

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЦИТОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА ЯИЧНИКОВ

М.Г. Леонов, С.А. Беляева, Я.Х.-Б. Ершова, Ж.П. Селифонова

ГБУЗ «Онкологический диспансер № 3», г. Новороссийск

Цель исследования: Повышение достоверности морфологической диагностики рака яичников.

Материалы и методы: В работе представлены сравнительные результаты цитологического исследования методом жидкостной цитологии и традиционным методом эксудатов брюшной, плевральной полостей и смывов брюшной полости, полученных от 104 пациентов, 72 из которых были с подозрением на рак яичников (РЯ) и 32 больных РЯ после лечения с подозрением на рецидив заболевания.

Результаты: В результате проведенного исследования установлено, что диагностическая ценность метода жидкостной цитологии в диагностике РЯ и его рецидивов в 1,5 раза выше традиционного цитологического метода.

Заключение: Жидкостная цитология с использованием питательной среды 199, в отличие от традиционного цитологического исследования эксудатов плевральной и брюшной полостей или смыва брюшной полости, значительно повышает чувствительность цитологического метода за счет получения монослойных препаратов, характеризующихся распределением клеточного материала на небольшом участке предметного стекла, хорошей визуализацией деталей ядра и цитоплазмы, значительным снижением числа элементов воспаления, эритроцитов, слизи и артефактов. При этом значительно уменьшается число неудовлетворительных препаратов, сокращается время, повышаются точность и производительность исследования. Полученные монослойные препараты могут использоваться для ИЦХ (иммуноцитохимического исследования).

Ключевые слова: рак яичников, жидкостная цитология, традиционное цитологическое исследование, питательная среда 199, морфологическая диагностика.

DEVELOPMENT AND IMPROVEMENT OF CYTOLOGICAL DIAGNOSIS OF OVARIAN CANCER

M.G. Leonov, S.A. Belyaeva, Ya.Kh.-B. Ershova, Zh.P. Selifonova

State Budgetary Healthcare Institution «Oncologic Dispensary № 3», Novorossiysk

Objective of the study — to increase accuracy of morphologic diagnosis of ovarian cancer.

Materials and Methods. The work presents comparative results of cytologic examination using a method of liquid-based cytology and a traditional method of detection of exudates in peritoneal and pleural cavities, as well as peritoneal lavages obtained from 104 patients of whom 72 were suspected with ovarian cancer and 32 patients were with ovarian cancer after they had undergone treatment and were suspected with recurrence of the disease.

Results. The study revealed that diagnostic value of a method of liquid-based cytology in the diagnosis of ovarian cancer and its recurrences is 1,5 times higher than that of a traditional cytological examination.

Conclusion. Liquid-based cytology using nutrient medium 199 unlike a traditional cytological examination of exudates obtained from peritoneal and pleural cavities or lavages from pleural cavity significantly increases the sensitivity of cytological method of examination based on the preparation of monolayer specimens which are characterized by the distribution of cellular material on a small section of a slide, by good detailed visualization of nucleus and cytoplasm, by a considerable decrease of a number of elements of inflammation, erythrocytes, mucus and artefacts. Furthermore, the number of unsatisfactory preparations is decreased, it reduces the time, the accuracy and productivity of research is increased. The prepared monolayer specimens can be used for immunocytochemical examination.

Key words: ovarian cancer, liquid-based cytology, traditional cytological examination, nutrient medium 199, morphological diagnosis.

Традиционный способ цитологической диагностики РЯ при исследовании плеврального экссудата и асцитической жидкости имеет ряд недостатков: загрязнение фона исследуемого препарата элементами воспаления, некроза, эритроцитами и артефактами, что затрудняет цитологическую диагностику; плохая сохранность, повреждение и разрушение клеток, особенно злокачественных, которые отличаются чувствительностью к изменениям внешней среды и быстро подвергаются распаду, что требует немедленного приготовления цитологических препаратов после получения экссудата или смыва брюшной полости; образование фибриновых сгустков при большом содержании крови или недостаточном количестве антикоагулянта или его отсутствие в экссудате; большое разнообразие мезотелиального клеточного состава в связи с высокой реактивностью серозного покрова плевральной и брюшной полостей с постоянной декомпенсацией и регенерацией мезотелия, при этом мезотелий может приобретать выраженные признаки атипии, в связи с чем его становится трудно отличать от клеток рака; неравномерное расположение клеточного материала на предметном стекле; затрудненность цитологической диагностики из-за наличия единичных опухолевых клеток; невозможность быстрого обзора препарата из-за имеющихся участков многослойности.

