

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ЖИДКОСТНАЯ ЦИТОЛОГИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ПОРАЖЕНИЙ ЖЕЛУДКА.

Никитина Л.В., Касоян К.Т., Шабалова И.П.

ГБОУ ДПО РМАПО Минздравсоцразвития, КАФЕДРА КЛИНИЧЕСКОЙ
ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Г.МОСКВА, УЛ. БАРРИКАДНАЯ, Д.2/1 (495) 945-82-22 kafedra-kdl@list.ru

Резюме: Проведено иммуноцитохимическое исследование с использованием метода жидкостной цитологии на биопсийном материале доброкачественных и злокачественных поражений желудка. Оценена значимость применения c-erb-B2/HER2 и РЭА на материале из слизистой оболочки желудка.

Ключевые слова: жидкостная цитология, иммуноцитохимия, c-erb-B2/HER2, РЭА, рак желудка.

LIQUID-BASED CYTOLOGY WITH IMMUNOCYTOCHEMISTRY IN GASTRIC LESIONS.

Nikitina L., Kasoyan K., Shabalova I.

Objective: Immunocytochemistry was performed on the liquid-based cytology specimens in benign and malignant gastric lesions. Diagnostic significance of c-erb-B2/HER2 and CEA usage on the cellular material from gastric mucosa was evaluated.

Key words: liquid-based cytology, immunocytochemistry, CEA, c-erb-B2/HER2 protein, gastric cancer

ВВЕДЕНИЕ.

В России у большинства больных рак желудка диагностируется на поздних стадиях, когда отдаленные результаты лечения нельзя признать удовлетворительными [4]. Выявление рака желудка на поздних стадиях и, как следствие, высокая смертность у большинства заболевших делает одной из первостепенных задач практической медицины совершенствование методов распознавания предшествующих поражений желудка с высоким риском озлокачествления [1, 4]. Среди инструментальных методов исследования в диагностике поражений желудка ведущую роль играет фиброгастроудоденоскопия с

биопсией и последующим морфологическим (цитологическим и гистологическим) исследованием. Цитологическое исследование является простым и дешевым методом, который позволяет быстро судить об определенных патологических процессах. Цитологический контроль показан при динамическом наблюдении за больными с выявленными предраковыми состояниями, а также после лечения по поводу рака с целью выявления рецидивов.

В настоящее время дополнительно к морфологическим методам исследования изучают возможность использования различных прогностических молекулярных маркеров, позволяющих судить о злокачественном потенциале опухоли. В основе злокачественной трансформации клеток лежит активация клеточных онкогенов и/или инактивация генов-супрессоров, которые могут быть выявлены при иммуноцитохимическом исследовании (ИЦХИ) [2]. Специфичного маркера для определения рака желудка в настоящее время нет. Однако в последнее время очень активно изучается онкопротеин c-erbB-2, который относится к семейству тирозинкиназных рецепторов ERBB и состоит из четырех функционально взаимосвязанных рецепторных молекул, играющих важную роль в пролиферации, апоптозе и дифференцировке клеток: эпидермальный фактор роста ERBB1 (EGF), ERBB2 (HER2/neu), ERBB3, ERBB4 [2, 3]. Прогностическая значимость экспрессии онкопротеина c-erbB-2 у пациентов с различными поражениями желудка неоднозначна. По мнению одних авторов он является более важным прогностическим индикатором для рака кишечного типа, чем диффузного [14], по мнению других при развитии рака желудка данный онкопротеин не играет важной роли, а имеет значение при определении всего семейства ERBB или совокупности факторов: p53, Bcl-2, COX-2, C-erb-B2, EPO-R, beta-catenin, и E-cadherin [9, 12, 13]. Получены результаты, которые показывают эффективность применения герцептина у пациентов с аденокарциномой желудка при наличии гиперэкспрессии c-erbB-2 [5, 6, 8, 10].

