

*В.И. Новик, В.Н. Клименко, Л.А. Красильникова, А.А. Михетько, А.В. Владимирова,
О.В. Иванов, Е.Л. Якубо, Е.С. Шалина, А.В. Нефедова, Т.Я. Линдеберг*

Цитологическая и иммуноцитохимическая диагностика опухолевых плевритов

ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Произведено цитологическое исследование мазков из осадка после центрифугирования плевральных жидкостей у 479 пациентов, проходивших обследование и лечение в НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова в 2014-2016 гг. У 249 (52%) пациентов опухолевые клетки в мазках не были обнаружены, в 230 (48%) наблюдениях цитологически высказано подозрение (28 наблюдений) или уверенное заключение (202) о наличии в экссудатах клеток злокачественной опухоли. В 38 случаях дополнительно выполнены ИЦХ исследования. В двух наблюдениях высказано ложноотрицательное заключение об отсутствии в мазках опухолевых клеток. Чувствительность цитологического исследования в диагностике злокачественных плевритов составила 99,0%. Утвердительные цитологические заключения о наличии злокачественных плевритов даны в 87,0% наблюдений, подозрительные цитологические ответы — в 12,0% случаев. ИЦХ исследования значительно расширяют возможности цитологического исследования и имеют наибольшее значение при диагностике метастазов опухолей неизвестной первичной локализации.

Ключевые слова: опухолевые плевриты, цитологическая диагностика, иммуноцитохимическое исследование

Опухолевые плевриты являются распространенными заболеваниями и составляют от 25 до 40% всех плевритов [3-5]. Чаще всего они имеют вторичный характер и встречаются у 30% онкологических больных, причем до 75% таких больных поступает в специализированные лечебные учреждения в III-IV стадии заболевания, т.е. при наличии распространенного опухолевого процесса. Нередко опухолевый плеврит является единственным симптомом онкологического заболевания. В таких случаях использование цитологического метода исследования плевральной выпота, полученного путем плевростомии, в большинстве случаев позволяет установить его доброкачественную или злокачественную природу, а в ряде случаев также гистологическое строение и гистогенез первичной опухоли. По

данным разных авторов достоверность цитологического исследования составляет от 64 до 96% [1, 7]. Использование иммуноцитохимического исследования (ИЦХ) значительно увеличивает возможности цитологической диагностики, особенно при опухолях неизвестной первичной локализации [1, 2, 6, 7]. Определение гистогенеза и гистологической формы первичной опухоли имеет большое значение для выбора лечебной тактики у пациентов с опухолевыми плевритами (системная химиотерапия, в том числе таргетная, гормонотерапия, плевродез) [4, 5].

В настоящей работе приводим опыт цитологической и иммуноцитохимической диагностики опухолевых плевритов на материале цитологической лаборатории ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Росздрава России за период 2014-2016 годов.

Материал и методы

Материал для цитологического исследования поступил от 479 пациентов, 160 мужчин и 319 женщин. Средний возраст пациентов — 56 лет (4 — 94 лет).

В 53 наблюдениях исследовали готовые консультативные препараты из других учреждений, в 403 — плевральная жидкость, полученная с помощью плевростомии, поступала в лабораторию из поликлиники и клинических отделений Института, в 23 произведены срочные цитологические исследования жидкости из плевральной полости во время хирургических операций.

После добавления антикоагулянта и размешивания плевральная жидкость отстаивалась в сосуде около 1 часа, придонные слои жидкости переносили в центрифужные пробирки, после центрифугирования на обычной центрифуге из осадка приготавливали цитологические препараты. Параллельно приготавливали цитоспиновые препараты с использованием цитоцентрифуги Cytospin Shandon-4. Препараты фиксировали 96% этанолом и окрашивали гематоксилином и эозином или азур-эозином по Лейшману. При наличии в препаратах опухолевых клеток и необходимости проведения ИЦХ исследования готовили дополнительные цитоспиновые препараты на полилизиновых стеклах, последовательно фиксировали их в охлажденном 96% этаноле и ацетоне, проводили демаскировку антигенов и постановку иммуноцитохимической реакции с помощью системы Novolink Polymer Detection System (Leica, Великобритания) или (с 2016 г.) прибора Ventana Benchmark GX (USA) согласно стандартному протоколу. В качестве первичных антител использовали следующие антитела фирмы DAKO, Германия: калретинин, виментин, мезотелин, цитокератин 5/6, 7, 20, РЭА моно и поликлональный, эпителиальный

антиген ВегЕр4, ТТФ-1, МОС-31, ER, PR, маммоглобин, Са125, тиреоглобулин, WT-1, Р63 и др. На основании полученных результатов, с учетом клинических данных и данных инструментальной диагностики, устанавливали цитологический диагноз. Всего ИЦХ исследования выполнены в 38 наблюдениях.

