

**ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ
ПРЕПАРАТОВ ЖИДКОСТНОЙ ЦИТОЛОГИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ
ПЛЕВРИТОВ И АСЦИТОВ**

Беляев А.М.,³ Раскин Г.А.^{1,2}, Захаренко А.А.³, Кондрацов С.А.³

*1 – Городской клинический онкологический диспансер, г. Санкт-Петербург, 2 – 122
Клиническая больница, г. Санкт-Петербург, 3 - Научно-исследовательский институт
скорой помощи им. И.И. Джанелидзе, г. Санкт-Петербург.*

Раскин Григорий Александрович 8 (812) 559-98-96; e-mail: diagnost@med122.com

Резюме: Иммуноцитохимия в своем развитии значительно отстала от иммуногистохимии, что было связано с невозможностью выполнять молекулярные исследования на обычных (conventional) мазках. С появлением жидкостной цитологии данная проблема перестала существовать. Наиболее актуальной проблемой для онкологии, которая не может быть решена другими морфологическими методами, кроме цитологических – это злокачественные асциты и плевриты. В литературе имеются разрозненные сообщения по решению точечных вопросов при исследовании злокачественных выпотов, но отсутствует системный подход к диагностике как при иммуногистохимии. Целью исследования было подобрать панели антител, эффективно решающих следующие проблемы: дифференциальная диагностика опухоли с реактивными изменениями, уточнение диагноза при известной локализации в анамнезе, определение первичного очага среди нескольких и без известной локализации. В работе было проанализировано 30 злокачественных плевритов и асцитов. Подобраны панели антител, решающие поставленные задачи. Определение первичного очага без первичной локализации, диагностика лимфом при помощи иммуноцитохимии требует дальнейших исследований.

Ключевые слова: жидкостная цитология, иммуноцитохимия, асцит, плеврит.

**IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDIES CYTOLOGICAL PREPARATIONS LIQUID
CYTOLOGY OF MALIGNANT PLEURITIS AND ASCITIS**

Belyaev A.M., Raskin G.A., Zakharenko A.A., Kondratsov S.A.

1 - City Clinical Oncology Dispensary, St. Petersburg, 2 - 122 Hospital, St. Petersburg, 3
Research Institute of Emergency Care. II Janelidze, St. Petersburg

Abstract: Immunocytochemistry in its development fell far short of immunohistochemistry, which was due to inability to perform molecular studies on normal

(conventional) smears. With the advent of liquid cytology, the problem ceased to exist. The most pressing issue for oncology, which can not be solved by other morphological methods, but cytological – it malignant pleuritis and ascitis. In the literature there are scattered reports on the decision point in the investigation of issues effusions, but no systematic approach to the diagnosis as in immunohistochemistry. The aim was to select panel of antibodies that effectively addresses the following issues: the differential diagnosis of the tumor with reactive changes, the diagnosis at a known location in history, the definition of the primary focus among the few without a known location. In this paper we have analyzed 30 malignant pleuritis and ascites . Selected panel of antibodies that solves our problem. Determination of the primary tumor without primary localization with immunocytochemistry requires further investigation.

Keywords: liquid cytology; immunocytochemistry; pleuritis; ascitis.

Введение: Основное отличие иммуноцитохимии от иммуногистохимии состоит в том, что исследования проводятся на цитологических мазках, а не на гистологических срезах. Таким образом, используется нативный материал, что делает антигены более доступные для взаимодействия с антителами.

Первые упоминания об иммуноцитохимии по PubMed относят 1975 году, когда были применены анти-IgM антитела, используя прямой иммунофлюоресцентный метод [1].

Асцит может быть первым проявлением злокачественной опухоли. Одной из самой больших проблем в цитологии выпотных жидкостей является достоверное отличие реактивного мезотелия от опухолевых клеток. Эффективное отличие эпителиальных клеток от мезотелиальных позволяет сделать следующая панель антител: В72.3, МОС-31 и Ber-EP4 – докладывается в одном из обзоров литературы [2]. Другие авторы использовали для дифференциальной диагностики МОС-31, D2-40 и калретинин, первый является эпителиальным антигеном, который также использовали предыдущие исследователи, вторые два – молекулы присущие для мезотелия. Достоверность и эффективность использования данных антител приближалась до 100% по данным работ [3, 4, 5]. Жидкостная цитология позволяет выполнять не только иммуноцитохимические исследования, но и генетические, такие как FISH [6].

После уточнения злокачественной природы выпота, возникает следующая проблема – определение источника опухолевых клеток.

