

Д.Ф. Глузман
Л.М. Скляренко
Т.С. Ивановская
А.С. Полищук

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина

Ключевые слова:
иммуноцитохимия, моноклональные антитела, микрометастазы, костный мозг, серозный экссудат.

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ МИКРОМЕТАСТАЗОВ ОПУХОЛЕЙ

В статье представлены результаты применения современных иммуноцитохимических методов для выявления микрометастазов различных типов опухолей у взрослых и детей. Показано, что использование специально подобранной панели моноклональных антител к онкофетальным, органно- и тканеспецифическим антигенам, белкам цитоскелета облегчает обнаружение небольших количеств опухолевых клеток в мазках из пункта костного мозга, экссудатах из серозных полостей и спинномозговой жидкости пациентов.

Основным методом диагностики метастазов до настоящего времени остается изучение гистологических срезов и цитологических препаратов, окрашенных рутинными методами. Доказательным при опухолях эпителиального происхождения считается обнаружение комплексов, скоплений или железистоподобных структур, состоящих из «чуждых», несвойственных данной ткани клеток, обладающих признаками атипичности [1–3]. При этом идентификация микрометастазов или изолированных неопластических клеток в мазках из пунктов костного мозга, лимфатических узлов и экссудатов из серозных полостей связана со значительными трудностями. Обусловлено это наличием в указанных тканях клеток, имеющих некоторые черты сходства с опухолевыми: в лимфатических узлах различных типов ретикулярных клеток, гистиоцитов, иммунобластов; в костном мозге — клеток стромы, эндотелия синусов, остеобластов, остеокластов, недифференцированных (бластных) кроветворных клеток, мегакариоцитов; в экссудатах из серозных полостей — клеток мезотелия, гистиоцитов. Следует также учитывать реактивные изменения в кроветворных органах при наличии в них неопластических клеток, а также то, что раковые клетки, попадая в иное микроокружение, могут утрачивать некоторые присущие им цитоморфологические особенности, маскируясь под молодые кроветворные клетки.

Достижения молекулярной биологии и иммуноцитохимии привели к открытию новых классов соединений, которые могут быть использованы в качестве онкомаркеров. К их числу относятся ряд онкофетальных, тканеспецифических, органоспецифических антигенов, рецепторы гормонов, белки цитоскелета и белки, кодируемые онкогенами [4–6]. Внедрению их в клиническую онкологию способствовало развитие гибридной технологии получения моноклональных антител (МкАТ), реагирующих с разнообразными детерминантами различных по своей природе опухолевых и иммунокомпетентных клеток [2, 4, 6].

Применение иммуногистохимических методов и МкАТ в решающей степени повысило эффективность диагностики лимфом, низкодифференцированных первичных опухолей и метастазов при исследовании гистологических препаратов [2].

Сотрудниками Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины разработаны более сложные в техническом исполнении иммуноцитохимические методы идентификации различных по своей природе клеток солидных новообразований и их метастазов в цитологических препаратах [7].

Иммуноцитохимические маркеры. В данном сообщении мы позволим себе кратко представить наш опыт применения иммуноцитохимических маркеров при выявлении микрометастазов солидных опухолей в мазках из пунктатов костного мозга, серозных экссудатов и в цитоцентрифужных препаратах спинномозговой жидкости (ликвора).

Перечень МкАТ к ряду маркерных соединений, применяющихся при выполнении иммуноцитохимических диагностических исследованиях, приведен в табл. 1.

Таблица 1
Некоторые маркерные иммуноцитохимические признаки для установления гистогенеза опухолей

Опухоли	Маркерные соединения
Эпителиальные	Цитокератины, полиморфный эпителиальный муцин, раковозмбриональный антиген (РЭА), гликопротеин TAG-72
Мезенхимального происхождения	Виментин, десмин, белок S-100, миоглобин, лизоцим, α ₁ -антихимотрипсин
Меланома	Виментин, белок S-100, меланома-ассоциированные антигены
Кроветворной и лимфоидной тканей	Общий лейкоцитарный антиген, легкие цепи иммуноглобулинов, линейноспецифические и дифференцировочные антигены Т- и В-лимфоцитов, гистиоцитов
Астроцитарные	Глиальный фибриллярный кислый белок, белок S-100
Герминогенные	Цитокератины (за исключением семинома), плацентарная щелочная фосфатаза, альфа-фетопротеин, β-хорионический гонадотропин

При необходимости указанный список может быть существенно расширен за счет других имеющихся и постоянно появляющихся новых реагентов.

