

Новые возможности верификации злокачественных опухолей яичника

А.Э. Протасова, Р.В. Орлова, Г.А. Раскин

Кафедра онкологии МАПО; медицинский факультет Государственного университета;
Городской клинический онкологический диспансер, Санкт-Петербург

Контакты: Анна Эдуардовна Протасова Protasova1966@yandex.ru

При асцитных формах рака яичника на проанализированных 72 случаях показана возможность достоверно верифицировать диагноз с помощью метода жидкостной цитологии и иммуноцитохимического исследования. Эффективной панелью для диагностики аденокарцином яичника с асцитом можно считать следующую: Ber-EP4, калретинин — с целью дифференциальной диагностики опухоли с реактивными изменениями и эстрогеновые рецепторы, WT-1, CK7 — для уточнения типа аденокарциномы (в случае положительной реакции на Ber-EP4). Верификация муцинозного типа аденокарциномы в настоящее время затруднена вследствие негативной реакции на органоспецифические маркеры.

Ключевые слова: жидкостная цитология, иммуноцитохимическое исследование, асцит, рак яичника

New verification possibilities for ovarian malignancies

A.E. Protasova, R.V. Orlova, G.A. Raskin

Department of Oncology, Moscow Academy of Postgraduate Education; Medical Faculty, State University;
City Clinical Oncology Dispensary, Saint Petersburg

The fact that the diagnosis can be significantly verified using the liquid-based cytology technique and immunocytochemical assay is shown in analyzed 72 cases with the ascites forms of ovarian cancer. The effective panel to diagnose ovarian adenocarcinomas with ascites may be considered as follows: Ber-EP4, calretinin for the differential diagnosis of the tumor with reactive changes, as well as estrogen receptors, WT-1, CK7 for the clarification of the type of adenocarcinoma (in case of a positive reaction to Ber-EP4). Verification of the mucinous form of adenocarcinoma is now made difficult by a negative reaction to organ-specific markers.

Key words: liquid-based cytology, immunocytochemical assay, ascites, ovarian cancer

Введение

Рак яичника (РЯ) относится к группе основных онкогинекологических заболеваний. В мире высокая заболеваемость РЯ регистрируется в северных регионах Канады (19,9 случая), Австрии (15,1) и Дании (14,1) на 100 тыс. женского населения. Заболеваемость в России составляет 10,2 случая на 100 тыс. женщин, однако за последние годы прирост заболеваемости РЯ увеличился на 13,6 %. В Санкт-Петербурге, начиная с 1990 г. показатель заболеваемости РЯ находился на уровне 11,2–12,9 и возрос на 15,2 %. Средний возраст больных РЯ — 63 года, частота заболеваемости с возрастом повышается [1–4].

Среди причин смерти женского населения в мире РЯ занимает 5-е место. Показатель смертности от РЯ в Европе составляет 12, в США — 7,9 случая на 100 тыс. женского населения. В России в период с 1990 по 2009 г. стандартизованные показатели смертности от РЯ не снизились и составили 7,4–7,9 случая на 100 тыс. населения [2, 3, 5]. Пятилетняя выживаемость пациенток с диагнозом РЯ в мире, Европе, России и Санкт-Петербурге составляет 30–36,5 %. Таким образом, для РЯ характерны тенденция роста показателей заболеваемости,

высокая смертность и низкие показатели выживаемости [1, 4, 6, 7].

На ранних этапах развития РЯ какая-либо симптоматика обычно отсутствует, а клинические симптомы заболевания возникают лишь при поздних стадиях развития патологического процесса (болевой синдром, нарушение функции соседних органов, чувство дискомфорта в животе, симптомы интоксикации и астенизации, увеличение объема живота), поэтому ранняя диагностика РЯ — скорее исключение, чем правило. До 2/3 случаев РЯ выявляются на поздних стадиях заболевания по причине скрытого его течения, короткого периода удвоения опухоли, агрессивности опухолевого процесса и универсального характера метастазирования, а также в связи с тем, что жалобы больных нередко бывают неопределенными [4, 7, 8].

К основным методам диагностики и дифференциальной диагностики РЯ в настоящее время относят ректовагинальное исследование, трансвагинальную эхографию, определение и мониторинг СА-125 в сочетании с HE4 и диагностическую лапароскопию, проводимую с целью морфологической верификации диагноза (чувствительность этого метода — 100 %) [4, 5, 8].

С учетом особенностей клинической картины РЯ первые клинические признаки заболевания часто связаны с симптомами серозита — выпотом жидкости в брюшной (асцит) полости. Пациентки впервые обращаются к врачу с жалобами на резкое увеличение объема живота и снижение диуреза. Ургентный характер симптоматики требует скорейшей верификации диагноза и выбора правильной лечебной тактики.

