



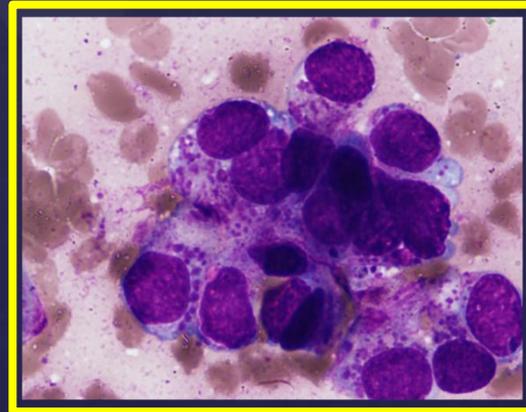
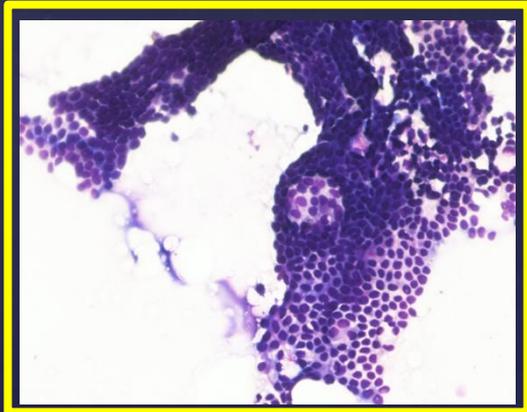
I Ежегодный Конгресс Ассоциации Онкопатологов,  
22-23 апреля 2016 г. Москва

**Флюоресцентная  
иммуноцитохимическая диагностика  
выпотных жидкостей на биочипах**

С.В.Сметанина, М.В.Савостикова, Е.Ю.Фурминская

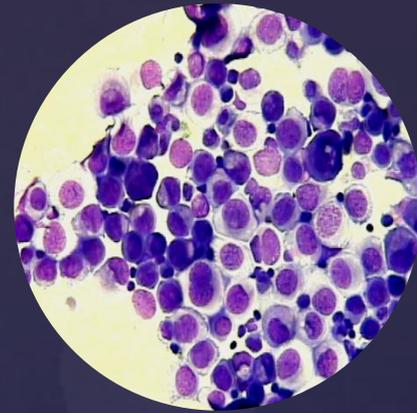
**Цитологическое исследование является  
единственным методом диагностики  
злокачественной природы экссудата.**

Достоверность цитологического исследования экссудатов по данным литературы составляет от 64 до 96% (Климова З.Ф., 1965г., Долгов В.В., Шабалова И.П. и соавт., 2006, Shidham V.V., Atkinson B.F., 2006).





## Интересный факт!

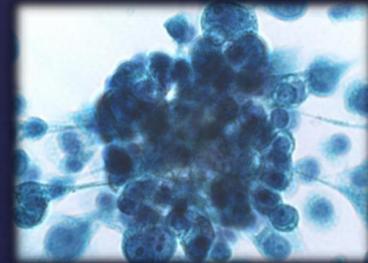
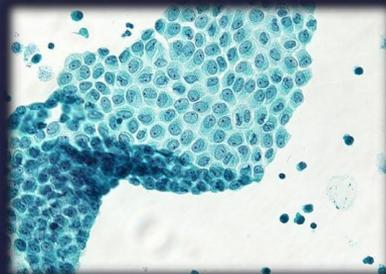


- У **14%** больных с плевритом и у **7%** пациентов с асцитом диагноз злокачественной опухоли впервые установлен при изучении экссудата.
- В **15 %** к моменту проведения цитологического исследования не известна локализация первичной опухоли.
- В **3-7%** наблюдений необходима дифференциальная диагностика между прогрессированием основного заболевания и первично множественным поражением.

*Борисова О.В. Современные возможности цитологического метода в исследовании плевральных и перитонеальных экссудатов // Дисс. канд. мед. наук. – Москва 2010 год.*

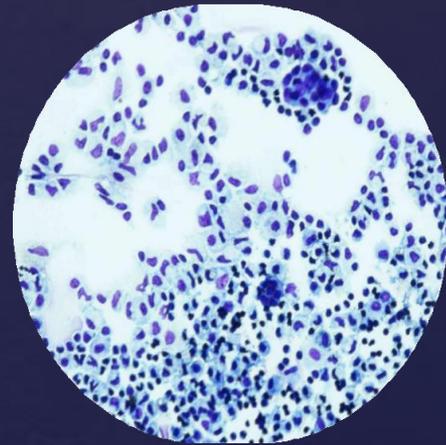
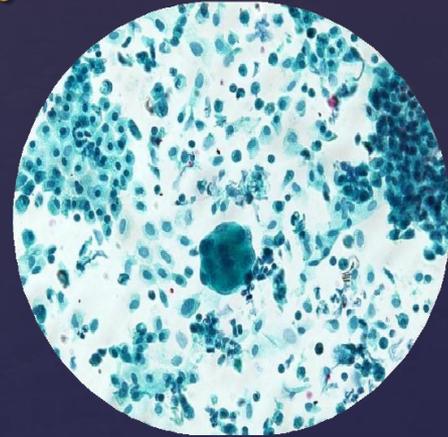
## Трудности цитологической интерпретации клеточного состава жидкости из серозной полости обусловлены:

- присутствием в них разнообразных клеточных элементов: гистиоцитарных, мезотелиальных, лейкоцитарных и опухолевых
- изменениями морфологии мезотелия, связанные с нахождением в жидкой среде, и возможностью формировать железисто- и сосочкоподобные структуры, весьма сходных со структурами, образующимися при раке;
- качество цитологических препаратов.



