

Н.Н. ВОЛЧЕНКО, О.В. БОРИСОВА

ДИАГНОСТИКА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ПО СЕРОЗНЫМ ЭКССУДАТАМ



Москва
ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА
«ГЭОТАР-Медиа»
2018

3

Дифференциально- диагностические цитологические и иммуноцитохимические критерии реактивного и метастатического экссудата

3.1. ПРОБЛЕМЫ ПРИ ЦИТОЛОГИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ ЭКССУДАТОВ

3.1.1. Изменение морфологии клеток мезотелия при различных патологических процессах

В трактовке клеточного состава жидкостей из серозных полостей при цитологическом исследовании имеется много трудностей, причиной которых является в первую очередь изменение морфологии мезотелиальных клеток. Мезотелий различных участков плевры и брюшины отличается по форме, величине и интенсивности окраски ядер и цитоплазмы. В мезотелии диафрагмальной плевры и брюшины встречаются только крупные клетки, а в мезотелии брюшины печени и желудка наблюдаются как крупные, так и мелкие клетки. Меняется ширина клеток в диафрагмальной брюшине, передней стенке живота и печени: они то широкие, то узкие; в желудке — только широкие клетки. Форма ядер соответствует форме клеток: в узких клетках ядра овальные, в широких — круглые [20].

Клетки неизмененного мезотелия могут располагаться разрозненно или в виде пластов, скоплений. В пластах клетки нередко образуют структуры в виде «булыжной мостовой» (см. рис.1.1). Ядра среднего размера, округлые или овальные, расположены либо центрально, либо несколько эксцентрично, ядерно-цитоплазматическое соотношение сдвинуто в сторону цитоплазмы. Хроматин мелкозернистый, распределен равномерно. Иногда в ядре видно небольшое ядрышко. Цитоплазма относительно широкая, с различной интенсивностью окраски, от оксифильной до резко базофиль-

ной [41, 54]. В некоторых клетках можно увидеть микроворсинки (рис. 3.1).

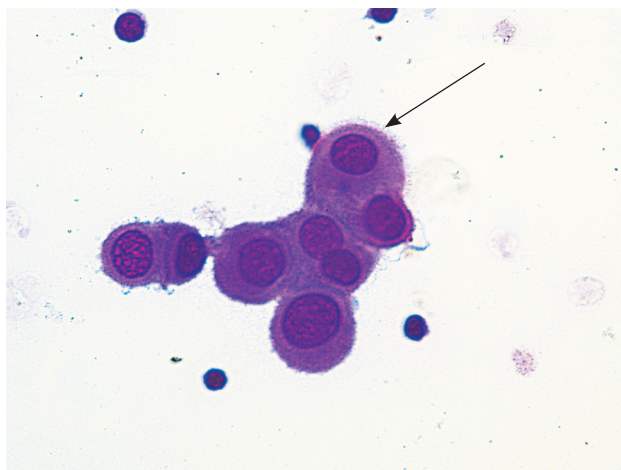
Часто в цитологических препаратах отмечается отрыв части цитоплазмы, что связано с апокринным типом секреции клеток мезотелия (рис. 3.2).

Серозные оболочки обладают чрезвычайной реактивностью на малейшее раздражение. При различных патологических условиях и регенерации мезотелия наблюдается нарушение непрерывности клеточного пласта вследствие обособления клеток, последние при этом могут принимать округлую или отростчатую форму (рис. 3.3).

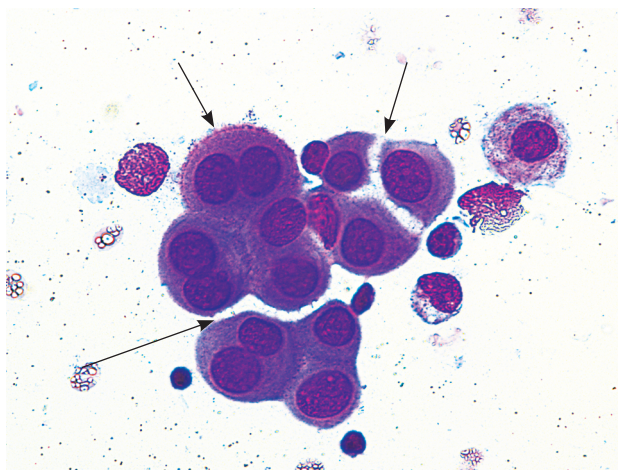
При плевритах и асцитах наблюдаются дисконфлексация клеточного пласта, дегенерация мезотелия и слущивание части его клеток. Первоначально клетки из плоских становятся высокими, принимают кубическую форму или округляются. При воспалении наблюдается некробиоз и слущивание клеток. При плевритах и асцитах, причиной которых является злокачественное новообразование, также наблюдаются признаки воспаления. Однако в этих случаях особенно четко прослеживаются репаративные процессы в форме роста мезотелия по поверхности фибрина. В неопухолевых и опухолевых экссудатах мезотелиальные пласты могут быть так компактны, что имеют вид сплошных островков эпителиальной ткани, при наличии в них просветов бросается в глаза сходство с тканью желез. В некоторых клетках отмечается наличие слизи (рис. 3.4).

При этом отмечается бурная пролиферация мезотелиальных клеток с образованием железистоподобных структур (рис. 3.5).

В краевой зоне раздражения отмечается резко выраженный полиморфизм реактивно измененных и пролиферирующих клеток мезотелия с различными размерами ядер и весьма разнообразными формами их (округлой, бобовидной, причудливой) и крупными ядрышками (рис. 3.6–3.8).



а



б

Рис. 3.1. Клетки мезотелия с хорошо просматриваемыми микроворсинками (указаны стрелками). Окраска по Паппенгейму, $\times 1000$

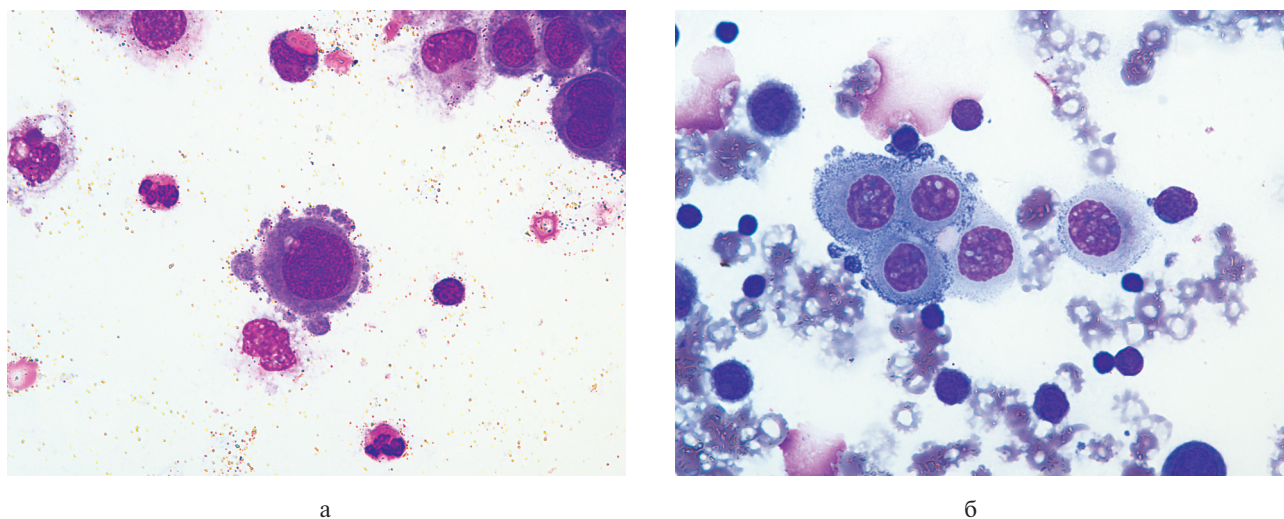


Рис. 3.2. Клетки мезотелия с апокриновым типом секреции. Окраска по Паппенгейму, $\times 1000$