К их числу из тканеспецифических маркеров могут быть отнесены: нейронспецифическая энзолаза (НСЭ), обнаруживаемая в опухолях центральной и периферической нервной системы, при мелкоклеточном раке легкого, в клетках рака молочной железы и почки, ганглионевромы и ганглионейробластомы; синаптофизин (СФ), маркирующий клетки нейробластомы, ганглионевромы, рака щитовидной железы, карциноидов легких и органов желудочно-кишечного тракта; хромогранин А (ХрА), определяющийся в клетках опухолей нейроэндокринной системы.

Важное значение при детекции микрометастазов имеют следующие органоспецифические маркеры: антиген предстательной железы, кислая фосфатаза предстательной железы, тиреоглобулин (рак щитовидной железы), миоглобин (рабдомиосаркома), пептидные гормоны, синтезируемые клетками желез внутренней секреции (рак щитовидной железы, поджелудочной железы, легкого, толстой кишки) [2, 4].

ВЫЯВЛЕНИЕ МИКРОМЕТАСТАЗОВ В КОСТНОМ МОЗГЕ У ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ

Миелоидный костный мозг относится к числу органов, где чаще всего оседают опухолевые клетки и скрыто развиваются метастазы. Располагающиеся свободно или имплантировавшиеся в синусах костного мозга на ранних этапах метастазирования опухолевые клетки могут быть обнаружены в мазках из пунктатов или в трепанобиоптатах подвздошной кости задолго до появления клинических, рентгенологических или радиоизотопных признаков поражения кости [8].

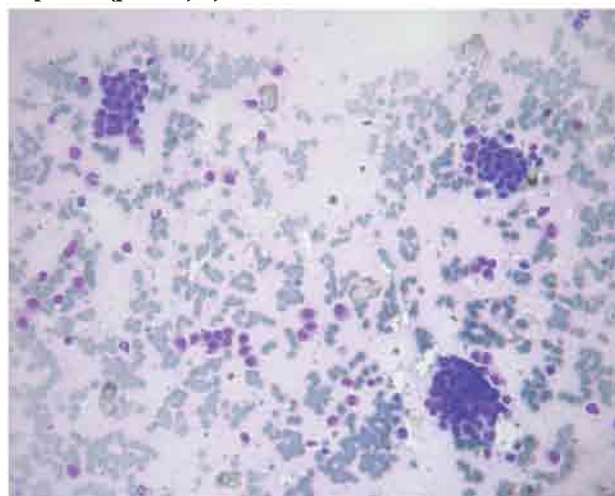
Частота выявления опухолевых клеток в костном мозге колеблется в значительных пределах и определяется локализацией и гистологической структурой первичной опухоли, клинической стадией заболевания, чувствительностью и специфичностью примененных методов исследования.

Наиболее часто метастазы в костном мозге и костях определяются при раке молочной железы (20–35%), предстательной железы (13–20%), при железистом и мелкоклеточном раке легкого (20–25%), при раке щитовидной железы и гипернефроме [7, 8].

