonov^{2,3}, A.V. Akobyan¹, T.V. Sinitskaya¹, O.V. Gospirovich¹, E.A. Artemova¹, Zh.B. Yeleubayeva⁴

¹GBUZ "Scientific Research Institute – Regional Clinical Hospital No. 1 after S.V. Ochapovsky," Krasnodar, the Russian Federation;

²GBUZ "Oncological dispensary No. 3," Novorossiysk, the Russian Federation;

³Kuban State Medical University, Krasnodar, the Russian Federation;

⁴"Kazakh Institute of Oncology and Radiology" JSC, Almaty, the Republic of Kazakhstan

Relevance: Cytological criteria of tumors in exudate fluids are associated with certain subjective difficulties, one of which is the differential diagnosis of proliferating mesothelial and adenocarcinoma cells.

The study aimed to increase the informational value of cytological diagnostics in a multidisciplinary hospital.

Methods: From 2018 to 2021, 10,082 serous cavity effusions (pleural – 8,166 (81%), abdominal cavity – 1,512 (15%), pericardial – 404 (4%)) were included in the cytological examination. Microscopic examination of traditional preparations was carried out, and immunocytochemical (ICC) examination was carried out in difficult diagnostic situations.

Results: Analysis of the study showed that by the traditional cytological method in effusion fluids in women, metastatic lesions of the serous cavities were diagnosed in 672 cases (58%), mainly due to the progression of breast cancer (26%). In men, pleurisy was mainly due to metastasis of adenocarcinoma of the lung – 266 cases (23%). ICC research increased the diagnostic accuracy of cytological examination by 62-93% and the specificity – by 95-99%.

Conclusions: An algorithm for conducting ICH studies, differing in the number of panels of mono-clonal antibodies used to determine the histological form and organ - the source of the tumor, has been developed. In specific cases, conducting ICR studies with 2-3 monoclonal antibodies may be quite enough to confirm the histological form of the tumor and, where necessary, perform additional ICR studies without significant loss of time for obtaining results.

Keywords: immunocytochemistry (ICC), monoclonal antibodies, malignant tumors, pleural fluid, ascitic fluid, conventional cytology, liquid-based cytology.

Прозрачность исследования: Авторы несут полную ответственность за содержание данной статьи.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Вклад авторов: вклад в концепцию – Павлюк К.С., Елеубаева Ж.Б.; научный дизайн – Леонов М.Г.; исполнение заявленного научного исследования – Павлюк К.С., Госпинович О.В., Артемова Е.А.; интерпретация заявленного научного исследования – Аюбян А.В., Сеницкая Т.В.; создание научной статьи – Павлюк К.С., Леонов М.Г.

Сведения об авторах:

Павлюк К.С. – биолог КДЛ, «НИИ-ККБ №1 им. С.В. Очаповского», ведущий специалист отдела ЦИИИЦХ, Краснодар, Российская Федерация, тел +79189785349, e-mail: karlygash@nextmail.ru, ID ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5059-0289>;

Леонов М.Г. – д.м.н., доцент кафедры онкологии с курсом торакальной хирургии ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет», главный врач ОД №3, Новороссийск, Российская Федерация, тел +79184839444, e-mail: novonko@yandex.ru, ID ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9658-4247>;

Аюбян А.В. – торакальный хирург ТХО-2, «НИИ-ККБ №1 им. С.В. Очаповского», Краснодар, Российская Федерация, тел +79182496652, e-mail: Akobyan_84@mail.ru, ID ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2710-2651>;

Сеницкая Т.В. – врач-пульмонолог, «НИИ-ККБ №1 им. С.В. Очаповского», Краснодар, Российская Федерация, тел +79280421650, e-mail: t_sinitskaya@mail.ru, ID ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6292-7491>;

Госпинович О.В. – биолог КДЛ, «НИИ-ККБ №1 им. С.В. Очаповского», Краснодар, Российская Федерация, тел +79180923729, e-mail: olga-cito@rambler.ru, ID ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2777-8205>;

Артемова Е.А. – биолог КДЛ, «НИИ-ККБ №1 им. С.В. Очаповского», Краснодар, Российская Федерация, тел +79180423442, e-mail: aleka.krd@gmail.com, ID ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2620-2917>;

Елеубаева Ж.Б. (корреспондирующий автор) – врач цитопатолог Центра морфологических исследований АО «КазНИИОиР», Алматы, 050000, пр-т Абая 91, Республика Казахстан, тел +77051339279, e-mail: zhanara66@gmail.com, ID ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6565-4695>.