Достоверность традиционного цитологического исследования экссудатов брюшной и плевральной полостей составляет не более 40–60%, что крайне недостаточно для установления точного диагноза [2, 4, 5, 6, 9, 10].

В связи с этим возникает необходимость использовать современные дополнительные методы, такие как жидкостная цитология и ИЦХ, в диагностике новообразований яичников [10].

На дооперационном этапе диагностики и при диспансерном наблюдении больных со злокачественными новообразованиями яичников, находящихся в III клинической группе, наиболее информативным является цитологическое исследование материала экссудатов брюшной и плевральной полостей, а также смывов брюшной полости.

В доступной научной литературе имеется работа М.В. Савостиковой (2013), связанная с использованием традиционного цитологического исследования и метода жидкостной цитологии в диагностике РЯ. Применение метода жидкост-

ной цитологии в диагностике рака яичников позволяет повысить эффективность цитологического исследования за счет стандартизации препаратов и дает возможность использовать их в дальнейшем для ИЦХ, цитогенетических и морфометрических исследований.

В связи с имеющимся собственным опытом применения метода жидкостной цитологии в диагностике рака и предраковой патологии шейки матки, с использованием питательной среды 199, повышающей диагностическую ценность цитологического метода исследования в 1,8 раза (М.Г. Леонов, Т.В. Шелякина, 2012), а также в диагностике рака мочевого пузыря и его рецидивов, улучшающей диагностику в 1,3 раза (патент РФ № 2547567, опубликованный 10.04.2015 г., «Способ цитологической диагностики рака мочевого пузыря») в сравнении с традиционным цитологическим методом нами была предпринята попытка повышения достоверности цитологической диагностики РЯ и его рецидивов с помощью метода жидкостной цитологии [7, 8].

Для улучшения качества жидкостных цитологических препаратов мы использовали питательную среду 199, содержащую неорганические соли, аминокислоты, витамины, глюкозу, которые сохраняют постоянство рН, осмотическое давление, обеспечивают клетки необходимыми питательными веществами. Питательная среда 199 предназначена для консервации образцов клеток, транспортировки и накопления, она сохраняет их до 6 суток при температуре +4° С без изменения морфологической структуры [3, 7, 8, 10, 11].

Цель исследования — повышение достоверности морфологической диагностики рака яичников.

Материалы и методы. За период 2013–2015 гг. в исследование были включены 104 человека, из них 72 пациента с подозрением на РЯ, проходивших обследование в ГБУЗ «Онкологический диспансер № 3» (г. Новороссийск) и 32 больных РЯ после проведенного лечения с подозрением на рецидив заболевания.

Материал для цитологического исследования при наличии плеврального выпота был получен у 3 больных путем плевральной пункции, при наличии асцита было выполнено 80 лапароцентезов под контролем ультразвукового исследования (аппарат Toshiba Aplio 500, конвексный

датчик, частота 3,8 МГц), а при отсутствии выпота в брюшной полости или незначительного его количества, выявленного с помощью лучевых методов (УЗИ, КТ, МРТ), было получено 80 смывов из брюшной полости при помощи пункций заднего свода влагалища.

