

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616-076.5

Волченко Н.Н., Борисова О.В., Баранова И.Б.

ТЕХНОЛОГИЯ «КЛЕТОЧНЫЙ БЛОК» В ЦИТОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр им. П.А. Герцена» Минздрава России, 125284, г. Москва

В статье изложена обобщающая информация об использовании технологии «клеточный блок» (КБ) в цитологической практике. Показаны возможности применения различных современных методик (иммуноцитохимическое (ИЦХ) исследование, FISH, CISH, полимеразная цепная реакция) с использованием метода КБ. Представлены собственные результаты исследования КБ, приготовленных с использованием желатина, AgarCyto и набора Shandon CytoBlock: сравнивали диагностическую эффективность метода КБ и обычного цитологического мазка, а также ИЦХ-исследования на материале КБ и жидкостной цитологии. Использование КБ на современном этапе необходимо с целью обеспечения сохранности клеточных элементов для последующих ИЦХ- и молекулярно-генетических исследований.

К л ю ч е в ы е с л о в а: клеточный блок; цитология; иммуноцитохимия.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60 (8): 37–39.

Volchenko N.N., Borisova O.V., Baranova I.B.

THE TECHNOLOGY «CELL BLOCK» IN CYTOLOGICAL PRACTICE

The P.A. Herzen Federal medical research center of Minzdrav of Russia, 125524 Moscow, Russia

The article presents summary information concerning application of “cell block” technology in cytological practice. The possibilities of implementation of various modern techniques (immune cytochemical analysis, FISH, CISH, polymerase chain reaction) with application of “cell block” method are demonstrated. The original results of study of “cell block” technology made with gelatin, AgarCyto and Shandon CytoBlock set are presented. The diagnostic effectiveness of “cell block” technology and common cytological smear and also immune cytochemical analysis on samples of “cell block” technology and fluid cytology were compared. Actually, application of “cell block” technology is necessary for ensuring preservation of cell elements for subsequent immune cytochemical and molecular genetic analysis.

Key words: cell block; cytology; immune cytochemistry

Citation: Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. 2015; 60 (8): 37–39. (in Russ.)

Введение. «Клеточный блок» (КБ) (cell-block, cytoblock) – метод приготовления цитологических препаратов, основанный на технике заливки клеточного материала (взвеси клеток) объемлющей средой с целью формирования КБ с последующим изготовлением из него тонких срезов и нанесением их на предметное стекло (как при гистологической технике). Метод является стандартной процедурой в цитопатологии.

Метод введен в клиническую практику более века назад и претерпел многочисленные изменения для улучшения качества процедуры. С развитием цитологии методика заливки клеточного материала в парафин отошла на второй план, так как при цитологическом исследовании препаратов, приготовленных методом мазков, обнаруживаются в основном те же детали строения клеток, которые удается выявить при гистологическом изучении срезов, но различимы они более отчетливо, поскольку площадь клетки в цитологических мазках примерно на 20–30% больше вследствие отсутствия резкой дегидратации тканей, имеющей место при изготовлении гистологических препаратов. В цитологических препаратах четче видны границы, очертания оболочки клеток, структура цитоплазмы, ядра, виднее ядрышки, наличие гранул в цитоплазме. Сохраняется структура клеточных комплексов. Однако цитологические неокрашенные препараты, приготовленные обычным способом, сохраняются недолго, через 2–3 нед происходит их высыхание с разрушением структуры белков. Проведение дальнейших исследований, таких как иммуноцитохимическое (ИЦХ), невозможно. Препараты, завернутые в тонкую алюминиевую фольгу, при температуре -20°C могут храниться в течение 4–6 мес. Материал, взятый в среду для жидкостной цитологии (например, BD CytoRich),

может храниться до 3–6 мес. Препараты, приготовленные методом КБ, залитые в парафин, хранятся неограниченное время при комнатной температуре с сохранением структуры белков и ДНК.

Материал для КБ может быть получен практически из всех разновидностей цитологических образцов: жидкости (из серозных оболочек, кисты и др.), пунктаты, полученные при тонкоигольной аспирационной биопсии, эксфолиативный материал, остаточный материал после использования методик жидкостной цитологии и т. д.