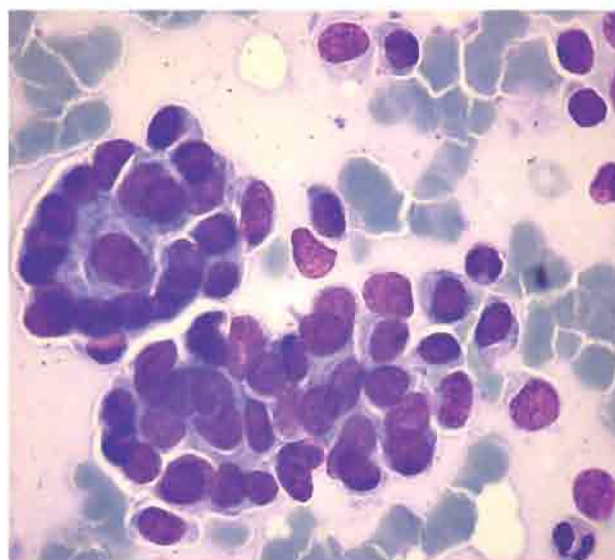
Нами были обследованы 108 больных, большинство из которых (78 человек) составили пациенты с раком легкого. Симптомы, обусловленные поражением костного мозга, варьибельны и не являются специфическими. К их числу относятся боль в костях, наблюдающаяся у 75% пациентов при прогрессировании процесса, анемия, геморрагические проявления при тромбоцитопении или, напротив, гипертромбоцитоз, инфекционные осложнения, обусловленные нейтропенией.

Показаниями к исследованию костного мозга у больных онкологического профиля являются признаки анемии, двух- или трехростковой цитопении, гиперкальциемия и повышенный уровень щелочной фосфатазы в сыворотке крови, необходимость мониторинга состояния гемопоэза при проведении протокольной терапии.

Гистологическое изучение трепанобиоптатов подвздошной кости, безусловно, имеет преимущества по сравнению с цитологическим исследованием стерального пунктата костного мозга. Однако паноптический метод окраски мазков из пунктата по Паппенгейму, дополненный иммуноцитохимическим исследованием с использованием панели МкАТ для обнаружения вышеупомянутых маркерных антигенов, позволяет выявить микрометастазы и единичные опухолевые клетки, лежащие изолированно, и отличить их от недифференцированных бластных клеток, мегакариоцитов, клеток стромы (рис. 1, 2).