Экссудат брюшной, плевральной полостей или смыв брюшной полости центрифугировали в центрифуге «Эликон ЦЛМН-Р10-01» при скорости 1 500 об/мин в течение 10 мин. Для получения традиционных цитологических препаратов надосадочную жидкость сливали, а из осадка готовили тонкослойные мазки. При выполнении жидкостной цитологии к полученному осадку в объеме 100–400 мкл добавляли 4 мл питательной среды 199 для получения клеточной суспензии. Клеточную суспензию центрифугировали в CytoFuge 2 (Stat Spin, США) при скорости 1 000 об/мин в течение 8 мин. Полученные цитологические препараты высушивали на воздухе. Фиксацию проводили фиксатором Май-Грюнвальда, окраску — по методу Романовского-Гимзе автоматизированным методом на универсальном настольном роботе Shandon Varistain Gemini ES (Англия), обеспечивающим быстрое и одновременное окрашивание большого количества цитологических препаратов. Микроскопирование цитологических препаратов проводилось под иммерсионной системой с использованием видеомикроскопа MC 1 000 (LCD), Австрия (окуляр 10х, объектив 100х, увеличение 1 000), со встроенной электронной системой, жидкокристаллическим сенсорным дисплеем, позволяющим проводить просмотр изображения в реальном времени. Результаты микроскопирования фотографировались и сохранялись на CD Cart для фотоархива микропрепаратов.

Для оценки эффективности метода жидкостной цитологии проводили сопоставление результатов исследуемого метода и традиционного цитологического исследования.

Результаты и обсуждение. В результате проведенного анализа обнаружена существенная разница сравниваемых методов в диагностике РЯ и его рецидивов (табл. 1).

Из 72 обследуемых первой группы традиционным цитологическим методом РЯ был диагностирован у 42 (58,4%) больных, а методом жидкостной цитологии — у 57 (79,2%).

При исследовании асцитической жидкости методом жидкостной цитологии была диагностирована аденокарцинома у 80,7% из 57 обследуемых с подозрением на РЯ, а традиционным методом — у 59,4%. Причем у одной больной двумя методами цитологического исследования была диагностирована аденокарцинома желудка с диссеминацией по брюшине и установлен диагноз рак желудка IV стадии, метастаз в яичнике.

При изучении смывов брюшной полости морфологически РЯ (аденокарцинома) методом жидкостной цитологии был диагностирован в 66,7% случаев, а традиционным цитологическим методом — только у 14,7% обследуемых. При исследовании плеврального экссудата во всех трех случаях РЯ (аденокарцинома) был верифицирован морфологически как при выполнении цитологического исследования методом жидкостной цитологии, так и традиционным методом.

Во второй группе из 32 больных, находящихся на диспансерном наблюдении после проведенного лечения по поводу РЯ, рецидив заболевания традиционным методом был диагностирован в 17 (53,1%) случаях, а при использовании метода жидкостной цитологии — в 21 (65,6%).

Таблица 1

Сравнительная оценка эффективности цитологических методов диагностики рака яичников и его рецидивов

| Исследуемая группа | Количество исследуемых, N | Метод жидкостной цитологии, N (%) | Традиционное цитологическое исследование, N (%) | P |
|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------|---|--------|
| Подозрение на РЯ, из них: | 72 | 57 (79,2) | 42 (58,4) | p<0,05 |
| – плевральная жидкость | 3 | 3 (100) | 3 (100) | |
| – асцитическая жидкость | 57 | 46 (80,7) | 34 (59,4) | |
| – смыв брюшной полости | 12 | 8 (66,7) | 5 (41,7) | |
| Больные РЯ, из них: | 32 | 21 (65,6) | 17 (53,1) | p<0,05 |
| – асцитическая жидкость | 10 | 10 (100) | 9 (90) | |
| – смыв брюшной полости | 23 | 11 (47,8) | 8 (34,5) | |

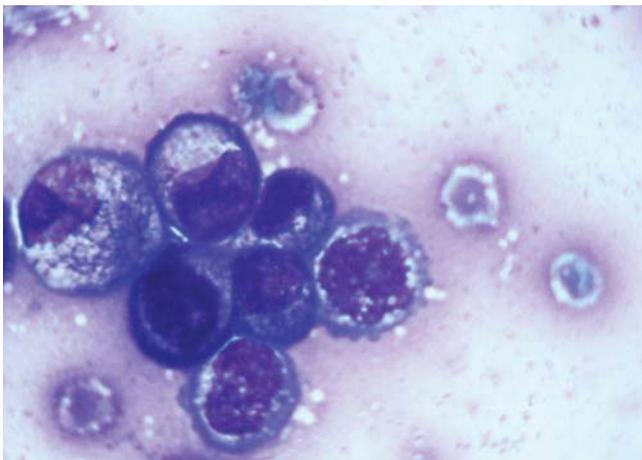


Рис. 1. Цитологический препарат, приготовленный методом жидкостной цитологии (микрофотография). Аденокарцинома желудка с диссеминацией по брюшине. Окраска препарата по Романовскому-Гимзе, $\times 1000$

