

Костерина Н.Е.^{1,2}, Гринберг Л.М.^{1,2}, Валамина И.Е.¹, Николаева А.М.¹, Неволин А.Н.³

Метод цитоблока в морфологической диагностике опухолевых поражений плевры на материале плевральной жидкости

1 - ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Екатеринбург, 2 - Центральное патологоанатомическое отделение ГБУЗ СО «Противотуберкулезный диспансер», г. Екатеринбург, 3 - ГБУЗ СО «Бюро Судебно-медицинской экспертизы», г. Екатеринбург

Kosterina N.E., Grinberg L.M., Valamina I.E., Nikolaeva A.M., Nevolin A.N.

Cell block method in morphologic diagnostics of tumorous pleura lesions studied on the material of pleural fluid

Резюме

В статье оценены возможности метода цитоблока с проведением иммуноцитохимического исследования для морфологической диагностики опухолевого поражения плевры на материале плевральной жидкости. В ходе работы методом цитоблока исследована плевральная жидкость больных с односторонним опухолевым поражением плевры. На материале цитологических блоков выполнено иммуноцитохимическое исследование и диагностированы метастазы аденокарциномы легкого в плевре и мезотелиома. В результате проведенного исследования доказана диагностическая значимость метода цитоблока, повышающего качество морфологической диагностики опухолей различных локализаций с возможностью проведения полноценного иммуноцитохимического исследования, не прибегая к методам «взрывной» фиксации, что особенно ценно при невозможности получения гистологического материала.

Ключевые слова: цитоблок, плевральная жидкость, опухоли плевры

Summary

In the article there have been estimated the resources of cell block method by having conducted an immunocytochemical research for further morphologic diagnostics of tumorous pleura lesions studied on the material of pleural fluid. During the research pleural fluid of patients with unilateral tumorous pleura lesions was studied with cell block method. Cell blocks were studied with immunocytochemical method and there were verified metastases of lung adenocarcinoma in pleura and mesothelioma. The results of the research have proved diagnostic significance of cell block method that improves quality of morphologic diagnostics of tumours of various localizations and provides conducting a valuable immunocytochemical research without using methods of “explosive” fixation that is especially valued when it is impossible to get histological material.

Keywords: cell block, pleural fluid, pleural tumors

Введение

Современная морфологическая диагностика опухолей различных локализаций включает жидкостную цитологию с использованием цитоцентрифуги и метод цитоблока, открывающих широкие возможности для проведения цитохимических (Циль-Нильсен, альциановый синий, ШИК-реакция, метиленовый синий и пр.), иммуноцитохимических (на материале жидкостной цитологии с использованием метода «взрывной» фиксации и цитоблока) и молекулярно-генетических исследований цитологического материала в дополнение к гистологическому или при невозможности получения гистологического материала [1-6].

Метод цитоблока (ЦБ) является способом обработки и заключения в парафин или воск клеточных суспензий при помощи цитоцентрифуги и системы CytoBlock (Shandon), целлоидина или факторов свертывания с последующим изготовлением цитологических препаратов при помощи рутинных гистологических методик. Цитологический материал, представляющий клеточную взвесь, концентрируется и смешивается со специальными агентами для формирования депозита, который в дальнейшем фиксируется, проводится по спиртам, заливается в парафин, подвергается микромированию аналогично гистологическому биопсийному материалу [3,4,7-10].

Метод ЦБ позволяет исследовать любой цитологический материал, сближает цитологический и гистологический методы исследования, что наиболее важно при отсутствии возможности получения гистологического материала, а также дает возможность полноценно использовать метод иммуноцитохимии (ИЦХ) с применением ядерных, мембранных и цитоплазматических маркеров за счет обеспечения доступа к внутренним структурам клеток опухоли, не прибегая при этом к методам «взрывной» фиксации, которые необходимы при проведении ИЦХ исследования на материале жидкостных препаратов [3-10].