Раковоэмбриональный антиген (РЭА) является онкофетальным белком, который продуцируется в очень ограниченных количествах эпителиальными клетками бронхов, молочной железы и желудочно-кишечного тракта. С наибольшим постоянством (до 90% случаев) РЭА повышен в крови больных при раке толстой кишки, желудка и поджелудочной железы. Основная область выявления антигена – мониторинг эффективности лечения [колоректального рака](#) [2, 3]. РЭА обнаруживается практически во всех слизеобразующих эпителиальных опухолях, в том числе и в клетках рака желудка. Обычно повышенное содержание РЭА определяется в

высокодифференцированных опухолях, в меньшей степени - в перстневидно-клеточных и редко - в недифференцированных опухолях [1]. Применение РЭА в диагностических целях ограничено его низкой специфичностью при неопухолевых заболеваниях, а также влиянием на синтез этого маркера некоторых экзогенных и эндогенных факторов.

Использование мазков-отпечатков для проведения ИЦХИ вызывает определенные сложности в связи с расположением клеток в пластах, содержанием неэпителиальных элементов, наличием фрагментов воспалительного или клеточного детрита и других

артефактов, и самое главное – ограничением в количестве получаемых стёкол мазков-отпечатков для выполнения иммуноцитохимических реакций.

В последнее время активно развивается метод жидкостной цитологии (ЖЦ). Суть метода заключается в том, что клеточный материал не переносится сразу на стекло, а смывается в подготовленный стабилизирующий раствор и отправляется в лабораторию. В условиях лаборатории при помощи специального оборудования происходит приготовление стандартного цитологического препарата из присланной суспензии клеток. В силу распределения материала на предметном стекле в виде монослоя снижается количество ложноотрицательных результатов цитологического исследования. Оставшуюся клеточную суспензию можно использовать для молекулярно-биологических исследований, в частности для приготовления серии препаратов для проведения ИЦХИ. Однако в доступной литературе мы не встретили данных о применении метода ЖЦ на материале слизистой оболочки желудка [2, 7, 11].

Цель настоящего исследования – выбрать наиболее информативный способ получения материала для ЖЦ, оценить возможности применения ЖЦ и ИЦХИ на клеточном материале из слизистой оболочки желудка.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.

Материал для исследования был получен у 75 пациентов с предшествующими поражениями и раком желудка во время проведения фиброгастродуоденоскопии. Средний возраст составил 51 год, соотношение мужчин и женщин – 2:1. У всех 75 пациентов выполняли прицельную щипцовую биопсию. С полученных биоптатов делали мазки-отпечатки на стекло для традиционного цитологического исследования.

Для фиксации, хранения, транспортировки клеточного материала и приготовления монослойных препаратов методом ЖЦ использовали стабилизирующий раствор «СУТО-

FAST Solution» фирмы HOSPITEX DIAGNOSTICS. Стабилизирующий раствор разливали в пробирки типа «Ependorff» по 0,8 мл на каждый образец.

Для приготовления монослойного цитологического препарата использовали цитоцентрифугу Cytospin 4 (рисунок 1). Клеточный материал в объеме 100 мкл помещали в камеру для образца и центрифугировали 5 минут при скорости вращения ротора 1000 об/мин.