Во всех десяти экссудатах брюшной полости, полученных путем лапароцентеза, традиционным цитологическим исследованием и методом жидкостной цитологии был морфологически верифицирован рецидив РЯ (клетки аденокарциномы). При анализе смывов брюшной полости методом жидкостной цитологии у 47,8% из 23 обследуемых выявлен рецидив заболевания, а традиционным цитологическим методом рецидив РЯ удалось установить только в 34,5% случаев.

В результате применения метода жидкостной цитологии снизилось количество неудовлетворительных микроскопических препаратов на 23,7%. Диагностическая ценность метода жидкостной цитологии в диагностике РЯ и его рецидивов

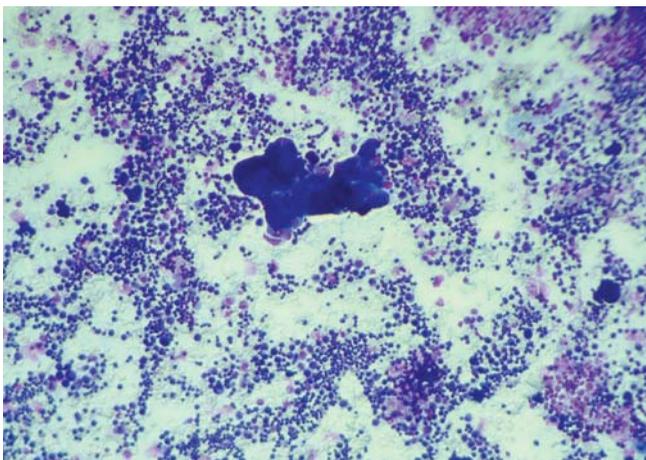


Рис. 3. Цитологические препараты, приготовленные традиционным методом (микрофотография). Аденокарцинома яичника. Окраска по Романовскому-Гимзе, $\times 1000$

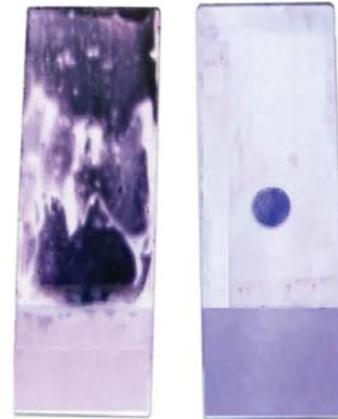


Рис. 2. Внешний вид препаратов, приготовленных традиционным цитологическим методом и методом жидкостной цитологии

в целом была выше в 1,5 раза, чем традиционного цитологического исследования ($p < 0,05$).

На рис. 2 представлен внешний вид цитологических препаратов, полученных традиционным методом и методом жидкостной цитологии.

На рис. 3 представлена микроскопическая картина цитологических препаратов, полученных традиционным способом, и на рис. 4 — методом жидкостной цитологии.

Чувствительность метода жидкостной цитологии в исследовании составила 87,8%, а специфичность — 92,1%.

Представляем клинические наблюдения использования метода жидкостной цитологии в диагностике первичного РЯ и его рецидивов.