По данным зарубежной литературы метод цитоблока с проведением ИЦХ исследования широко используется для дифференциальной диагностики опухолевого и неопухолевого поражений плевры на материале плевральной жидкости, а также определения первичной локализации опухоли при канцероматозе плевры, что особенно ценно при невозможности выполнения плевроскопии и получения биопсийного материала, являющихся золотым стандартом в диагностике опухолевых поражений плевры. В ряде работ доказана высокая эффективность и доступность исследования плевральной жидкости методом цитоблока с целью получения полноценного морфологического материала для молекулярно-генетического исследования и выявления мутаций для таргетной терапии [2-4,7-10]. В последней классификации опухолей легких ВОЗ 2015 года рекомендуется использовать метод цитоблока с проведением ИЦХ исследования самостоятельно или в дополнение к исследованию биопсийного материала для повышения качества морфологической диагностики опухолей легких, в том числе на материале плевральной жидкости [1,2]. В отечественной литературе мы не нашли публикаций, посвященных использованию метода цитоблока с проведением ИЦХ исследования для диагностики опухолевых поражений легких и плевры.

Цель настоящего исследования - оценить возможности метода ЦБ для морфологической диагностики опухолевых поражений плевры на материале плевральной жидкости.

Материалы и методы

В работу включены материалы 12 пациентов консультативно-диагностической поликлиники ГБУЗ СО «Противотуберкулезный диспансер» за 2016-2017гг. Это были больные с односторонними плевритами опухолевой природы, выявленными «традиционным» цитологическим методом исследования на материале плевральной жидкости. Среди них было 8 женщин и 4 мужчин в возрасте от 60 до 83 лет (средний возраст 70,6±8,0). У данных пациентов имелись противопоказания к выполнению диагностической плевроскопии и биопсии плевры (тяжелая дыхательная и сердечно-сосудистая недостаточность). В 6 случаях имелись рентгенологические данные о локализации первичной опухоли в легких, однако процесс морфологическими методами не был верифицирован. В 6 случаях первичная локализация опухоли была

неизвестна. При этом экстраторакальные локализации опухолевого процесса были по возможности исключены при помощи различных методов исследования.

По данным «традиционного» цитологического метода исследования плевральной жидкости всем пациентам был поставлен диагноз «злокачественной эпителиальной опухоли плевры» на основании обнаружения в цитологических мазках многослойных опухолевых структур из полиморфных округлых клеток с вакуолизированной цитоплазмой и овальным гиперхромным ядром с грубо-зернистой структурой хроматина, хорошо различимыми нуклеолами и неровным контуром ядерной мембраны (Рис. 1, 2).

В ходе работы морфологическому исследованию подлежала плевральная жидкость вышеуказанных больных с использованием методов ЦБ и ИЦХ на материале цитоблока, выполненных на базе гистологической лаборатории ЦНИЛ ГБОУ ВПО «УГМУ» МЗ РФ.

Для исследования плевральной жидкости использовали специализированную транспортную среду Thermo Scientific Shandon Cytospin Collection Fluid, цитоцентрифугу Shandon Cytospin 4 и набор Shandon Cytoblock Cell Block Preparation System (Thermo Fisher Scientific, USA). Полученные цитоблоки подвергались стандартному гистологическому исследованию с фиксацией в 10% забуференном формалине, проводкой в спиртах, заливкой в парафин, микротомированием, окраской срезов гематоксилин-эозином и заключением под покровное стекло по аналогии с гистологическим биопсийным материалом.