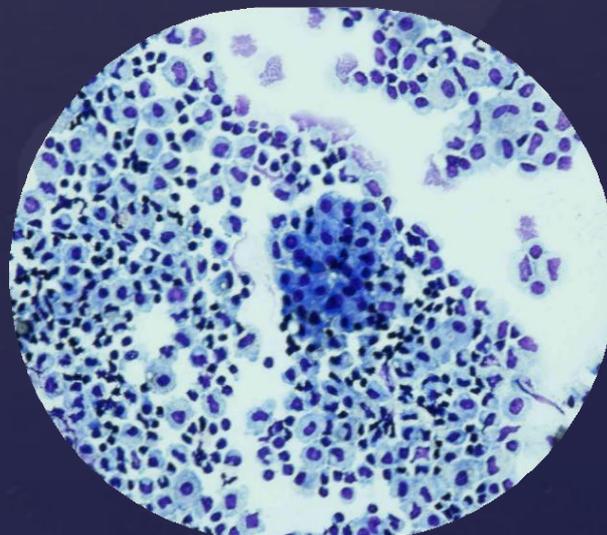
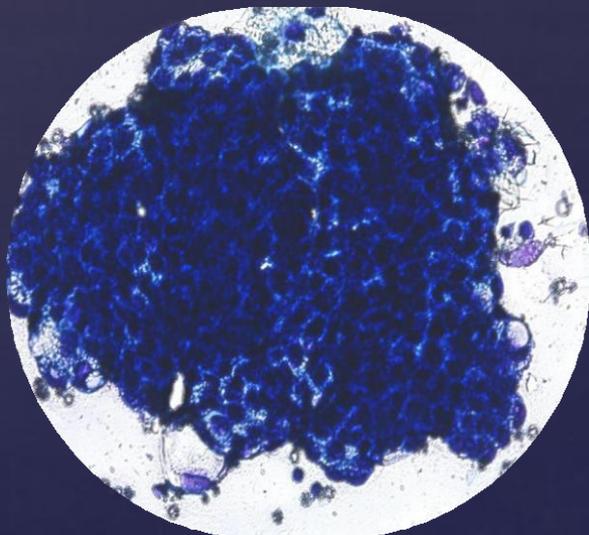
## Причины ложноотрицательных результатов

- Малое количество (единичные) клеток опухоли в жидкости.
- Пограничные опухоли яичников с минимальными признаками атипии.
- Специфический экссудат с наличием клеток перстневидноклеточного рака : невозможность отличить их от мезотелия.
- Нейроэндокринные (мелкоклеточные) опухоли, включая мелкоклеточную карциному легкого.
- Дистрофические процессы раковых клеток, связанные с нахождением в жидкой среде.



## Причины ложноположительных результатов

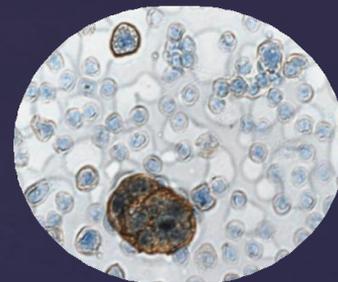
- Неправильная интерпретация мезотелиальных клеток, находящихся в состоянии пролиферации/регенерации с образованием железистоподобных структур с выраженным полиморфизмом





## Интересный факт!

### Иммуноцитохимическое исследование выпотных жидкостей

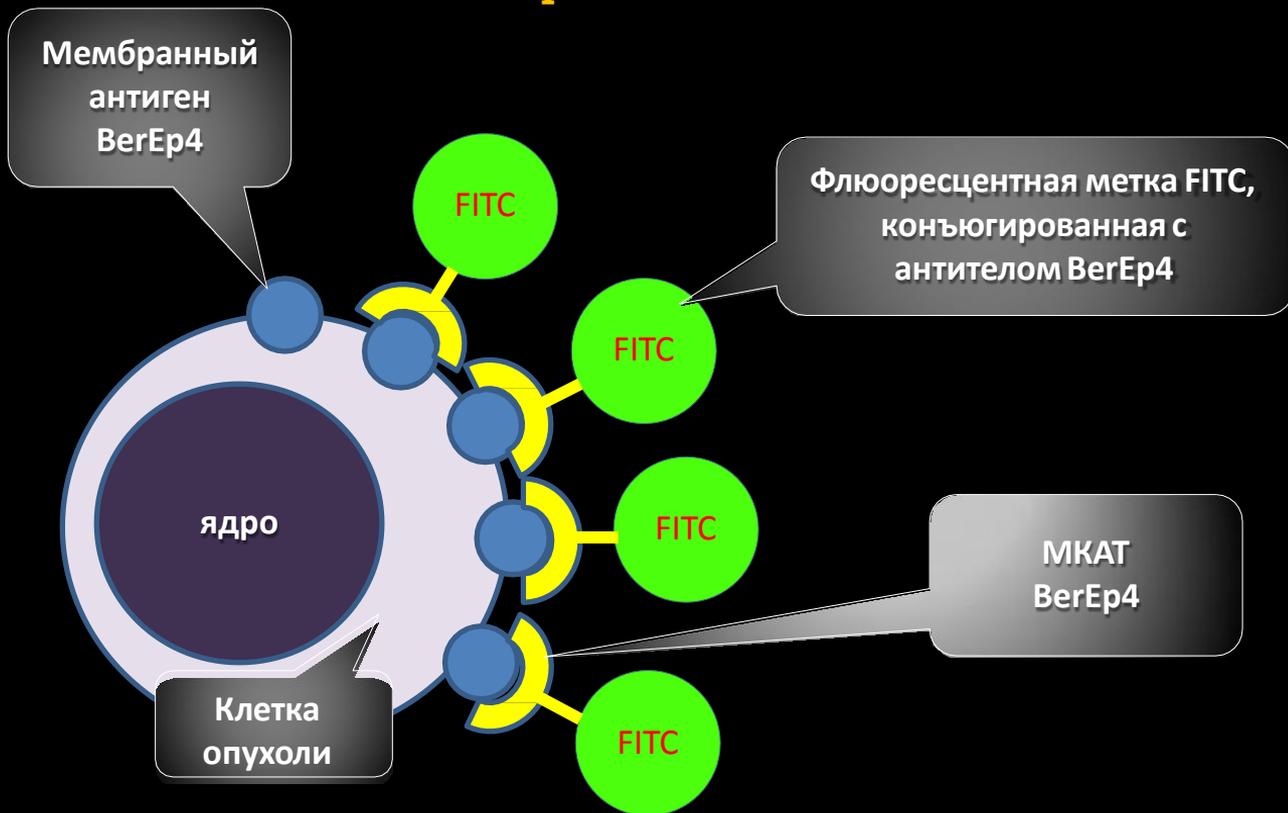


- Дифференциальная диагностика реактивных и метастатических экссудатов осуществляется чувствительным эпителиальным маркером **Ber-EP4**: чувствительность - 96%, специфичность - 99%.
- В **79%** подтверждает диссеминацию опухоли в серозные полости, заподозренную рутинным цитологическим исследованием, и до **7%** позволяет избежать гипердиагностики опухолевого процесса.
- При невыявленном первичном опухолевом очаге сочетание цитологического и ИЦХ исследований с использованием широкой панели моноклональных антител в **93%** устанавливает локализацию опухоли.