Существуют различные методики приготовления КБ с применением различных объемлющих сред: желатин, агар, тромбин, набор для приготовления блоков из клеточного материала CytoBlock Kit фирмы Thermo Shandon, HistoGel, крахмал и т. д. Используются различные фиксаторы (метанол, формалин, этиловый спирт и др.) с целью предотвращения распада клеток и разрушения структуры ткани под действием собственных ферментов клеток, стабилизации макромолекул за счет их химического сшивания. У различных фиксаторов имеются преимущества и ограничения. Из КБ готовятся криостатные срезы и парафиновые блоки (парафин, целлоидин, пластические среды и смолы).

На КБ применяются различные методы исследования: окрашивание (гематоксилин-эозин), цитохимические методы исследования (ШИК-реакция для определения гликогена, пероксидаза, липиды, альциановый синий и т. д.), ИЦХ-методы, молекулярно-генетические методы (FISH, CISH, полимеразная цепная реакция). Например, на материале, полученном с шейки матки с использованием набора для жидкостной цитологии, сначала проводится тест Папаниколау, при необходимости тест на вирус папилломы человека (ВПЧ), далее ИЦХ-исследование для оценки диагностической ценности p16 (INK4a) и Ki-67 для выявления предраковых поражений шейки матки, можно провести гибридизацию *in situ* с выявлением ДНК ВПЧ и т. д.; оставшийся материал можно архи-

Для корреспонденции: Борисова Олеся Владимировна, borisova07@bk.ru

For correspondence: Borisova O.V., borisova07@bk.ru

вировать приготовлением КБ с последующим повторением при необходимости вышеперечисленных методик или провести все методики сразу на материале КБ.

ИЦХ-исследование можно стандартизовать с иммуногистохимическим, так как клеточный материал обрабатывается таким же образом, что и образцы ткани для гистологии (за рубежом ИЦХ-реакция ставится практически всегда на материале КБ и называется иммуногистохимической). Метод дает возможность получить многочисленные срезы из одного КБ для постановки ИЦХ-реакции с различными антителами.

В настоящее время в США широко используется автоматизированная система для приготовления КБ Cellient (Hologic, США), построенная на технологии ThinPrep®, что увеличивает насыщенность клетками даже от небольших/мизерных образцов, позволяет получить высококачественные КБ [1–3]. Это полностью автоматизированная система с минимальной зависимостью от оператора. В нашей стране она пока не используется.

Минимально инвазивные методы диагностики (тонкоигольная аспирационная биопсия) все чаще используются для получения образцов для морфологического диагноза, определения факторов прогноза. В эпоху персонализированной медицины полезность цитологических образцов для анализа молекулярно-генетических изменений так же эффективна, как и анализ гистологических образцов. Большое количество последних исследований посвящено использованию цитологического материала для приготовления КБ и молекулярно-генетических исследований на них [4, 5].

В недавнем прошлом была создана новая морфологическая, иммуногистохимическая и молекулярно-генетическая классификация рака легкого, в том числе для цитологических образцов, предложены алгоритмы и рекомендации по стандартизации, и несколькими организациями рекомендуется использовать КБ в качестве предпочтительного метода для молекулярного тестирования [6–10].

Таким образом, на современном этапе развития онкоцитологии КБ является одним из основных инструментов для исследования клеточного материала.

Цель исследования – сравнить рутинные цитологические препараты с препаратами КБ, приготовленными с использованием различных методик, и провести ИЦХ-исследование на КБ.

Материалы и методы. Приготовлено 30 КБ из серозных экссудатов ($n = 20$) и соскобов с опухоли молочной железы ($n = 10$) методами с применением желатина, AgarCyto и набора Shandon Cytoblock. ИЦХ-исследование проводили на цитологических препаратах с использованием цитоцентрифуги Cytospin4 фирмы Thermo Shandon (Великобритания, США) и КБ, приготовленных по методикам AgarCyto и с применением набора Shandon Cytoblock. Использовали систему детекции EnVision™ FLEX Systems и моноклональные антитела Her-Ep4, цитокератины 7, 20, раковый эмбриональный антиген (РЭА), CA125, TTF1, WT1, cdx2, рецепторы эстрогенов (РЭ), рецепторы прогестерона (РП), Her-2/neu и Ki-67 компании DAKO. Контролем являлось гистологическое и иммуногистохимическое исследование.