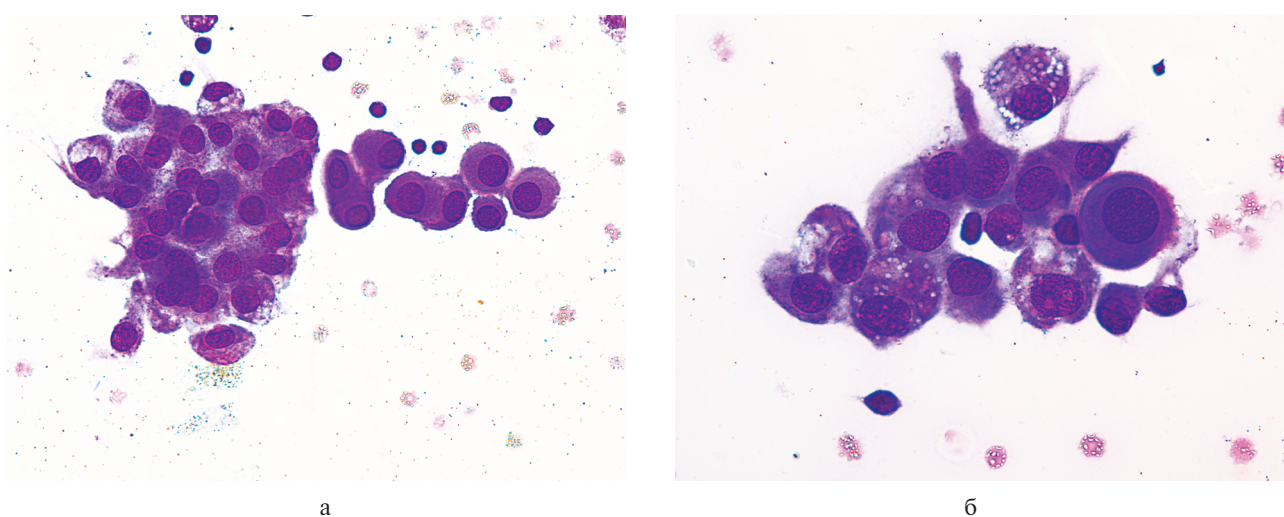


Рис. 3.3. Реактивный экссудат, скопление клеток мезотелия с реактивными изменениями, часть клеток отростчатой формы, окраска по Паппенгейму: а — $\times 630$; б — $\times 1000$

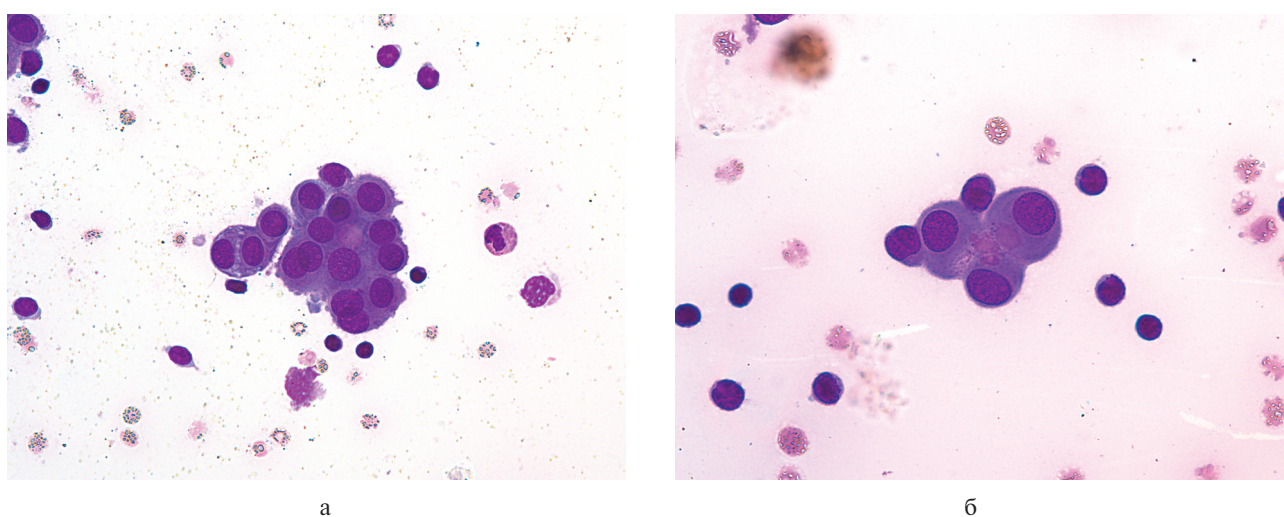
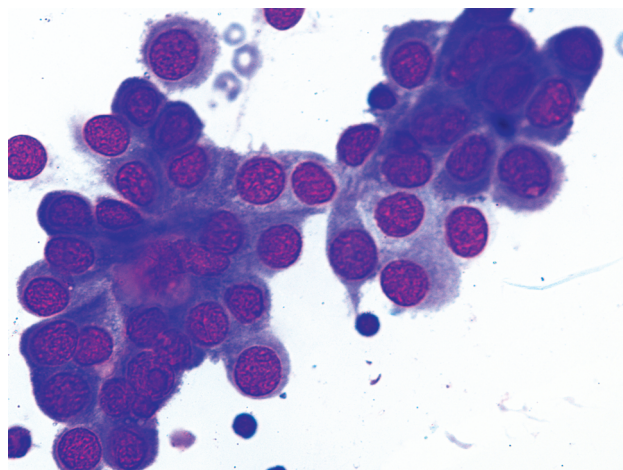
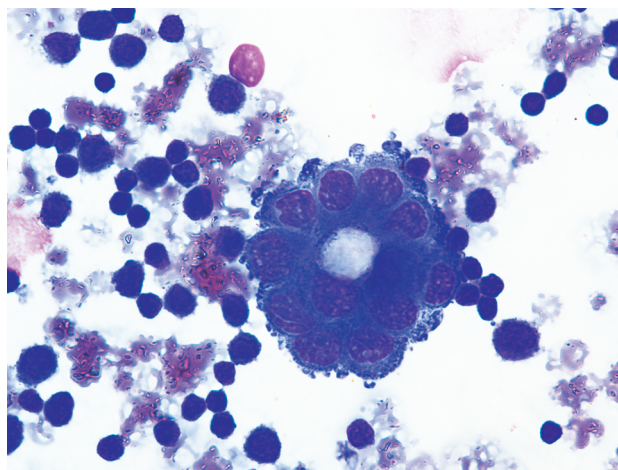


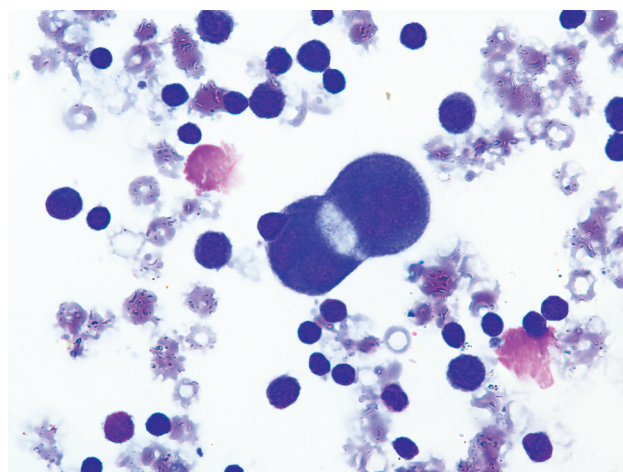
Рис. 3.4. Клетки мезотелия с секреторной активностью. Окраска по Паппенгейму, $\times 1000$