*Longato F.(2002), Глузман Д.Ф.(2003), Савостикова М.В. (2007), Борисова О.В. (2010)*

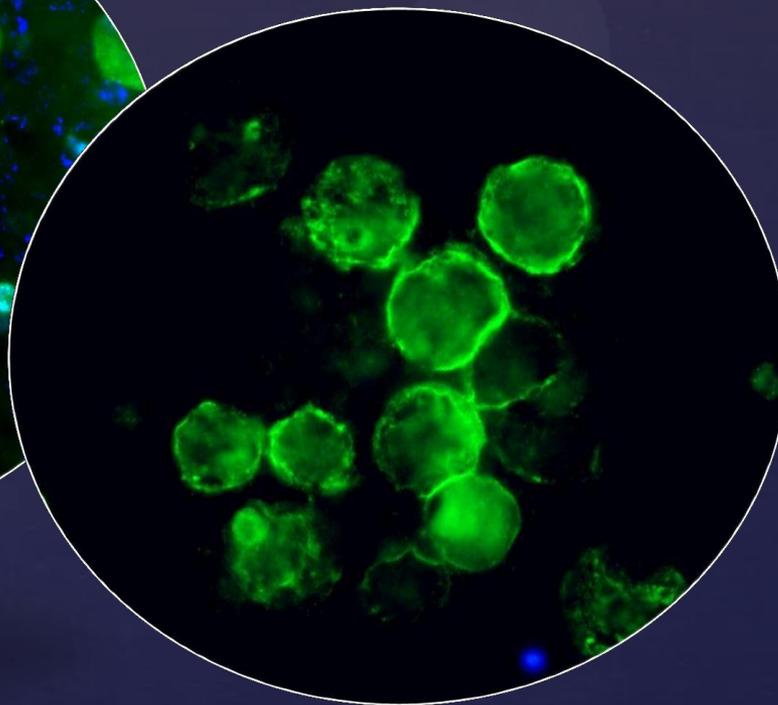
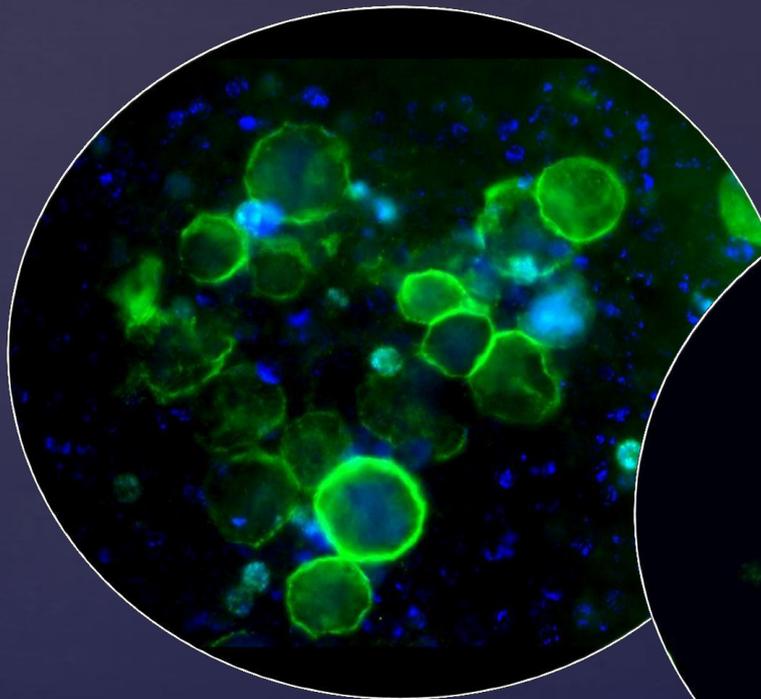
**Вариант:            прямой метод иммуноцитохимической  
диагностики с антителами BerEp4, мечеными  
флюоресцентными красителями.**

**Принцип метода:**



**Жидкость из перикарда (метастаз рака желудка)**  
***Her-Ep4 - FITC***

Экспрессия HerEp4-FITC в  
клетках аденокарциномы



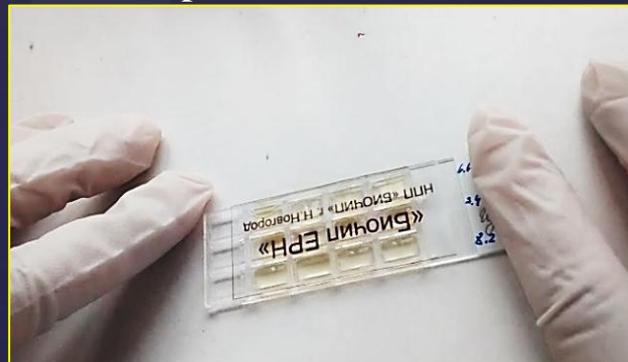
# Научно-производственное предприятие «Биочип» г.Нижний Новгород.

- Биочип является высокотехнологичным изделием медицинского назначения, ориентированным для решения различных клинических задач.
- Все биочипы имеют общие принцип строения и работы.
- Биочип состоит из двух основных частей:

функциональной



рабочей



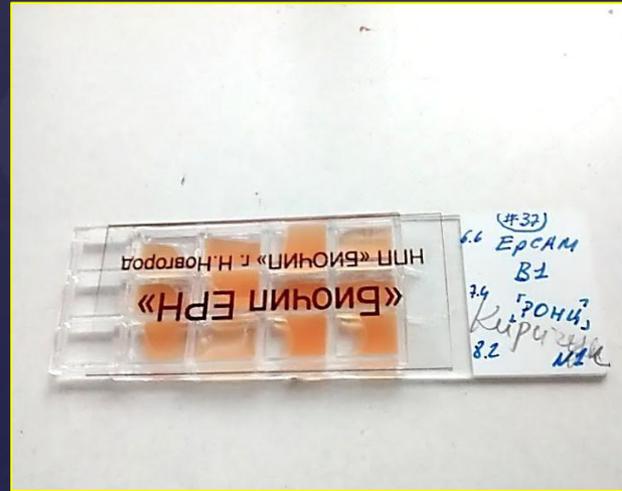
## Рабочая часть

- разделена решеткой на несколько равных частей-ячеек, количество которых может варьировать в зависимости от модели.
- в каждую ячейку на дно нанесено адгезивное покрытие и определенный вид антител. Антитела, используемые для конструирования биочипа, снабжены флуоресцентными метками (Cy3)
- Сверху рабочая поверхность покрыта защитной прозрачной пленкой

