

ТЕСТ-СИСТЕМА «БИОЧИП-SER» ДЛЯ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНА Ep-CAM НА МАТЕРИАЛЕ ВЫПОТНЫХ ЖИДКОСТЕЙ И СМЫВОВ

DOI: 10.17691/stm2018.10.4.04

УДК 616–003.274–07

Поступила 6.06.2018 г.

С.В. Зиновьев, специалист научной части¹; директор²;И.Г. Терентьев, д.м.н., зав. кафедрой онкологии¹;О.В. Уткин, зав. лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии³; технический директор²;Е.Ю. Фурминская, научный сотрудник лаборатории клинической цитологии⁴;Е.С. Федосеева, младший научный сотрудник лаборатории клинической цитологии⁴;М.В. Савостикова, к.м.н., зав. лабораторией клинической цитологии⁴¹Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина, 10/1, Н. Новгород, 603005;²НПП «Биочип», ул. Нобеля, 7, помещение 14, Москва, Сколково, 143026;³Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии

им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, ул. Малая Ямская, 71, Н. Новгород, 603950;

⁴Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина, Каширское шоссе, 24, Москва, 115478

Цель исследования — оценить возможности тест-системы «Биочип-SER» для анализа экспрессии антигена Ep-CAM методом флюоресцентной иммуноцитохимии.

Материалы и методы. Проведено 64 цитологических, 64 стандартных иммуноцитохимических (СИЦХ) и 64 флюоресцентных иммуноцитохимических (ФИЦХ) исследования с использованием тест-системы «Биочип-SER» 59 пациентам (45 выпотов и 19 смывов с органов брюшной полости). Работу выполняли в 4 этапа: 1-й этап — цитологическое исследование; 2-й этап — СИЦХ; 3-й этап — ФИЦХ на тест-системе «Биочип-SER»; 4-й этап — контрольное цитологическое исследование с использованием тест-системы «Биочип-SER». СИЦХ проводили с моноклональным антителом (МКАТ) к эпителиальному антигену Ep-CAM, ФИЦХ — с МКАТ к эпителиальному антигену Ep-CAM, конъюгированному с флюорохромом Alexa Flour 488.

Результаты. ФИЦХ-исследование, выполненное с использованием тест-системы «Биочип-SER», показало 100% диагностическую чувствительность, специфичность теста составила 89%.

Заключение. ФИЦХ-исследование, проведенное с МКАТ к антигену Ep-CAM, конъюгированному с Alexa Flour 488, на тест-системе «Биочип-SER» является надежным методом диагностики опухолевого процесса в выпотных жидкостях, что позволяет рекомендовать его для широкого применения как в специализированных учреждениях, так и в первичном диагностическом звене.

Ключевые слова: метастатический выпот; тест-система «Биочип-SER»; иммуноцитохимическое исследование; флюоресцентное иммуноцитохимическое исследование; антиген Ep-CAM; Ber-EP4; Alexa Flour 488.

Как цитировать: Zinoviev S.V., Terentiev I.G., Utkin O.V., Furminskaya E.Yu., Fedoseeva E.S., Savostikova M.V. Biochip-SER test system for fluorescent immunocytochemical analysis of Ep-CAM antigen expression in effusions and washes. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2018; 10(4): 34–41, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.4.04>

English

Biochip-SER Test System for Fluorescent Immunocytochemical Analysis of Ep-CAM Antigen Expression in Effusions and Washes

S.V. Zinoviev, Science Department Specialist¹; Director²;I.G. Terentiev, MD, DSc, Head of Oncology Department¹;O.V. Utkin, Head of the Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology³; Technical Director²;E.Yu. Furminskaya, Researcher, Laboratory of Clinical Cytology⁴;

Для контактов: Савостикова Марина Владимировна, e-mail: savostikovamv@yandex.ru

E.S. Fedoseeva, Junior Researcher, Laboratory of Clinical Cytology⁴;
M.V. Savostikova, MD, PhD, Head of the Laboratory of Clinical Cytology⁴

¹Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia;

²SPE Biochip, 7 Nobelya St., room 14, Moscow, Territory of the Innovation Center "Skolkovo", 143026, Russia;

³Blokhina Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod,
 Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор),
 71 Malaya Yamskaya St., Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation;

⁴N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of Russian Academy of Medical Science, 24 Kashirskoe Shosse,
 Moscow, 115478, Russia

The aim of the study was to evaluate the Biochip-SER test system for its ability to measure the expression of Ep-CAM antigen by fluorescent immunocytochemistry.

Materials and Methods. We conducted 64 cytological, 64 standard immunocytochemical (SICC) and 64 fluorescent immunocytochemical (FICC) tests using the Biochip-SER test system and samples from 59 patients (45 effusions and 19 peritoneal washings). The study was performed in 4 stages: cytological examination, SICC, FICC using the Biochip-SER system, and control cytological study by the Biochip-SER system. The SICC was performed using the monoclonal antibody (MAB) to the epithelial antigen Ep-CAM; FICC was performed using the MAB to the epithelial antigen Ep-CAM conjugated to the Alexa Flour 488 fluorochrome.