Поджелудочная железа и яичник – наиболее часто являются первичным источником злокачественных выпотов относительно других локализаций. Рядом авторов

было показано, что иммуноцитохимическое исследование с использованием антител против MUC5ac и WT-1 может быть эффективным в дифференциальной диагностике рака яичника и поджелудочной железы [7]. Другие исследователи показали эффективность иммуноцитохимического исследования асцитической жидкости при помощи антител против cdx2, который не экспрессируется в асцитических клетках не опухолевого происхождения. Позитивная реакция на данный антиген указывает на гастроинтестинальный рак или опухоль поджелудочной железы [8].

Докладываются случаи эндометриальной стромальной саркомы низкой степени злокачественности с диссеминацией по брюшине и асцитом. Иммуноцитохимическое исследование на CD10 может быть эффективным в данном случае для верификации диагноза [9].

Кроме того, отдельными авторами показана возможность эффективного иммуноцитохимического исследования не только диагностических (качественных) показателей, но и прогностических (количественных) [10].

Таким образом, в литературе имеются разрозненные сообщения по решению точечных вопросов при исследовании выпотных жидкостей, но отсутствует системный подход к диагностике как при иммуногистохимии.

Материал и методы: Всего было исследовано 30 выпотных жидкостей, из которых 14 были из плевральной полости и 16 – асцитических. В 21 случае (70%) перед исследованием ставилась задача определить наличие опухолевых клеток и локализацию, в 6 случаях (20%) была известна локализация, требовалось определить природу выпота, в 3 наблюдениях (10%) необходимо было выяснить источник опухолевых клеток среди 2-3 локализаций. Во всех случаях материал центрифугировался с образованием осадка, который в дальнейшем обрабатывался на цитоцентрифуге Cytospin 4. Полученные мазки окрашивались гематоксилин-эозном, по Романовскому-Гимзе, по Паппаниколау. Оценивалась цитологическая картина, клеточная концентрация в жидкости, после чего выбиралась нужное количество осадка для образования одного мазка при помощи Cytospin 4. В зависимости от задач исследования формировалось количество мазков, соответствующее числу используемых антител. Мазки высушивались на воздухе, фиксировались в холодном ацетоне в течение 10 минут. После чего смачивались в трибуфере с твином (BioOptica), обводились восковым карандашом (DAKO). Первым этапом осуществлялось ингибирование эндогенной пероксидазы при помощи 3% перекиси водорода в течение 20 минут. Все последующие этапы исследования осуществлялись во влажной бане при температуре 28°C. Первые антитела инкубировались в течение 60 минут (таблица 1).

Таблица 1. Спецификация антител.

№	Название антитела	Клон	Характер антител	Разведение	Фирма-производитель
1.	Cytokeratin – Pan	AE1/AE3	Смесь антител	1:300	LabVision
2.	Cytokeratin 7		Кроличьи, поликлональные	1:200	Epitomics
3.	Cytokeratin 20	Ks20.8	Мышиные, моноклональные	1:100	LabVision
4.	Cytokeratin 18	E431-1	Кроличьи, моноклональные	1:200	LabVision
5.	Ber-EP4	Ber-EP4	Мышиные, моноклональные	1:10	LabVision
6.	Wilm's Tumor Protein (WT1)	6F-H2	Мышиные, моноклональные	1:10	LabVision
7.	TTF-1	TTF-1 (Thyroid Transcription Factor-1)	Мышиные, моноклональные	1:150	LabVision
8.	СК-НМВ	34betaE12	Мышиные, моноклональные	1:100	LabVision
9.	Estrogen receptor	SP1	Кроличьи, моноклональные	1:100	LabVision
10.	Cdx2		Кроличьи, поликлональные	1:50	LabVision
11.	Androgen receptor		Кроличьи, поликлональные	1:100	LabVision
12.	PSA	EP1588Y	Кроличьи, моноклональные	1:100	LabVision

Для визуализации реакции антиген-антитело применялась полимерная система детекции UltraVision компании LabVision, в качестве хромогена использовался диаминобензидин. Контр-окрашивание ядер осуществлялось при помощи гематоксилина Майера. После каждого из этапов до окрашивания диаминобензидином стекла со срезами промывались в трис-буфере с твином рН 7,1 фирмы BioOptica. Стекла заключались BioMaunt фирмы BioOptica.

Результаты и обсуждение: В 18 случаях (60%) из 30 опухолевые клетки не были выявлены. Эффективным набором антител в данном случае было: Ber-EP4 (негативная реакция в мезотелии), WT-1 (позитивная реакция в мезотелии), СК-Pan (в 70% случаев

отмечалась негативная реакция в мезотелии). По данным литературы для решения данных вопросов может быть использованы следующие антитела В72.3, МОС-31, D2-40, калретинин, НВМЕ-1 [2, 3, 4, 5]. Мы также пробовали использовать калретинин и НВМЕ-1. Использование антител против калретинина показывает схожие результаты с WT-1, применение анти-НММЕ-1 оказалось неэффективным, ввиду большого количества случаев реактивного мезотелия с негативной реакцией.