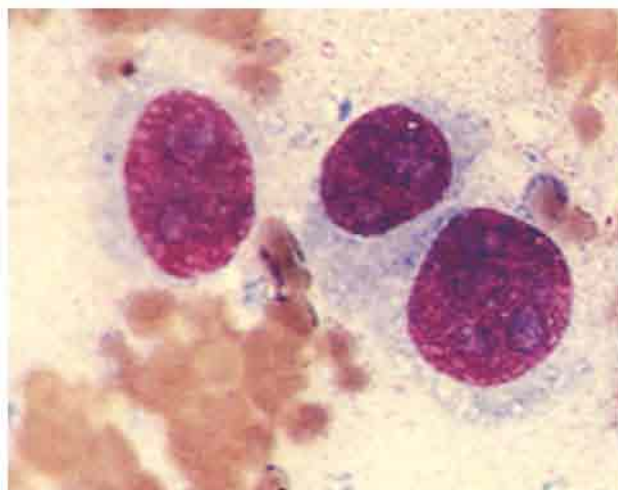


a

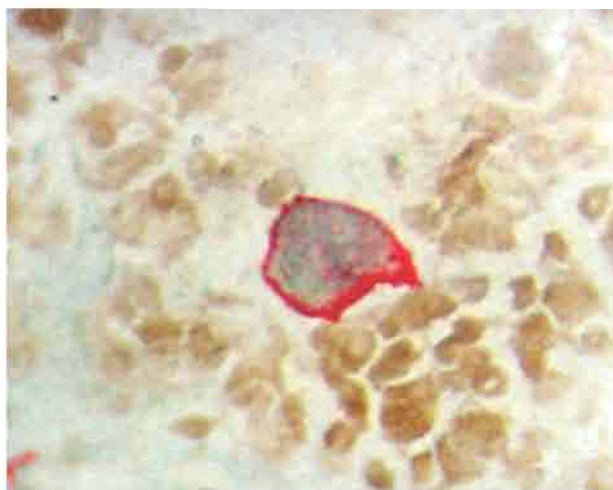


b

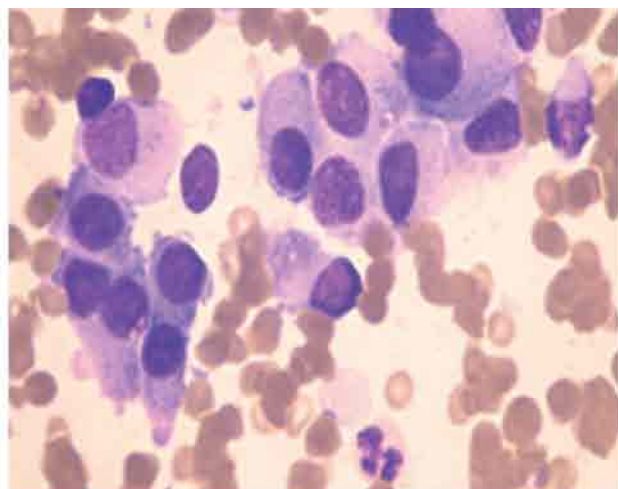
Рис. 1. Метастатическое поражение костного мозга при «анонимной» опухоли при окраске по Паппенгейму: *a* — ув. $\times 200$; *b* — ув. $\times 1000$



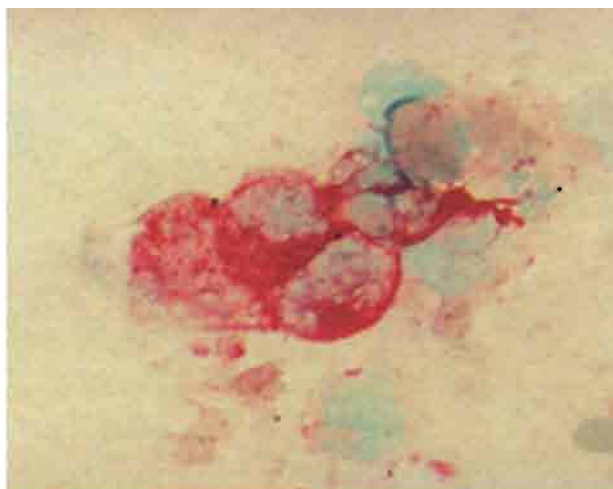
а



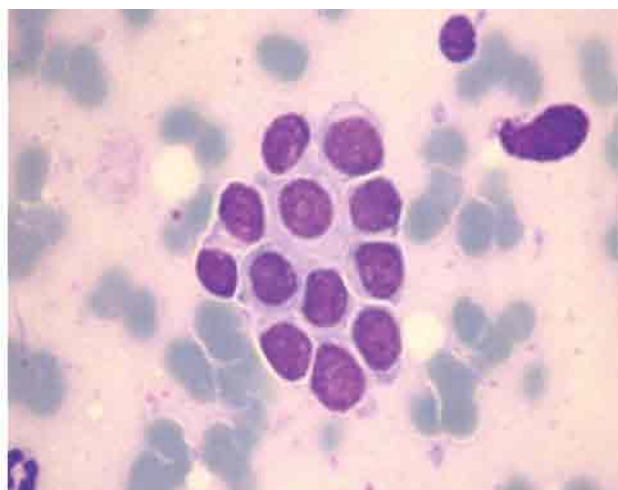
г



б



д



в

ВЫЯВЛЕНИЕ МИКРОМЕТАСТАЗОВ В КОСТНОМ МОЗГЕ ПРИ ОПУХОЛЯХ У ДЕТЕЙ

У пациентов детского возраста с солидными опухолями наиболее часто метастазы в костном мозге и костях выявляют при новообразованиях из малых округлых «синих» клеток (нейробластоме, саркоме Юинга, рабдомиосаркоме, медуллобластоме

Рис. 2. Микрометастазы рака молочной железы в костном мозге: а, б, в — при окраске по Паппенгейму; г — экспрессия цитокератина 19; д — экспрессия цитокератина 8. Ув. × 1000

и др.) [9]. Нередко признаки поражения костного мозга определяются уже в момент установления диагноза. Особенно часто инфильтрация костного мозга опухолевыми клетками отмечается у детей в возрасте до 1 года. Частота выявления метастазов почти одинакова при изучении гистологических срезов трепанобиоптатов и мазков, полученных при пункции костного мозга в 2–4 точках.