Результаты и обсуждение. Сравнивали диагностическую эффективность метода КБ и обычного цитологического мазка. Цитологические препараты отличаются тем, что клеточные признаки (полиморфизм, структура ядра и цитоплазмы, нуклеолы) выражены лучше, частично сохраняется структура комплексов. Это является одновременно и преимуществом и недостатком цитологического метода, так как гипердиагностика при пролиферативных процессах и реактивных изменениях выше, чем при исследовании гистологических препаратов. При приготовлении КБ клеточные признаки атипии выражены менее резко, что затрудняет цитологическую оценку характера процесса, однако структурные признаки опухоли сохраняются лучше, что позволяет более уверенно высказываться о ее гистологической форме, особенно при низкодифференцированных опухолях – аденокарциноме и плоскоклеточном раке. В зави-

симости от способа приготовления КБ и используемых фиксаторов может изменяться морфология клеточных элементов. КБ, приготовленные с применением желатина, получают более клеточными, клеточные элементы максимально сходны с цитологическими препаратами, хорошо сохраняется структура комплексов. КБ, приготовленные по методике AgarCyto, характеризуются более мелкими размерами клеток, клетки оказываются как бы сдавленными в агаре (рис. 1, см. вклейку). В целом материал, приготовленный методом КБ, занимает промежуточное положение между цитологическим и гистологическим препаратами, что затрудняет оценку как цитологу из-за невыраженности клеточных признаков, так и гистологу вследствие отсутствия архитектуры тканей, поэтому для оценки материала КБ необходимо дополнительное обучение.

От методики приготовления КБ и используемых фиксаторов зависит технология дальнейших ИЦХ- и молекулярно-генетических исследований. Например, необходимо учитывать, что если КБ готовился с использованием желатина, то его невозможно удалить из срезов при фиксации в формалине, поэтому ИЦХ-исследование провести невозможно. Желатиновые срезы, не обработанные в формалине, режут на замораживающем микротоме, из полученных срезов удаляют желатин, помещая на 30 мин в 10% раствор гидроксида калия при 37°C, затем их промывают и проводят ИЦХ-исследование.

В нашей работе ИЦХ-исследование проводили на цитологических препаратах с использованием цитоцентрифуги Cytospin4 и на КБ, приготовленных по методикам AgarCyto и с применением набора Shandon Cytoblock.

При исследовании экссудатов из серозных полостей в 20 наблюдениях определяли ИЦХ-профиль с целью установления локализации первичной опухоли. Во всех случаях ИЦХ-профиль, определяемый на цитологических препаратах, соответствовал ИЦХ-профилю препаратов КБ, приготовленных различными методиками. Ядерные и цитоплазматические реакции с антителами к цитокератинам 7 и 20, РЭА, CA125, TTF1, WT1, cdx2, РЭ, РП были сопоставимы по интенсивности и характеру окрашивания, что позволило предположить первичный очаг поражения, подтвержденный дальнейшим клиническим обследованием пациентов и гистологическим исследованием (рис. 2, см. вклейку). В отдельных наблюдениях при определении экспрессии эпителиального маркера Her-EP4 обнаружено, что ИЦХ-реакция на материале КБ отсутствовала, тогда как в жидкостных цитологических препаратах экспрессия маркера выражена четко. Эпителиальный антиген Her-EP4 является мембранным гликопротеином и, по-видимому, высокочувствителен к воздействию агрессивных реактивов при гистологической проводке, поэтому его экспрессию лучше исследовать на цитологических препаратах.

С помощью ИЦХ-исследования в 10 наблюдениях определяли гормональный, Her2/neu-статус и пролиферативную активность при раке молочной железы. В целом при исследовании экспрессии РЭ, РП и белка Ki-67 показана конкордантность иммуноокрашивания в цитологических образцах, КБ и на гистологических препаратах. Наибольшие сложности в оценке возникли при исследовании экспрессии онкобелка Her2/neu. Рецептор Her2/neu также является мембранным белком, экспрессия его в цитологических препаратах несколько выше, чем на материале КБ и в гистологических препаратах (рис. 3, см. вклейку). Данная проблема требует дальнейшего углубленного исследования и сопоставления результатов с данными флуоресцентной гибридизации *in situ*.