В 12 случаях (40%) опухолевые клетки были выявлены. В 6 случаях была известна первичная локализация: 2 пациента с раком желудка, 2 – с аденокарциномой легкого, 1 – с раком толстой кишки, 1 – с раком яичника, причем 1 случай рака желудка был выявлен в плевральной жидкости. Эффективной панелью в данном случае (после применения дифференциальной диагностики с реактивными изменениями, описанными выше) было использование СК7, СК20, TTF-1, cdx2, ЭР, WT-1 с вариациями, приведенными в таблице 2. В 3-х случаях требовалась дифференциальная диагностика между двумя нозологиями (таблица 2). Наиболее сложной задачей было определение источника опухоли без известного первичного очага (3 наблюдения). Были выставлены следующие диагнозы: рак предстательной железы, аденокарцинома легкого, аденокарцинома гастро-панкреато-холангиогенной зоны.

Таблица 2. Иммуноцитохимические панели в зависимости от задач исследования.

Задача исследования		Рекомендуемая панель
Дифференциальная диагностика опухоли с реактивными изменениями		Вс-EP4, калретинин
Уточнение диагноза при известной локализации в анамнезе	Легкое	TTF-1
	Кишка	Cdx2, СК20
	Желудок	СК7, СК20
	Яичник	ЭР, WT-1, СК7
Определение первичного очага среди нескольких	Легкое Vs. желудок	TTF-1, СК7, СК20
	Яичник Vs. кишка	WT-1, ЭР, cdx2, СК20, СК7
	Кишка Vs. эндометрий	Cdx2, СК20, СК7, ЭР, СЕА
Без первичного очага		Cdx2, СК20, СК7, ЭР, СЕА, TTF-1, СК-НМW, PSA, AR, СК18, WT-1

Выводы: иммуноцитохимическое исследование выпотных жидкостей, выполненное на основе жидкостной цитологии позволяет достоверно выявлять

опухолевые клетки. Определение первичного источника эффективно решается при нескольких известных локализациях. Определение метастаза без первичной локализации, диагностика лимфом требует дальнейших исследований.

Литература:

1. Binder R.A., Jencks J.A., Chun B., Rath C.E. "B" cell origin of malignant cells in a case of American Burkitt's lymphoma. Characterization of cells from a pleural effusion. // *Cancer*. - 1975. - V.36(1). - P.161-8;
2. Lin O. Challenges in the interpretation of peritoneal cytologic specimens. // *Arch Pathol Lab Med*. - 2009. - V.33(5). - P. 739-42;
3. Davidson B., Risberg B., Kristensen G., Kvalheim G. et al. Detection of cancer cells in effusions from patients diagnosed with gynaecological malignancies. Evaluation of five epithelial markers. // *Virchows Arch*. - 1999. - V.435(1). - P.43-9;
4. Kim J.H., Kim G.E., Choi Y.D., Lee J.S. et al. Immunocytochemical panel for distinguishing between adenocarcinomas and reactive mesothelial cells in effusion cell blocks. // *Diagn Cytopathol*. - 2009. - V.37(4). - P.258-61;
5. Politi E., Kandaraki C., Apostolopoulou C., Kyritsi T., Koutselini H. Immunocytochemical panel for distinguishing between carcinoma and reactive mesothelial cells in body cavity fluids. // *Diagn Cytopathol*. - 2005. - V. 32(3). - P.151-5;
6. Park I.H., Kwon Y., Ro J.Y., Lee K.S., Ro J. Concordant HER2 status between metastatic breast cancer cells in CSF and primary breast cancer tissue. // *Breast Cancer Res Treat*. - 2009, [Epub ahead of print];
7. Han L., Pansare V., Al-Abbadi M. et al. Combination of MUC5ac and WT-1 immunohistochemistry is useful in distinguishing pancreatic ductal carcinoma from ovarian serous carcinoma in effusion cytology. // *Diagn Cytopathol*. - 2009. [Epub ahead of print];
8. Kobayashi M., Ueyama Y., Nakanishi H., Ishida H. et al. Immunocytochemical detection using CDX2. // *Cancer Cytopathology*. - V.108(2). - P. 114-118;
9. Lim B.J., Choi S.Y., Kang D.Y., Suh K.S. Peritoneal washing cytology of disseminated low grade endometrial stromal sarcoma: a case report. // *Acta Cytol*. - 2009.- V.53(5). - P. 587-90;
10. Li C., Ma Y., Xue Y., Zhang H., Wei Y. Molecular characterization and significance for prognosis of free gastric cancer cells in the peritoneal cavity. // *Hepatogastroenterology*. - 2009. - V.56(91-92). - P. 891-8.