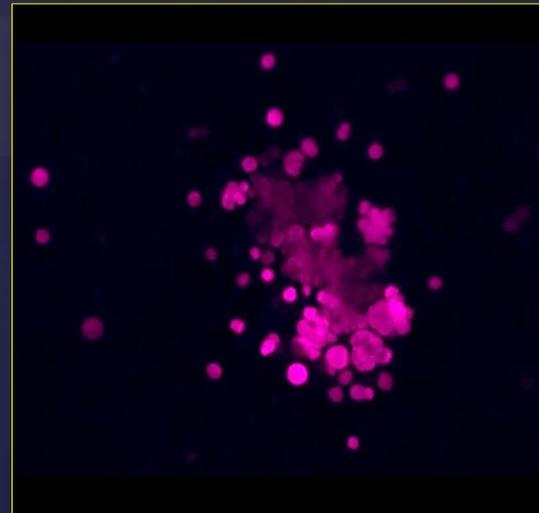


## Функциональная часть

содержит информацию о локации антител в ячейках, в виде метки и предназначена для фиксации изделия в руках



**Цель исследования** — оценить возможности и преимущества применения флюоресцентного иммуноцитохимического исследования, проводимого на биочипах, меченных моноклональными антителами Ver-Ep4 (Cy3) при цитоморфологическом анализе характера экссудатов из серозных полостей



## Материалы и методы

Методом ФИЦХ исследовано 65 экссудатов из серозных полостей

Патология	количество наблюдений
Рак молочной железы	14
Рак желудка (З - перстневидноклеточный)	13
Рак яичников	16
Пограничная опухоль яичников	2
Аденокарцинома легкого	9
Экссудаты неясной этиологии	11

## Материалы и методы:

Препараты готовили с помощью центрифуги Labofudgi 400

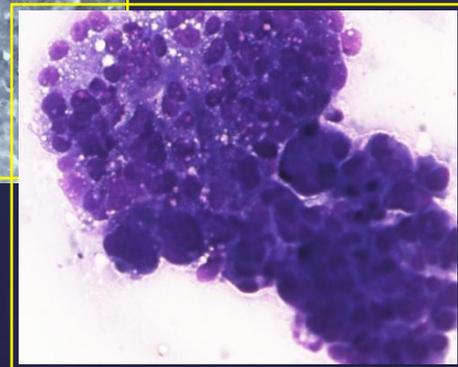
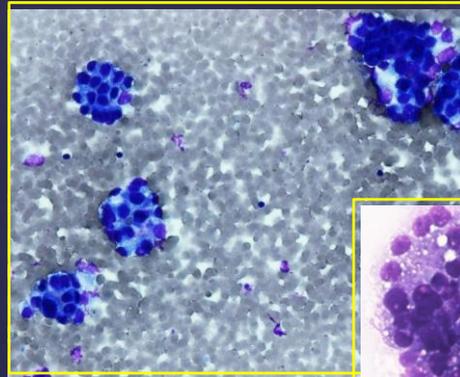
Микроскопию осуществляли на флуоресцентном микроскопе «NICON j50».



## На первом этапе

Проводили исследование на жидкостных цитологических препаратах с использованием светового микроскопа.

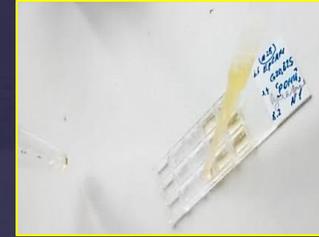
Все случаи (23), которые не вызывали сомнения в отношении метастатического процесса, в последующем ставились как положительный контроль.





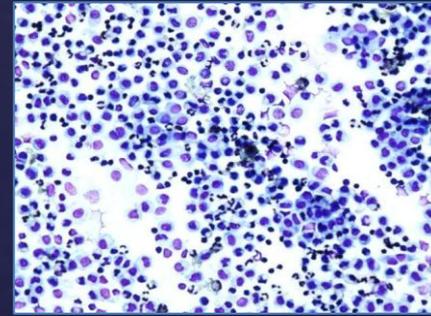
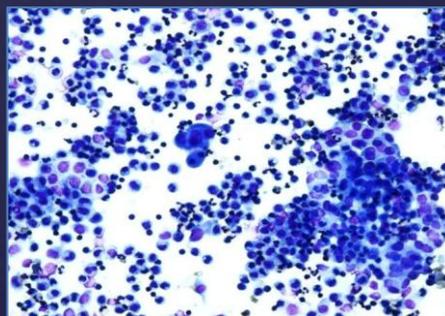
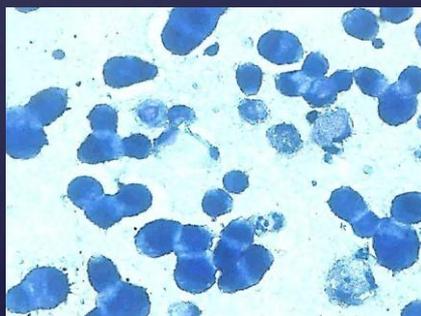
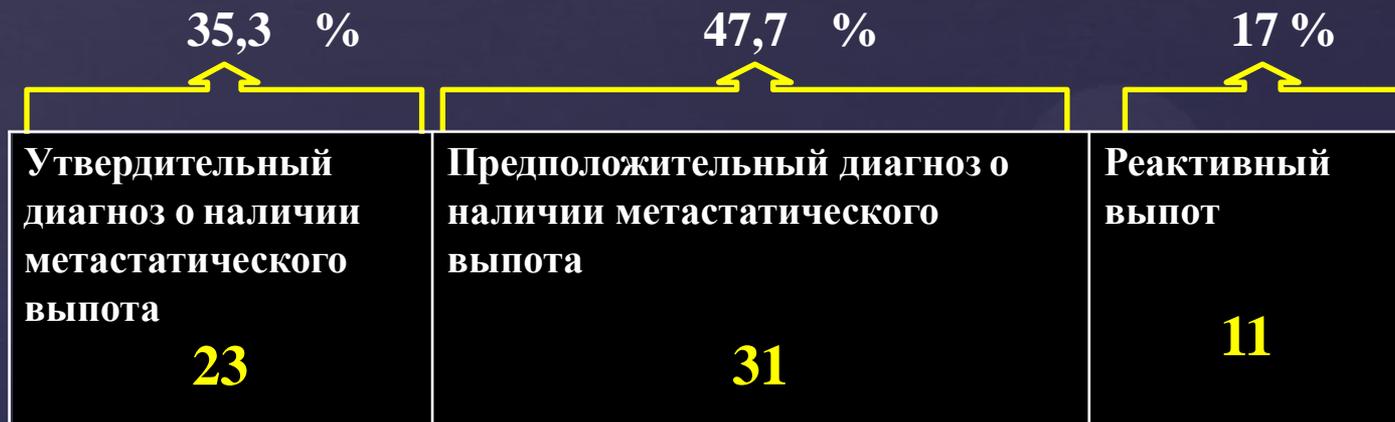
## Методика

