

- При наличии в яичнике метастаза карциномы из других органов, аналогичных клеток рака в материале из полости матки не выявляется.
- При цитологическом исследовании клеточного материала из полости матки у 12 пациенток с доброкачественной патологией яичников клеток АК в полученном материале выявлено не было! Однако ИЦХ исследование в 2 наблюдениях выявило очаговую слабую и умеренную экспрессию белка p53 в отдельных клетках эпителия эндометрия при серозной и муцинозной цистаденомах.
- Большую диагностическую ценность имеет маркер p53, поскольку, он экспрессировался клетками карциномы яичников, обнаруженных в полости матки, в 100% наблюдений.
- Маркер серозных карцином яичников и мезотелиомы WT1 экспрессировался 67% наблюдений в клетках рака яичников, обнаруженных в полости матки. Данный маркер может быть диагностически значимым для выявления и диагностики раков яичников в смывах и аспиратах из полости матки.

Современный подход в цитоморфологической диагностике диссеминированного рака желудка

Е. С. Федосеева¹, М. В. Савостикова¹, М. Н. Нариманов¹

Место работы: ¹ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России

e-mail: savostikovamv@yandex.ru

Распространенность рака желудка диктует необходимость применения современных технологий в морфологическом исследовании.

Цель. оценить возможности современных методов цитологии в диагностике диссеминированного рака желудка.

Материалы и методы. Проведено 33 цитологических и 99 ИЦХ исследований на материале отпечатков с гастро-биоптатов, полученных при эндоскопическом исследовании у пациентов с клиническим диагнозом «рак желудка». Также проведено 55 цитологических и 165 ИЦХ исследований на материале выпотных жидкостей и смывов с брюшной полости у пациентов с распространенным опухолевым процессом. ИЦХ анализ проводился на препаратах, приготовленных с помощью Cytospin-технологии, исследовались реакции с МКАТ к p53, Ki67, HER2/neu, Ber-EP4. ИЦХ исследования проводились на иммуногистостейнере Вентана (BenchMark ULTRA). Также на материале выпотных жидкостей и смывов проводилось флюоресцентное ИЦХ исследование (n=55) с МКАТ к Ber-EP, конъюгированном с FITC (прямой метод), и на биочипах с флюорохромом Cy3. Все ИЦХ исследования были сопоставлены с ИГХ реакциями на операционном материале после гастрэктомии и на клеточных блоках, приготовленных из материала выпотных жидкостей и смывов.

Результаты. ИЦХ анализ показал выраженную и умеренную экспрессию белка p53 в 60% наблюдений, выраженную и умеренную экспрессию Ki67 в 75% наблюдений, выраженная экспрессия Her2/neu (3+) отмечалась в 32% исследований. При исследовании выпотных жидкостей и смывов (n=55) уверенное цитологическое заключение о наличии/отсутствии клеток опухоли было дано в 94,5% наблюдений, применение ФИЦХ позволило избежать гипердиагностики в 1 случае и гиподиагностики — в 2.

Выводы. Чувствительность цитологического метода в первичной диагностике рака желудка составила 93,8%. При неуверенном цитологическом заключении и даже при уверенности об отсутствии клеток опухоли в выпотных

жидкостях рекомендуется проводить ИЦХ исследование с BerEP4, либо ФИЦХ прямым методом при необходимости срочного исследования. Технология Cell-block может с успехом применяться для проспективного и ретроспективного ИГХ анализа — в сравнении с традиционной ИЦХ реакцией ярче, четче, нет фонового окрашивания, чаще сохраняется структурное расположение клеток опухоли.

Новые методы в цитологической диагностике уринарной патологии

М. В. Савостикова¹, А. Г. Кудайбергенова¹, Е. С. Федосеева¹, А. В. Хачатурян¹

Место работы: ¹ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, г. Москва

e-mail: savostikovamv@yandex.ru

Наименее благоприятными с точки зрения прогноза являются НГУС, которые относятся к генетически нестабильным опухолям, развиваются по диспластическому пути, характеризуются полисомией 3, 7, 17 хромосом и делецией локуса 9p21. Этот патогенетический путь ассоциирован с большим количеством мутаций — наиболее значимыми являются мутации, связанные с инактивацией гена TP53, которая наблюдается приблизительно в 60% случаев. Поскольку полисомия 17 хромосомы вызывает амплификацию гена, кодирующего Her2/neu, появляется возможность оценить его гиперэкспрессию иммуноцитохимически.