Для уточнения природы клеток метастазов у 86 детей с солидными опухолями были использованы маркерные иммуноцитохимические признаки, представленные в табл. 2.

На иммуноцитохимических признаках метастазов некоторых из приведенных в табл. 2 опухолей остановимся несколько подробнее.

Нейробластома возникает из эмбриональных нейробластов. Относится к числу наиболее распространенных солидных новообразований у детей (7–10% всех опухолей детского возраста). Метастазы в костном мозге выявляют почти у 70% детей, а в 50–60% случаев — уже в момент установления диагно-

Иммуноцитохимические маркеры опухолей из малых округлых клеток и их метастазов в костном мозге

Опухоли	Виментин	ЦК	БПФ	Десмин	MIC (CD99)	Белок S-100	НСЭ	CD57	CD45	СФ	ХрА
Нейробластома	-/+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+
Саркома Юинга	+	-/+	-/+	-	+	+/-	+/-	+/-	-	-	-
PNET	+	-	+/-	-	+	+/-	+	+/-	-	+/-	-
Рабдомиосаркома	+	-	+	+	+/-	-	+	+	-	-	-
Остеогенная саркома	+	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
Хондросаркома	+	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
Медуллобластома	+/-	-	-/+	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-
Ретинобластома	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Лимфобластный лейкоз	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Неходжкинская лимфома	+/-	-	-	-	+/-	-	-	-	+	-	-

ЦК – цитокератин; БПФ – белки промежуточных филаментов.