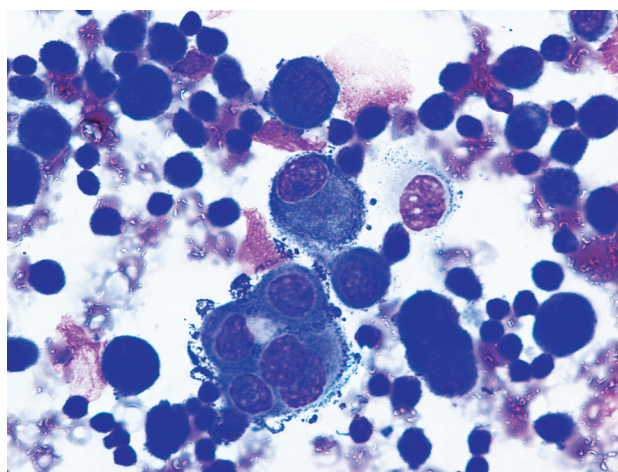
а



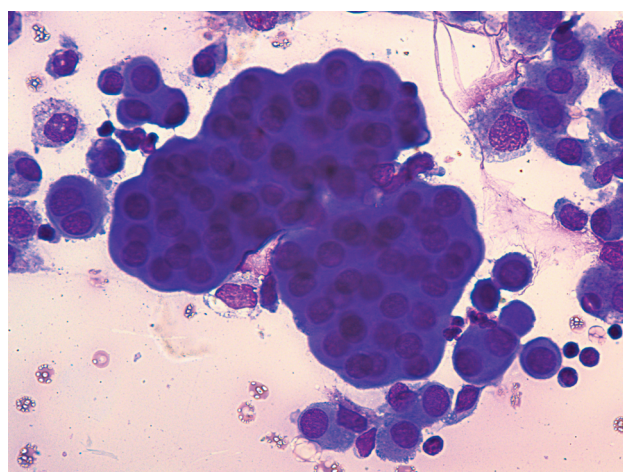
б



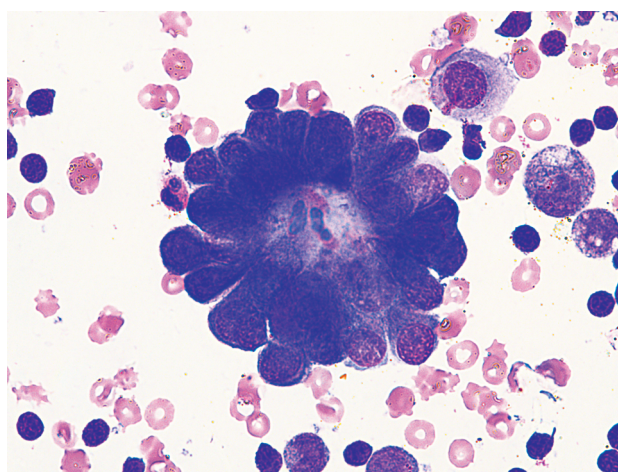
в



г

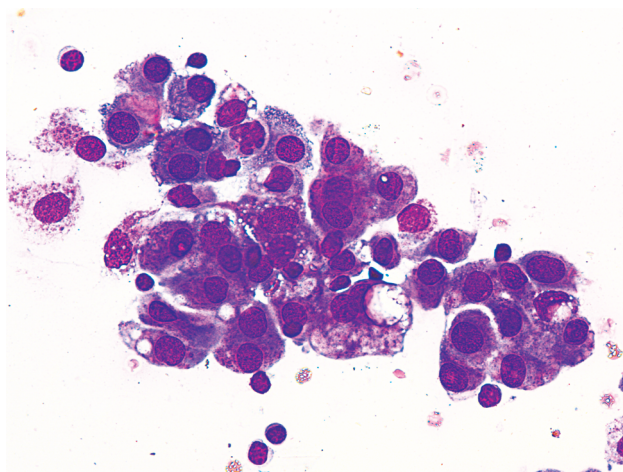


д

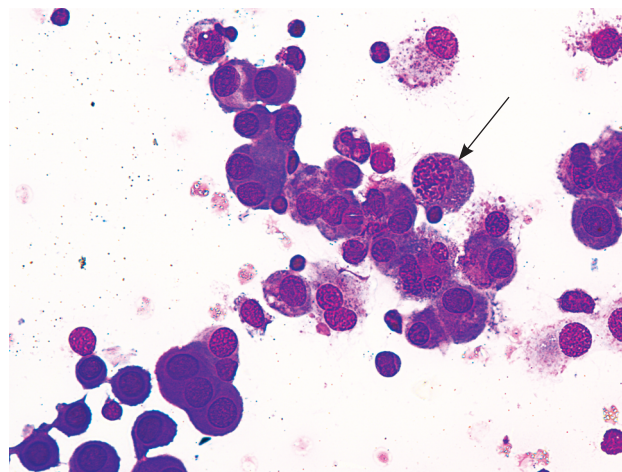


е

Рис. 3.5. Скопление клеток мезотелия с образованием железистоподобной структуры, окраска по Паппенгейму. $\times 1000$ (а–г, е), $\times 630$ (д)

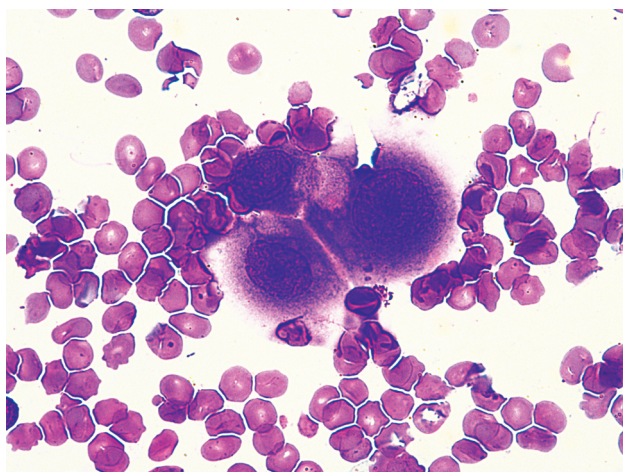


а

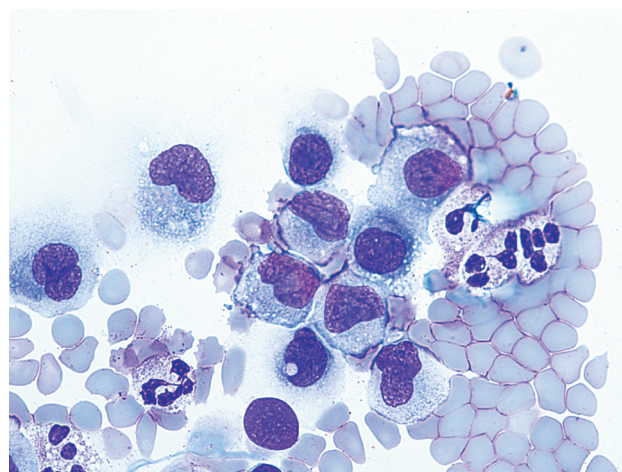


б

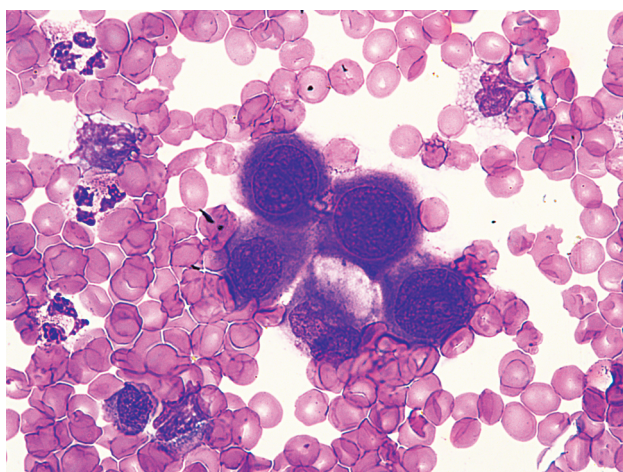
Рис. 3.6. Реактивный экссудат, окраска по Паппенгейму, $\times 630$: а — выраженные реактивные изменения клеток мезотелия; б — митоз в клетке мезотелия (показан стрелкой)