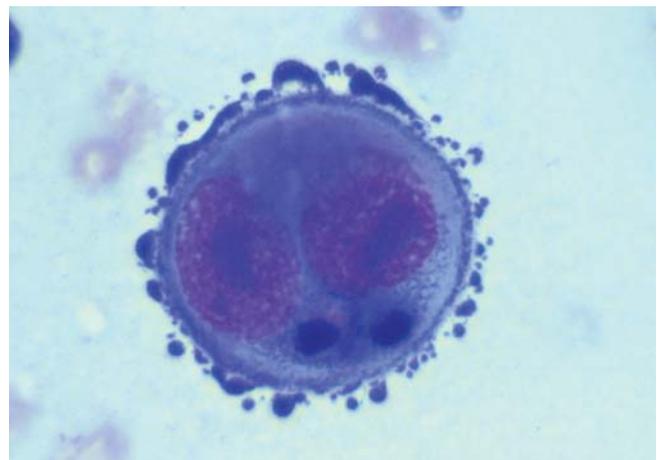


Рис. 4. Цитологический препарат, приготовленный методом жидкостной цитологии (микрофотография). Аденокарцинома яичника. Окраска препарата по Романовскому-Гимзе, $\times 1000$

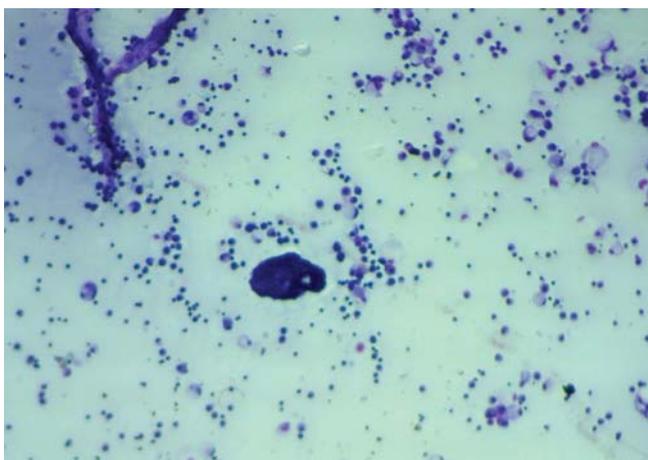


Рис. 5. Цитологический препарат, приготовленный традиционным методом (микрофотография). Среди пролиферирующего мезотелия в препарате небольшие скопления клеток, похожих на аденокарциному. Окраска препарата по Романовскому-Гимзе, $\times 1000$

Клиническое наблюдение 1. Больная М., 63 года, обратилась в ГБУЗ «Онкологический диспансер № 3» (г. Новороссийск) 15.05.14 г. по направлению акушера-гинеколога женской консультации.

Первые признаки заболевания почувствовала два месяца назад, когда появились слабость, недомогание, дискомфорт после приема пищи, увеличение в объеме живота, одышка после умеренной физической нагрузки. Обратилась к акушеру-гинекологу в женскую консультацию 18.04.2015 г., где ей были проведены клинико-лабораторное и инструментальное обследования: СА125=128,36 ЕД/мл, УЗИ органов малого таза — ЭХО признаки солидно-кистозного образования правого яичника размером 75×80 мм с неровными четкими контурами, при ЦДК наличие интранодулярного типа кровотока. В брюшной полости — значительное количество асцитической жидкости. Больная направлена в онкологический диспансер с целью уточнения диагноза и определения тактики лечения.

В онкологическом диспансере больной выполнен лапароцентез под контролем УЗИ. Получено около 8,5 л асцитической жидкости. Цитологическое исследование клеточного осадка экссудата брюшной полости выполнено традиционным методом и методом жидкостной цитологии с использованием питательной среды 199. В результате проведенного традиционного цитологического исследования среди пролиферирующего мезотелия редко обнаружены в препарате небольшие

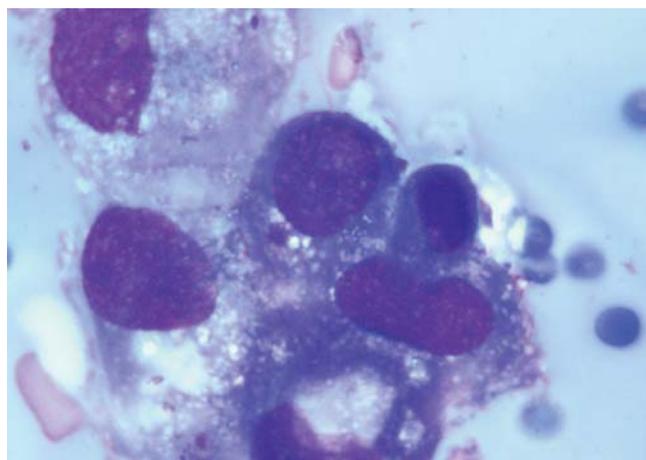


Рис. 6. Цитологический препарат, приготовленный методом жидкостной цитологии (микрофотография). Аденокарцинома яичника. Окраска препарата по Романовскому-Гимзе, $\times 1000$