Results. FICC test performed using the Biochip-SER test system, showed 100% diagnostic sensitivity and 89% specificity.

Conclusion. FICC test carried out with MAB to the Ep-CAM antigen conjugated with Alexa Flour 488 using the Biochip-SER system is a reliable method for diagnosing tumors by testing effusion fluids, which allows us to recommend this system for practical use in specialized institutions and primary points of care.

Key words: metastatic effusion; Biochip-SER test system; immunocytochemical study; fluorescent immunocytochemical study; Ep-CAM antigen; Ber-EP4; Alexa Flour 488.

Введение

Обнаружение раковых клеток в экссудатах на ранних этапах метастазирования опухоли является очень важной задачей, поскольку установление факта диссеминации опухолевого процесса до проявления клинических признаков заболевания позволяет выбрать оптимальную тактику лечения. Как известно, серозные полости покрыты слоем эпителиальных клеток мезенхимального происхождения (мезотелием). При различных патологических процессах (неоплазии, инфекционных и системных заболеваниях) мезотелий становится полиморфным и даже атипичным, что связано с его реактивной пролиферацией [1]. Вариабельность морфологии клеток реактивного мезотелия вызывает значительные затруднения при дифференциальной диагностике со злокачественной мезотелиомой и метастазами карцином, что требует привлечения дополнительных аналитических методов.

У здорового человека в плевральной полости содержится около 10 мл, в перикардиальной — приблизительно 1–2 мл и в брюшной — до 50 мл серозной жидкости [2]. Считается, что объем, превышающий указанное количество жидкости в полостях, свидетельствует о наличии патологического процесса и является достаточным основанием для диагностической пункции.

Злокачественные заболевания довольно часто сопровождаются выпотом в плевральную и брюшную полости. У мужчин по частоте обнаружения опухолевых клеток в экссудатах первое место занимает рак легкого (49%), затем лейкозы и злокачественные лим-

фомы (21%), карциномы органов пищеварения (7%) и мочеполовой системы (6%). У женщин плевральные и перитонеальные экссудаты встречаются в 2 раза чаще, особенно при прогрессировании рака молочной железы (37–50%) и яичников (20%), реже — при злокачественных лимфомах (8%) и карциномах органов пищеварения (4%) [3].

Цитологическое исследование — единственный метод диагностики злокачественной природы экссудата, однако достоверность его вариабельна и составляет от 60 до 96% [2, 4, 5].

При оценке морфологии серозных выпотов наличие в препаратах полиморфных клеток с выраженной атипией ядер и клеточных скоплений в виде характерных структур (ацинарных, микрососочковых, шаровидных и т.д.) позволяет установить диагноз злокачественной опухоли без затруднений. Однако разнообразный клеточный состав экссудата — наличие клеток пролиферирующего мезотелия, лимфоидных и гистиоцитарно-макрофагальных элементов, лейкоцитов, а также опухолевых клеток, морфологически сходных с клетками мезотелия, — может являться причиной неуверенных заключений о характере выпота.

Затруднения в дифференциальной диагностике реактивно измененного мезотелия, мезотелиомы и метастатического рака в большинстве случаев можно преодолеть, используя дополнительные методы: иммуноцитохимическое исследование, цитогенетический метод, проточную цитофлуориметрию, электронную микроскопию и др. [6–8].

При проведении иммуноцитохимии для разрешения спорных диагностических ситуаций чаще всего

используются моноклональные антитела (МКАТ) к поверхностному эпителиальному антигену Ер-САМ (клон Вег-ЕР4). Ер-САМ — трансмембранный белок, состоящий из двух молекул гликопротеинов с молекулярной массой 34 и 39 кДа, локализуется на мембране и в цитоплазме нормальных эпителиальных клеток, клеток карциноидов и карцином различного генеза [9, 10]. Ер-САМ не экспрессируется в большинстве неэпителиальных опухолей, на мезотелиальных клетках, гепатоцитах и лимфоцитах. В сочетании с другими маркерами Ер-САМ может использоваться для подтверждения эпителиального происхождения опухоли в дифференциальной диагностике между аденокарциномой (АК) и мезотелиомой [11, 12].

Данные зарубежных коллег показывают высокую чувствительность, специфичность и положительную предсказательную ценность иммуноцитохимических исследований с использованием МКАТ к Ер-САМ в выявлении АК — 80, 94 [13] и 96% соответственно [14].

По данным отечественной литературы, применение Ер-САМ при исследовании материала выпотных жидкостей позволяет повысить чувствительность и специфичность цитологической диагностики АК до 96 и 99% соответственно [15].