Выводы. Использование КБ на современном этапе необходимо с целью обеспечения сохранности клеточных элементов для последующих ИЦХ- и молекулярно-генетических исследований.

Основные преимущества КБ:

– возможность для цитолога изучать дополнительные морфологические признаки, в первую очередь структурные признаки опухоли;

– архивирование цитологического материала на неограниченное время с последующим ИЦХ- и молекулярно-генетическим исследованием;

– возможность получить серийные срезы в целях проведения ИЦХ- и молекулярно-генетического исследования;

– возможность повторить ИГХ и молекулярно-генетическое исследование тех же образцов. Например, в случае прогрессирования опухоли дополнительные исследования могут быть проведены на материале исходного КБ, если повторная биопсия не представляется возможной;

– наличие установленных и проверенных протоколов для ИГХ- и молекулярно-генетического исследования;

– простота, безопасность, экономическая эффективность техники, воспроизводимость даже в условиях ограниченных ресурсов.

Таким образом, метод КБ в настоящее время является чрезвычайно актуальным. Это надежный дополнительный метод к рутинным цитологическому и гистологическому исследованиям для удовлетворения растущих потребностей диагностики, прогнозирования и назначения таргетной терапии [11–27].

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wagner D.G., Russell D.K., Benson J.M., Schneider A.E., Hoda R.S., Bonfiglio T.A. Cellient™ automated cell block versus traditional cell block preparation: a comparison of morphologic features and immunohistochemical staining. *Diagn. Cytopathol.* 2011; 39 (10): 730–6.
2. Predeville S., Brosnan T., Browne T.J., McCarthy J. Automated Cellient™ cytoblocks: better, stronger, faster? *Diagn. Cytopathol.* 2011; 39 (10): 730–6.
3. Wagner D.G., Russell D.K., Benson J.M., Schneider A.E., Hoda R.S., Bonfiglio T.A. Cellient™ automated cell block versus traditional cell block preparation: a comparison of morphologic features and immunohistochemical staining. *Cytopathology.* 2014; 18.
4. Bhatia P., Dey P., Uppal R., Shifa R., Srinivasan R., Nijhawan R. Cell blocks from scraping of cytology smear: comparison with conventional cell block. *Acta Cytol.* 2008; 52 (3): 329–33.
5. Briffod M., Hacène K., Le Doussal V. Immunohistochemistry on cell blocks from fine-needle cytopunctures of primary breast carcinomas and lymph node metastases. *Mod. Pathol.* 2000; 13 (8): 841–50.
6. Crapanzano J.P., Heymann J.J., Monaco S., Nassar A., Saqi A. The state of cell block variation and satisfaction in the era of molecular diagnostics and personalized medicine. *Cytojournal.* 2014; 11: 7.
7. Kossakowski C.A., Morresi-Hauf A., Schnabel P.A., Eberhardt R., Herth F.J., Warth A. Preparation of cell blocks for lung cancer diagnosis and prediction: protocol and experience of a high-volume center. *Respiration.* 2014; 87 (5):432–8.
8. Loukeris K., Vazquez M.F., Sica G., Wagner P., Yankelevitz D.F., Henschke C.I., Cham M.D., Saqi A. Cytological cell blocks: Predictors of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma subtypes. *Diagn. Cytopathol.* 2012; 40 (5): 380–7.
9. Yung R.C., Otell S., Illei P., Clark D.P., Feller-Kopman D., Yarmus L., Askin F., Gabrielson E., Li Q.K. Improvement of cellularity on cell block preparations using the so-called tissue coagulum clot method during endobronchial ultrasound-guided transbronchial fine-needle aspiration. *Cancer Cytopathol.* 2012; 120 (3): 185–95.