- После преподготовки материала для исследования с поверхности биочипа удаляли защитную пленку и вносили взвесь клеток в ячейки слегка касаясь пипеткой дна



- Затем биочип накрывали пленкой и помещали в шейкер-термостат на 25 минут, соблюдая режим темноты.
- Подсушивали и легким движением чип ополаскивали в Трис-буфере.
- Помещали препарат на предметный столик флуоресцентного микроскопа и изучали каждую ячейку на предмет наличия флуоресценции в клетке (оценка согласно утвержденному протоколу).
- После оценки флуоресценции, материал фиксировали и проводили окраску по Романовскому с последующим анализом, сопоставляя результаты стандартного исследования и флуоресценции.

# Стандартное цитоморфологическое исследование и окрашивание



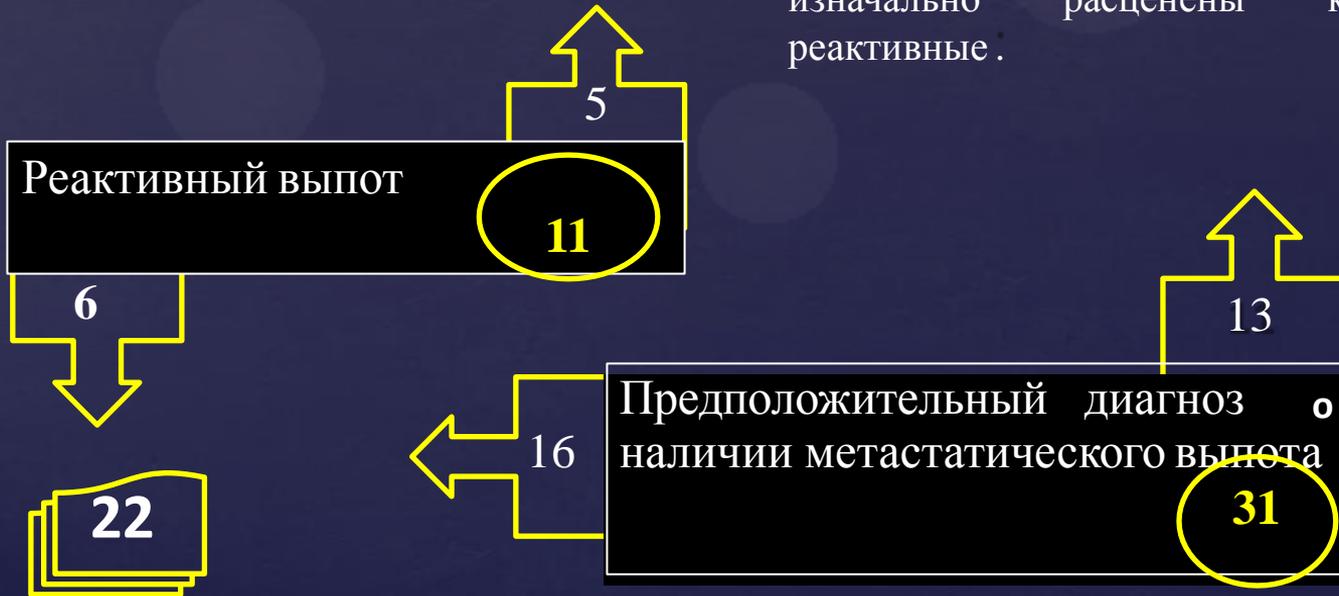
# Применение флюоресцентной иммуоцитохимии на биочипах с МКАТ VerEr4-Cy3

41

Утвердительный диагноз о наличии метастатического выпота

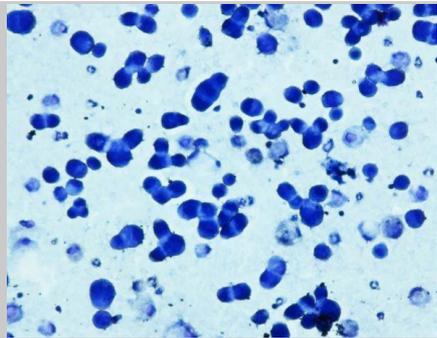
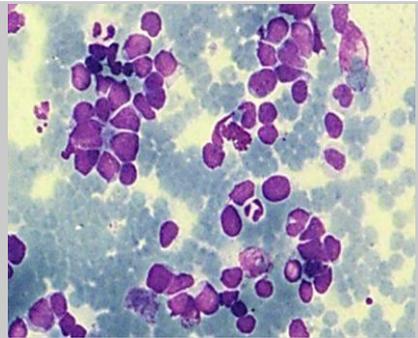
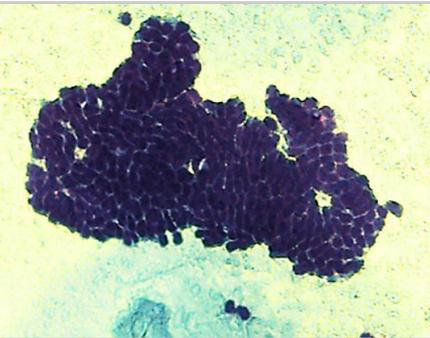
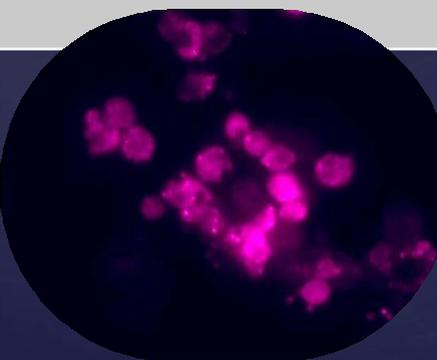
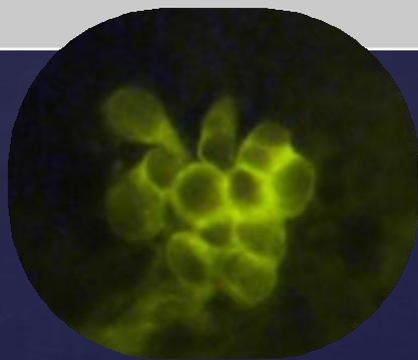
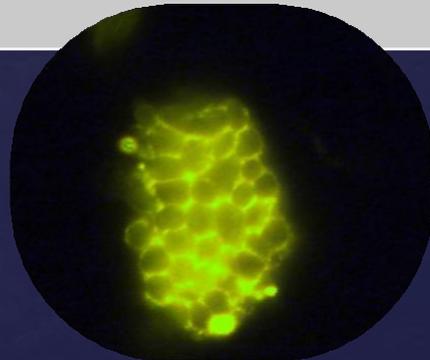
23 (35,3%)

- в 20 % наблюдений при цитологическом исследовании высказывалось лишь подозрение на наличие опухолевых клеток,
- в 7,7 % наблюдений эксудаты изначально расценены как реактивные .