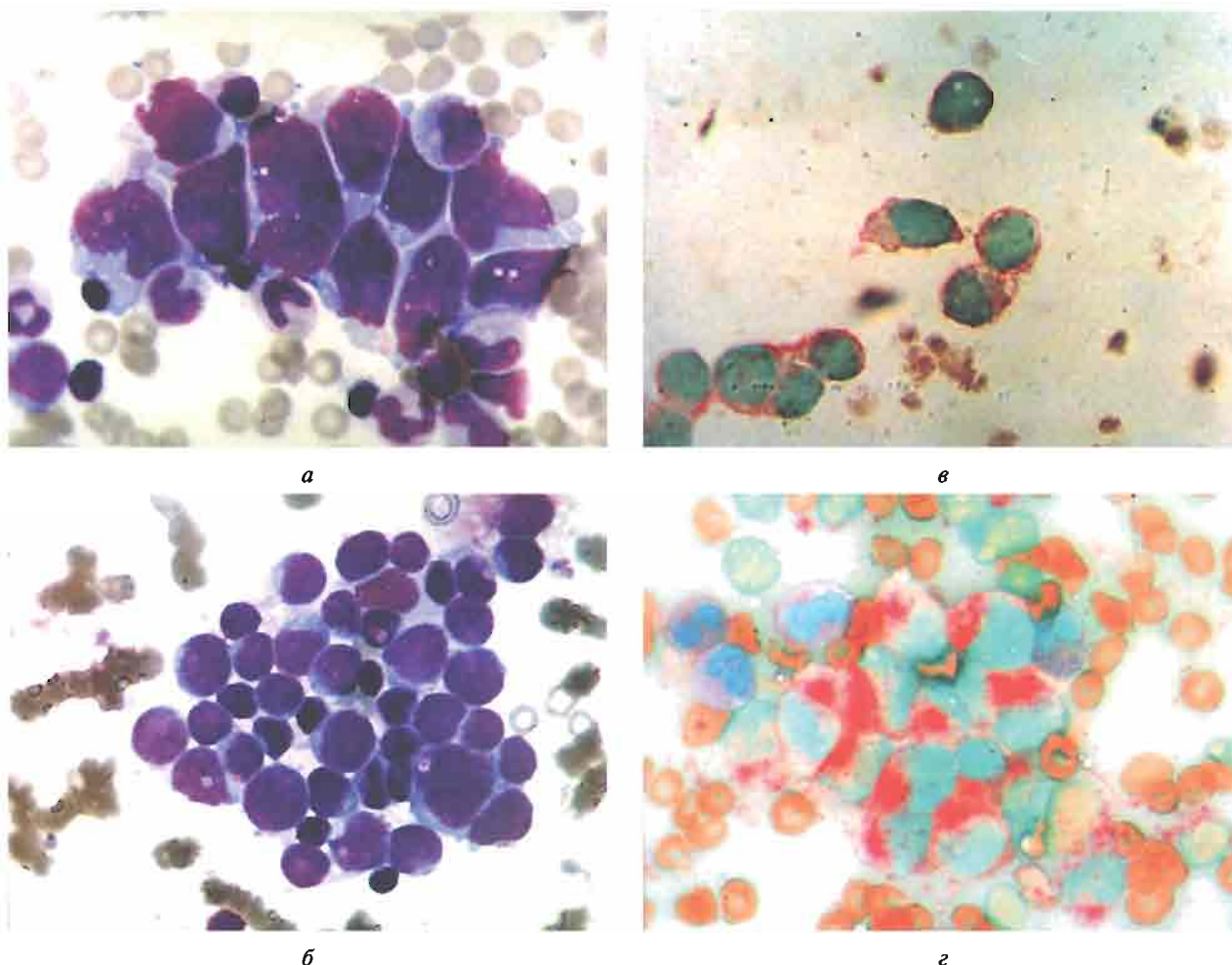


Рис. 3. Метастазы нейробластомы в костном мозге: а, б — окраска по Паппенгейму; в — экспрессия антигена CD56; г — цитохимическая реакция на кислую фосфатазу. Ув. × 1000

за (рис. 3). При иммуноцитохимическом исследовании в клетках метастазов нейробластомы определяется экспрессия белка S-100, НСЭ, СФ и ХрА.

Саркома Юинга является второй по частоте злокачественной опухолью костей у детей после остеогенной саркомы (рис. 4). Опухоли семейства Юинга, имеющие нейроэктодермальное происхождение, помимо недифференцируемой типичной саркомы Юинга и ее внеклеточного аналога, включают злокачественную мелкоклеточную опухоль торакоабдоминальной области (опухоль Аскина) и группу примитивных нейроэктодермальных новообразований мягких тканей и костей (PNET). Для клеток

саркомы Юинга и ее метастазов характерными являются положительная реакция при выявлении антигена CD99 (продукта экспрессии гена *MIC2*) и отложение гликогена в виде крупных блоков в цитоплазме неопластических клеток при PAS-реакции.

Рабдомиосаркома (6,5% всех злокачественных опухолей у детей) возникает из примитивных мезенхимальных клеток, коммитированных к развитию в поперечнополосатую мышечную ткань. Характеризуется чрезвычайно агрессивным течением, способна к диссеминации как лимфогенным, так и гематогенным путем. Маркерной для метастазов рабдомиосаркомы является реакция на дес-