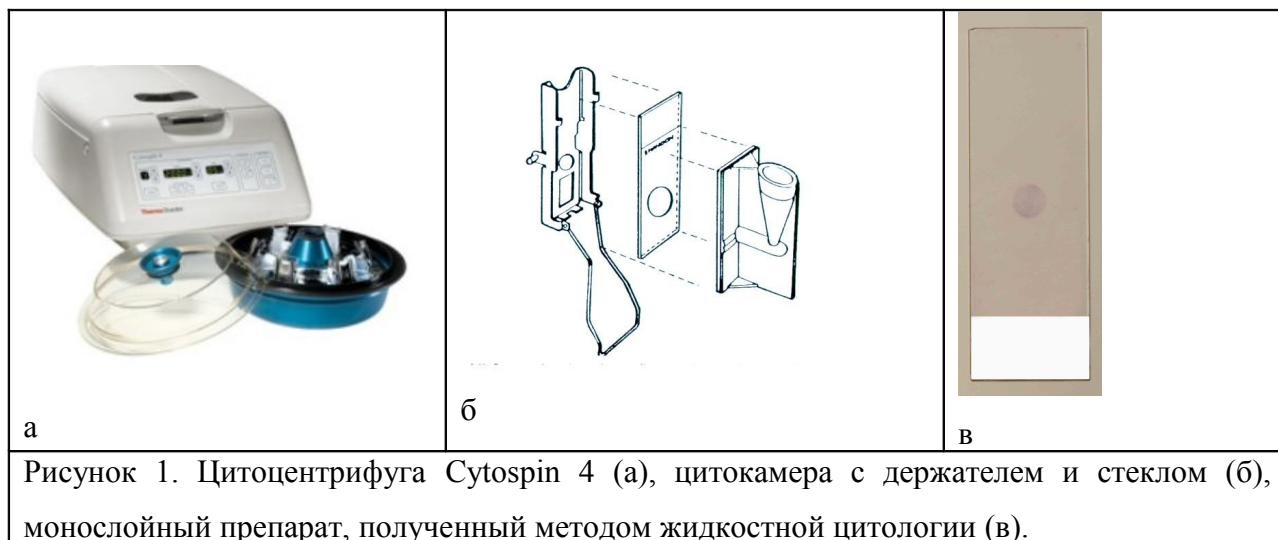


Рисунок 1. Цитоцентрифуга Cytospin 4 (а), цитокamera с держателем и стеклом (б), монослойный препарат, полученный методом жидкостной цитологии (в).

Для оценки адекватности полученного материала один монослойный препарат окрашивали по Папаниколау. Критерием отбора монослойных препаратов для проведения иммуноцитохимического исследования было наличие в каждом из них клеток эпителия желудка в достаточном количестве (минимум 100 клеток) и их монослойное расположение. При соответствии препаратов данным критериям на оставшихся неокрашенных стеклах проводили ИЦХИ.

Для ИЦХИ использовали готовые антитела c-erbB-2/HER2, CEACAM6 (РЭА) и систему визуализации Super Sensitive Polymer-HRP фирмы BIO CARE MEDICAL. Для контроля правильности выполняемой методики и специфичности окрашивания использовали предметные стёкла с положительным контролем. ИЦХИ были проведены у 35 пациентов по соответствующему протоколу.

При определении экспрессии CEACAM6 оценивали цитоплазмennую реакцию, которая характеризовалась диффузным окрашиванием цитоплазмы или отложением гранул в виде пятен или зерен. При проведении реакции с c-erb-2/HER2 оценивали окрашивание мембраны, при этом учитывали и точечное окрашивание. Реакцию считали отрицательной при отсутствии или наличии экспрессии антигена менее чем в 5% клеток, слабopоложительной – при наличии реакции в 6%-25% клеток, умеренноположительной – в 26-75% клеток, выраженной более чем в 75% клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Нами было проанализировано качество цитологического материала, полученного с помощью отпечатков с биоптата и взятого эндоскопической щеткой.