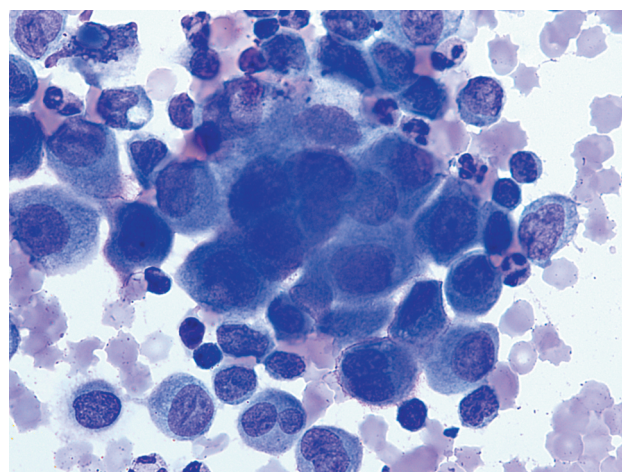
а



б

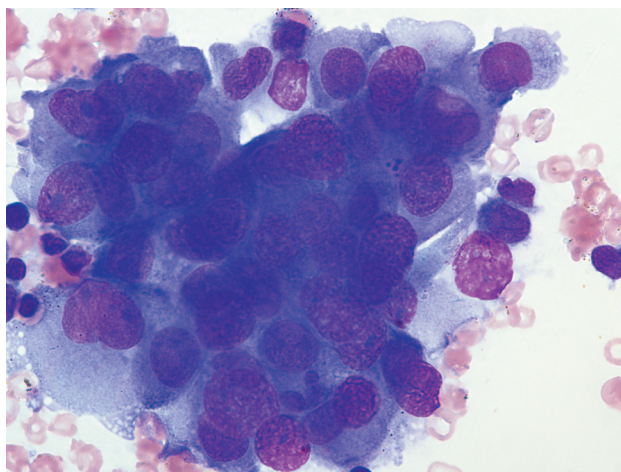


в

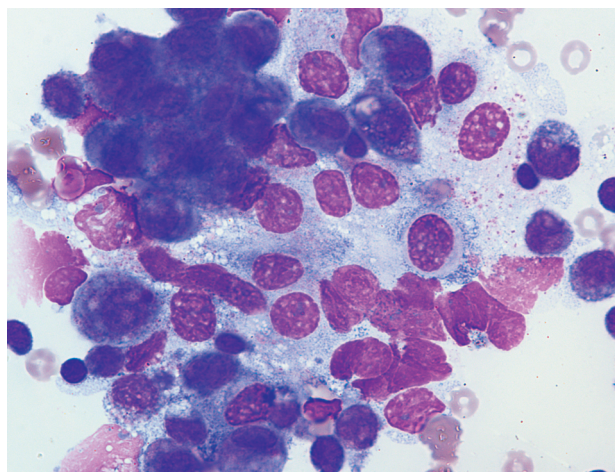


г

Рис. 3.7. Реактивный экссудат. Резко выраженные реактивные изменения клеток мезотелия. Окраска по Паппенгейму, $\times 1000$



а



б

Рис. 3.8. Реактивный экссудат. Выраженная пролиферация клеток мезотелия. Окраска по Паппенгейму, $\times 1000$

Отделившиеся и находящиеся в условиях жидкой среды клетки мезотелия, как и другие клетки, постепенно подвергаются дегенерации и дистрофии (рис. 3.9) и, что выражается в набухании, жировом и гидропическом перерождении с образованием вакуолей, изменении окрашивания клеток (метахромазия) (рис. 3.10), часть клеток может принимать перстневидную форму (рис. 3.11).

При лучевом повреждении клеток мезотелия отмечаются увеличение клеток и ядер, гиперхромия, могут быть выражены ядрышки, встречаются фрагментация ядер, многоядерность, дистрофические изменения [20, 41, 81] (рис. 3.12).

Таким образом, при различных патологических процессах (остром и хроническом воспалении, повреждении серозных оболочек, воздействии лекарственных препаратов, лучевой терапии, послеоперационном периоде, неопухолевых и опухолевых заболеваниях) фенотип клеток мезотелия чрезвычайно разнообразен, что является причиной их неправильной трактовки, особенно при появлении выраженных признаков атипии, это делает клетки мезотелия трудно отличимыми от клеток рака.

Другие клеточные элементы экссудата, вызывающие сложности в их оценке

Разнообразие клеточных элементов в экссудате объясняется чрезвычайно высокой реактивностью серозного покрова и субсерозной мезенхимы на малейшее раздражение и способностью клеточных элементов к размножению. Возможна ошибочная интерпретация клеток макрофагально-гистиоцитарной природы, имеющих различную морфологию и всегда в большом количестве присутствующих в экссудатах: клетки иногда трудно отличить от мезотелиальных и опухолевых. Гистиоциты крупных размеров с большим ядром бобовидной формы, занимающим практически всю цитоплаз-

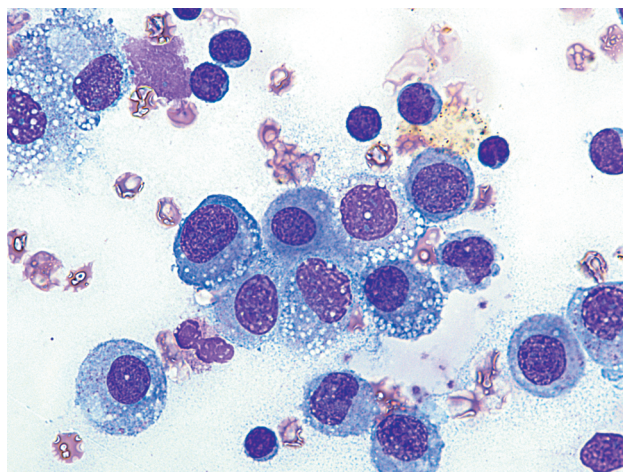
му, и выраженными сочными ядрышками. При внимательном их изучении можно отметить, что мембрана не имеет четких контуров, вытягивается, это может помочь в правильной их идентификации. Клетки макрофагальной природы крупные и не всегда с четкими очертаниями. Цитоплазма обильная, пенистая, часто вакуолизированная, может содержать включения. Ядра средние, располагаются по центру или эксцентрично с мелкопетлистой структурой хроматина (рис. 3.13).

Лимфоидные элементы различной степени зрелости всегда присутствуют в экссудате в различных количествах. Выраженная лимфоцитарная реакция с частыми фигурами митозов, наблюдаемая при туберкулезе и некоторых других реактивных неопухолевых процессах, может быть ошибочно интерпретирована как лимфома.