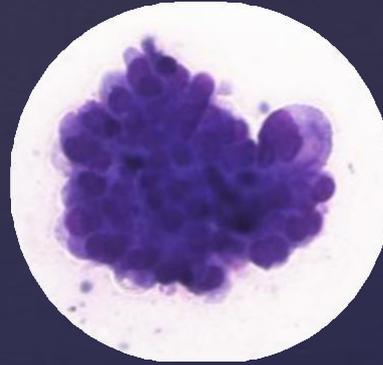
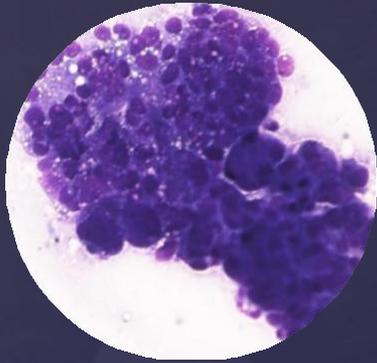




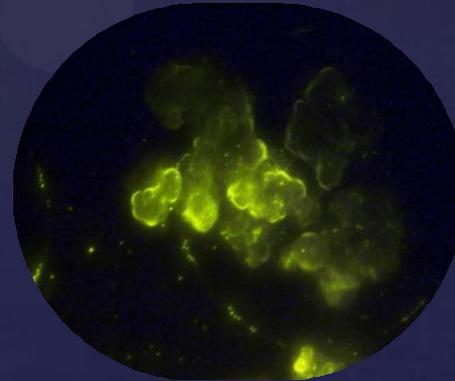
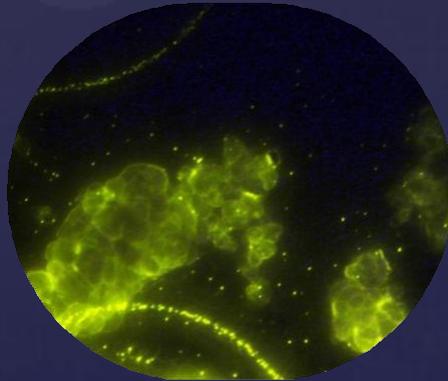
**Наибольшие сложности при цитоморфологическом исследовании экссудатов возникали при метастазах:**

Перстневидноклеточного рака желудка	Мелкоклеточного рака	Пограничной опухоли яичников
		
		

## Предположительный диагноз



## Утвердительный диагноз



## Клиническое наблюдение

Данные пациента: Ж 1972 г.р.

Характер материала: асцитическая жидкость

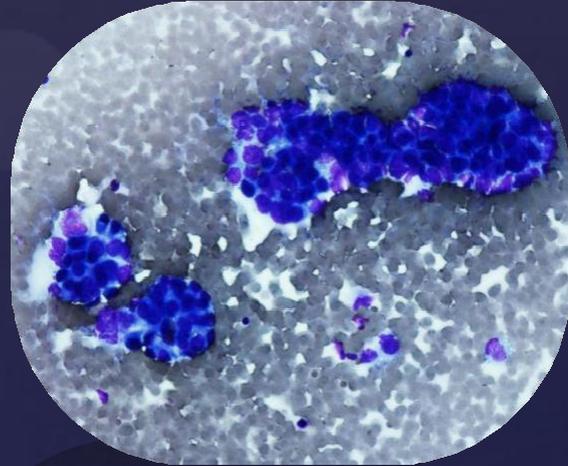
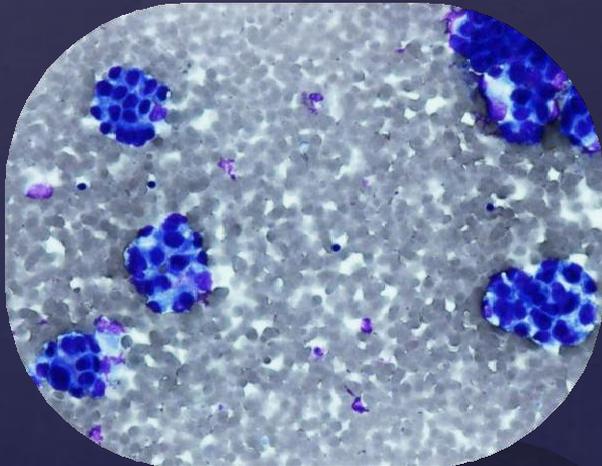
Клинический диагноз: рак яичников