Отмечены хорошие результаты использования Ер-САМ при дифференциальной диагностике АК и мезотелиомы: позитивная реакция отмечается в 100% аденогенных карцином легкого, в 100% плоскоклеточных раков, в 93% нелегочных карцином, в 67% уротелиальных карцином и в 84% АК без первично выявленного очага, метастазировавших в плевру. В то же время в клетках мезотелиомы Ер-САМ экспрессируется в 18–26% наблюдений [16, 17]. При этом следует отметить, что в мезотелиомах экспрессия Ер-САМ наблюдается фокусно, в части опухолевых клеток.

Одним из вариантов иммуноцитохимических исследований является флюоресцентная иммуноцитохимия (ФИЦХ), которая позволяет проводить интраоперационные исследования экссудатов, поскольку не требует больших временных затрат и обладает доказанной эффективностью. Так, в работе японских коллег [18] были сопоставлены результаты разных вариантов иммуноцитохимических исследований: стандартной (СИЦХ), стандартной и срочной интраоперационной ФИЦХ с использованием жидкостных технологий — на 64 образцах (35 смывов с органов брюшной полости и 29 асцитических выпотов), полученных от пациентов с различной неопухолевой патологией и злокачественными процессами. При СИЦХ и ФИЦХ из использован-

ных в работе маркеров (Вег-ЕР4, СЕА, ЕМА и МОС-31) клоны Вег-ЕР4 и МОС-31 показали наибольшую значимость в оценке характера выпота, поскольку продемонстрировали выраженную экспрессию в клетках АК и полное ее отсутствие в клетках реактивного мезотелия: в 92% случаев АК (12 из 13) клетки были Вег-ЕР4/МОС-31-позитивны.

По нашим собственным данным, применение СИЦХ и ФИЦХ с Ер-САМ (Вег-ЕР4) повышает чувствительность и специфичность цитологического метода при исследовании выпотов и смывов до 100% [5].

С учетом высокой чувствительности и специфичности МКАТ к Ер-САМ (клон Вег-ЕР4) этот маркер был выбран для идентификации клеток АК при СИЦХ и ФИЦХ.

С целью усовершенствования цитологического и иммуноцитохимического методов была разработана тест-система «Биочип-SER». Эта система является высокотехнологичным изделием медицинского назначения для проведения ФИЦХ [19]. Она состоит из двух основных частей: рабочей и функциональной (рис. 1). Рабочая часть представляет собой прозрачную подложку из стекла размерами 25,4×76,2 мм, толщиной 1 мм. Подложка с положительно заряженным покрытием разделена на 15 равных ячеек посредством решетки из пластика. В каждой ячейке содержится МКАТ к Ер-САМ (клон Вег-ЕР4), конъюгированному с флюорохромом Alexa Fluor 488, который возбуждается светом с длиной волны 468–509 нм и излучает свет с длиной волны 504–541 нм. Для сохранения антител во влажной среде в каждую ячейку добавлен реагент PBS (фосфатный буфер) в количестве 0,1 мкл, сверху на рабочую поверхность нанесена гидрофобная пленка, препятствующая их высыханию. В зависимости от плотности клеток опухоли в материале исследователя имеет возможность индивидуально подходить к выбору необходимого количества ячеек для изучения одного образца. При обнаружении единичных клеток опухоли или немногочисленных их скоплений могут быть задействованы все 15 ячеек биочипа.

Часть тест-системы не имеет специфического покрытия и предназначена для маркировки изделия (QR-код) и фиксации в руках исследователя.

Цель исследования — оценить возможности тест-системы «Биочип-SER» для анализа экспрессии антигена Ер-САМ методом флюоресцентной иммуноцитохимии.

Материалы и методы

Проведено 64 цитологических, 64 СИЦХ- и 64 ФИЦХ-исследования на тест-системе «Биочип-SER» 59 пациентам с опухолевой и неопухолевой патологией. В исследование включены 8 мужчин (возраст 33–67 лет) и 51 женщина (возраст 29–88 лет). Работа выполнена в соответствии с Хельсинкской декларацией (2013) и одобрена Этическим комитетом Национального медицинского исследовательского

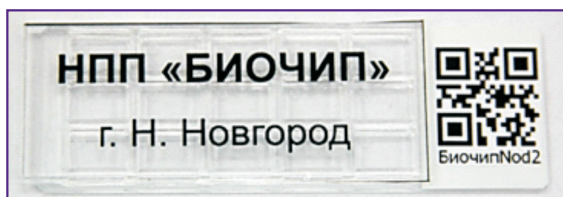


Рис. 1. Внешний вид тест-системы «Биочип-SER»

центра онкологии им. Н.Н. Блохина. От каждого пациента получено информированное согласие. Изучены клеточные осадки 45 выпотов (26 асцитов, 17 плевритов, 2 перикардиальных выпота) и 19 смывов с органов брюшной полости. У двух пациенток дважды проводился забор материала, у троих были исследованы