Для решения вопроса о начале противоопухолевого лечения больных РЯ необходим основной этап диагностики — морфологическая верификация диагноза. В случаях когда выполнение биопсии первичного опухолевого очага невозможно, а заболевание сопровождается асцитом, ранее использовался метод цитологического исследования выпотной жидкости, который по рутинно выполняемой методике определяет лишь наличие или отсутствие атипических клеток в пунктате и является субъективным.

Современным методом комплексной оценки выпотных жидкостей для подтверждения или исключения злокачественного опухолевого процесса, определения органоспецифической принадлежности опухолевых клеток в жидкости является метод жидкостной цитологии с последующим проведением иммуноцитохимического исследования. Для исследования используется нативный материал, что делает антигены более доступными для взаимодействия с моноклональными антителами. Одно из первых упоминаний о диагностическом иммуноцитохимическом исследовании относится к 1975 г., когда для анализа лимфомы Беркитта с помощью метода прямой иммунофлуоресценции были применены анти-IgM-антитела [9].

Одной из проблем в цитологии выпотных жидкостей является достоверное отличие реактивного мезотелия от опухолевых клеток. Достоверно отличить опухолевые эпителиальные клетки от мезотелиальных позволяет следующая панель антител: B72.3, MOC-31 и Ber-EP4 [10]. Необходимо отметить, что CDX-2 не экспрессируется в клетках асцитической жидкости неопухолевого происхождения [11]. Другие авторы использовали для дифференциальной диагностики MOC-31, D2-40 и калретинин, причем первый является эпителиальным антигеном, а остальные два — мезотелиальными. По данным ряда авторов, достоверность и эффективность применения данных антител приближалась к 100 % [12–14].

После уточнения злокачественной природы выпота возникает следующая задача — определение органоспецифичности опухолевых клеток. Проведение иммуноцитохимического исследования с антителами против MUC5ac и WT-1 целесообразно в дифференциальной диагностике РЯ и рака поджелудочной железы [15]. Описаны случаи эндометриальной стромальной саркомы низкой степени злокачественности с диссеминацией по брюшине и асцитом, когда имму-

ноцитохимическое исследование на CD10 помогало верифицировать диагноз [16]. Таким образом, в литературе имеются разрозненные сообщения о решении ряда конкретных диагностических задач с помощью исследования выпотных жидкостей и последующего иммуноцитохимического исследования, отсутствует и системный подход к диагностике, который существует в иммуногистохимии.

Цель исследования — оценка возможности использования метода жидкостной цитологии и иммуноцитохимического исследования в диагностике асцитных форм РЯ.

Материалы и методы

Проанализировано 72 асцитических жидкости и 10 мазков — отпечатков брюшной полости и дугласова пространства, полученных от 72 больных с диагностированным РЯ. У всех пациенток по результатам предварительно проведенного ультразвукового исследования визуализированы новообразования в области придатков матки, признаки асцита (различной степени выраженности) и установлен диагноз «подозрение на новообразование яичника».

Асцитическая жидкость была получена методом пункции брюшной полости через задний свод влагалища. Пункцию осуществляли после опорожнения прямой кишки и мочевого пузыря по стандартной методике. Полученный экссудат направляли на цитологическое и иммуноцитохимическое исследования.

Во всех случаях асцитическую жидкость центрифугировали с образованием осадка, который в дальнейшем обрабатывался на цитоцентрифуге Cytospin 4. Полученные мазки окрашивались гематоксилин-эозином, по Романовскому—Гимзе и по Папаниколу. Оценивали цитологическую картину, клеточную концентрацию в жидкости, после чего выбирали нужное количество осадка для образования одного мазка при помощи Cytospin 4. Формировалось число мазков, соответствующее количеству используемых антител. Мазки в виде пятен диаметром 7–8 мм высушивали на воздухе и фиксировали в холодном ацетоне в течение 10 мин, после чего они смачивались в трис-буфере с твином (BioOptica) и обводились парафиновым карандашом. На первом этапе проводили подавление эндогенной пероксидазы при помощи 3 % перекиси водорода в течение 20 мин. Все последующие этапы исследования осуществлялись во влажной бане при температуре 28 °С. Первые антитела инкубировали в течение 60 мин (см. таблицу).

Для визуализации реакции антиген—антитело применялась полимерная система детекции UltraVision компании LabVision, в качестве хромогена использовали диаминобензидин. После каждого из этапов до окрашивания диаминобензидином стекла с мазками промывали в трис-буфере с твином pH 7,1. Ядра окра-

Характеристика использованных антител

№	Название АТ*	Клон	Характеристика АТ	Разведение
1	Ber-EP4	Ber-EP4	Мышиные, моноклональные	RTU
2	Calretinin	DAK-Calret 1	Мышиные, моноклональные	RTU
3	Estrogen receptor	SP1	Кроличьи, моноклональные	1:100
4	Wilm's Tumor Protein (WT1)	6F-H2	Мышиные, моноклональные	1:10
5	Cytokeratin 7		Кроличьи, поликлональные	1:200

*АТ — антитело.