Результаты цитологического исследования: метастаз папиллярной аденокарциномы

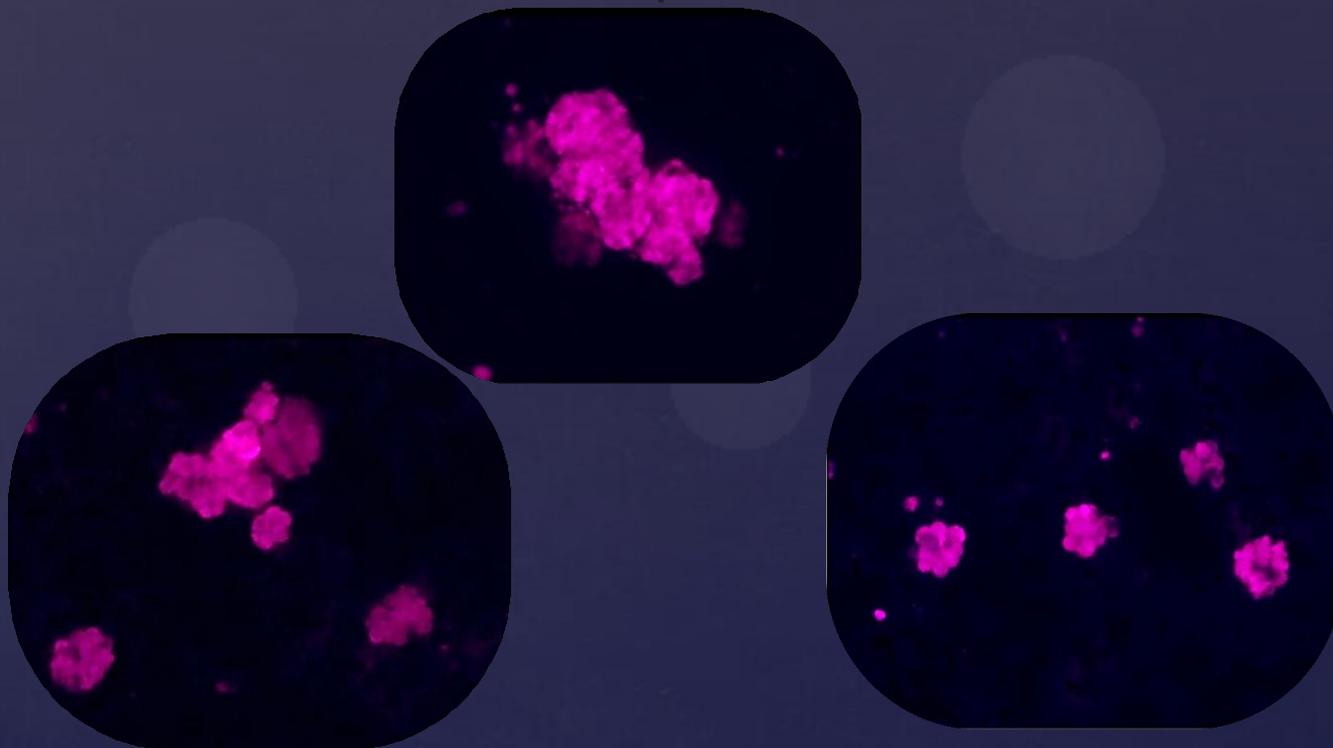
Результаты гистологического исследования: серозная карцинома высокой степени злокачественности (яичники), с метастазами в полость матки и большой сальник.

Высота осадка  $h=3\text{мм}$ .

**Цитологический препарат (X200).**



**Заключение после флуоресцентного  
иммуноцитохимического исследования на биочипах с МКАТ  
BerEp4-Cy3 подтвердилось положительной экспрессией  
антигенов**



## Клиническое наблюдение

Данные пациента: Ж 1953 г.р.

Характер материала: асцит, 200 мл

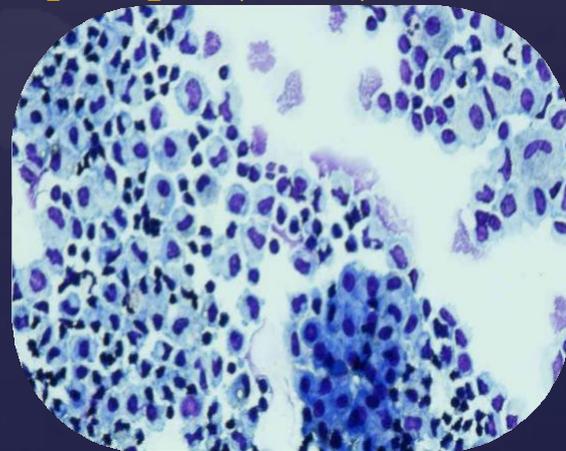
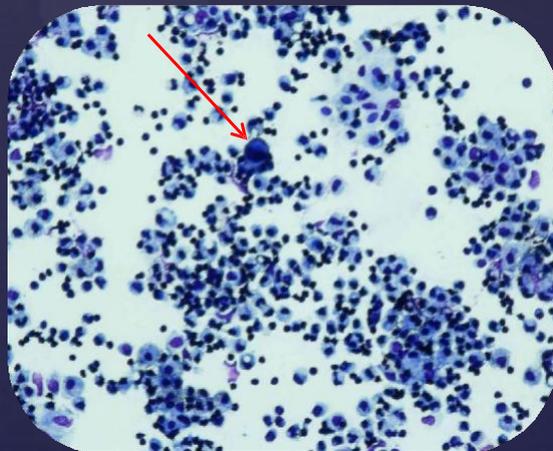
Клинический диагноз: рак левой МЖ, подозрение на mts в яичники

Результаты цитологического исследования: в полученном материале среди клеток пролиферирующего мезотелия определяются единичные клетки подозрительные в отношении карциномы

Результаты гистологического исследования: инфильтративный рак G2 (МЖ)

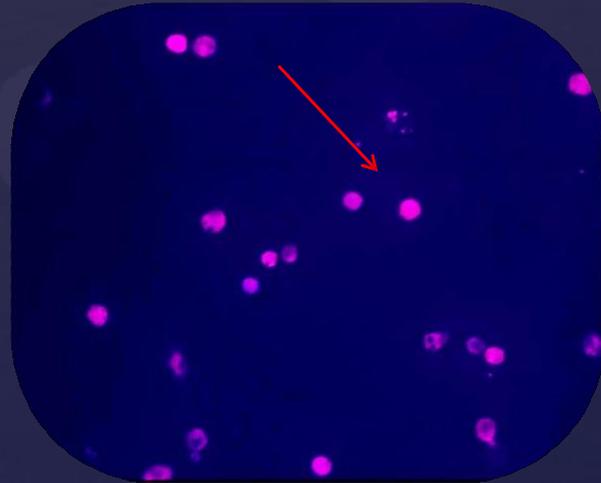
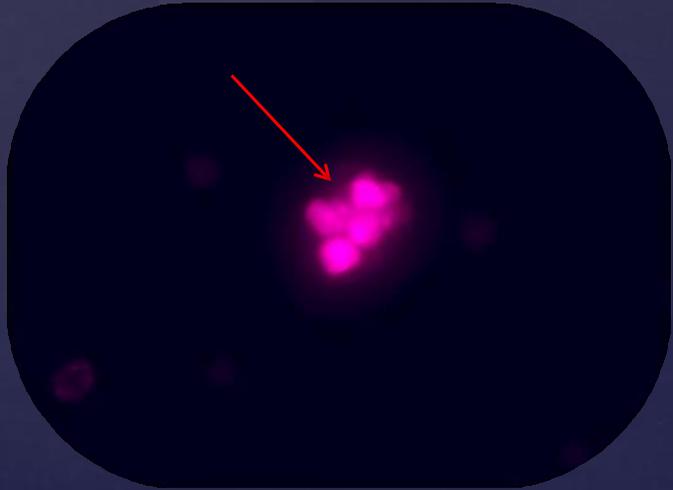
Высота осадка после центрифугирования  $h=0,5\text{мм}$ .