Материалы и методы. Исследовано: смывов с мочевого пузыря — 25, материала свободно выпущенной мочи — 15 у 30 пациентов с уротелиальной карциномой (УК) в анамнезе. Для приготовления препаратов использовали метод двойного центрифугирования. Все цитологические заключения формировались в соответствии с Парижской системой интерпретации уринарной цитологии 2016 года. Проведено 80 ИЦХ исследований (40 — p53 и 40 — HER2).

Результаты исследований. В 19 наблюдениях было дано заключение НГУС, при ИЦХ исследовании в 1 из 19 выявлена выраженная экспрессия Her2 в единичной мелкой группе клеток, в 4 из 19 отмечена слабая экспрессия p53 в 1—10% клеток. Гистологически в дальнейшем была выявлена уротелиальная папиллома в 2 наблюдениях, во всех остальных случаях опухолевой патологии не выявлено. В группу цитологических заключений АUC попало 2 наблюдения: ни в одном из них экспрессия HER2 не выявлена, в 1 отмечена слабая экспрессия p53 в 5% клеток (гистологически в одном случае была диагностирована LGUC, в другом — НГУС). В категории «атипические уротелиальные клетки, нельзя исключить уротелиальную карциному высокой степени злокачественности (AUC-H)» — 2 наблюдения: в обоих случаях отмечалась выраженная экспрессия HER2 и умеренная экспрессия p53 в 20% клеток (гистологически в их случаях — НГУС). Категория LGUC была дана в 9 случаях: в 5 из 9 выявлена умеренная и выраженная экспрессия HER2 и в 4 — умеренная p53 (от 5 до 20%) в клетках рака. Заключение о НГУС было дано в 8 наблюдениях: во всех случаях определена выраженная и умеренная экспрессия HER2 и p53 (в 10—90% клеток рака).

Выводы. Цитологический метод, несмотря на сравнительно невысокую чувствительность, остается единственным малоинвазивным морфологическим методом. Перспективным является иммуноцитохимический метод: выраженная экспрессия p53 и Her2/neu в атипичных уротелиальных клетках значительно повышает вероятность обнаружения НГУС.

Изучение экспрессии матричных металлопротеиназ (ММП-2 и ММП-9) в плоскоклеточном раке гортани

Р. Н. Кулагин³, С. В. Петров^{1,2}

Место работы: ¹ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрав России, Казань, Россия; ²Приволжский филиал РОНЦ им. Н. Н. Блохина, Казань, Россия; ³ГМУЗ «ГКБ № 7», Казань, Россия.

e-mail: rnkulagin@yandex.ru

Цель. Исследовать экспрессию матричных металлопротеиназ (ММП-2 и ММП-9) в плоскоклеточном раке гортани и изучить ее связь с некоторыми клинико-морфологическими показателями и прогнозом заболевания.

Материалы и методы. Использовались парафиновые блоки архивного материала, полученного от 201-го больного за период с 2000 по 2009 г., с дальнейшим изготовлением восьми ТМА-мультиблоков (технология tissue microarray) и оцифровкой микропрепаратов на сканере Mirax MIDI (Carl Zeiss). Для иммуногистохимического исследования использовалось антитело против ММП-2 (MMP-2, 72kDa Collagenase IV, разведение 1:50, Clone VB3, LabVision Corp.) и MMP-9 (MMP-9, 92kDa Collagenase IV, разведение 1:35, LabVision Corp.).

Для визуализации применяли систему детекции UltraVision с DAB Plus хромогеном (LabVision Corp.).

Результаты. Распределение по клиническим стадиям следующее: I-я — 7 случаев, II — 56, III — 95, IV — 43. Больных с опухолями, имеющими степень дифференцировки G1, было 60, G2-54, G3-83. Метастазы в регионарные лимфатические узлы отмечены в 45 случаях (22,4%). Цитоплазматическая экспрессия ММП-2 обнаружена в 47,2%, а ММП-9 — в 35% (в 95-ти и 70-ти случаях, соответственно). Пятилетняя выживаемость в исследуемой группе составила 46,7% (94 случая), а рецидивы обнаружены в 7,9% (16 случаев). В низкодифференцированных опухолях (G3) наблюдается достоверное снижение экспрессии исследуемых маркеров по сравнению с высокодифференцированными (G1) ($p < 0,002$).

Нами обнаружено, что в группе больных (III IV) клинических стадий статистически увеличивается экспрессия ММП-2 по сравнению с начальными клиническими стадиями (I—II) ($p < 0,001$). При увеличении размера опухоли (T-стадия) наблюдалось увеличение экспрессии маркера без статистических различий, однако, у пациентов групп T3 T4 экспрессия ММП-2 статистически выше, чем у больных T1 T2 ($p < 0,05$).

