

ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Путова М.В., Носкова К.К., Поморцев Б.А., Семенов Н.Е., Израйлов Р.Е.

ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ИНТРАОПЕРАЦИОННЫХ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ СМЫВОВ ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА

ГБУЗ Московский клинический научный центр имени А.С. Логинова, 111123, Москва, Россия

Диагностика микроканцероматоза брюшины является важнейшей задачей, позволяющей определить тактику лечения при раке желудка. Для ее решения на предоперационном этапе выполняется диагностическая лапароскопия с перитонеальным смывом и последующим цитологическим исследованием. Цель работы: совершенствовать цитологическую диагностику перитонеальных смывов с помощью иммуноцитохимических методик и cell block метода. Работа проводилась на материале 276 операционных перитонеальных смывов у больных раком желудка, находившихся на лечении в отделе высокотехнологичной хирургии с июня 2016 по июнь 2018 года. В результате была выбрана оптимальная панель моноклональных антител (Ber-EP4, CEA, CK20), позволившая повысить чувствительность с 52% до 96% и специфичность цитологической диагностики с 80% до 98%, а общую точность метода с 67% до 98%.

Ключевые слова: иммуноморфологическое исследование; цитологическая диагностика; свободные опухолевые клетки; рак желудка.

Для цитирования: Путова М. В., Носкова К. К., Поморцев Б. А., Семенов Н. Е., Израйлов Р. Е. Цитологическая диагностика интраоперационных перитонеальных смывов при раке желудка. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (4): 225-228. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-225-228>

Putova M. V., Noskova K. K., Semenov N. E., Pomortsev B. A., Izrailov R. E.

CYTOLOGICAL DIAGNOSTICS OF INTRAOPERATIVE PERITONEAL WASHES IN GASTRIC CANCER

The Moscow Clinical Scientific Centre of the State Budgetary Healthcare Institution named after Loginov A.S. Moscow Health Department, Moscow, Russia

Diagnosis of peritoneal microcanceromatosis is the most important task allowing to determine treatment strategy for patients with stomach cancer. Laparoscopy combined with peritoneal flushing and subsequent cytological examination should be performed to detect the peritoneal microcanceromatosis at the preoperative stage. The objective of this work was to improve cytological diagnostics of peritoneal washings using immunocytochemical techniques and the cell block method. The work was carried out on the basis of 276 surgical peritoneal washings in patients with stomach cancer who were on treatment in the department of high-tech surgery of the Moscow Clinical Scientific Centre of the State Budgetary Healthcare Institution named after Loginov A.S. from June 2016 to June 2018. As a result, the optimal panel of monoclonal antibodies (Ber-EP4, CEA, CK20) was chosen, which increased the sensitivity from 52% to 96% and the specificity of cytological diagnosis from 80% to 98%, and the overall accuracy of the method from 67% to 98%.

Key words: immunomorphological markers; cytological exam; free cancer cells; gastric cancer.

For citation: Putova M. V., Noskova K. K., Semenov N. E., Pomortsev B. A., Izrailov R. E. Cytological diagnostics of intraoperative peritoneal washes in gastric cancer. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)/ 2019; 64 (3): 225-228 (in Russ.)

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-3-225-228>

For correspondence: Putova M.V., biologist clinical laboratory diagnostics; e-mail: mputova@bk.ru

Information about authors:

Putova M., <https://orcid.org/0000-0002-0825-7148>

Semenov N., <https://orcid.org/0000-0001-5543-199X>

Noskova K., <https://orcid.org/0000-0001-5734-0995>

Conflict of interest. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 01.11.2018
Accepted 01.03.2019

Введение. Рак желудка остается одной из самых распространенных форм злокачественных опухолей человека. Ежегодно в мире заболевает около 1 млн человек.

В структуре онкологической смертности рак желудка занимает третье место. В Российской Федерации ежегодно регистрируют около 39 тыс. новых случаев рака желудка и более 34 тыс. больных умирает от этого заболевания [1, 2].