10. Kim D.H., Kwon M.S. Role of fine needle aspiration cytology, cell block preparation and CD63, P63 and CD56 immunostaining in classifying the specific tumor type of the lung. *Acta Cytol.* 2010; 54 (1): 55–9.
11. Ghosh I., Dey S.K., Das A., Bhattacharjee D., Gangopadhyay S. Cell block cytology in pleural effusion. *J. Indian. Med. Assoc.* 2012; 110 (6): 390–2, 396.
12. Jain D., Mathur S.R., Iyer V.K. Cell blocks in cytopathology: a review of preparative methods, utility in diagnosis and role in ancillary studies. *Cytopathology.* 2014; 11.
13. Jing X., Li Q.K., Bedrossian U., Michael C.W. Morphologic and immunocytochemical performances of effusion cell blocks prepared using 3 different methods. *Am. J. Clin. Pathol.* 2013; 139 (2): 177–82.
14. He Q.L., Zhu Y.Z., Zheng G.J., Shi L.C., Hu S.W., Li C.T. A new convenient technique for making cell blocks. *Cell Tissue Res.* 2012; 350 (2): 395–400.
15. Wen C.H., Tsao S.C., Su Y.C., Wu C.C., Chai C.Y. Utility of the capsule-based technique for cell block preparation – in body fluids and Liqui-PREP™ specimens. *Acta Cytol.* 2011; 55 (5): 460–6.
16. Bao H., Wu Y. p16INK4A and Ki-67 immunostaining on cell blocks from residual ThinPrep material is helpful in identifying significant preneoplastic cervical lesions. *Pathol. Res. Pract.* 2011; 207 (4): 216–9.
17. Dharan M. Utility of cell block preparation in endometrial aspiration cytology: a report of 4 cases. *Acta Cytol.* 2010; 54 (5, Suppl.): 893–7.
18. Yu L., Wang L., Zhong J., Chen S. Diagnostic value of p16INK4A, Ki-67, and human papillomavirus L1 capsid protein immunohistochemical staining on cell blocks from residual liquid-based gynecologic cytology specimens. *Cancer Cytopathol.* 2010; 118 (1): 47–55.
19. Kaneko C., Kobayashi T.K., Hasegawa K., Udagawa Y., Iwai M. A cell-block preparation using glucomannan extracted from *Amorphophallus konjac*. *Diagn. Cytopathol.* 2010; 38 (9): 652–6.
20. Engohan-Aloghe C., Hottat N., Noël J.C. Accuracy of lymph nodes cell block preparation according to ultrasound features in preoperative staging of breast cancer. *Diagn. Cytopathol.* 2010; 38 (1): 5–8.
21. Varsegi G.M., Shidham V. Cell block preparation from cytology specimen with predominance of individually scattered cells. *J. Vis. Exp.* 2009; (29).
22. Thapar M., Mishra R.K., Sharma A., Goyal V., Goyal V. Critical analysis of cell block versus smear examination in effusions. *J. Cytol.* 2009; 26 (2):60–4.
23. Jalal R., Aftab K., Hasan S.H., Pervez S. Diagnostic value of clot examination for malignant cells in serous effusions. *Cytopathology.* 2009; 20 (4): 231–4.
24. Saleh H.A., Hammoud J., Zakaria R., Khan A.Z. Comparison of Thin-Prep and cell block preparation for the evaluation of Thyroid epithelial lesions on fine needle aspiration biopsy. *Diagn. Cytopathol.* 2007; 35 (10): 640–3.
25. Nigro K., Tynski Z., Wasman J., Abdul-Karim F., Wang N. Comparison of cell block preparation methods for nongynecologic ThinPrep specimens. *Cytojournal.* 2008; 5: 3.
26. Weihmann J., Weichert C., Petersen I., Gajda M. Evaluation of a cell block method in cytological diagnostics. *Arch. Soc. Esp. Ophthalmol.* 2001; 76 (12): 723–30.
27. Martín F., Pastor J.C., Saornil M.A., Aragón J., Rodríguez De La Rúa E., Bailez C. et al. Comparison of different techniques for cytologic analysis of vitreous specimens]. *Pathologie.* 2012; 33 (6): 553–9.

Поступила 16.03.15
Received 16.03.15

К ст. Сниховской К.В. и соавт.