Результаты

При цитологическом исследовании у 249 (52%) пациентов опухолевые клетки в мазках плевральных выпотов не обнаружены, при этом у 19 из них материал был неинформативным, в мазках имелись лишь элементы крови.

В 230 (48%) наблюдениях цитологически высказано подозрение (28 наблюдений) или уверенное заключение (202) о наличии в экссудатах клеток злокачественной опухоли.

При анализе первой группы пациентов установлено, что в большинстве случаев в мазках были видны в том или ином количестве элементы крови, скопления лимфоцитов, группы гистиоцитов и пласты клеток мезотелия. Атипические клетки отсутствовали. Клинический диагноз направления на цитологическое исследование был разным: плеврит (25 набл.), рак легкого (82), рак молочной железы (28), рак яичников (11), лимфома (28), метастаз опухоли неизвестной первичной локализации (16) и др. Отсутствие в мазках опухолевых клеток позволяет предположить, что в большинстве этих случаев имелся паранеопластический плеврит или плеврит неопухолевой этиологии. В ряде случаев возможной причиной отсутствия опухолевых клеток в жидкости было недостаточное количество доставленного образца, образование сгустка фибрина из-за не добавления антикоагулянта и пр. В одном наблюдении у женщины 55 лет с клиническим диагнозом «Лимфома? Рак желудка?» имеющиеся в мазках группы клеток с вакуолизированной цитоплазмой и гипохромной окраской цитологически ошибочно расценены как клетки мезотелия. При гистологическом исследовании выявлена неходжкинская крупноклеточная лимфома. Причиной ошибочного заключения явился неправильный подбор антител для ИЦХ исследования (не включение в панель лимфоидных антител). Еще в одном наблюдении немногочисленные группы клеток муцинозной аденокарциномы яичника цитологически были ошибочно приняты за клетки мезотелия с крупными вакуолями в цитоплазме; результаты ИЦХ исследования были сомнительными.

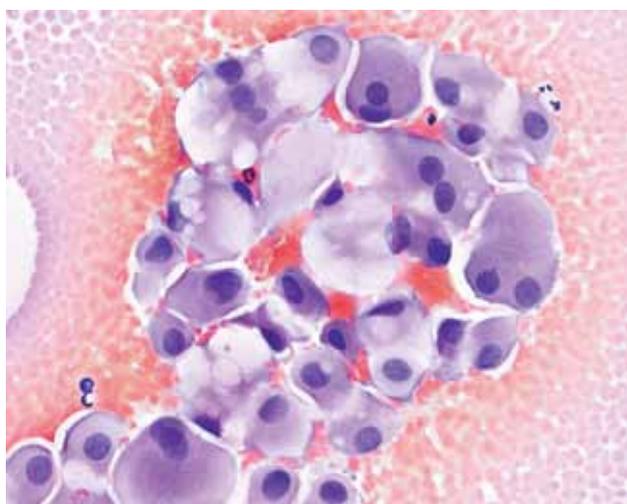
В группе наблюдений с цитологическим подозрением на наличие злокачественной опухоли в 21 из 28 случаев причиной неуверенного цитологического заключения было слишком малое количество атипических клеток в мазках, нередко с наличием дистрофических изменений (после проведения химиотерапии). В 2-х наблю-

дениях имела место недооценка степени атипичности атипических клеток. В 1 наблюдении у пациентки с клиническим диагнозом подозрение на рак яичника цитологически трудно было проводить дифференциальный диагноз между опухолевыми клетками и клетками пролиферирующего мезотелия. ИЦХ исследование позволило установить наличие серозного рака яичника. Использование ИЦХ исследования в других случаях оказалось невозможным, т.к. в 7 наблюдениях исследованы готовые консультативные цитологические препараты, а в 3 произведены срочные исследования материала из операционной.