Выбор лечебной тактики при раке желудка определя-

Для корреспонденции: Путова Мария Вадимовна, биолог; e-mail: mputova@bk.ru

ется стадией опухолевого процесса. Одной из основных проблем стадирования рака желудка у больных является исключение канцероматоза в начальной стадии, когда еще нет асцитической жидкости и видимых признаков метастатического поражения брюшины [3,4]. По рекомендациям NCCN (Американского Национального Общества по раку) наличие свободных опухолевых клеток в перитонеальном смыве расценивается как отдаленное метастазирование (M1), а лапароскопическое исследование с перитонеальным смывом является обязательным методом предоперационного обследования больных местнораспространенными формами рака желудка [1,4]. Согласно последним Российским рекомендациям Ассоциации онкологов России всем больным с резектабельным местнораспространенным раком желудка необходимо выполнять диагностическую лапароскопию с перитонеальным смывом для исключения канцероматоза брюшины.

По данным F.Tustumı с соавт. [5–7] обнаружена четкая связь между наличием свободных опухолевых клеток (СОК) в брюшной полости и неблагоприятным прогнозом заболевания. Больные с наличием СОК имели высокую частоту метастазирования в лимфатические узлы, наличие инвазии в серозную оболочку, рецидивов в течение 60 месяцев и низкую общую 3-х летнюю выживаемость [4]. Прогноз в этой группе пациентов сопоставим с больными, находящимися на симптоматической химиотерапии без оперативного лечения. Это обуславливает важность определения на дооперационном этапе групп пациентов с микроканцероматозом.

Цитологическое исследование перитонеальных смывов имеет определенные сложности, обусловленные разрушающим воздействием физиологического раствора на клетки (изменение формы, границ клетки, клеточной мембраны). Клетки мезотелия округляются, ядро часто теряет центральное расположение, в хроматине просматриваются не визуализируемые в мезотелиальных клетках ядрышки и нуклеолы. Клетки часто расположены разрозненно, в отличие от клеток мезотелия в выпотной жидкости, где одним из критериев определения мезотелиальных клеток является наличие кластерных структур [8].

Дегенеративные изменения при попадании в физиологический раствор происходят также с клетками рака, поэтому дифференцировать единичные клетки аденокарциномы, перстневидноклеточного рака и клетки низкодифференцированной карциномы от дегенеративно измененных клеток мезотелия в перитонеальном смыве не простая задача даже для опытного морфолога [9]. По

данным литературы, чувствительность цитологического метода традиционной световой микроскопии для диагностики клеток рака составляет 34,5 – 89%, а специфичность 36 – 76,9% [10,11]. Таким образом, встает вопрос о необходимости поиска путей повышения общей точности цитологического исследования, как метода диагностики СОК.

По данным Jo-Neon Kim с соавт. [12, 13] комбинация цитологического, иммуноцитохимического метода и технологии cell block позволяет увеличивать чувствительность исследований до 90% и специфичность до 97%. В свою очередь применение двух и более МКАТ позволяет улучшить эти показатели до 99% и 100%, соответственно.

Цель работы – совершенствование цитологической диагностики перитонеальных смывов с использованием иммуноморфологических методик для выявления СОК при раке желудка.

Материал и методы. Материал для исследования получен из отделения высокотехнологичной хирургии ГБУЗ МКНЦ им. А.С. Логинова ДЗМ.

Выполнен анализ 276 операционных перитонеальных смывов у больных раком желудка, находившихся на лечении в отделении высокотехнологичной хирургии с июня 2016 по июнь 2018 года. Перитонеальные смывы получены при диагностической лапароскопии. Средний возраст пациентов составил 64 года (32 – 86 лет), из них 140 женщин и 136 мужчин. В 185 из 276 (67%) случаях было проведено традиционное цитологическое исследование. В процессе исследования нами определены следующие структурно-морфологические признаки опухолевых клеток в перитонеальных смывах (табл. 1).