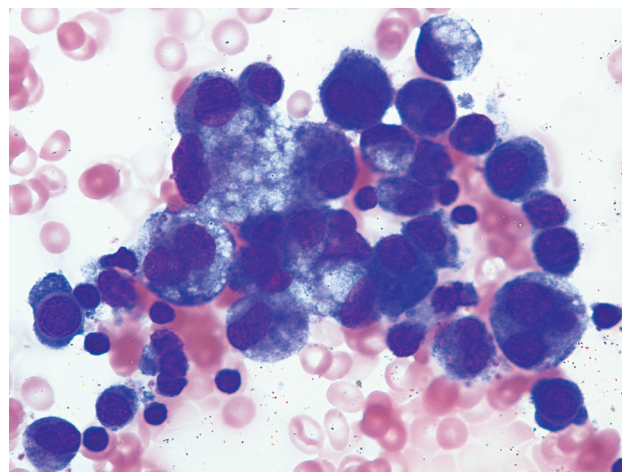
Изменение морфологии опухолевых клеток в экссудате

Распознавание клеток опухоли не всегда бывает простым. При одной и той же гистологической форме опухоли у одного больного и даже в одном и том же препарате клетки имеют неодинаковую морфологию. Это объясняется гистологической формой и полиморфизмом самой опухоли, а также тем, что клетки, отделившиеся от массива опухоли, как и клетки нормальных тканей, находят в экссудате благоприятную среду для роста и размножения и проходят весь цикл своего развития, вплоть до гибели.

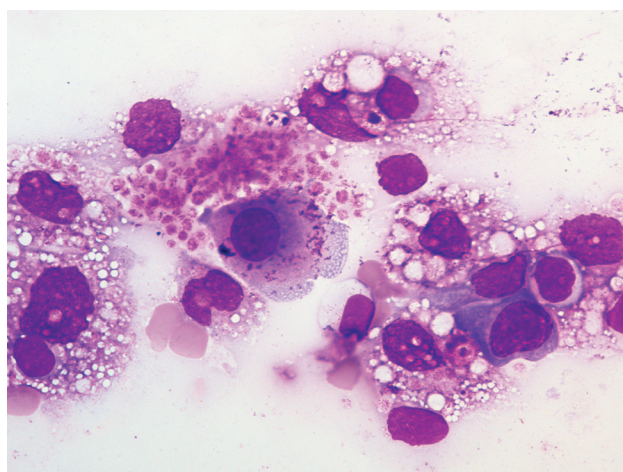
Трудности интерпретации цитологического исследования жидкости, полученной из серозных полостей, зависят от присутствия разнообразных клеточных элементов и усугубляются изменениями морфологии клеток, связанными с нахождением в жидкой среде, состояниями пролиферации, репаративными и дистрофическими процессами.



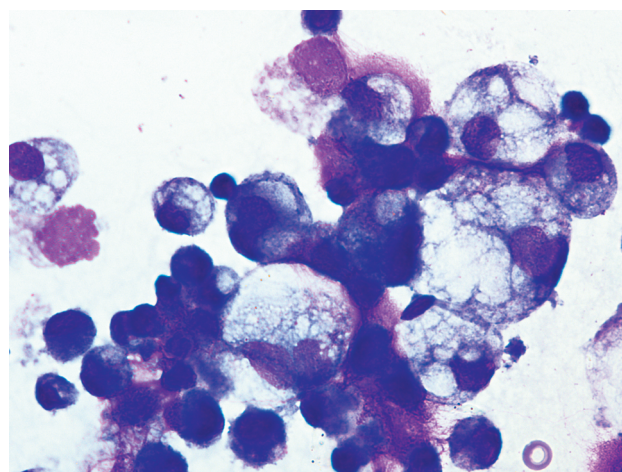
а



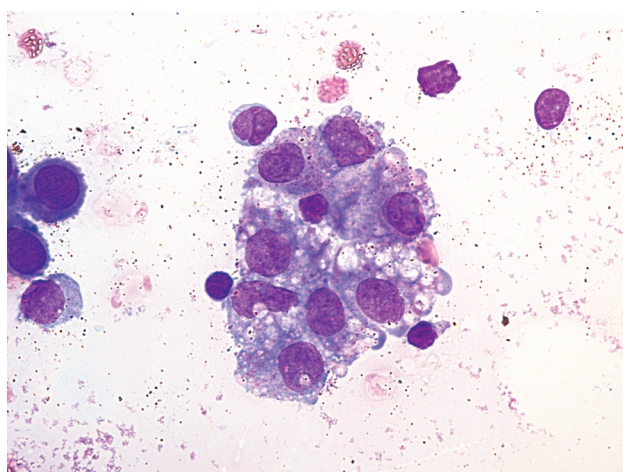
б



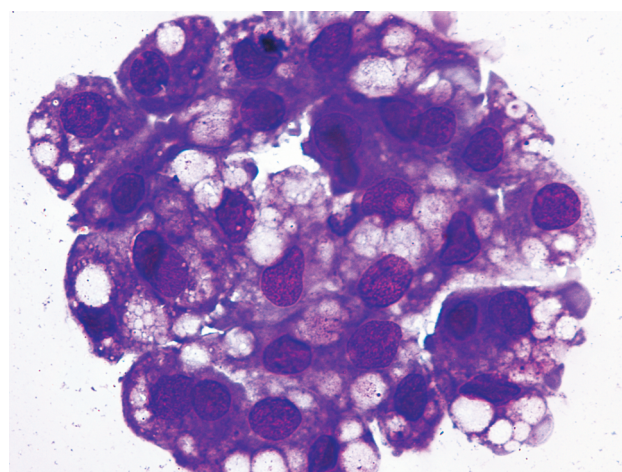
в



г

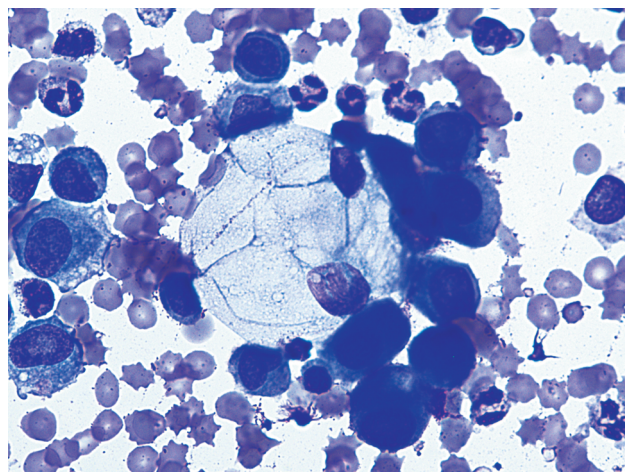


д

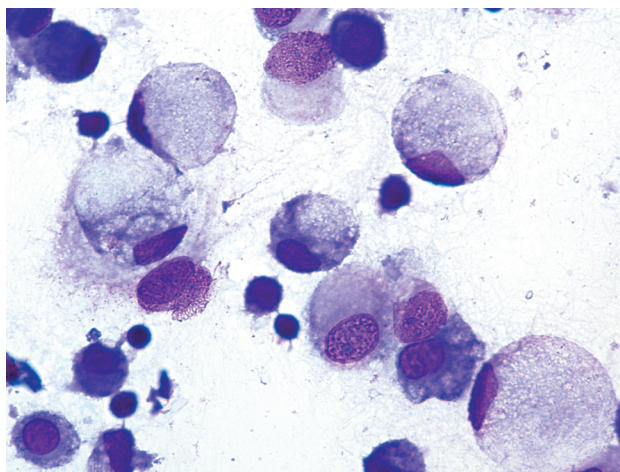


е

Рис. 3.9. Реактивный экссудат. Дистрофические изменения клеток мезотелия. Окраска по Паппенгейму, $\times 1000$