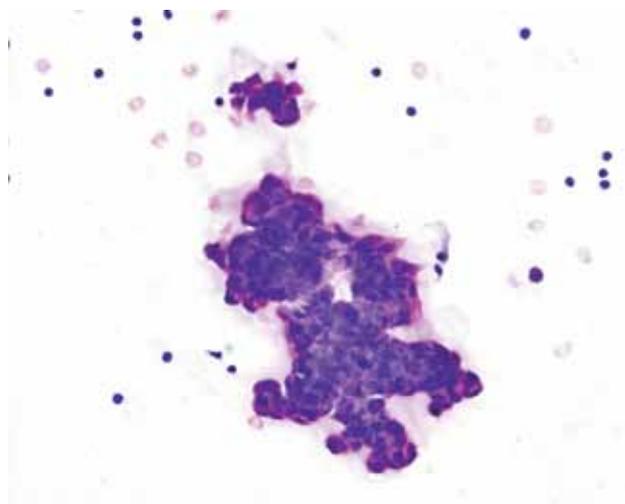
Анализ результатов цитологического исследования в третьей группе больных целесообразно производить с учетом первичного клинического диагноза.

У 44 пациентов установлен клинический диагноз рака легкого (РЛ), причем у 9 из них в предположительной форме. При цитологическом исследовании плевральной жидкости у всех пациентов в мазках обнаружены опухолевые клетки, расцененные как элементы злокачественной опухоли (2), рака (6), аденокарциномы (31), мелкоклеточного рака (3), плоскоклеточного рака (2). В 6 наблюдениях выполнено ИЦХ исследование. Пересмотр препаратов позволил выявить некоторые цитологические особенности клеток железистого РЛ в плевральной жидкости. В ряде случаев в мазках были видны скопления клеток с обильной светлой цитоплазмой и крупными полиморфными ядрами, встречались двуядерные клетки (рис. 1А). В других случаях наблюдались обычные комплексы клеток железистого рака. Кроме того, в материале некоторых пациентов комплексы клеток со сниженной дифференцировкой ошибочно принимались за элементы плоскоклеточного неороговевающего рака и наоборот. Для аденокарциномы легкого характерен следующий иммунофенотип: ВегЕр4(+), ТТФ1(+), СЕАм(+), СК7(+), СК20(-), калретинин(-). Для плоскоклеточного рака ИЦХ характеристики другие: ТТФ1(-), Р63(+), СК5/6(+). При метастазе плоскоклеточного ороговевающего рака в мазках видны группы опухолевых клеток с плоскоклеточной дифференцировкой — округлые и вытянутые клетки с крупными гиперхромными ядрами и эозинофильной цитоплазмой. Метастаз мелкоклеточного рака характеризуется наличием в мазках плеврального экссудата групп и комплексов сравнительно мелких опухолевых клеток со скудной цитоплазмой, тесно расположенных друг к другу (рис. 1Б). Иммунофенотип мелкоклеточного РЛ: ТТФ1(+), Chromogranin А(+), Synaptophysin(+), CD56(+), Р63(-).

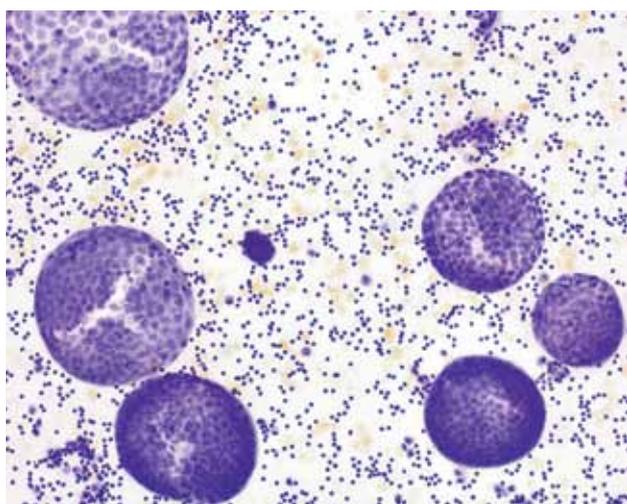
В одном наблюдении у пациента с диагнозом РЛ в мазках плеврального экссудата обнаружены комплексы опухолевых клеток в виде