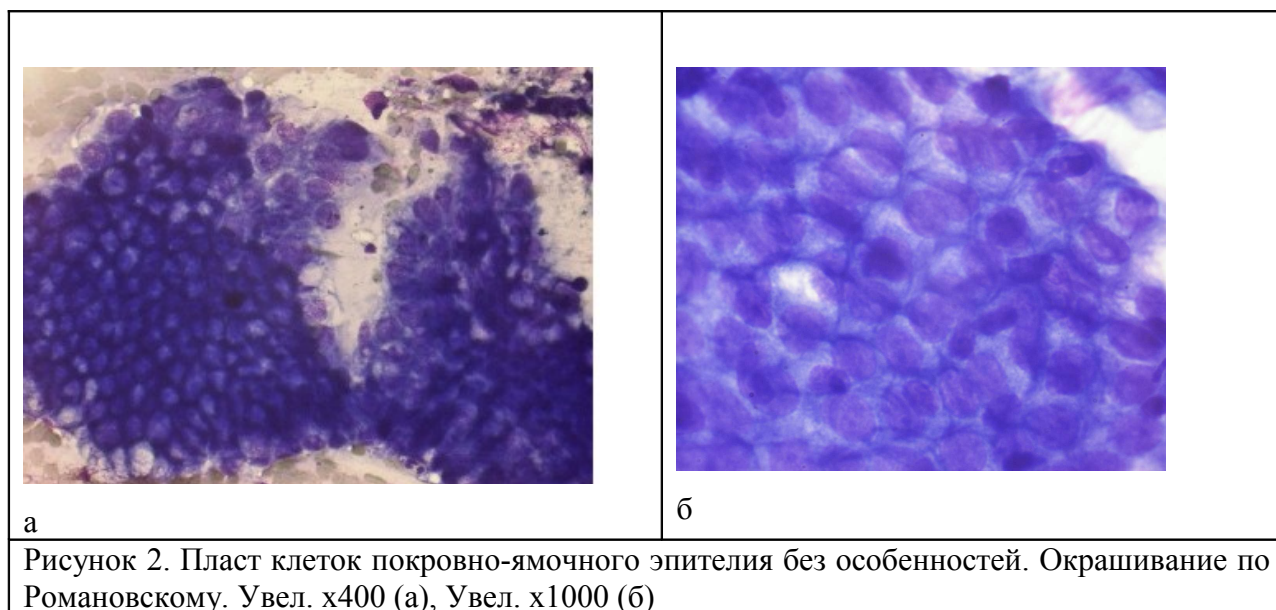
На первом этапе работы была предпринята попытка получить материал для ЖЦ при соскобе с измененного участка слизистой оболочки желудка (СОЖ) эндоскопической щёткой после взятия биоптата. У 21 пациента материал со щетки наносили на предметное стекло для цитологического исследования (традиционный способ приготовления цитологических препаратов со щетки). У 19 пациентов полученный материал со щетки смывали в стабилизирующий раствор для ЖЦ (таблица 1).

Таблица 1. Сравнение качества цитологического материала со слизистой оболочки желудка, полученного различными методами.

	Неинформативный материал	Информативный материал	всего
Традиционный метод: мазок со щётки на предметное стекло	20 (95,2%)	1 (4,8%)	21 (100%)
Метод жидкостной цитологии: смыв со щётки в раствор «Cytoscreen»	17 (89,5%)	2 (10,5%)	19 (100%)
Мазки-отпечатки с биоптата	-	40 (100%)	40 (100%)

В 37 (92,5%) из 40 наблюдений материал, полученный с помощью щетки, был неинформативным: в цитологических препаратах присутствовали только клетки плоского эпителия обычного строения или с дегенеративными изменениями, кокковая флора, неизмененные эритроциты и единичные клетки покровно-ямочного эпителия. При традиционном приготовлении препаратов (материал со щетки переносили сразу на стекло) неинформативный материал был получен в 20 наблюдениях (95,2%), при использовании ЖЦ (клеточный материал смывали со щетки в стабилизирующий раствор) – в 17 (89,5%). Достоверных различий между эффективностью последних двух методов не установлено ($p>0,05$). Таким образом, цитологические препараты, полученные при помощи эндоскопической щетки и приготовленные как традиционным методом, так и методом ЖЦ не отвечали искомому требованию. Возможно, такие результаты связаны с тем, что соскобы щёткой брали после взятия биоптатов и на поверхности СОЖ имелась кровь и тканевая жидкость, препятствующие получению качественного клеточного материала.

Во всех 40 мазках-отпечатках получен материал, пригодный для традиционного цитологического исследования (рисунок 2). Таким образом, по результатам цитологического исследования мазки-отпечатки с биоптата оказались более информативными, чем соскобы взятые щеткой независимо от их дальнейшей обработки ($p < 0,001$).



На втором этапе работы после получения неудовлетворительных результатов, связанных с взятием материала щеткой, нами была предпринята попытка разработать метод возможного использования биоптата из СОЖ для ЖЦ. Было выбрано два возможных способа использования биоптата. В первой группе наблюдений (21 пациент) биоптат помещали в стабилизирующий раствор смывали клетки с поверхности биоптата путём перемешивания, затем погружали в формалин для последующего гистологического исследования. Далее из полученного раствора готовили препараты методом ЖЦ.

У 35 пациентов помимо биоптата для гистологического исследования брали второй кусочек ткани из того же патологического очага, помещали в стабилизирующий раствор и гомогенизировали его путем растирания. Далее из полученной суспензии готовили препараты методом ЖЦ.