плевральный и перитонеальный выпоты (табл. 1). Из 59 больных 57 человек (96,6%) имели онкологический анамнез (серозный папиллярный рак яичников, пограничная опухоль яичника, АК эндометрия, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак желудка, АК легкого, мезотелиома, мелкоклеточный рак легкого), у 2

Таблица 1

Клинико-морфологическая характеристика исследованного материала

№	Пол	Возраст, лет	Материал — количество образцов	Первичное цитологическое заключение	Итоговое заключение (после СИЦХ)	Клинический диагноз		
1–21	Ж	29–88	Смывы — 6 Плевриты — 4 Асциты — 12	Аденокарцинома	Аденокарцинома	Рак яичников		
22	Ж	47	Асцит			Карциносаркома яичников		
23	Ж	55	Смыв			Рак шейки матки		
24–26	Ж	57–69	Плеврит — 1 Смывы — 2			Рак тела матки		
27–29	Ж–2, М–1	33–59	Плеврит			Рак молочной/ грудной железы		
30	Ж	59	Асцит			Первично-множественное злокачественное новообразование		
31	Ж	44	Плеврит, асцит					
32	Ж	62	Асцит					
33	Ж	50	Асцит					
34–39	М–4, Ж–2	35–70	Смыв — 1 Асциты — 4 Перикардит — 1			Аденокарцинома легкого		
40	М	57	Плеврит					
41	М	52	Перикардит					
42	Ж	64	Плеврит, асцит					
43	Ж	88	Плеврит			Аденокарцинома легкого		
44	Ж	49	Плеврит					
45	М	54	Плеврит			Мелкоклеточный рак легкого	Мелкоклеточный рак легкого	Мелкоклеточный рак легкого
46	Ж	29	Смыв			Подозрение на аденокарциному	Аденокарцинома	Рак яичников
47	Ж	34	Смыв				Реактивный мезотелий	
48	Ж	53	Плеврит					
49	Ж	70	Смыв			Реактивный мезотелий	Реактивный мезотелий	Рак тела матки
50	Ж	50	Смыв				Эндометриоз	
51	Ж	58	Асцит, плеврит					Эхинококкоз
52	Ж	50	Смыв				Рак молочной железы	
53	Ж	75	Смыв				Рак тела матки	
54	Ж	65	Смыв					
55	Ж	55	Асцит	Мезотелиома	Мезотелиома	Мезотелиома		
56	Ж	87	Асциты — 2	Подозрение на мезотелиому				
57	Ж	71	Плеврит			Метастазы по плевре без выявленного первичного очага		
58	Ж	55	Смыв	Подозрение на пограничную опухоль яичников	Подозрение на пограничную опухоль яичников	Пограничная опухоль яичников		
59	Ж	41	Смыв	Подозрение на пограничную опухоль яичников	Подозрение на пограничную опухоль яичников	Пограничная опухоль яичников		

пациентов (3,4%) опухолевой патологии не выявлено (1 наблюдение — эхинококкоз печени и 1 — эндометриоз маточной трубы). Среди пациентов с опухолевой патологией у 7 (12,3%) были диагностированы первично-множественные злокачественные новообразования. Только у 42 из 59 пациентов гистологически было верифицировано наличие/отсутствие распространения опухолевого процесса по брюшине/плевре, у двух пациенток с неопухолевой патологией (эндометриоз, эхинококкоз) диагнозы также подтвердились.

Хотя наибольшей чувствительностью Ep-CAM обладает именно в отношении клеток АК, интерес для исследования представляла также экспрессия антигена в клетках опухолей другого генеза и клетках реактивного мезотелия.

В нашей работе весь исследованный материал был оценен как информативный, поскольку для проведения СИЦХ и ФИЦХ отбирался осадок с высокой клеточностью.

Работу проводили в четыре этапа: 1-й этап — цитологическое исследование; 2-й этап — СИЦХ; 3-й этап — ФИЦХ на тест-системе «Биочип-SER»; 4-й этап — контрольное цитологическое исследование на системе «Биочип-SER».

Для цитологического, СИЦХ- и ФИЦХ-исследований использовали концентрированную клеточную взвесь, полученную путем центрифугирования осадка отстоявшейся биологической жидкости. Осадок помещали в центрифужные пробирки объемом 10 мл и центрифугировали в режиме 2000 об./мин в течение 10 мин на центрифуге ОПН-3М (ELMI Ltd., Латвия). Надосадочную жидкость сливали, оставляя до 1 мл клеточной взвеси. Содержимое пробирки ресуспендировали или встряхивали на вортексе для получения однородной клеточной взвеси, которую затем распределяли (в объеме 50–80 мкл в зависимости от клеточной плотности) по кюветам цитоцентрифуги Cytospin-3 (Thermo Scientific Shandon, Великобритания) и центрифугировали в режиме 1500 об./мин в течение 10 мин.