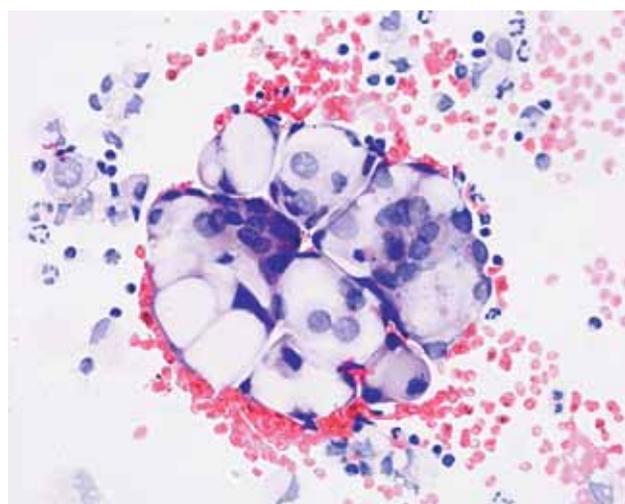
а



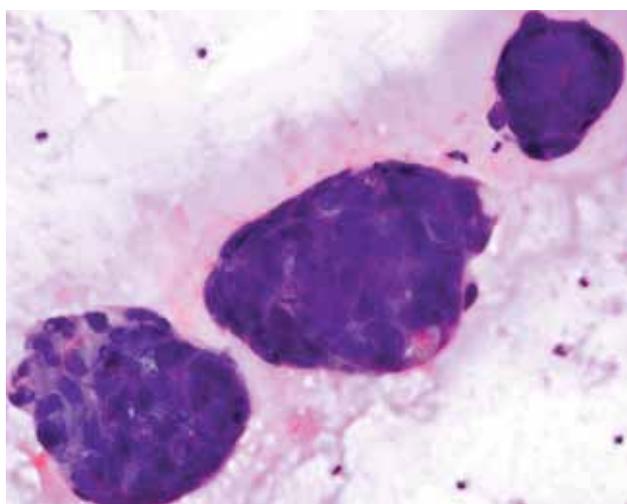
б



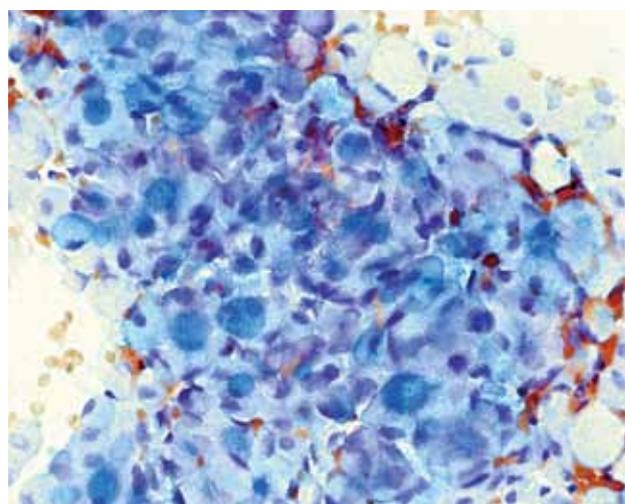
в



г

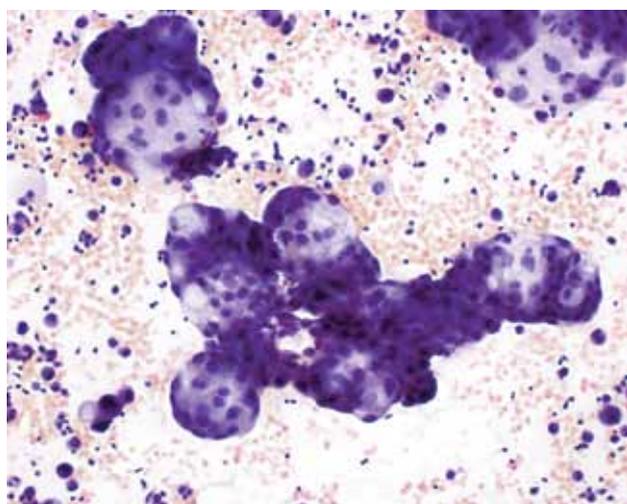


д

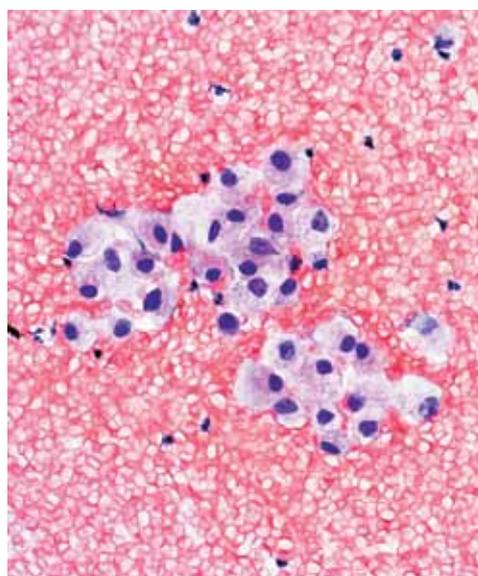


е

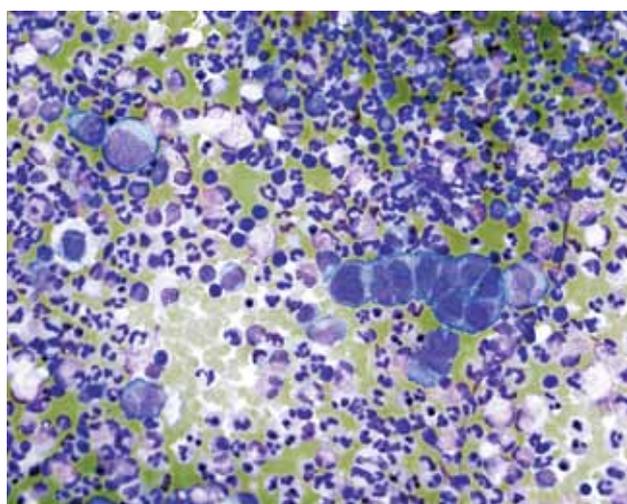
Рис. 1. Цитологические картины плевральных экссудатов при аденокарциноме (А) и мелкоклеточном (Б) раке легкого, раке молочной железы (В), раке яичника (Г), раке толстой кишки (Д), перстневидноклеточном раке желудка (Е). Окраска А-Д — гематоксилином и эозином, Е — альциановым синим.
Ув. Обь. А, Б, Г-Е — 40х, В — 20х