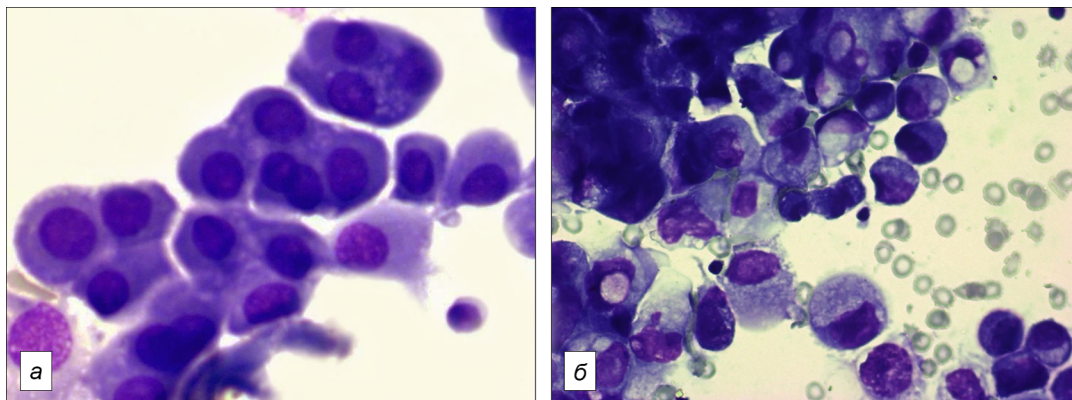


Рис. 4. Плевральный выпот: *а* – клетки пролиферирующего мезотелия; *б* – клетки АЖ. Окрашивание по методу Мая–Грюнвальда–Гимзы. $\times 400$.

К ст. Волченко Н. Н. и соавт.