При необходимости, если результат исследования был неоднозначный и/или противоречил клиническим и лабораторным данным, иммуногистохимическое исследование проводилось на материале, приготовленном методом клеточного блока. Однако, следует отметить, что данная методика на материале смывов показала сомнительные результаты в связи с малым количеством клеточного материала. В нашем исследовании клеточные блоки в 80% случаев были умеренно или гипоклеточными, вследствие чего данный метод был выбран как вспомогательный.

В 91 из 276 (33%) кроме традиционной световой микроскопии было проведено иммуноцитохимическое исследование на цитологических препаратах и/или клеточных блоках. Цитологические препараты готовились по жидкостной методике на цитоцентрифуге Cyto-Tek. Контролем наличия необходимого количества клеточ-

Таблица 1

Структурно-морфологические признаки мезотелиальных и опухолевых клеток в перитонеальных смывах

| Клеточный и/или структурный признак | Мезотелиальные клетки | Опухолевые клетки |
|---|---|--|
| Ядерно-цитоплазматическое соотношение | Смещено в пользу цитоплазмы, реже в пользу ядра | Смещено в пользу ядра |
| Гиперхромия клеток или ядра | Слабо выражена | Сильно выражена |
| Дискариоз ядер | Не отмечался | Отмечался часто |
| Наличие перстневидных клеток | В качестве редких находок | Отмечался в 90% диссеминации перстневидноклеточного рака |
| Наличие визуализируемых ядрышек | Умеренно выражен | Сильно выражен |
| Кластерные и/или шаровидные структуры, гиперхромные структуры | Выражен слабо | Сильно выражен |
| Наслоение ядер в структурах | Выражен слабо | Сильно выражен |

Диагностическая информативность методов выявления микроканцероматоза

| Метод | Диагностическая лапароскопия (макроскопическая оценка) <i>n</i> =185 | Световая микроскопия <i>n</i> =185 | Световая микроскопия + ИЦХ исследование (Ber-EP4, CEA, CK20) + cell block <i>n</i> =91 |
|-----------------------|--|---------------------------------------|--|
| Чувствительность (Se) | 92% | 52% | 96% |
| Специфичность (Sp) | 54% | 80% | 98% |
| Общая точность (OT) | 63% | 67% | 98% |

ного материала служили цитологические препараты, окрашенные по Паппенгейму. Иммуноцитохимическое исследование проводилось с антителами фирмы Rabbit Monoclonal Primary Antibody (Roche, Франция), диагностическими наборами *ultraView Universal DAB Detection Kit* (Roche, Франция), на автоматическом иммуногисто-стейнере Ventana BenchMark XT (Roche, Франция). Была выбрана следующая панель МКАТ: Ber-EP4, CEA, CK7, CK20.

Результаты. Разработка. По результатам традиционной световой микроскопии СОК обнаружены у 80 из 185 (43%) пациентов (в твердительной или предположительной форме). У 104 из 185 (56,4%) пациентов опухолевых клеток в перитонеальном смыве не обнаружено, в одном случае (0,6%) материал был не информативным из-за выраженной дегенерации клеточных элементов.

Хирургическое лечение проведено 31 из 104 (30%) больному из группы с отрицательным результатом исследования перитонеальных смывов на СОК.

На основании данных мировой литературы, достоверно показавших корреляцию между инвазией первичной опухоли за пределы серозной оболочки желудка и риском имплантационного метастазирования (появления микро- и макроканцероматоза брюшины), нами были сопоставлены результаты патогистологического исследования операционных органокомплексов (с оценкой глубины инвазии опухоли) с результатами цитологического исследования перитонеальных смывов [14,15].

Обсуждение. Рассчитанная положительная (PPV) и отрицательная (PVN) прогностическая значимость теста, составила 69% и 67%, соответственно. Чувствительность световой микроскопии составила 52%, специфичность 81%, общая точность метода 67%. Точность данного метода исследования перитонеальных смывов была сопоставима с общей точностью макроскопической оценки прорастания опухоли серозной оболочки при диагностической лапароскопии (63%).