ИЦХ исследование проводили на материале цитологических блоков плевральной жидкости пероксидазо-антипероксидазным методом по стандартным диагностическим протоколам с использованием полимерной системы детекции UltraVision Quanto detection systems (Thermo Fisher Scientific, USA) и набора первичных антител Thyroid Transcription Factor-1 (8G7G3/1) (TTF-1), Keratin 7 (OV-TL 12/30) (Ker 7), Keratin 5/6 (D5/16 B4) (Ker 5/6), CDX2 (EPR2764Y), Estrogen Receptor (SP1) (ER), Progesterone Receptor (Y85) (PR), Epithelial Membrane Antigen (E29) (EMA), Wilms Tumor-1 (6F-H2) (WT-1) и Calretinin (AB 702) (Calret).

В 3 из вышеописанных случаев позднее был исследован аутопсийный материал на базе судебно-гистологического отделения ГБУЗ СО «БСМЭ» и гистологической лаборатории ЦНИЛ ГБОУ ВПО «УГМУ» МЗ РФ с использованием «традиционного» гистологического и иммуногистохимического (ИГХ) методов исследования опухолей плевры. ИГХ исследование проводили на материале парафиновых блоков пероксидазо-антипероксидазным методом по стандартным диагностическим протоколам с использованием полимерной системы детекции UltraVision Quanto и набора первичных антител TTF-1, EMA, WT-1 и Calret.

Микроскопия и фотографирование полученных гистологических, цитологических и ИГХ препаратов выполнялась на световом микроскопе Olympus CX41 с цифровой камерой DP27 и программным пакетом изображений «cellSens Entry» (Olympus Corporation, Япония).

Результаты и обсуждение

На основании микроскопической картины препаратов, полученных методом ЦБ и окрашенных гематоксилин-эозином, во всех случаях была диагностирована «злокачественная эпителиальная железисто-подобная опухоль плевры». В микропрепаратах ЦБ были обнаружены «многослойные» солидные и железисто-подобные опухолевые структуры из полиморфных округлых и овальных клеток с вариабельно выраженной вакуолизированной цитоплазмой и овальным или неправильной формы ядром с грубозернистой структурой хроматина и хорошо различимыми нуклеолами (Рис. 1, 2).

В 6 случаях с клинически доказанной первичной локализацией опухолевого процесса в легких на материале ЦБ было выполнено ИЦХ исследование с использованием антитела TTF-1. Во всех 6 случаях клетки опухоли вариабельно экспрессируют TTF-1, что подтвердило пневмоцитарную дифференцировку опухоли и метастатическую природу процесса. Во всех случаях опухоль расценена как аденокарцинома легкого с метастазами в плевре.

В 3 случаях с неизвестной первичной локализацией опухолевого процесса на материале ЦБ было выполнено ИЦХ исследование с использованием антител TTF-1, Кер 7, CDX2, ER и PR. В этих случаях клетки опухоли вариабельно экспрессируют TTF-1, в 2 их них - Кер 7, реакции с CDX2, ER и PR отрицательные, что также подтвердило пневмоцитарную дифференцировку опухоли и метастатическую природу процесса. Маркеры CDX2, ER и PR использовались для исключения первичной локализации опухоли в ЖКТ и молочной железе. Во всех 3 случаях опухоль расценена как аденокарцинома легкого с метастазами в плевре (Рис. 1 - рисунки к статье см. на специальной цветной вставке журнала - *прим. ред.*).

В 3 случаях с неизвестной первичной локализацией опухолевого процесса на первом этапе было выполнено ИЦХ исследование на материале ЦБ с использованием антител TTF-1, Кер 7, CDX2, ER и PR. В этих случаях клетки опухоли диффузно сильно экспрессируют Кер 7, реакции со всеми остальными маркерами отрицательные. На втором этапе ИЦХ исследования использовались антитела ЕМА, Кер 5/6, WT-1 и Calret. Клетки опухолей диффузно вариабельно экспрессируют ЭМА и Кер 5/6, диффузно сильно - WT1 и Calret (ядерная и цитоплазматическая реакция), что подтвердило первичную локализацию процесса в плевре. В данных случаях на основании ИЦХ исследования наиболее вероятным представлялся диагноз эпителиоидной мезотелиомы плевры (Рис. 2).