Все биоптаты при гистологическом исследовании содержали информативный материал, но при помещении в жидкостную среду и приготовлении препаратов методом ЖЦ, качество препаратов отличалось (таблица 2).

Таблица 2. Сравнение качества цитологического материала, приготовленного из биоптата различными методами.

	Неинформативный материал	Информативный материал	Всего
Смыв с биоптата в раствор «Cytoscreen»	21	-	21
Гомогенизация биоптата в растворе «Cytoscreen»	-	35	35

При смыве клеточного материала с биоптата в стабилизирующий раствор во всех 21 (100%) наблюдениях был получен неинформативный материал (клеточный материал отсутствовал или присутствовали единичные разрушенные клетки, недостаточные для цитологического исследования). В группе наблюдений, в которых выполняли гомогенизацию биоптата, неинформативный материал отсутствовал. Получено статистически достоверное различие между двумя способами обработки биоптата ($p < 0,001$).

Таким образом, препараты, приготовленные методом ЖЦ после гомогенизации биоптата, оказались наиболее пригодными для ИЦХИ. Качество контролировали по окрашенному по Папаниколау препарату (рисунок 3). Всего из полученной клеточной суспензии приготавливали 5 монослойных препаратов: два препарата на одно используемое антитело и один для контроля качества.

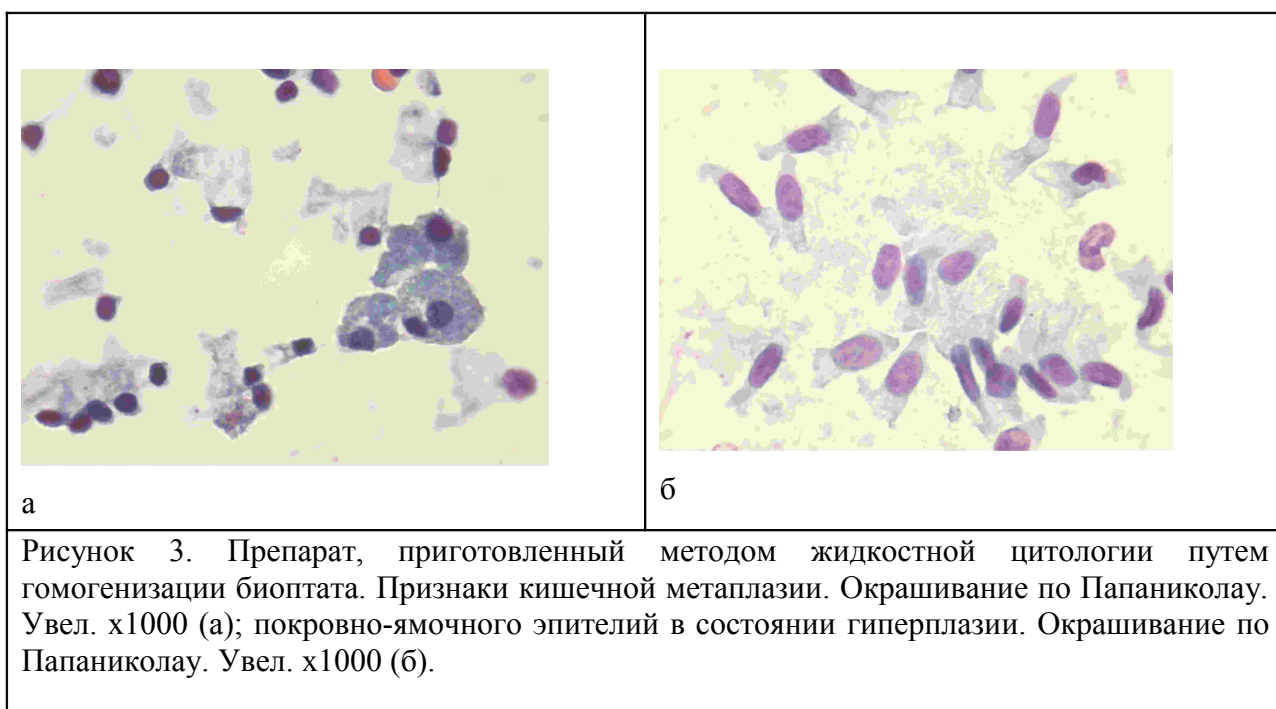
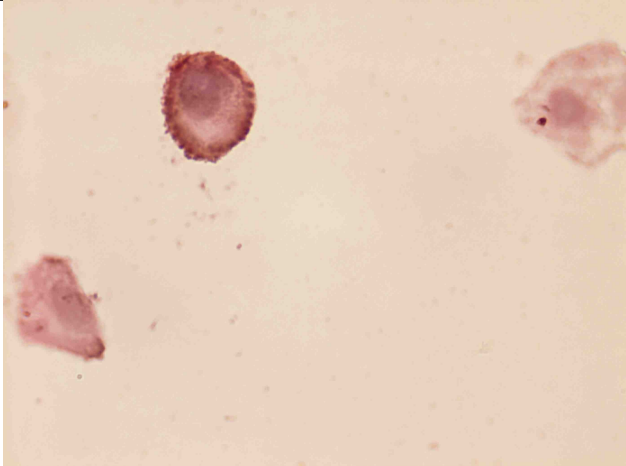