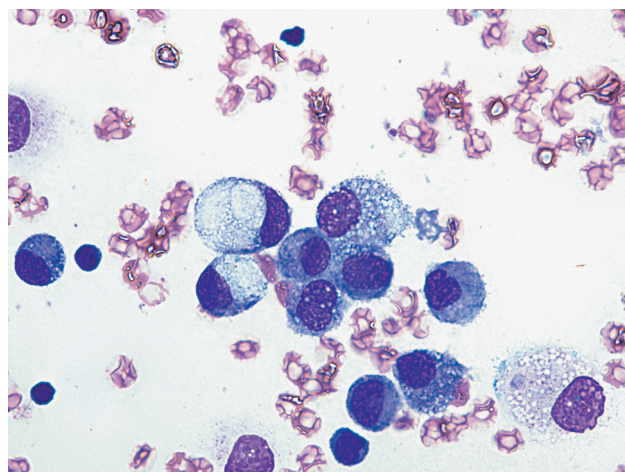


а

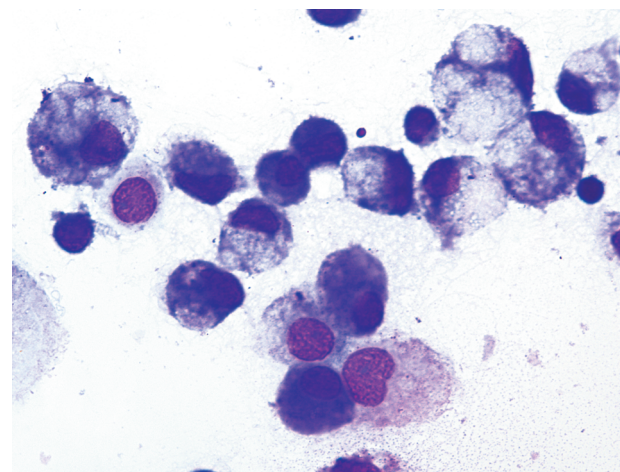


б

Рис. 3.10. Реактивный экссудат. Гидропическое перерождение клеток мезотелия с образованием вакуолей. Окраска по Паппенгейму, $\times 1000$

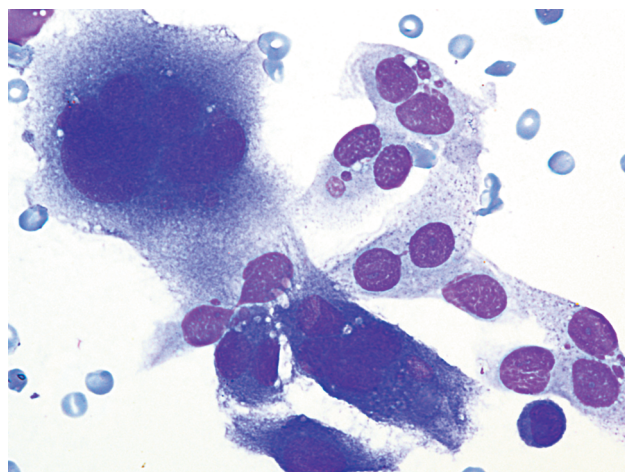


а

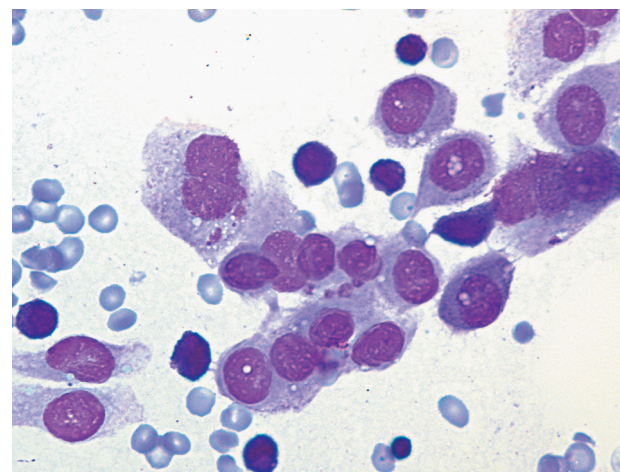


б

Рис. 3.11. Дегенеративные изменения клеток мезотелия с образованием перстневидных клеток. Окраска по Паппенгейму, $\times 1000$

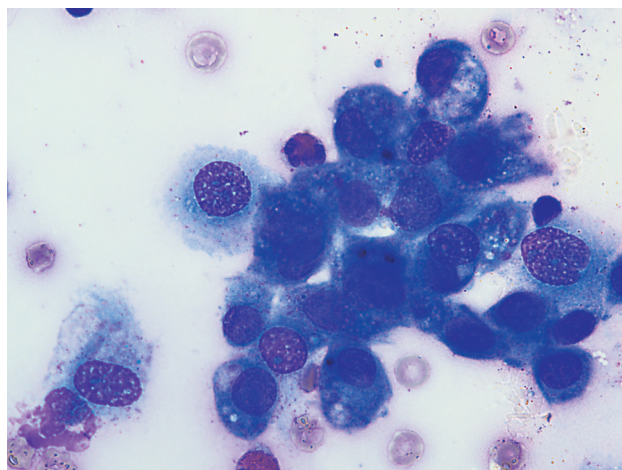


а

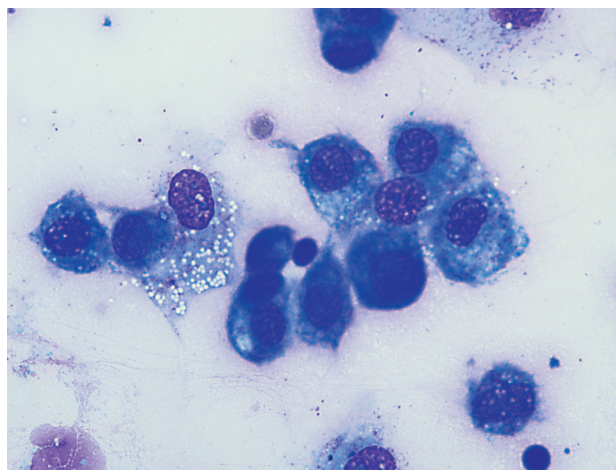


б

Рис. 3.12. Реактивный экссудат. Клетки мезотелия с признаками лучевого повреждения. Окраска по Паппенгейму, $\times 1000$



а



б

Рис. 3.13. Реактивный экссудат. Клетки макрофагально-гистиоцитарной природы сходны с клетками мезотелия: имеются включения в цитоплазме. Окраска по Паппенгейму, $\times 1000$

3.1.2. Дифференциальная диагностика реактивного и метастатического экссудата с помощью иммуноцитохимического исследования

В сложных диагностических случаях при затруднении определения характера экссудата используются современные более чувствительные методы, каковым является ИЦХ, что позволяет увеличить число наблюдений с доказанной диссеминацией опухоли и более точно определить распространенность опухолевого процесса.

ИЦХ-исследование можно применять в двух вариантах — иммунопероксидазный метод (ИПМ) и иммунофлюоресцентный метод (ИФМ).

С целью выявления опухолевых клеток в плевральном или перитонеальном экссудате может быть применен различный набор антител, для выявления наиболее частой причины специфического экссудата — аденогенного рака применяются эпителиальный маркер Ber-EP4, эпителиальный мембранный антиген (ЭМА) и раково-эмбриональный антиген (РЭА).

РЭА является онкофетальным белком, представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 180–200 кДа. У взрослых людей продуцируется в очень ограниченных количествах эпителиальными клетками бронхов, молочной железы и желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). МкАТ к РЭА выявляют клетки рака в экссудатах в 44–55% случаев в цитоплазме опухолевых клеток. Экспрессия этого маркера наиболее характерна для рака желудка и толстой кишки, он не экспрессируется в мезотелии и клетках лимфогистиоцитарной природы.

ЭМА является антителом к полиморфному муцину, представляющему собой апикальную часть

поверхностных мембран эпителия. Спектр применения ЭМА как маркера клеток эпителиальной природы широк, он экспрессируется практически во всех формах рака, включая гепатоцеллюлярный, холангиоцеллюлярный и почечно-клеточный рак. ЭМА не экспрессируется в нейроэндокринных опухолях, мезотелиальных клетках и в большинстве клеток макрофагально-гистиоцитарной природы. Однако он взаимодействует с плазматическими клетками, которые могут присутствовать в экссудате, что необходимо учитывать. ЭМА имеет мембранную экспрессию.