Готовили серию монослойных препаратов: для цитологического исследования 2 мазка окрашивали по методу Романовского в модификации Лейшмана, на двух проводили СИЦХ-исследование с МКАТ к эпителиальному антигену Ep-CAM, клон Ber-EP4 (Dako, США). Наличие мембранного окрашивания клеток опухоли свидетельствовало о положительной экспрессии Ep-CAM.

В нескольких случаях (n=9) для подтверждения диагноза и дифференциальной диагностики были также проведены СИЦХ-исследования с МКАТ к антигену WT-1, клон 6F-H2, титр 0,7:100 (Cell Marque Corp., США); калретину, клон Calret, титр 1:100 (Dako, США); мезотелину, клон NCL-L-MESO, титр 1:40 (Novocastra Laboratories, Великобритания); мезотелиальному антигену HBME-1, клон HBME-1, титр 1:40 (Cell Marque Corp., США); десмину, клон D33, титр 1:100 (Cell Marque Corp., США); TTF-1, клон G7G3/1,

титр 0,7:100 (Cell Marque Corp., США); CK7, клон OV-TL 12/30, титр 0,7:100 (Cell Marque Corp., США); синнаптофизину, клон MRQ-40, титр 0,7:100 (Cell Marque Corp., США); Epithelial-Related Antigen, клон MOC-31, титр 1:60 (Dako, США). Все СИЦХ были проведены на иммуногистостейнере BenchMark ULTRA (Ventana, США).

Для выполнения ФИЦХ на изделии «Биочип-SER» в оставшуюся клеточную взвесь добавляли 10% раствор реополиглобулина (в соотношении 1:9) с целью уменьшения фонового окрашивания и нивелирования эффекта автофлюоресценции, повторно центрифугировали в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляли до остаточного объема 0,6–0,8 мл. Клеточную взвесь после снятия защитной пленки на биочипе распределяли в объеме 30 мкл в каждую ячейку. При внесении исследуемого материала в ячейки происходит прямая иммуноцитохимическая реакция «антиген–антитело», определяемая с помощью эффекта флюоресценции. Для более равномерного распределения материала и ускорения реакции «антиген–антитело» содержимое ячеек тщательно перемешивали, биочип инкубировали в течение 30 мин в гибридайсере (возможно применение термостата либо термошейкера). Затем оценивали полученные реакции с помощью флюоресцентного микроскопа Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия), используя фильтры FITC, DAPI.

Анализ экспрессии антигена Ep-CAM проводили в каждой из ячеек тест-системы по следующим параметрам:

- наличие либо отсутствие специфического мембранного свечения в клетках опухолей;
- количество прореагировавших клеток;
- интенсивность флюоресценции.

Впоследствии (4-й этап) биочип окрашивали традиционным способом (по Лейшману) и проводили контрольное цитологическое исследование. Во всех цитологических препаратах оценивали разнообразие клеточного состава, плотность клеток опухоли в материале, сохранность характерных морфологических признаков опухоли и ее архитектоники. Микроскопию выполняли на световом микроскопе Eclipse Ci (Nikon, Япония) при увеличении 100, 200, 400 и 1000.

Результаты и обсуждение

Результаты цитологического исследования (1-й этап). Все полученные заключения были распределены на три группы.

1. Уверенное заключение о наличии клеток опухоли (n=51). Материал отличался высокой клеточностью. В соответствии с нозологией отмечались характерные морфологические особенности опухолевых клеток и их скоплений.

2. Подозрение на наличие клеток опухоли (n=7). Причинами неуверенных цитологических заключений служили следующие факты:

наличие единичных клеток, морфологически сходных с опухолевыми (n=2);

«пестрый» клеточный состав с наличием выраженной лимфоцитарно-гистиоцитарной реакции (n=2);

клетки реактивно пролиферирующего мезотелия, подозрительные на мезотелиому (n=2), либо скопления опухолевых клеток, которые трудно дифференцировать между АК и мезотелиомой (n=1).

3. Уверенное заключение об отсутствии клеток опухоли (n=6).

Во всех наблюдениях данной группы цитограммы были представлены бесструктурными скоплениями и пластами клеток мезотелия.

Результаты СИЦХ-исследования (2-й этап).

Применение СИЦХ позволило подтвердить цитологический диагноз в 56 наблюдениях, уточнить в 6 и избежать гипердиагностики — в двух случаях (см. табл. 1).

Для оценки чувствительности и специфичности цитологического метода в выявлении АК из 64 наблюдений соответственно исключили те случаи, где были уверенно или предположительно диагностированы мезотелиома (n=4), опухоли с пограничной степенью злокачественности (n=2) и мелкоклеточный рак (n=1). Проведение СИЦХ-исследования с МКАТ к Ер-САМ (n=57) позволило подтвердить цитологическое заключение «аденокарцинома» в 46 случаях, а также перевести в категорию уверенных заключений 2 наблюдения с подозрением на АК (табл. 2).