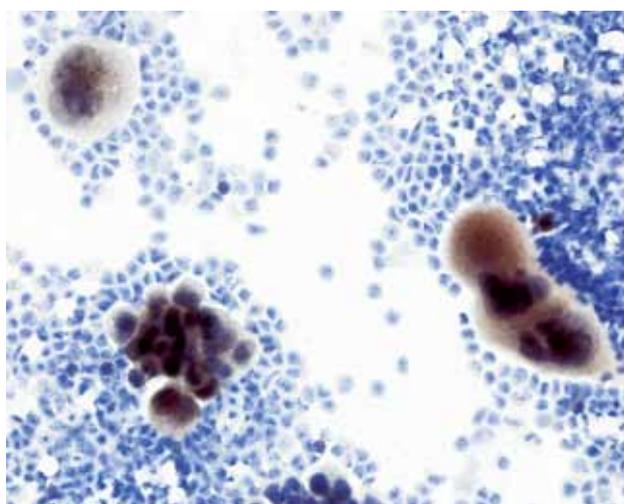
а



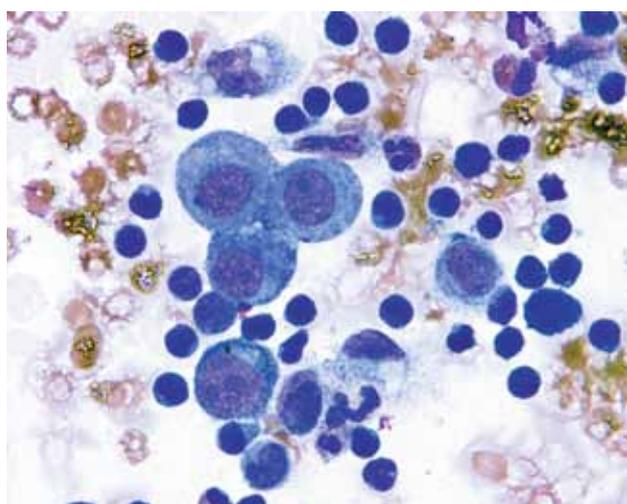
б



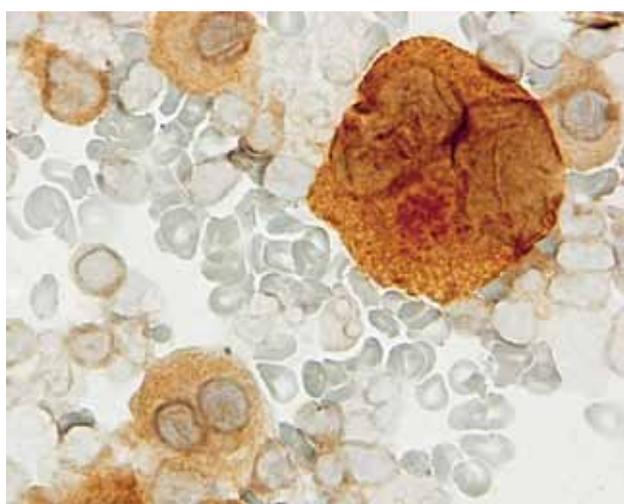
в



г



д



е

Рис. 2. Цитологические картины плевральных экссудатов при метастазе: А — рака щитовидной железы, Б — почечноклеточного рака, В — плоскоклеточного рака (пищевода), Г — при мезотелиоме плевры, Д — крупноклеточной лимфоме, Е — лимфоме Ходжкина. Окраска: А, Б — гематоксилином и эозином, В, Д — азур-эозином по Лейшману, Г — положительная ИЦХ реакция на калретинин, Е — положительная ИЦХ реакция на CD30. Ув. Обь. А — 20х, Б-Г — 40х, Д, Е — 100х

папиллярных структур (рис. 2А). Иммунофенотип: *HerEP4(+)*, *TTF1(+)*, *Thyroglobulin(+)*. Заподозрен метастаз рака щитовидной железы (РЩЖ), что в последующем подтвердилось при углубленном обследовании пациента.

Из 56 пациентов с клиническим диагнозом рак молочной железы (РМЖ) при цитологическом исследовании плевральной жидкости обнаружены в мазках опухолевые клетки расценены как элементы рака (11), аденокарциномы (32) и РМЖ (12). В 8 наблюдениях выполнено ИЦХ исследование. В 12 наблюдениях опухолевые клетки располагались в мазках в виде характерных шаровидных или сферических структур различной величины, описанных многими авторами, напоминающие колонии-клоны клеточных культур (рис. 1В). ИЦХ профиль РМЖ: *CK7(+)*, *HerEP4(+)*, *CEAm(+)*, *ER(+)*, *PR(+)*, *маммоглобин(+)*.

У 30 пациентов установлен первичный клинический диагноз рак яичников (РЯ), при этом у 16 из них — в предположительной форме. Обнаруженные в мазках плевральной жидкости опухолевые клетки цитологически расценены как элементы рака (1), аденокарциномы (25) и серозного РЯ (4). В 7 наблюдениях произведено ИЦХ исследование. Характерной цитологической особенностью серозного РЯ является наличие в мазках комплексов опухолевых клеток, среди которых видны клетки с очень крупными светлыми вакуолями, т.н. «клетки-пузыри» (рис. 1Г). При ИЦХ исследовании определяются следующие маркеры: *HerEP4(+)*, *CK7(+)*, *Ca125(+)*, *WT1(+)*, *CEAm(-)*, *CK20(-)*.

Во всех 4 наблюдениях рака толстой кишки (РТК) в мазках плеврального экссудата обнаружены комплексы клеток железистого рака (рис. 1Д). В 1 наблюдении произведено ИЦХ исследование со следующим результатом: *CEAm(+)*, *CK20(+)*, *CK7(-)*.