Исходя из вышесказанного, использование РЭА и ЭМА при исследовании экссудатов ограничено. Хотя РЭА можно применять при выявлении диссеминации опухолей из ЖКТ, а ЭМА — при гепатоцеллюлярном и почечно-клеточных формах рака. При оценке ИЦХ-исследования надо быть уверенным, что реакция прошла именно в опухолевых клетках, так как возможны экспрессия в неопухолевых клеточных элементах и выраженное фоновое окрашивание.

Эпителиальный маркер Ber-EP4 (Er-CAM, МОС-31) представляет собой молекулу адгезии эпителиальных клеток, является трансмембранным гликопротеином, состоящим из двух полипептидных цепей с молекулярной массой 34 и 39 кДа. Окрашиваемый антителами эпитоп в норме обнаруживается на поверхностной мембране или в цитоплазме клеток преимущественно аденогенного рака. Экспрессия его отмечается в клетках широкого спектра новообразований эпителиального происхождения, включая мелкоклеточные, недифференцированные формы рака и нейроэндокринные опухоли. Ограничено его использование при диссеминации плоскоклеточного, гепатоцеллюлярного и почечно-клеточного рака. В клетках мезотелия и опухолях не-

эпителиального происхождения Ber-EP4 не экспрессируется. При оценке ИЦХ-реакции имеет значение цитоплазматическая и **одновременно четкая мембранная экспрессия маркера**. Обнаружение положительно реагирующих клеток при правильно проведенной ИЦХ-реакции и соответствующих контрольных исследованиях, а также изучении морфологии клеточных элементов свидетельствует о наличии метастазов рака (рис. 3.14) [61, 62, 104, 137, 188, 210, 226, 231, 247].

При диссеминации аденогенного рака наиболее надежным и чувствительным маркером является эпителиальный маркер Ber-EP4: чувствительность его составляет 96%, специфичность — 99%.

ИЦХ-исследование позволяет:

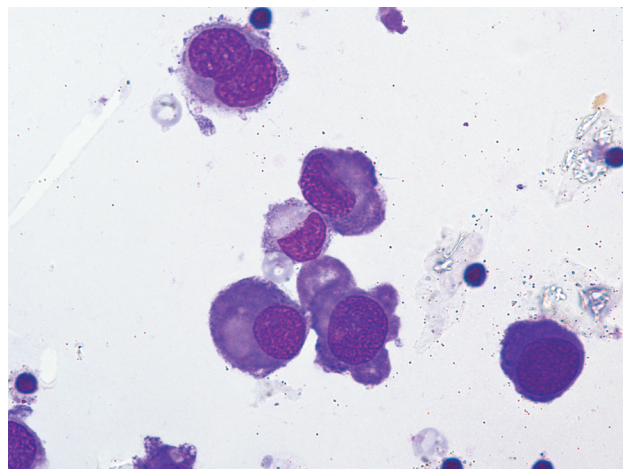
- в 79% случаев подтвердить диссеминацию опухоли, заподозренную рутинным цитологическим исследованием;
- в 15% обнаружить малочисленные опухолевые комплексы, не выявленные при рутинном цитологическом исследовании;
- в 7% избежать гипердиагностики опухолевого процесса [7].

3.1.3. Преимущества иммунофлюоресцентного метода

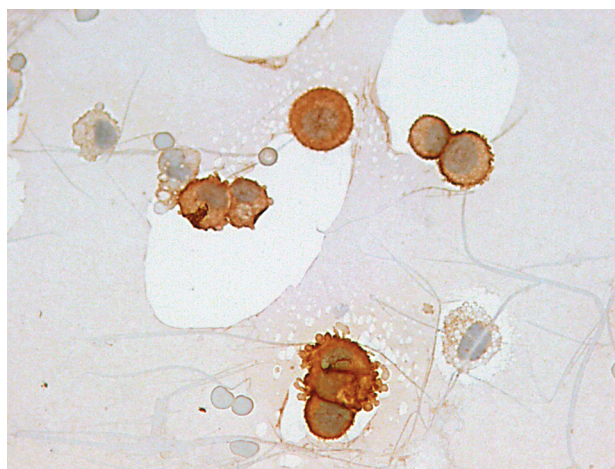
Большое значение имеет выявление опухолевых клеток при срочном интраоперационном исследовании экссудатов в связи с внедрением новых методов лечения, таких как интраоперационная внутривисцеральная и внутрибрюшная химиотерапия, интраоперационная гипертермическая химиотерапия, фотодинамическая терапия брюшины и плевры. Однако ИЦХ-исследование

ИПМ занимает по времени 2–3 ч, срочное исследование — достаточно трудоемкая процедура, так как состоит из нескольких этапов, для ускорения реакции необходимо подогревать реактивы, все это требует дополнительного времени (минимум 40 мин). Прямой ИФМ — высокочувствительный микроскопический метод, основанный на иммунной реакции выявляемого антигена с антителом, конъюгированным с флюорохромом. Особенно перспективно применение этого метода при срочных интраоперационных исследованиях экссудатов, так как не требует сложной пробоподготовки материала и значительных временных затрат: исследование занимает 20 мин. Клеточные элементы в жидкости находятся в благоприятной для них среде, жидкость доставляется в лабораторию сразу после взятия, поэтому высушивания, переохлаждения, а следовательно, и изменения конформации белков не происходит. Эпителиальный маркер Ber-EP4 является гликопротеином и находится на поверхности клеточной мембраны. ИЦХ-реакция прямая: флюорохром непосредственно конъюгирован с антителом. Все это способствует сокращению времени инкубации антитела с антигеном и применению эпителиального маркера Ber-EP4 в срочной интраоперационной цитологической диагностике экссудатов (рис. 3.15).

ИФМ-исследования экссудатов являются новым надежным и быстрым методом диагностики характера экссудата при аденогенном раке. Особенно перспективно применение этого метода при срочных интраоперационных исследованиях экссудатов, так как не требует сложной пробоподготовки материала и значительных временных затрат.



а



б

Рис. 3.14. Плевральная жидкость: а — диссеминация дольчатого рака молочной железы, окраска по Паппенгейму, $\times 1000$; б — та же пациентка, иммуноцитохимическое исследование иммунопероксидазным методом: четкая мембранная и одновременно цитоплазматическая экспрессия эпителиального маркера Ber-EP4 в клетках дольчатого рака молочной железы, $\times 630$

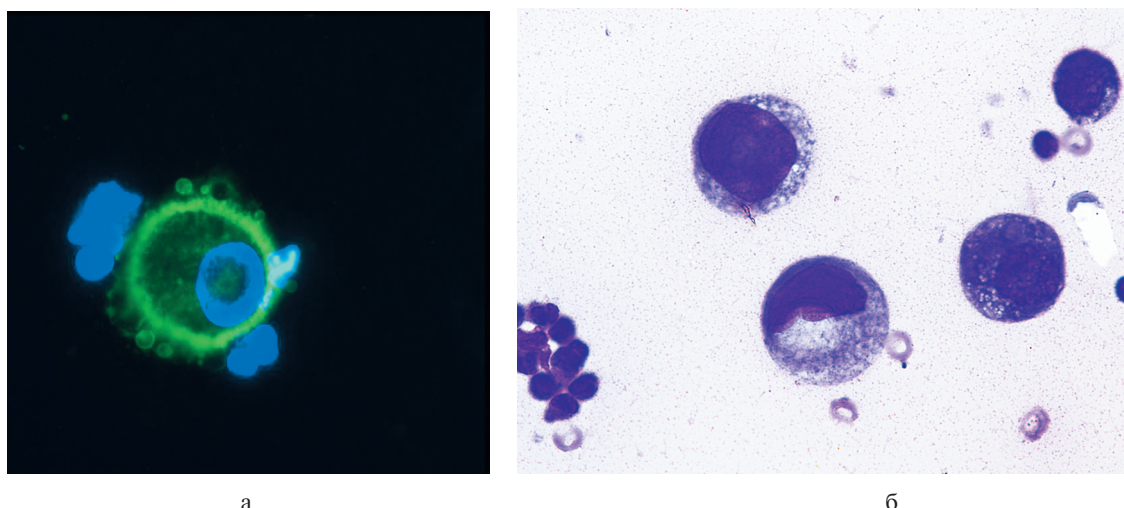


Рис. 3.15. Асцитическая жидкость: а — диссеминация перстневидно-клеточного рака желудка, окраска по Паппенгейму; б — тот же пациент, иммунофлюоресцентный метод исследования: экспрессия эпителиального маркера Ber-EP4 в клетке перстневидно-клеточного рака, хорошо видна четкая мембранная экспрессия маркера, $\times 1000$