Поскольку ложноотрицательных цитологических заключений отмечено не было, чувствительность цитологической диагностики составила 100%. Группу ложноположительных цитологических заключений в итоге составили 2 наблюдения с подозрением на АК, не подтвердившуюся при СИЦХ, а также один случай с уверенным заключением о метастазе аденогенного рака. Таким образом, специфичность цитологического метода составила всего 67%. Однако стоит отметить, что данные показатели можно рассматривать лишь в качестве условного ориентира ввиду малой выборки пациентов.

При пограничной опухоли яичников (n=2) положительная экспрессия Ер-САМ отмечена в обоих случаях. Во всех наблюдениях с утвердительными и предположительными заключениями о мезотелиоме (n=4), а также при диссеминации мелкоклеточного рака легкого по плевре реакция с Ер-САМ была отрицательной. Диагноз эпителиоидно-клеточной мезотелиомы был подтвержден СИЦХ-реакциями с позитивной экспрессией калретинина, мезотелина, WT-1, НВМЕ и негативной экспрессией МОС-31, десмина. Мелкоклеточный рак при СИЦХ характеризовался позитивной экспрессией ТТФ-1 и синаптофизина (ранее гистогенез опухоли был подтвержден иммуногистохимически).

Результаты ФИЦХ-исследования на тест-системе «Биочип-SER» (3-й этап). ФИЦХ, проведенная на системе «Биочип-SER», также показала 100% диагностическую чувствительность: во всех случаях АК,

Т а б л и ц а 2

Экспрессия Ер-САМ при стандартном иммуноцитохимическом исследовании

Первичное цитологическое заключение	Экспрессия Ер-САМ	Количество наблюдений
Аденокарцинома (n=47)	—	1
	+	46
Подозрение на аденокарциному (n=4)	—	2
	+	2
Реактивные клетки мезотелия (n=6)	—	6
	+	0

подтвержденных СИЦХ, выявлена положительная экспрессия антигена Ер-САМ, конъюгированного с Alexa Fluor 488. Специфичность теста составила 89%, лишь в одном наблюдении результаты СИЦХ и ФИЦХ не совпали (положительная реакция была отмечена только на биочипе), причем в дальнейшем гистологически была подтверждена диссеминация опухолевого процесса, что говорит об истинности результата ФИЦХ.

Необходимо отметить ряд нюансов, с которыми сталкивается исследователь при работе с тест-системой «Биочип-SER». Так, под воздействием лучевого или химиотерапевтического лечения в клетках опухоли проявляются признаки дистрофии и дегенерации, в связи с чем мембранная экспрессия Ер-САМ может наблюдаться в виде флюоресцентного свечения разной интенсивности (от слабой до умеренной), иногда прерывистого. Эта особенность может затруднять обнаружение опухолевых клеток.

Результаты контрольного цитологического исследования на тест-системе «Биочип-SER». Отмечалась сохранность характерных морфологических признаков клеток опухоли и архитектоники скоплений. Распределение клеточных элементов в ячейках оказалось не совсем равномерным — наибольшее количество материала скапливалось в углах ячеек. Это хорошо иллюстрируют приведенные примеры результатов исследований (рис. 2, 3).

Таким образом, проведенное исследование показывает высокую сопоставимость результатов ФИЦХ- и СИЦХ-исследований экспрессии Ер-САМ. При этом использование тест-системы «Биочип-SER» дает ФИЦХ-исследованию дополнительные преимущества:

а) экономия времени — исследование занимает около 60 мин с учетом пробоподготовки против 180 мин при СИЦХ;

б) возможность выполнения контрольного исследования: после ФИЦХ препарат окрашивается традиционным способом;

в) используемые флюорохромы имеют длительный срок флюоресценции;

г) низкая себестоимость, экономия реагентов и расходных материалов;

д) не требуется применения системы визуализации и канцерогенного хромогена — диаминобензидина;

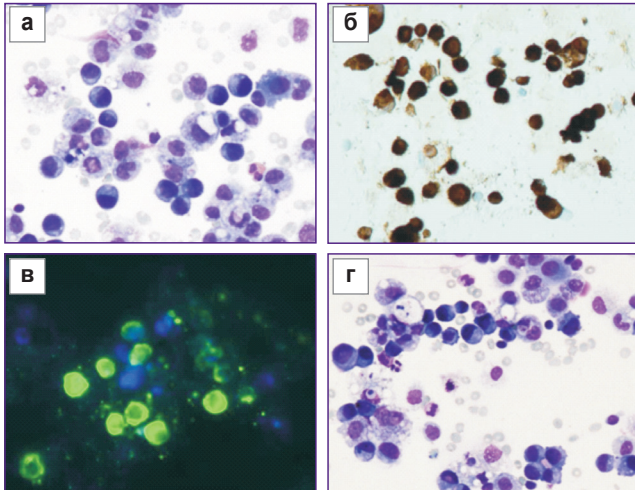


Рис. 2. Больная И., 50 лет, клинический диагноз: «рак желудка, асцит»:

а — цитологическое исследование: метастаз перстневидноклеточного рака, x200; б — СИЦХ: положительная экспрессия Ep-CAM, x200; в — ФИЦХ на тест-системе «Биочип-SER»: положительная экспрессия Ep-CAM, x200; г — контрольное цитологическое исследование на биочипе: метастаз перстневидноклеточного рака, x200

е) использование телемедицины — возможность проведения в условиях поликлиники преаналитического этапа обученным средним медицинским персоналом с дальнейшей передачей данных сканированных изображений в специализированный референсный центр.