Из 5 наблюдений рака желудка (РЖ) в 4 при цитологическом исследовании в мазках плеврального экссудата обнаружены комплексы клеток железистого рака, в 1 — скопления клеток перстневидно-клеточного рака: при окраске альциановым синим в цитоплазме опухолевых клеток обнаружена слизь (рис. 1Е). ИЦХ профиль: *CEAm(+)*, *CK7(+)*, *CK20(+)*.

Характерная цитологическая картина плеврального экссудата наблюдалась в 1 случае метастаза рака почки. В мазках были видны пласты и комплексы клеток почечно-клеточного рака с обильной светлой цитоплазмой и однородными ядрами (рис. 1Б). В одном случае метастаза рака пищевода в мазках плеврального экссудата были видны группы клеток плоскоклеточного рака (рис. 1В). Клетки аденокарциномы в мазках были выявлены также при метастазах рака тела матки (3 набл.), рака вувльвы (1), рака предстательной железы (1) и пр.

Клетки метастатических эпителиальных опухолей необходимо дифференцировать от клеток первичной эпителиоидно-клеточной мезотелиомы. При мезотелиоме (2 набл.) в мазках видны группы крупных опухолевых клеток, некоторые из которых находятся в состоянии митоза, встречаются двуядерные и многоядерные клетки. При ИЦХ исследовании используется следующая панель антител: *калретинин(+)*, *мезотелин(+)*, *CK5/6(+)*, *WT1(+)*, *CK7(-)*, *HerEP4(-)* (рис. 2Г).

Из 10 наблюдений лимфомы при цитологическом исследовании в 2-х наблюдениях констатировано наличие в плевральной жидкости опухолевых клеток, в 7 — диагностирована неходжкинская лимфома, в 1 — лимфома Ходжкина. При крупноклеточной лимфоме в мазках среди лимфоидных клеток видны бластные клетки с крупными ядрами и ядрышками (рис. 2Д), местами в состоянии митотического деления. При лимфогранулематозе среди лимфоидных клеток встречаются гигантские многоядерные клетки Березовского — Штернберга. Отмечается положительная реакция на маркеры лимфоидной ткани: *CD30(+)*, *CD45(+)* и др. (рис. 2Е).

У 16 пациентов установлен первичный клинический диагноз «плеврит». При цитологическом исследовании у 4 из них выявлены клетки злокачественной опухоли, у 12 установлен диагноз «аденокарцинома». В 4 наблюдениях произведено ИЦХ исследование. По его результатам у 3 пациентов установлено наличие рака яичника, у 1 — рака легкого.

У 27 пациентов имелись опухоли неясной первичной локализации, причем у 4 из них — первично-множественные опухолевые заболевания. У 9 из этих пациентов при цитологическом исследовании плеврального экссудата установлено наличие клеток аденокарциномы, однако первичную локализацию метастазирующей опухоли определить не удалось, при этом у 2-х пациентов исследованы лишь консультативные цитологические препараты. В 2-х наблюдениях первичная локализация опухоли (РМЖ, РЯ) была установлена при цитологическом исследовании. Дополнительное применение ИЦХ исследования в 16 других наблюдениях позволило в 15 из них правильно определить первичную локализацию опухолевого процесса. В одном наблюдении у женщины 77 лет проводился дифференциальный клинический диагноз между РЩЖ, РЯ, РМЖ и РЛ. Результаты ИЦХ исследования: *калретинин(-)*, *HerEP4(-)*, *маммоглобин(-)*, *TTF1(+)*, *Тиреоглобулин(+)*, предполагали метастазирование из РЩЖ, однако при клиническом обследовании и пересмотре консультативных гистологических препаратов установлено наличие метастаза высокодифференцированной аденокарциномы легкого в плевру.

Таким образом, чувствительность цитологического исследования в диагностике злокачественных плевритов составила 202 из 204 наблюдений, или 99,0%. При учете группы подозрительных цитологических заключений, утвердительные цитологические заключения о наличии злокачественных плевритов составили 202 (87,0%) из 232 наблюдений, подозрительные ответы — 28 (12,0%) из 232.