скопления клеток похожих на аденокарциному (рис. 5), в препаратах, полученных методом жидкостной цитологии (рис. 6), обнаружены клетки аденокарциномы. В результате использования метода жидкостной цитологии был установлен диагноз РЯ (клетки аденокарциномы).

В дальнейшем 28.05.2014 г. больной была выполнена операция — лапаротомия. Экстирпация матки с придатками. Экстирпация большого сальника. Патологогистологическое исследование № 8354–68 папиллярная цистоаденокарцинома правого яичника, папиллярная цистоаденокарцинома яичника слева с инвазией в маточную трубу, метастаз папиллярной аденокарциномы в большом сальнике. При этом было зафиксировано совпадение результатов цитологического исследования экссудата брюшной полости выполненных методом жидкостной цитологии (рис. 7) с результатами гистологического исследования операционного материала.

Заключительный клинический диагноз: рак яичников pT3NxM0 III стадия.

Клиническое наблюдение 2. Больная П., 57 лет, наблюдается в ГБУЗ «Онкологический диспансер № 3» (г. Новороссийск) с 02.09.13 г. по поводу рака яичников. 12.09.13 г. была выполнена операция: экстирпация матки с придатками, удаление большого сальника. Патологогистологическое исследование № 1254–77 папиллярная аденокарцинома обоих яичников с метастазами в большом сальнике. В послеоперационном периоде больной проведено

6 курсов полихимиотерапии. Больная находилась под диспансерным наблюдением.

При контрольном обследовании в июне 2014 г. выполнено ультразвуковое исследование малого таза и органов брюшной полости — обнаружено незначительное количество асцитической жидкости в малом тазу, СА125 = 12,57 ЕД/мл, произведена пункция заднего свода влагалища, получен смыв из брюшной полости. Из клеточного осадка были приготовлены морфологические препараты традиционным способом и методом жидкостной цитологии. В результате проведенного исследования были обнаружены клетки аденокарциномы при использовании обоих методов во всех препаратах (рис. 8–9). У больной был диагностирован рецидив РЯ.

Заключительный клинический диагноз: РЯ рТ3NxMo, III стадия. Состояние после комбинированного лечения. Рецидив заболевания.

Заключение. Таким образом, жидкостная цитология с использованием питательной среды 199, в отличие от традиционного цитологического исследования экссудатов плевральной и брюшной полостей или смыва брюшной полости, значительно повышает чувствительность цитологического метода исследования за счет получения монослойных препаратов. Эти препараты характеризуются равномерным, тонкослойным (монослойным) распределением клеточного материала на небольшом участке предметного стекла, хорошей визуализацией деталей ядра и цитоплазмы, значительным снижением числа элементов воспаления, эритроцитов, слизи и артефактов. При жидкостной цитологии значительно снижается число

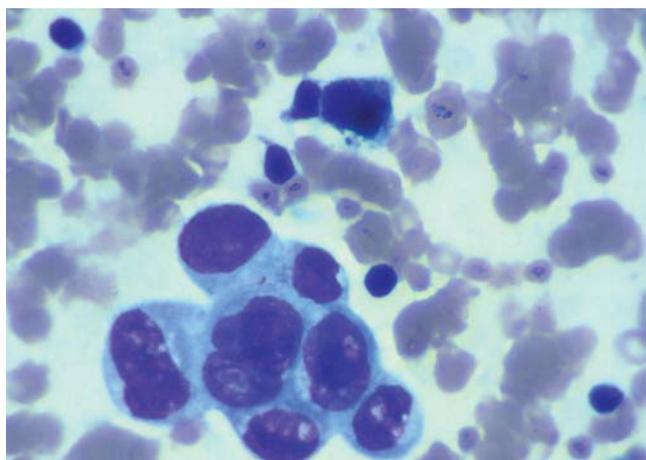


Рис. 7. Цитологический препарат, приготовленный традиционным методом (микрофотография). Рецидив аденокарциномы яичника. Окраска препарата по Романовскому-Гимзе, $\times 1000$

неудовлетворительных препаратов, сокращается время, повышаются точность и производительность исследования. Полученные монослойные препараты могут быть использованы для ИЦХ.