Полученные данные свидетельствовали о необходимости повышения точности исследования.

Для реализации этой задачи, наряду с общепринятым световым методом, было применено иммуноцитохимическое исследование.

Так у 91 (33%) из 276 пациентов цитологическое исследование перитонеальных смывов начиналось со световой микроскопии препаратов и одновременно с этим проводилось ИЦХ исследование. По данным литературы наиболее чувствительными и специфичными МКАТ для выявления клеток рака желудка в жидкости являются Ber-EP4, CEA, CK20, CK7 [9,12,14]. Это послужило основой выбора иммуноцитохимической панели в нашем исследовании. Однако, в процессе исследования была отмечена положительная экспрессия CK7 в клетках мезотелия в 52% случаев (рис. 1, 2 см. обложку), что

на наш взгляд не позволяет использовать данный маркер в диагностике клеток рака желудка в перитонеальном смыве. На основании полученных данных СК7 из панели был исключен.

В результате 91 комбинированного исследования было выявлено 26 (29%) положительных на СОК и 65 (71%) отрицательных случаев. У 21 пациента из 65 (32%), с отрицательным результатом на СОК, было проведено хирургическое лечение с последующим гистологическим исследованием операционного материала.

Из них в 20 случаях патогистологическое исследование не выявило инвазии опухоли за пределы серозной оболочки желудка, что было сопоставимо с результатами цитологического исследования перитонеальных смывов. Тем не менее, у одного пациента с отрицательным результатом цитологического исследования (4,7%) было диагностировано прорастание серозной оболочки.

Таким образом, используя комбинированную световую и иммуноцитохимическую методики, удалось повысить чувствительность и специфичность цитологической диагностики перитонеальных смывов на 44% и 18% соответственно. Общая точность метода достигла 98%. Результаты представлены в табл. 2.

Положительная прогностическая значимость теста (PPV) составила 96%, отрицательная (PVN) 98%.

Выводы

1. Использование только световой микроскопии для выявления свободных опухолевых клеток в перитонеальном смыве недостаточно, так как клеточные элементы подвержены значительным изменениям, единичные клетки рака трудно дифференцируемы среди мезотелия, гистиоидных и других элементов фона.

2. Иммуноцитохимическое исследование с применением комбинации моноклональных антител к Ber-EP4, CEA, CK20 повышает чувствительность с 52% до 96% и специфичность цитологической диагностики с 80% до 98%, а общую точность метода с 67% до 98%.

3. Повышение диагностической точности цитологического исследования свободных опухолевых клеток в перитонеальном смыве у больных раком желудка достигается применением комбинации световой микроскопии с иммуноцитохимическим исследованием.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2–7, 11–15 см. REFERENCES)

- Бяхов М. Ю., Бесова Н. С., Владимирова Л. Ю., Волков Н. М., Левченко Е. В., Сакаева Д. Д. и соавт. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака желудка. *Злокачественные опухоли*. 2016; 4 (Спецвыпуск 2): 234–24.
- Липова В.А., Котов В.А. Дифференциальная диагностика опухо-

ЦИТОЛОГИЯ

лей по клеточному составу серозных жидкостей: учебное пособие для врачей. СПб: Наука; 2003.

9. Дорошенко А.М., Дворниченко В.В., Голодников М.А., Пленкин С.М., Миронов П.В., Наталинов Д.И., Лисичникова И.В., Кислицына Л.Ю. Использование цитологического исследования с применением иммуноцитохимического анализа интраоперационных перитонеальных смывов у больных с низкодифференцированным раком желудка. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2010; 5: 40-3.
10. Амелюшкина В.А. Новая технология для стандартизированного приготовления цитологических препаратов. *Лабораторная медицина*. 2003; 6: 12-4.