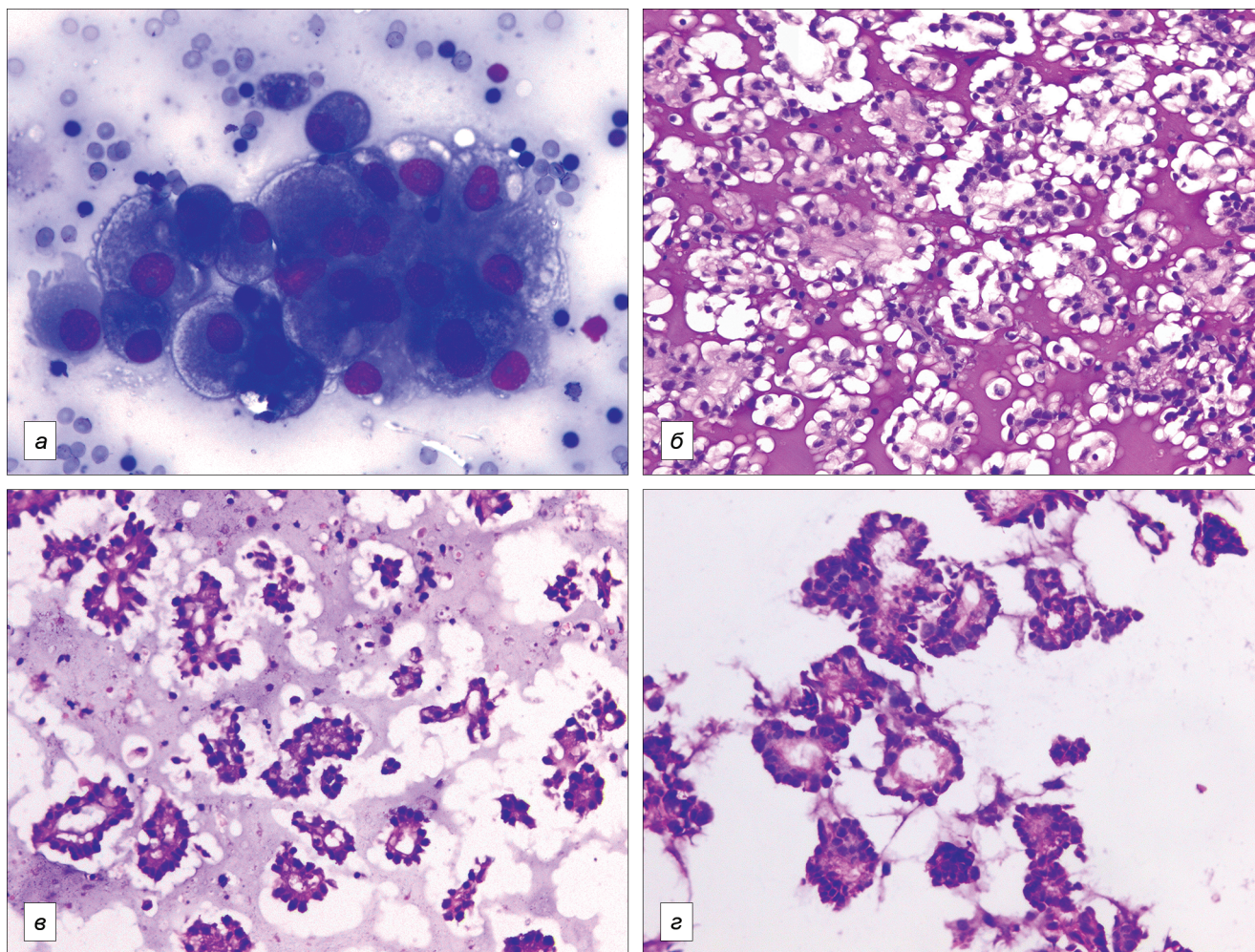


Рис. 1. Плевральная жидкость. Диссеминация аденокарциномы легкого: *а* – цитологический препарат (окраска по Пап-пенгейму, $\times 600$); *б* – КБ, приготовленный с использованием желатина; *в* – КБ AgarCyto; *г* – КБ с применением набора Shandon Cytoblock (окраска гематоксилином-эозином, $\times 400$).