Заключение

Рациональное использование современных дополнительных методов исследования позволяет расширить возможности и повысить качество дифференциальной диагностики метастатических аденокарцином, мезотелиом и реактивно измененного мезотелия в выпотах и смывах с серозных полостей, что снижает частоту гипо- и гипердиагностики опухолевого процесса.

Предлагаемая тест-система «Биочип-SER» с МКАТ к Ep-CAM, конъюгированному с Alexa Fluor 488, обладает рядом преимуществ в сравнении с принятым в мировой практике вариантом ФИЦХ-исследования, который является современным надежным методом диагностики опухолевого процесса в выпотных жидкостях. Это позволяет рекомендовать «Биочип-SER» для широкого применения как в специализированных учреждениях, так и на этапе первичного звена.

Финансирование исследования. Работа выполнена при поддержке ООО НПП «Биочип».

Конфликт интересов. ООО НПП «Биочип» не влияло на ход исследования и его результаты.

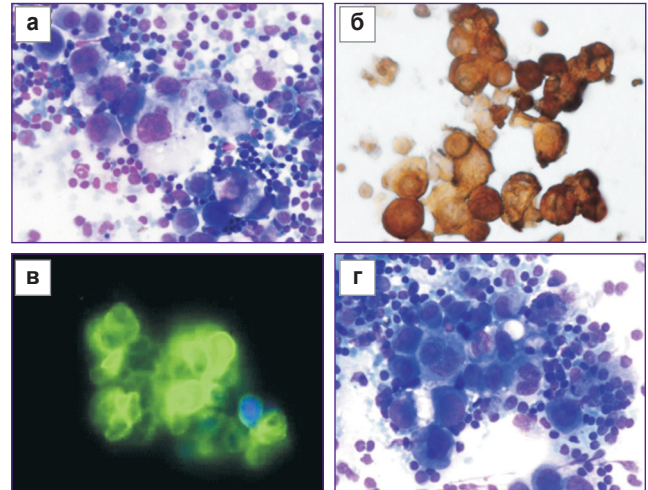


Рис. 3. Больная К., 59 лет, клинический диагноз: «рак яичников, асцит»:

а — цитологическое исследование: метастаз серозной папиллярной цистаденокарциномы яичника, x200; б — СИЦХ: положительная экспрессия Ep-CAM, x200; в — ФИЦХ на тест-системе «Биочип-SER»: положительная экспрессия Ep-CAM, x200; г — контрольное цитологическое исследование: метастаз серозной папиллярной цистаденокарциномы яичника, x200

Литература/References

- Семенов Д.А., Целуйко С.С. Гистофизиология плевральной полости и плеврального выпота. Дальневосточный медицинский журнал 2012; 2: 140–144. Semenov D.A., Tseluyko S.S. Histophysiology of the pleural cavity and pleural effusion. *Dal'nevostochnyy meditsinskiy zhurnal* 2012; 2: 140–144.
- Долгов В.В., Шабалова И.П., Миронова И.И., Джангирова Т.В., Коротаев А.Л. Выпотные жидкости. Лабораторное исследование. М: Триада; 2006. Dolgov V.V., Shabalova I.P., Mironova I.I., Djangirova T.V., Korotaev A.L. *Vypotnye zhidkosti. Laboratornoe issledovanie* [Serous effusions. Laboratory diagnostics]. Moscow: Triada; 2006.
- Глузман Д.Ф., Склиренко Л.М., Надгорная В.А., Крячок И.А. Диагностическая иммуноцитохимия опухолей. Киев: Морион; 2003. Gluzman D.F., Sklyarenko L.M., Nadgornaya V.A., Kryachok I.A. *Diagnosticheskaya immunotsitokhimiya opukholey* [Diagnostic immunocytochemistry of tumors]. Kiev: Morion; 2003.
- Shidham V.B., Atkinson B.F. *Cytopathologic diagnosis of serous fluids*. Elsevier Saunders; 2007.
- Савостикова М.В., Фурминская Е.Ю., Федосеева Е.С., Кудайбергенова А.Г. Флуоресцентное иммуноцитохимическое исследование выпотов и смывов с серозных полостей при интраоперационной диагностике. Клиническая лабораторная диагностика 2017; 62(12): 742–745. Savostikova M.V., Furminskaya E.Yu., Fedoseeva E.S., Kudaibergenova A.G. The fluorescent immune cytochemical analysis of exudations and washouts from serous cavities under intra-operational cytological diagnostic. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2017; 62(12): 742–745.
- Лазарев А.Ф., Григорук О.Г., Базулина Л.М., Музалевский П.Н., Кравцов В.Ю. Мезотелиома плевры:

этиология, заболеваемость, диагностика, лечение, выживаемость. *Российский онкологический журнал* 2013; 5: 15–20. Lazarev A.F., Grigoruk O.G., Bazulina L.M., Muzalevskiy P.N., Kravtsov V.Yu. Pleural mesothelioma: etiology, incidence, diagnosis, treatment and survival. *Rossiyskiy onkologicheskii zhurnal* 2013; 5: 15–20.

7. Davidson B. Malignant nonhematological effusion characterization by flow cytometry. *Acta Cytol* 2016; 60(4): 365–371, <https://doi.org/10.1159/000447687>.

8. Болгова Л.С., Мариненко С.В. Современные возможности дифференциальной цитологической диагностики пролиферирующего мезотелия, мезотелиомы и метастазов рака (обзор литературы и результаты собственных исследований). *Клиническая онкология* 2015; 4(20). Bolgova L.S., Marinenko S.V. Modern possibilities of differential cytological diagnostics of proliferating mesothelium, mesothelioma and cancer metastases (literature review and results of own research). *Klinicheskaya onkologiya* 2015; 4(20).

9. Gabris S., Kern L. Two color immunostaining of pleural effusions with Ber-EP4 and CK5/6. *Cytopathology* 2004; 15(Suppl 2): 14.

10. Comin C.E., Saieva C., Messerini L. H-caldesmon, calretinin, estrogen receptor, and Ber-EP4: a useful combination of immunohistochemical markers for differentiating epithelioid peritoneal mesothelioma from serous papillary carcinoma of the ovary. *Am J Surg Pathol* 2007; 31(8): 1139–1148, <https://doi.org/10.1097/pas.0b013e318033e7a8>.

11. Schnell U., Cirulli V., Giepmans B.N. EpCAM: structure and function in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1828(8): 1989–2001, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.04.018>.

12. Latza U., Niedobitek G., Schwarting R., Nekarda H., Stein H. Ber-EP4: new monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelial. *J Clin Pathol* 1990; 43(3): 213–219, <https://doi.org/10.1136/jcp.43.3.213>.

13. Wang B., Li D., Ou X., Yi Q., Feng Y. Diagnostic

accuracy of Ber-EP4 for metastatic adenocarcinoma in serous effusions: a meta-analysis. *PLoS One* 2014; 9(9): e107741, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107741>.

14. Maguire B., Whitaker D., Carrello S., Spagnolo D. Monoclonal antibody Ber-EP4: its use in the differential diagnosis of malignant effusions and carcinoma in cell blocks of malignant effusions and FNA specimens. *Diagn Cytopathol* 1994; 10(2): 130–134, <https://doi.org/10.1002/dc.2840100207>.

15. Волченко Н.Н., Борисова О.В. Роль эпителиального антигена Ber-EP4 в исследовании экссудата из серозных полостей. *Российский онкологический журнал* 2012; 2: 18–22. Volchenko N.N., Borisova O.V. Role of epithelial antigen Ber-EP4 in the study of exudates from serous sacs. *Rossiyskiy onkologicheskii zhurnal* 2012; 2: 18–22.

16. Ordóñez N.G. Value of the Ber-EP4 antibody in differentiating epithelial pleural mesothelioma from adenocarcinoma: the M.D. Anderson experience and a critical review of the literature. *Am J Clin Pathol* 1998; 109(1): 85–89, <https://doi.org/10.1093/ajcp/109.1.85>.

17. Ordóñez N.G. The Immunohistochemical diagnosis of mesothelioma. *Am J Surg Pathol* 2003; 27(8): 1031–1051, <https://doi.org/10.1097/00000478-200308000-00001>.

18. Morimoto A., Ito A., Hashimoto K., Nakano A., Nagasaka T., Yokoi T. New diagnostic technique for rapid fluorescence immunocytochemical staining of adenocarcinoma and mesothelial cells using liquid-based cytology. *Acta Cytol* 2014; 58(5): 461–468, <https://doi.org/10.1159/000367706>.

19. Зиновьев С.В., Рачков В.В., Уткин О.В., Савостикова М.В., Фурминская Е.Ю. Биочип для мультиплексного анализа и способ исследования клеток при диагностике онкологических заболеваний. Патент WO 2017/204674 A1. 2017. Zinoviev S.V., Rachkov V.V., Utkin O.V., Savostikova M.V., Furminskaya E.Yu. A biochip for multiplex analysis and a method of studying cells in the diagnosis of oncological diseases. Patent WO 2017/204674 A1. 2017.