шивались при помощи гематоксилина Майера, стекла заключались в среду BioMaunt.

Результаты и обсуждение

Из проанализированных 72 случаев в 24 наблюдениях при диагностированном РЯ в асцитической жидкости раковых клеток не выявлено (негативная реакция на Ber-EP4), а в 48 — они были обнаружены (позитивная реакция на Ber-EP4). При проведении дальнейшей диагностики оказалось, что в 12 случаях аденокарцинома яичника была муцинозной, и данные опухоли имели следующий иммунофенотип: BerEP4⁺,

СК7⁺, WT-1⁺, отрицательные эстрогеновые рецепторы. В 22 наблюдениях верифицирована серозная аденокарцинома яичника, характеризовавшаяся следующим иммунофенотипом: позитивная реакция на BerEP4, СК7, WT-1, эстрогеновые рецепторы. В 2 из 48 случаев эстрогеновые рецепторы продемонстрировали отрицательную реакцию. В 12 наблюдениях аденокарцинома яичника не была уточнена.

При проведении цитологических исследований мазков — отпечатков с брюшины опухолевые клетки не были выявлены ни разу. Отсутствие возможности проведения иммуноцитохимического исследования ставит под сомнение эффективность использования данного метода.

Таким образом, эффективная панель для диагностики аденокарцином яичника в выпотных жидкостях выглядит следующим образом: Ber-EP4, калретинин — с целью дифференциальной диагностики опухоли с реактивными изменениями и эстрогеновые рецепторы, WT-1, СК7 — для уточнения типа аденокарциномы, верификации локализации в яичнике (в случае позитивной реакции на Ber-EP4).

Выводы

Цитологическое и иммуноцитохимическое исследования асцитической жидкости больных с подозрением на новообразование яичника, выполненные на основе жидкостной цитологии, позволяют достоверно верифицировать диагноз «аденокарцинома». Верификация муцинозного типа аденокарциномы в настоящее время затруднена вследствие негативной реакции на органоспецифические маркеры.

ЛИТЕРАТУРА

- Мерабишвили В.М., Щербук Ю.А. Онкологическая служба в Санкт-Петербурге и районах города в 2009 году (заболеваемость, смертность, выживаемость). СПб., 2010.
- Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2009 году (заболеваемость и смертность). М., 2011.
- American Cancer Society. Cancer Prevention & Early Detection Facts & Figures 2007. Atlanta: American Cancer Society, 2007.
- Wenham R.M. Ovarian cancer: a bright future. Cancer Control 2011;18:4–5.
- Pavlidis N., Hansen H., Stahel R. ESMO Clinical Practice Guidelines: development, implementation and dissemination. Ann Oncol 2010;21:7–8.
- De Angelis R., Francisci S., Baili P. et al. The EURO-CARE-4 database on cancer survival in Europe: data standardisation, quality control and methods of statistical analysis. Eur J Cancer 2009;45:909–30.
- Chabner B.A., Lynch T.J., Longo D.L. Harrison's manual of oncology. NY: McGraw-Hill Medical, 2011; p. 517–38.
- Ашрафян Л.А., Антонова И.Б., Ивашина С.В. и др. Ранняя диагностика рака эндометрия и яичников. Практик онкол 2009;10(2):71–5.
- Binder R.A., Jencks J.A., Chun B., Rath C.E. "B" cell origin of malignant cells in a case of American Burkitt's lymphoma. Characterization of cells from a pleural effusion. Cancer 1975;36(1):161–8.
- Lin O. Challenges in the interpretation of peritoneal cytologic specimens. Arch Pathol Lab Med 2009;33:739–42.
- Kobayashi M., Ueyama Y., Nakanishi H. et al. Immunocytochemical detection using CDX2. Cancer Cytopathol 2006;108:114–8.
- Davidson B., Risberg B., Kristensen G. et al. Detection of cancer cells in effusions from patients diagnosed with gynaecological malignancies. Evaluation of five epithelial markers. Virchow Arch 1999; 435:43–9.
- Kim J.H., Kim G.E., Choi Y.D. et al. Immunocytochemical panel for distinguishing between adenocarcinomas and reactive mesothelial cells in effusion cell blocks. Diagn Cytopathol 2009;37:258–61.
- Politi E., Kandaraki C., Apostolopoulou C. et al. Immunocytochemical panel for distinguishing between carcinoma and reactive mesothelial cells in body cavity fluids. Diagn Cytopathol 2005;32:151–5.
- Han L., Pansare V., Al-Abbadi M. et al. Combination of MUC5ac and WT-1 immunohistochemistry is useful in distinguishing pancreatic ductal carcinoma from ovarian serous carcinoma in effusion cytology. Diagn Cytopathol 2009;37(5):321–4.
- Lim B.J., Choi S.Y., Kang D.Y., Suh K.S. Peritoneal washing cytology of disseminated low grade endometrial stromal sarcoma: a case report. Acta Cytol 2009;53(5):587–90.