Качественный и количественный составы питательной среды 199 при использовании в диагностике рака яичников и его рецидивов являются адекватными для нормального метаболизма клеток, способны поддерживать их нормальное осмотическое давление и необходимый уровень кислотно-щелочного равновесия. Питательная среда 199 выпускается отечественной промышленностью, что обуславливает невысокую себестоимость и обеспечивает соответствие использования метода жидкостной цитологии критерию промышленной применяемости.

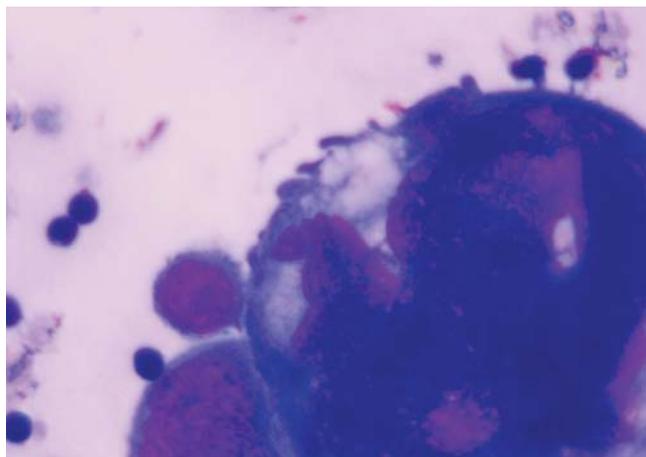
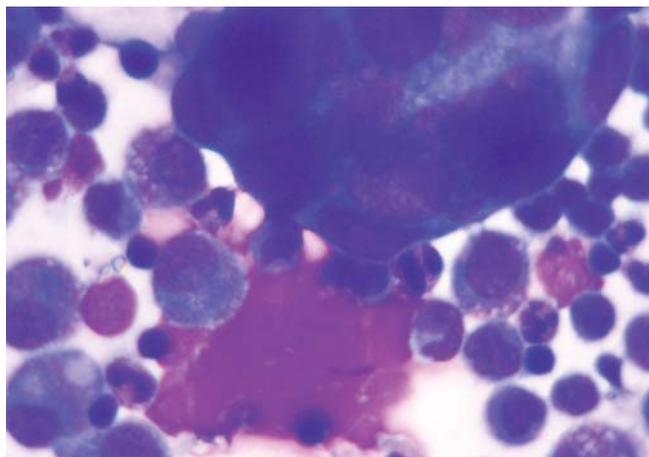


Рис. 8–9. Цитологические препараты, приготовленные методом жидкостной цитологии (микрофотографии). Рецидив аденокарциномы яичника. Окраска препарата по Романовскому-Гимзе, $\times 1000$

Применение жидкостной цитологии в онкогинекологической клинике способствует повышению достоверности морфологической диагностики РЯ и его рецидивов.

В заключение необходимо отметить, что цитологическое исследование является высокоинформативным и востребованным на всех этапах обследования (предоперационном, ин-