	
Рис. 4. Иммуноцитохимическое окрашивание CEACAM6. Клетки покровно-ямочного эпителия с коричневым окрашиванием цитоплазмы. Увел.х1000	Рис. 5 CEACAM6 г Тубуловорсинчатая аденома с малигнизацией
	
Рис.6 c-erb-2/HER2 Аденокарцинома желудка	Рис.7.c-erb-2/HER2 Умереннодифференцированная аденокарцинома с участками слизистого рака

При проведении ИЦХИ на препаратах, были получены следующие результаты (рисунок 4-7, таблица 3)

В связи с тем, что удовлетворительные монослойные препараты удалось получить только при гомогенизации биоптата, ИЦХИ проводили только у данных 35 пациентов.

У 9 обследованных пациентов имелись доброкачественные поражения (хронический гастрит, полип желудка), 17 - предшествующие поражения и 9 - с злокачественные опухоли.

Таблица 3. Результаты иммуноцитохимического исследования материала слизистой оболочки желудка.

Гистологический диагноз	Цитологический диагноз	экспрессия c-erb-B2/HER2				экспрессия CEACAM6				Всего наблюдений
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	
Доброкачественные поражения	Доброкачественные поражения	7	-	2	-	3	2	3	1	9
Предшествующие поражения	Предшествующие поражения с кишечной метаплазией	7	9	1	-	4	3	8	2	17
Дисплазия, рак	Дисплазия, рак	1	-	7	1	-	-	1	8	9
Всего		15	9	10	1	7	5	12	11	35

- нет экспрессии (отсутствие экспрессии или экспрессия в <5% клеток)

+ слабая экспрессия (экспрессия в 6-25% клеток)

++ умеренная экспрессия (экспрессия в 26-75% клеток)

+++ выраженная экспрессия (экспрессия в >75% клеток)

При доброкачественных поражениях в 7 из 9 наблюдений экспрессия c-erb-B2/HER2 отсутствовала и только в двух имелась положительная реакция, умеренно выраженная. При предшествующих поражениях в 7 из 17 экспрессия c-erb-B2/HER2 отсутствовала, в 9 была слабо выражена и только в 1 (5,9%) – умеренно выражена. При дисплазии и раке в 7 наблюдения из 9 реакция была умеренно выраженной, в 1 – выраженной и только в одном случае экспрессия c-erb-B2/HER2 отсутствовала. Исходя из полученных нами данных порогом чувствительности экспрессии c-erb-B2/HER2 в диагностике дисплазии и рака желудка можно считать наличие умеренной экспрессии.

При ИЦХИ CEACAM6 препаратов с доброкачественными поражениями желудка в 3 наблюдениях из 9 экспрессия отсутствовала, в 2 – была слабо выражена, в 3 – выражена умеренно, и лишь в одном наблюдении отмечали – выраженную экспрессию антигена. При предшествующих поражениях соответственно в 4 из 17 экспрессия отсутствовала, 3 – была слабой, 8 – умеренной, 2 – выраженной. Отсутствие даже слабой экспрессии CEACAM6 было отмечено при дисплазии и раке желудка, в одном из 9 наблюдений экспрессия была умеренной, а в 8 – выраженной. В результате порогом чувствительности в диагностике дисплазии и рака желудка целесообразно считать наличие выраженной экспрессии CEACAM6.