Обсуждение

Как видно из нашего материала, опухолевые плевриты с наличием в экссудате клеток злокачественной опухоли составляют около половины всех случаев поступившей на исследование плевральной жидкости. Наличие в экссудате опухолевых элементов чаще всего свидетельствует о распространенном опухолевом процессе и плохом прогнозе заболевания. В большинстве таких случаев концентрация злокачественных клеток в жидкости бывает очень высокой. Однако в начальных стадиях метастазирования опухолевых элементов в жидкости может быть мало и для получения достаточной их концентрации приходится исследовать весь объем полученной жидкости, производить ее отстаивание не менее 1 часа после добавления антикоагулянта, использовать центрифугирование придонного слоя жидкости в центрифугах с большим объемом пробирок или отстаивать жидкость в делительных воронках. Это позволит увеличить количество уверенных цитологических заключений о наличии в мазках клеток злокачественной опухоли, а применение специфического системного противоопухолевого лечения может быть более эффективным.

При клинически выявленном первичном злокачественном очаге наличие в мазках опухолевых клеток может быть достаточным для подтверждения факта метастазирования в плевральную полость. В ряде случаев характерные цитологические картины позволяют предположительно установить гистологическую форму и гистогенез первичной опухоли. Дополнительное использование ИЦХ исследования значительно увеличивают возможности цитологического исследования. Проведение такого исследования имеет наибольшее значение в случаях метастазирования опухолей неясной первичной локализации, в том числе синхронных или метасинхронных первично-множественных опухолей. Если встречаются затруднения в правильной интерпретации результатов ИЦХ исследования, при наличии достаточного клеточного материала более точные данные могут быть получены при использовании метода клеточных блоков и проведения иммуногистохимического исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волченко Н.Н., Борисова О.В. Диагностика злокачественных опухолей по серозным экссудатам / Цитологический атлас. — М., «Гэотар-Медиа», 2017. — 144 с.
2. Григорук О.Г., Лазарев А.Ф., Богатырев В.Н. Дифференциальная цитологическая диагностика плевритов / Монография — Барнаул: Алтайский филиал ФГБУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина, 2012. — 258 с.
3. Иванов О.В., Клименко В.Н., Новик В.И., Николаев Г.В. Иммуноцитохимия — метод выбора в дифференциальной диагностике опухолевых плевритов неясной этиологии // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. — 2016. — Т. XXIII. — № 2. — С. 42-46.
4. Клименко В.Н., Иванов О.В. Диагностика и тактика лечения опухолевых плевритов в амбулаторных условиях // Вопр. онкол. — 2015. — Т. 61. — № 6. — С. 949-955.
5. Переводчикова Н.И., Алексеева Т.Р. Опухолевые плевриты: диагностика и выбор терапевтической тактики // Международный медицинский журнал. — 2003. — № 4. — С. 88-93.
6. Ganjei-Azar P., Jorda M., Krishan A. Effusion Cytology / A Practical Guide to Cancer Diagnosis. — Demos Medical Publishing, New York, 2011. — 177 p.
7. Shidham V.B., Atkinson B.F. Cytopathologic diagnosis of serous fluids / 1st ed., Saunders Elsevier, 2007. — 288 p.

*V.I. Novik, V.N. Klimenko, L.A. Krasilnikova,
A.A. Mikhethko, A.V. Vladimirova, O.V. Ivanov,
E.L. Yakubo, E.S. Shalina, A.V. Nefedova,
T.Ya. Lindeberg*

Cytological and immunocytochemical diagnosis of tumor pleuritis

N.N. Petrov National Medical Research Center
of Oncology
St. Petersburg

Cytological examination of smears from the sediment after centrifugation of pleural fluids was performed in 479 patients who underwent examination and treatment at our institution in 2014-2016. In 249 (52%) patients tumor cells were not detected in smears, in 230 (48%) observations a suspicion (28 observations) or a confident conclusion (202 observations) on the presence of malignant tumor cells in the exudates was cytologically expressed. In 38 cases immunocytochemical studies was additionally performed. In two observations a false-negative conclusion about the absence of tumor cells in smears was expressed. The sensitivity of the cytological study in the diagnosis of malignant pleuritis was 99.0%. Affirmative cytological conclusions on the presence of malignant pleuritis were given in 87.0% of observations, suspicious cytological responses — in 12.0% of cases. Immunocytochemical studies significantly expanded the possibilities of cytological research and were of great importance in the diagnosis of metastases of tumors of unknown primary localization.

Key words: tumor pleuritis, cytological diagnosis, immunocytochemical study