3.1.4. Возможные сложности при иммуноцитохимическом исследовании с эпителиальным маркером Ber-EP4

В некоторых случаях в реактивно-воспалительных экссудатах с большим количеством гистиоцитарных элементов отмечается нечеткая цитоплазматическая реакция за счет поглощения этими клетками частиц красителя, которая при оценке не должна учитываться. Необходимо отметить, что макрофагальные элементы, присутствующие в экссудате в большом количестве, захватывают частицы красителя, выявляемые как светящиеся включения в цитоплазме (рис. 3.16).

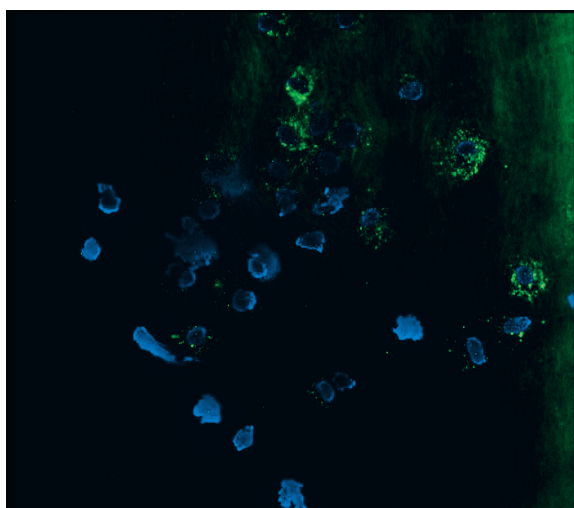


Рис. 3.16. Иммунофлюоресцентный метод. Асцитическая жидкость. Реактивный экссудат. Макрофаги с частицами красителя в цитоплазме. $\times 400$

Кроме того, в клетках в состоянии дегенерации маркер может проникать путем диффузии, реакция

не имеет строгой мембранной экспрессии, поэтому необходимо быть очень внимательным и аккуратным, и при неуверенности в истинности реакции лучше ее не учитывать (рис. 3.17).

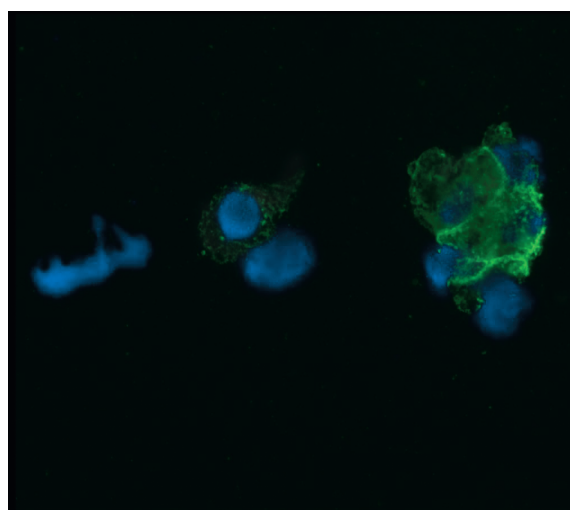


Рис. 3.17. Иммунофлюоресцентный метод. Клетки в состоянии дегенерации. Отсутствует четкая мембранная реакция. Оценивать нельзя. $\times 630$

Мезотелий при выраженных реактивных изменениях может давать слабую экспрессию маркера, поэтому всегда необходимо внимательно оценивать морфологию клеток, в которых прошла ИЦХ-реакция (рис. 3.18).

ИЦХ-исследование с эпителиальным маркером Ber-EP4 выявляет в экссудате клетки эпителиальной железистой природы, как опухолевой, так и неопухолевой. Поэтому при оценке реакции необходимо учитывать процессы, при которых клетки железистого эпителия могут оказаться в экссудате: кубический эпителий выстилки кист яичника, поджелудочной железы и других органов, попавший в

экссудат при пункции (рис. 3.19), покровный эпителий яичников, попавший в выпот в малом тазу после овуляции (рис. 3.20), эндосальпингоз и эндометриоз брюшины (см. раздел 4.5), эпителиальные опухолевые и неопухолевые клетки, попавшие в экссудат во время операции, могут сохраняться до 3 мес.

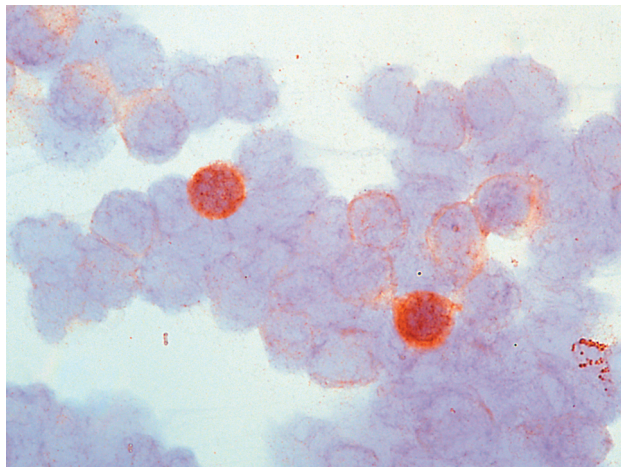


Рис. 3.18. Иммунопероксидазный метод. Слабая экспрессия эпителиального маркера Ber-EP4 в реактивно измененном мезотелии. Отсутствует четкая мембранная реакция. $\times 1000$

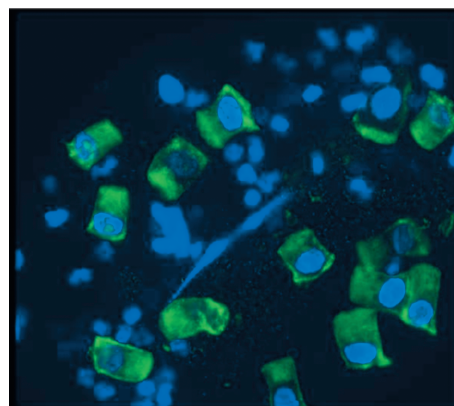


Рис. 3.19. Иммунофлуоресцентный метод. Асцитическая жидкость. Кубический эпителий выстилки кисты яичника, попавший в выпот при пункции кисты. $\times 630$

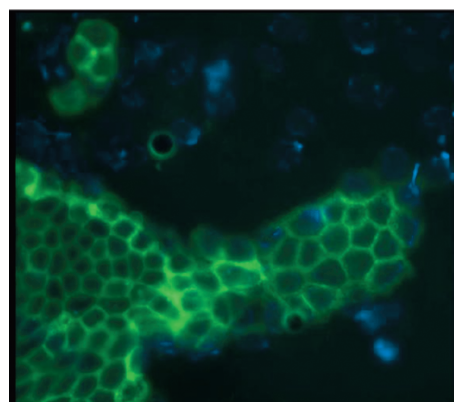


Рис. 3.20. Иммунофлуоресцентный метод. Асцитическая жидкость. Покровный эпителий яичников, попавший в выпот после овуляции. $\times 630$