Таким образом, метод ЦБ с проведением ИЦХ исследования плевральной жидкости позволил в 9 случаях морфологически верифицировать аденокарциному легкого с метастазами в плевре, в 3 случаях - эпителиоидную мезотелиому плевры. В 3 случаях аденокарциномы на материале цитоблока проведено молекулярно-генетическое исследование, и в одном из них выявлена EGFR-мутация.

В дальнейшем в 3 случаях эпителиоидной мезотелиомы плевры, предположительно диагностированной при-

жизненно при помощи ИЦХ исследования на материале ЦБ плевральной жидкости, были исследованы материалы аутопсий умерших от генерализованного опухолевого процесса больных. Выполнено посмертное гистологическое и ИГХ исследование опухолевой ткани. При гистологическом исследовании во всех случаях опухоль плевры состоит из тубулярных структур, образованных полиморфными кубическими эпителиальными клетками с умеренно выраженной эозинофильной цитоплазмой и овальным ядром с грубозернистой структурой хроматина и хорошо различимыми нуклеолами. По данным ИГХ исследования клетки опухоли вариабельно экспрессируют ЕМА и Calret, в одном случае - WT-1, реакция с TTF-1 отрицательная (Рис. 3), что подтверждает наличие у данных пациентов эпителиоидной мезотелиомы плевры. Результаты ИГХ исследования соответствуют данным ИЦХ исследования, выполненного на материале ЦБ.

Таким образом, цитологическое исследование плевральной жидкости с использованием метода ЦБ и ИЦХ исследования представляется весьма эффективным и перспективным методом морфологической диагностики опухолей.

Заключение

В результате проведенного исследования доказана высокая диагностическая ценность метода ЦБ, существенно повышающего возможности цитологической диагностики опухолей по материалам плевральной жидкости. Метод позволяет проводить полноценное ИЦХ исследование, не прибегая к методам «взрывной» фиксации, что особенно ценно при невозможности получения гистологического материала по техническим причинам, труднодоступной локализации опухоли или тяжелого состояния пациента (тяжелая дыхательная, сердечно-сосудистая недостаточность, кахексия и пр.). Следует подчеркнуть, что применение метода ЦБ расширяет возможности проведения молекулярно-генетического исследования опухолевого материала, что имеет существенное значение в современных условиях успешного использования таргетной химиотерапии опухолей легких. ■

Костерина Н.Е., заведующая ЦПАО ГБУЗ СО «ИТД», врач-патологоанатом и цитолог гистологической лаборатории ЦНИЛ ГБОУ ВПО «УГМУ» МЗ РФ, г. Екатеринбург. **Гринберг Л.М.**, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии ГБОУ ВПО «УГМУ» МЗ РФ, Главный научный сотрудник Уральского НИИ фтизиопульмонологии, г. Екатеринбург. **Валамина И.Е.**, к.м.н., доцент кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО «УГМУ» МЗ РФ, заведующая гистологической лабораторией ЦНИЛ ГБОУ ВПО «УГМУ» МЗ РФ, г. Екатеринбург. **Николаева А.М.**, м.н.с. гистологической лаборатории ГБОУ ВПО «УГМУ» МЗ РФ, г. Екатеринбург. **Неволин А.Н.**, врач судебно-медицинский эксперт ГБУЗ СО «БСМЭ», г. Екатеринбург. Автор, ответственный за ведение переписки: Костерина Н.Е., 620142, г. Екатеринбург, ул. Чапаева, 9, ЦПАО ГБУЗ СО «ИТД», hellodolly@mail.ru

Литература:

1. *World Health Organization Classification of Tumours : WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart / Edited by W. D. Travis, E. Brambilla, Allen P. Burke [et. al.]*. – Lyon : IARC Press, 2015. – P. 412.
2. *Travis W. D. International Association for the Study of Lung Cancer / American Thoracic Society / European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma / William D. Travis, Elisabeth Brambilla, Masayuki Noguchi [et al.] // Journal of Thoracic Oncology*. – 2011. - Vol. 6. – P. 244-285.
3. *Comprehensive Cytopathology / Edited by Marluce Bibbo, David Wilbur*. – 3rd ed. – Philadelphia : Elsevier / Saunders, 2008. - 1136 p. – P. 334 – 371.
4. *Cibas E. Cytology: Diagnostic Principles and Clinical Correlates, Expert Consult / Edmund Cibas, Barbara Ducatman* – 3rd ed. – Philadelphia : Saunders, 2009. - 552 p. – P. 92 – 95, 130.
5. *Dabbs D. J. Diagnostic Immunohistochemistry : Theranostic and Genomic Applications / David J. Dabbs*. – 4th ed. – Philadelphia : Elsevier/Saunders, 2014. - 960 p. – P. 400-404.
6. *Волченко Н. Н. Атлас цитологической и иммуноцитохимической диагностики опухолей / Н. Н. Волченко, М. В. Савостикова*. - М. : Ренпоцентр, 2010. – 236 с. – С. 158-162.
7. *Shivakumarswamy U. Diagnostic utility of the cell block method versus the conventional smear study in pleural fluid cytology / U. Shivakumarswamy, U. A. Surekha , H. K. Mahesh [et al.] // Journal of Cytology 2012*. – Vol. 29(1). – P. 11–15.
8. *Miyoshi S. Diagnostic Utility of Pleural Fluid Cell Block versus Pleural Biopsy Collected by Flex-Rigid Pleuroscopy for Malignant Pleural Disease: A Single Center Retrospective Analysis / S. Miyoshi, S. Sasada, T. Izumo [et al.] PLoS One 2016*. – Vol. 11(11).
9. *Köksal D. The Cell Block Method Increases the Diagnostic Yield in Exudative Pleural Effusions Accompanying Lung Cancer / D. Köksal, F. Demirag, H. Bayiz [et al.] // Turkish Journal of Pathology 2013*. – Vol. 29. – P. 165-170.
10. *Костерина Н. Е. Методы жидкостной цитологии и цитоблок в морфологической диагностике опухолей легких / Н. Е. Костерина, Л. М. Гринберг, А. М. Николаева // Уральский медицинский журнал 2016*. - №3(136). – С. 45-49

Костерина Н.Е., Гринберг Л.М., Валамина И.Е., Николаева А.М., Неволин А.Н.

Метод цитоблока в морфологической диагностике опухолевых поражений плевры на материале плевральной жидкости

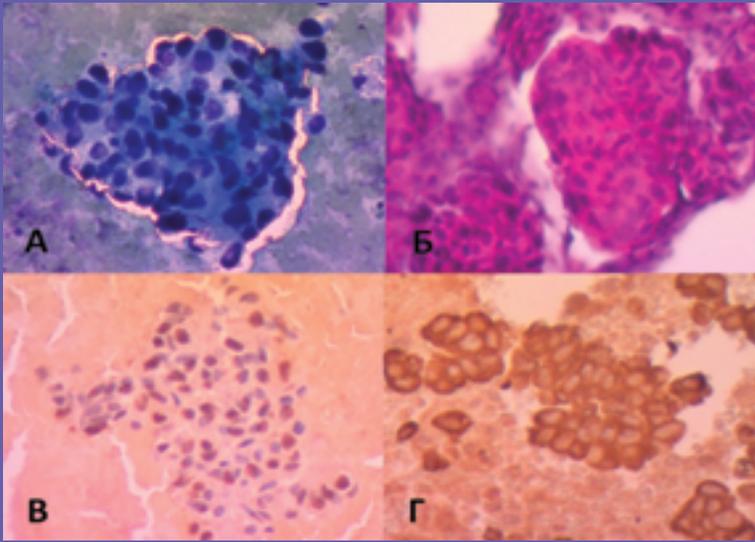


Рисунок 1. Аденокарцинома легкого. А – цитологический мазок, азур-эозин, X200, Б – микропрепарат цитоблока, гематоксилин-эозин, X200, В – иммуноцитохимический препарат, экспрессия клетками опухоли TTF-1, X200, Г – экспрессия клетками опухоли Ker 7, X200