REFERENCES

1. Byakhov M. Yu., Besova N. S., Vladimirova L. Yu., Volkov N. M., Levchenko E. V., Sakayeva D. D. i soavt. Prakticheskiye rekomendatsii po lekarstvennomu lecheniyu raka zheludka. *Zlokachestvennyye opukholy*. 2016; 4 (Spetsvyпуск 2): 234–24. (in Russian)
2. Jernal A., Bray F. Global Cancer Statistics. *A Cancer Journal for Clinicians*. 2011; 61: 69-90.
3. Romano F1, Cesana G, Berselli M, Gaia Piacentini M, Caprotti R, Bovo G, Uggeri F. J. Biological, histological, and clinical impact of preoperative IL-2 administration in radically operable gastric cancer patients. *Surg. Oncol*. 2004. 15;88(4): 240-7.
4. Hoskovec D., Varga J., Dytrych P., Konecna E., Matek J. Peritoneal lavage examination as a prognostic tool in cases of gastric cancer. *Gastric cancer*. 2017; 1:13(3): 612-6.
5. A systematic review of the accuracy and utility of peritoneal cytology in patients with gastric cancer. *Gastric cancer*. 2011; 1:15(3): 510-5.
6. Tustumi F, Bernardo WM, Dias AR, Ramos MF, Cecconello I, Zilberstein B, Ribeiro-Júnior U. Detection value of free cancer cells in peritoneal washing in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2016; 1:71(12): 733-45.
7. Yonemura Y, Kawamura T, Bandou E, Tsukiyama G, Endou Y, Miura M. The natural history of free cancer cells in the peritoneal cavity.

In: *Gonzalez-Moreno S, editor. Advances in Peritoneal Surface Oncology*. Berlin, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2007; 11–23.

8. Lipova V.A., Kotov V.A. Differential diagnosis of tumors according to the cellular composition of serous fluids: manual for doctors. St.Petersburg: Nauka; 2003. (in Russian)
9. Doroshenko A.M., Dvornichenko V.V., Golodnikov M.A., Plenkin S.M., Mironov P.V., Natalinov D.I., Lisichnikova I.V., Kislitsyna L.YU. The use of cytological studies using immunocytochemical analysis of intraoperative peritoneal lavages in patients with low differentiated gastric cancer. *Byulleten' VSNC SO RAMN*. 2010; 5: 40-3. (in Russian)
10. Amelyushkina V.A. New technology for standardized preparation of cytological preparations. *Laboratornaya meditsina*. 2003; 6: 12-4. (in Russian)
11. Kodera Y., Nakanishi H., Yamamura Y., Shimizu Y. Prognostic value and clinical implications of disseminated cancer cells in the peritoneal cavity detected by reverse transcriptase–polymerase chain reaction and cytology. *Int.J.Cancer predict.Oncol*. 1998; 79: 429–33.
12. Hui Zhang, Jia Wen, Pi Li Xu, Rui Chen, Xi Yang, Lian Er Zhou et al. Role of Liquid based Cytology and Cell Block in the Diagnosis of Endometrial Lesions Immunocytochemical Panel for distinguishing between adenocarcinomas and reactive mesothelial cells in effusion Cell Blocks. *Chinese Medical Journal*. 2016; 129(12): 1459-63.
13. Jo-Heon Kim, M.D., Ga-Eon Kim, M.D., YooDuk Choi, M.D., Ji Shin Lee, M.D., Jae Hyuk Lee, M.D., Jong-Hee Nam, M.D., and ChanChoi, M.D. *Diagn. Cytopathol*. 2009; 37: 258–61.
14. Bando E., Kavamura T., Takashi S. Magnitude of serosal changes predicts peritoneal recurrence of gastric cancer. *J.Am.Coll.Surg*. 2003; 197(2): 212-22.
15. Kusamura S, Baratti D, Zaffaroni N, Villa R, Laterza B, Balestra MR. Pathophysiology and biology of peritoneal carcinomatosis. *World J Gastrointest Oncol*. 2010 Jan 15; 2(1)