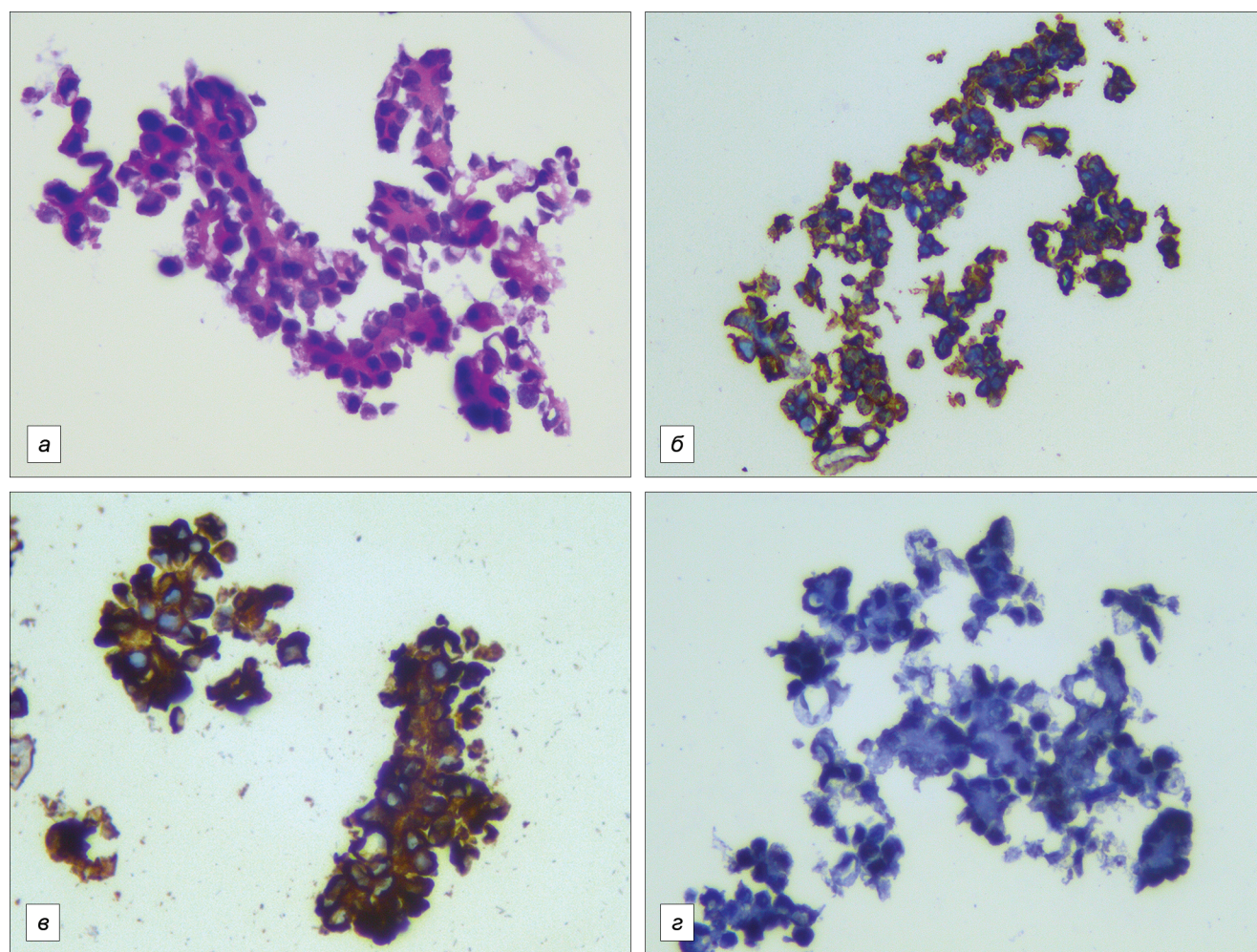


Рис. 2. Асцитическая жидкость. Диссеминация серозного рака яичников. КБ AgarCyto: *а* – окраска гематоксилином-эозином; *б* – ИЦХ-экспрессия цитокератина 7; *в* – экспрессия СА125; *г* – экспрессия WT1, отсутствие экспрессии цитокератина 20. $\times 400$.

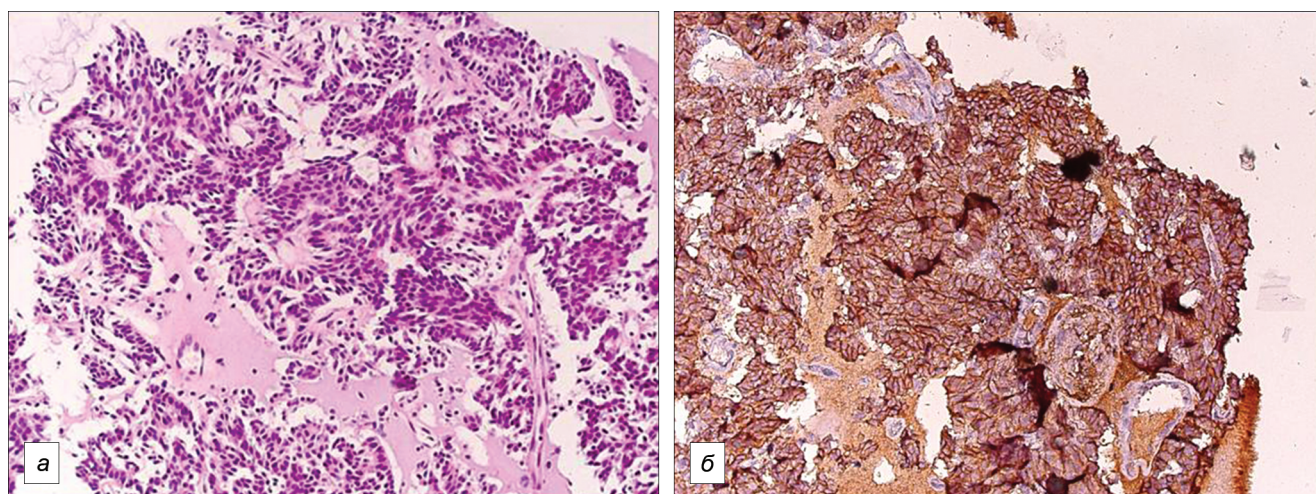


Рис. 3. Умереннодифференцированный рак молочной железы без признаков специфичности. Соскоб с опухоли. КБ с применением набора Shandon Cytoblock: *а* – окраска гематоксилином-эозином; *б* – ИЦХ-экспрессия онкопротеина Her2/neu 3+.