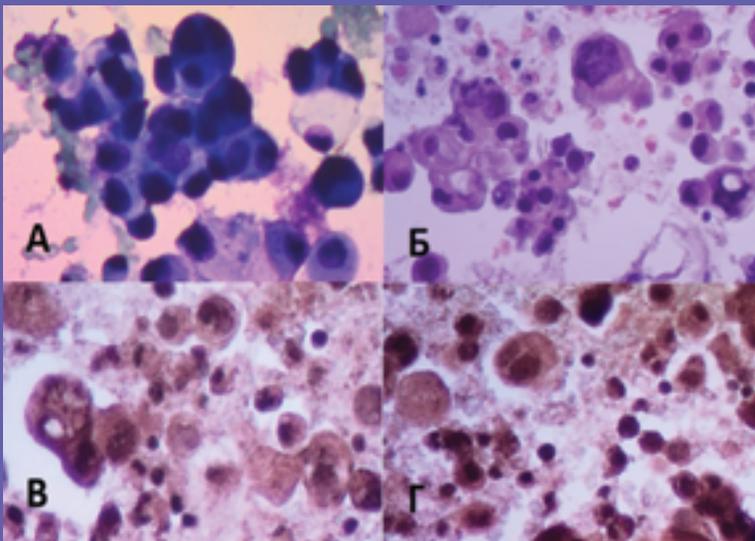


Рисунок 2. Эпителиоидная мезотелиома плевры. А – цитологический мазок, азур-эозин, X200, Б – микропрепарат цитоблока, гематоксилин-эозин, X200, В – иммуноцитохимический препарат, экспрессия клетками опухоли WT1, X200, Г – экспрессия клетками опухоли Calret, X200

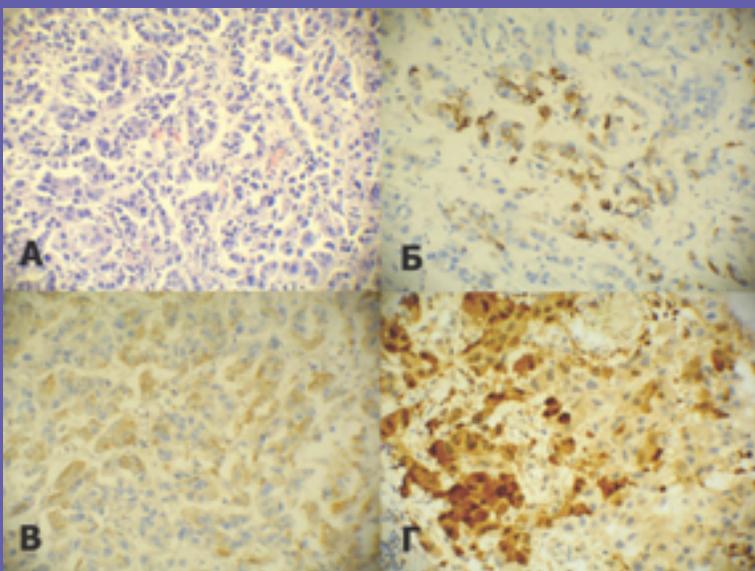


Рисунок 3. Эпителиоидная мезотелиома плевры (аутопсийный материал). А – гистологический препарат, азур-эозин, X100, Б – иммуногистохимический препарат, экспрессия клетками опухоли EMA, В – экспрессия клетками опухоли Calret, X100, Г – экспрессия клетками опухоли WT1, X100