Чувствительность ИЦХИ c-erb-B2/HER2 в диагностике дисплазии и рака желудка при пороге чувствительности наличия умеренной экспрессии составила 88,9%, специфичность 88,5%, эффективность 72,7%. Экспрессия CEACAM6 была менее специфичной и наблюдалась и при выраженной пролиферации эпителия и при предшествующих поражениях и при раке.

Возможно, экспрессия используемых нами маркеров при предшествующих поражениях отражает начальный этап неопластического процесса; умеренная и выраженная экспрессия может рассматриваться как маркер возможной тяжелой дисплазии или рака.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Валенкевич Л.Н., Яхонтова О.И. //Болезни органов пищеварения Руководство по гастроэнтерологии для врачей. – СПб.: Питер, 2006. - ДЕАН 656 с.
2. Волченко Н.Н., Савостикова М.В. //Атлас цитологической и иммуноцитохимической диагностики опухолей. – М., 2010. – 235 с.
3. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей под редакцией С.В.Петрова, Н.Т. Райхлина, РИЦ "Титул", Казань, 2004
4. Социально значимые заболевания населения России в 2010 г. Статистические материалы Минздравсоцразвития РФ. Москва, 2011 г.
5. Albarello L, Pecciarini L, Doglioni C. //HER2 testing in gastric cancer. Adv Anat Pathol. 2011 Jan;18(1):53-9.
6. Arrington AK, Dahlberg PS, Davydova J, Vickers SM, Yamamoto M. //ERBB2 suppression decreases cell growth via apoptosis in gastrointestinal adenocarcinomas. Surgery. 2009 Aug;146(2):213-9.
7. Baker J.J. //Conventional and liquid-based cervicovaginal cytology: a comparison study with clinical and histologic follow-up // Diagn. Cytopathol. – 2002. – Vol. 27. - №3. – P. 185-188.
8. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Ruschhoff J, Kang YK; ToGA //Trial Investigators. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus

- chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2010 Aug 28;376(9742):687-97. Epub 2010 Aug 19.
9. Blok P, Craanen ME, Dekker W, Offerhaus GJ, Tytgat GN. // "No evidence for c-erbB-2 overexpression in gastric carcinogenesis. *Histopathology*. 1998 Apr;32(4):335-9.
 10. Hohler T, Ruschoff J, Ridwelski K, Moehler M. // HER2 testing and targeted therapy in advanced gastric cancer *Onkologie*. 2010;33 Suppl 4:26-30. Epub 2010 Apr 23.
 11. Limaye A., Comor A.J., Huang X., Luff R. // Comparative analysis of conventional Papanicolaou test and fluid-based thin-layer method *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2003. – Vol. 127. – P. 200-204).
 12. Sereno M, Garcia-Cabezas MA, De Castro J, Cejas P, Saenz EC, Belda-Iniesta C, Feijoo JB, Larrauri J, Nistal M, Baron MG. // Immunohistochemical expression of p53, Bcl-2, COX-2, C-erb-B2, EPO-R, beta-catenin, and E-cadherin in non tumoral gastric mucous membrane. *Eur J Histochem*. 2006 Oct-Dec;50(4):285-92.
 13. Slesak B, Harlozinska A, Porebska I, Bojarowski T, Lapinska J, Rzeszutko M, Wojnar A. // Expression of epidermal growth factor receptor family proteins (EGFR, c-erbB-2 and c-erbB-3) in gastric cancer and chronic gastritis. *Anticancer Res*. 1998 Jul-Aug;18(4A):2727-32.
 14. Uchino S, Tsuda H, Maruyama K, Kinoshita T, Sasako M, Saito T, Kobayashi M, Hirohashi S. // Overexpression of c-erbB-2 protein in gastric cancer. Its correlation with long-term survival of patients. *Cancer*. 1993 Dec 1;72(11):3179-84.