### Цитологический препарат (X100)



**Заключение после флуоресцентного иммуноцитохимического исследования на биочипах было изменено:**

*в полученном материале специфический экссудат с наличием метастатической карциномы. (X200; 100).*



## Клиническое наблюдение

Данные пациента: М., 1949 г.р.

Характер материала: асцит из брюшной полости

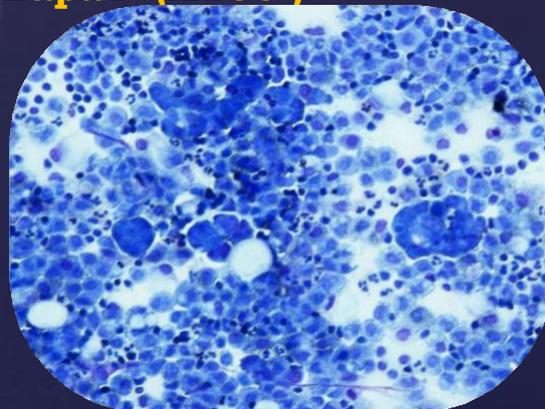
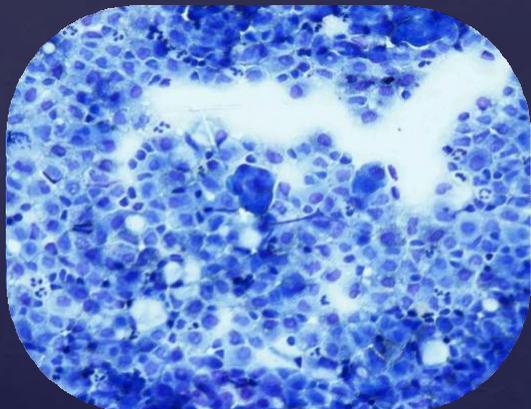
Клинический диагноз: рак желудка

Результаты цитологического исследования: метастаз низкодифференцированной аденокарциномы с наличием перстневидных клеток.

Результаты гистологического исследования: перстневидноклеточный рак (желудок); комплексы клеток рака (брюшина).

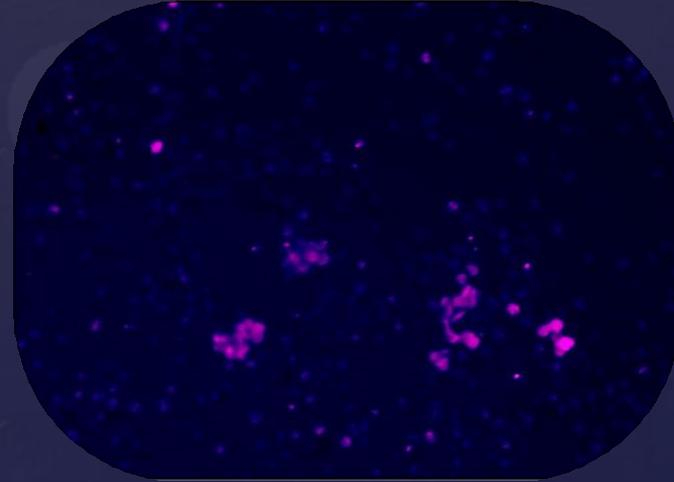
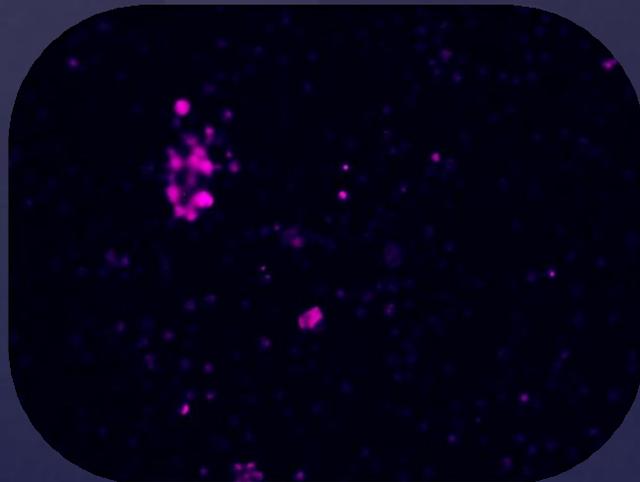
Высота осадка после центрифугирования  $h=4,0$ мм.

### Цитологический препарат (X100 )



**Заключение после флюоресцентного  
иммуоцитохимического исследования на биочипах с МКАТ  
BerEp4-Cy3 :**

*в полученном материале специфический эксудат с наличием клеток  
метастатической аденокарциномы с перстневидными клетками. (X100)*

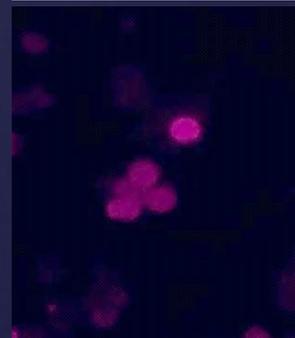
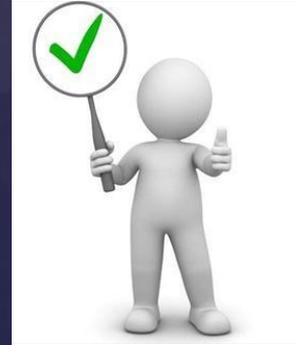
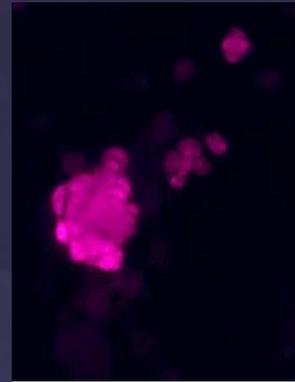


## Исследование показало:

ФИЦХ исследование на биочипах с МКАТ Ver-Ep4 является надежным и быстрым методом диагностики характера экссудата.

- Метод позволяет:

- обнаруживать немногочисленные опухолевые клетки и мелкие их скопления, не выявляемые с помощью традиционного цитологического исследования,
- снизить частоту гипо- и гипердиагностики опухолевого процесса,
- применять ФИЦХ метод на биочипах при срочном интраоперационном исследовании выпотов, так как не требует сложной предподготовки и значительных временных затрат.
- методика пробоподготовки проста и возможно исполнение лаборантом без участия врача цитолога.





**Благодарим за внимание**