У больных с метастазами и рецидивами экспрессия ММП-2 была выше, а ММП-9 — ниже, но без статистических различий ($p > 0,05$). Мы не выявили связи между 5-летней выживаемостью, локализацией опухоли в гортани и возрастом больных и экспрессией изучаемых маркеров.

Заключение. Таким образом, при прогрессии плоскоклеточного рака гортани наблюдается увеличение уровня экспрессии ММП-2, а уровень ММП-9 — снижается.

Взаимодействие клеток асцитной карциномы Эрлиха с анионными липосомами

О. М. Алексеева¹, Ю. А. Ким²

Место работы: ¹Институт биохимической физики им. Н. М. Эммануэля РАН, Москва, Россия; ²Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская обл., Россия

e-mail: oigavek@yandex.ru

Исследовали взаимодействие клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) с анионными липосомами как вероятными транспортерами лекарственных веществ в клетки карциномы.

Цель. Подбор условий для слияния отрицательно заряженных липосом с отрицательно заряженной мембраной клеток АКЭ и определение вида распределения липосомальных фосфолипидов на мембране и внутри клетки.

Материалы и методы. Флуорофоры N-NBD-PE (N- (7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол-4-ил) фосфатидилэтаноламин) и N-Rh-PE (N- (лиссамин родамин В сульфонил) фосфатидилэтаноламин) «Avanti»; NaCl, HEPES «Sigma»; ПЭГ-300 «The British Drug Houses Ltd». Клетки АКЭ получали из инъекцированных АКЭ мышей через 7—8 дней. Отмывали двукратным осаждением в среде Хенкса с 20 мМ HEPES (pH 7,4).

Большие однослойные липосомы 1000 Å, сформированные из пальмитоилолеилфосфатидилхолина, пальмитоилолеилфосфатидилсерина и холестерина (2:2:1), получали методом упаривания обратной фазы в среде 100 мМ NaCl и 10 мМ HEPES (pH 7,4). Эфирно-водно липидную фазу интенсивным встряхиванием на вибрационном смесителе 30гц 30 мин до образования однородной эмульсии. Затем упаривали воду под вакуумом, освобождали от эфира, и пропускали через поликарбонатную мембрану-фильтр с порами диаметром 0,1—0,2 мкм для экстракции.

Флуоресцентные фосфолипидные метки N-NBD-PE (N- (7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол-4-ил) фосфатидилэтаноламин) и N-Rh-PE (N- (лиссамин родамин В сульфонил) фосфатидилэтаноламин) вносили тонкой струей шприцом «Hamilton» в первоначальную смесь в концентрации 1 моль%. Липидные дисперсии пропускали через колонки с сефадексами G 15, G 25 и сефарозой В 2. Конечная концентрация липидов в дисперсиях 10 мМ. Флуоресцентномеченые липосомы содержали по 400—500 молекул флуорофора. Хранились при 50 С.

Флуоресценцию и кинетики слияния регистрировали на спектрофлуориметре «Perkin-Elmer — MPF 44B» при 370 С и постоянном перемешивании. Длины волн возбуждения и излучения соответственно для N-NBD-флуорофора 470 нм и 530 нм и для родамин В-флуорофора 470 нм и 577 нм. Фузию и эндоцитоз липосом отслеживали с помощью конфокального лазерного микроскопа «LSM 510 NLO» (Carl Zeiss) с аргоновым и гелий-неоновым лазерами с длинами волн возбуждения 488 нм и 543 нм соответственно. Регистрировали в трех каналах

Результаты. Было показано, что в определенных условиях происходит спонтанное слияние мембран липосом с мембранами клеток АКЭ. Полиэтиленгликоль ПЭГ 300 (15%) действует, как фузоген, а низкое значение pH среды инкубации (5,65) снижает заряженность липосом и клеток, что инициирует слияние мембран липосом из анионных липидов с мембранами клеток асцитной карциномы Эрлиха.

Для исследования слияния липосом с клетками АКЭ применили флуоресцентный метод регистрации кинетики слияния. С помощью метода резонансного переноса энергии между меченым (N-NBD) фосфолипидом-донором и меченым (родамин В) фосфолипидом-акцептором обнаружили, что флуоресценция донора не тушится в липосомах в присутствии клеток АКЭ, т.е. перенос энергии снижается. Это происходит из-за встраивания меченных фосфолипидов в мембрану клеток и, соответственно, из-за разбавления концентрации флуорофоров, ведущее к увеличению дистанции между донором и акцептором, и затруднению переноса энергии. На этом этапе были подобраны оптимальные условия слияния липосом с клетками pH 5,65 и концентрация ПЭГ 300 10%. Клетки перед опытом хранились при 50С в анаэробных условиях, в результате этого получили метаболическое истощение и увеличили проницаемость мембран.