траоперационном и диспансерном наблюдении, после проведенного лечения) пациентов с опухолями яичников. Поиск новых и совершенствование существующих морфологических методов исследования, повышающих эффективность диагностики первичного РЯ его рецидивов, является актуальной проблемой современной онкологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / под ред. М.О. Биргера. — М.: Медицина, 1982. — 464 с.
2. Борисова О.В. Современные возможности цитологического метода в исследовании плевральных и перитонеальных экссудатов: автореф. дис.... канд. мед. наук — М., 2010. — 24 с.
3. Волченко Н.Н., Савостикова М.В. Питательная среда накопления образца клеток для последующего цитологического и/или иммуноцитохимического анализа. — М., 2003. Патент РФ № 2246110. Опубликовано 10.02.2005 г.
4. Волченко Н.Н., Славнова Е.Н., Тузуликова А.А. Жидкостная цитология в онкологии // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. — 2013. — № 5. — С. 26–31.
5. Глузман Д.Ф., Скляренко Л.М., Надгорная В.А., Крячок И.А. Диагностическая иммуноцитохимия опухолей. Киев: Морион, 2003. — С. 28–31.
6. Долгов В.В., Шабалова И.П., Миронова И.И. и соавт. Выпотные жидкости. Лабораторное исследование. — М. — Тверь, 2006. — 161 с.
7. Леонов М.Г., Шелякина Т.В. Современные возможности профилактики и ранней диагностики рака шейки матки. — М.: Вузовская книга, 2012. — 288 с.
8. Леонов М.Г., Шелякина Т.В., Тагапсо А.А., Еришова Я.Х., Беляева С.А. Возможности жидкостной цитологии в диагностике рака мочевого пузыря // Злокачественные опухоли. — 2014 — № 3. — С. 89–90.
9. Руководство по цитологической диагностике опухолей человека / под ред. А.С. Петрова. — М.: Медицина, 1976. — 301 с.
10. Савостикова М.В. Жидкостная цитология и иммуноцитохимическое исследование в цитологической диагностике биологических жидкостей и смывов с брюшины при онкогинекологических заболеваниях // Онкогинекология. — 2013. — № 4. — С. 42–43.
11. Инструкция по применению изделия медицинского назначения набора реагентов «Питательная среда 199 с индикатором или без индикатора для культуры клеток» «Питательная среда 199». — М., 2011. — 6 с.

АВТОРЫ

Леонов Михаил Генрихович, доктор медицинских наук, доцент, главный врач ГБУЗ «Онкологический диспансер № 3» Министерства здравоохранения Краснодарского края. Адрес: 353915, Россия, Краснодарский край, г. Новороссийск, ул. Лейтенанта Шмидта, д. 7. E-mail: novonko@yandex.ru

Leonov Michail Genrihovich, doctor of medical sciences, associate professor, chief physician State budgetary healthcare institution Oncological clinic No. 3 novonko@yandex.ru. Oncology Dispensary the Third; 7, Lieutenant Shmidt St., Novorossiysk, Krasnodar Territory 353915, Russia.

Беляева Софья Александровна, врач-онколог ГБУЗ «Онкологический диспансер № 3» Министерства здравоохранения Краснодарского края. 353915, Россия, Краснодарский край, г. Новороссийск, ул. Лейтенанта Шмидта, д. 7. E-mail: dr.onco.sa@mail.ru

Belyaeva Sofya Alexandrovna, Oncologist, State budgetary institution of health care Oncological clinic No. 3. Oncology Dispensary the Third; 7, Lieutenant Shmidt St., Novorossiysk, Krasnodar Territory 353915, Russia. E-mail: dr.onco.sa@mail.ru

Еришова Янина Хаим-Беньяминовна, врач клинической лабораторной диагностики ГБУЗ «Онкологический диспансер № 3» Министерства здравоохранения Краснодарского края. 353915, Россия, Краснодарский край, г. Новороссийск, ул. Лейтенанта Шмидта, д. 7.

Yanina Haim-Benyaminovna Ershova, doctor of clinical laboratory diagnostics department, State budgetary institution of health care Oncological clinic No. 3. Oncology Dispensary the Third; 7, Lieutenant Shmidt St., Novorossiysk, Krasnodar Territory 353915, Russia.

Селифонова Жанна Павловна, врач клинической лабораторной диагностики ГБУЗ «Онкологический диспансер № 3» Министерства здравоохранения Краснодарского края. 353915, Россия, Краснодарский край, г. Новороссийск, ул. Лейтенанта Шмидта, д. 7.

Selifonova Janna Pavlovna, doctor of clinical laboratory diagnostics department, State budgetary institution of health care Oncological clinic No. 3. Oncology Dispensary the Third; 7, Lieutenant Shmidt St., Novorossiysk, Krasnodar Territory 353915, Russia.