Поступила 01.11.18
Принята к печати 01.03.19

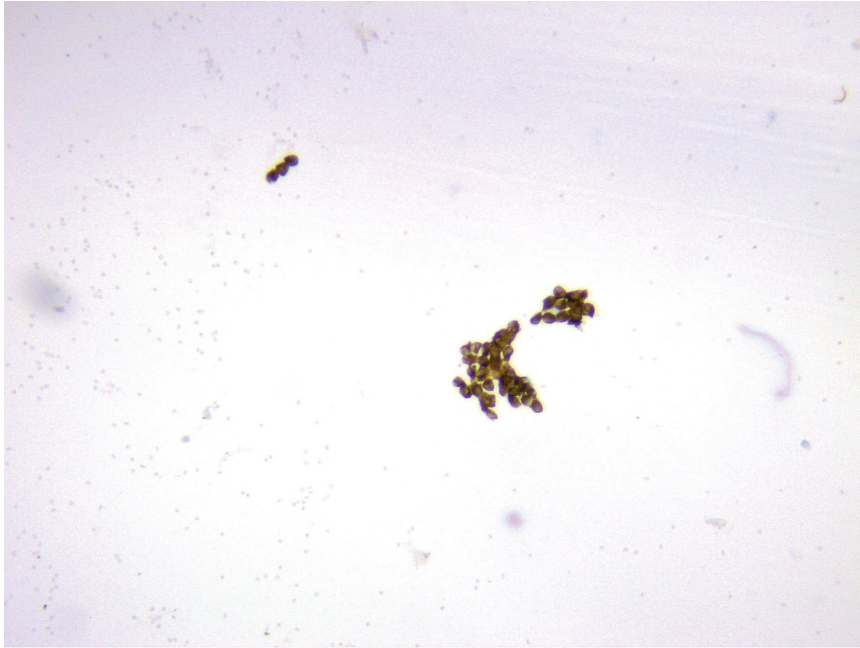


Рис. 1. Положительная экспрессия СК7 в клетках мезотелия. Об.х10.

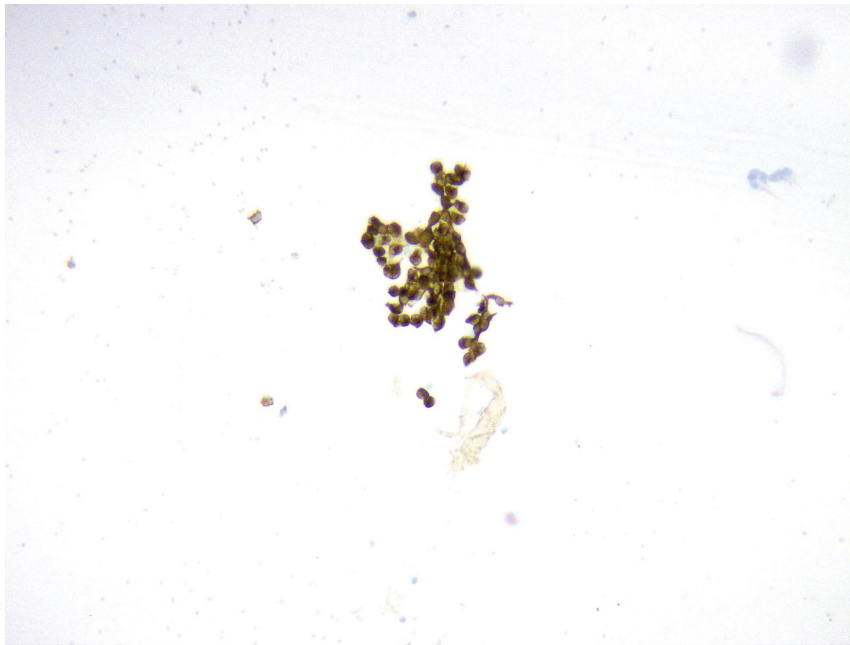


Рис. 2. Положительная экспрессия СК7 в клетках мезотелия. Об.х10.