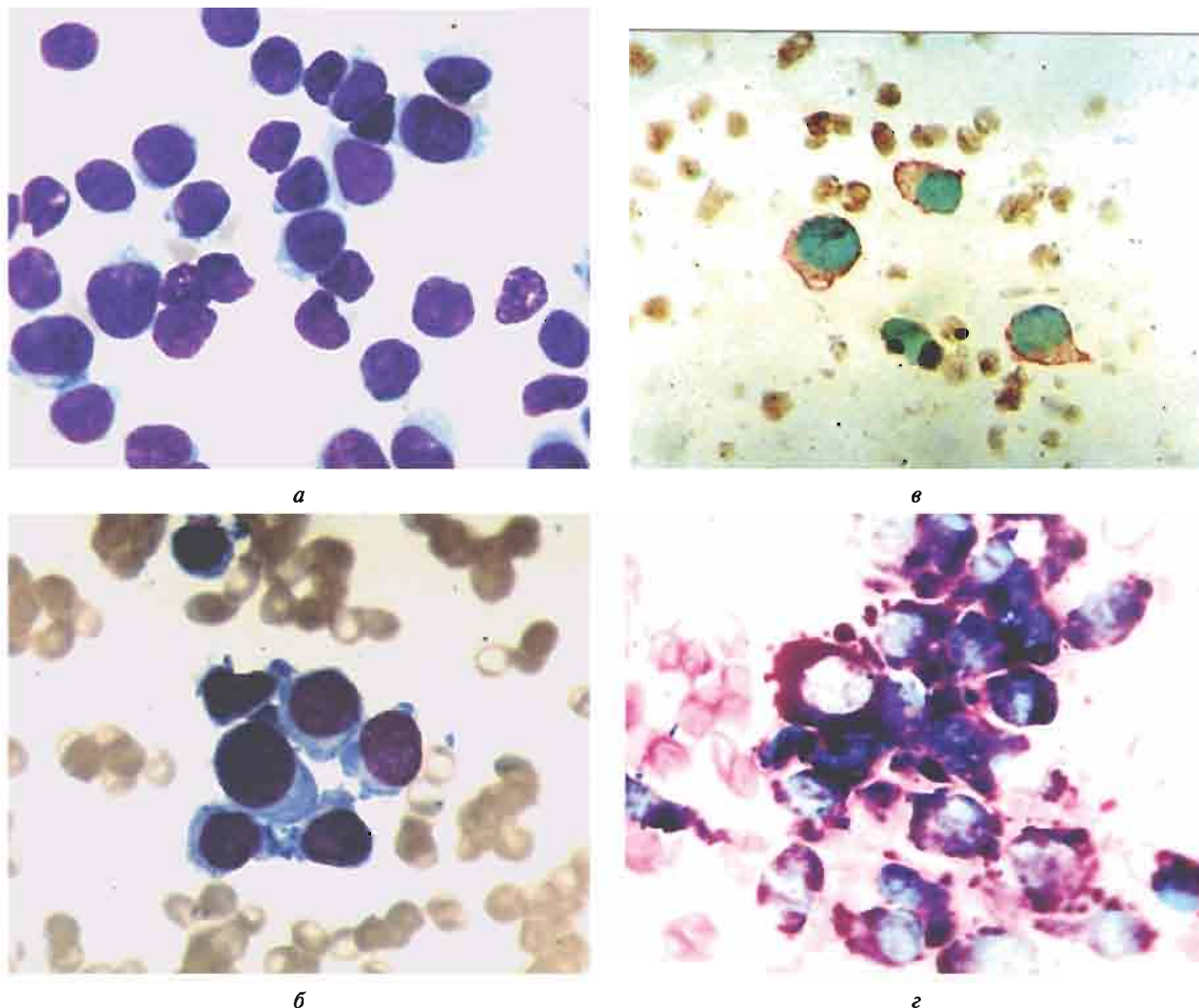


Рис. 4. Клетки саркомы Юинга в мазках из пунктата опухоли (а) и в костном мозге (б) при окраске по Паппенгейму; в — экспрессия антигена CD99; з — гликоген в цитоплазме клеток при PAS-реакции. Ув. × 1000

мин (рис. 5). В значительном числе случаев в ядрах опухолевых клеток определяется антиген MyoD1 — продукт гена мышечной дифференцировки.

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКССУДАТОВ ИЗ СЕРОЗНЫХ ПОЛОСТЕЙ

Выпоты в плевральную и брюшную полость чаще вызываются поражением серозных оболочек метастазами железистого рака (66% у мужчин и 82% у женщин), а опухолями неэпителиальной природы — в 22 и 14% случаев соответственно. Сложности в дифференциальной диагностике первичных злокачественных опухолей серозных оболочек (мезотелиом), метастатических поражений, реактивно-воспалительных и других патологических процессов, сопровождающихся накоплением жидкости в серозных полостях, общеизвестны [10]. Но они могут быть преодолены при применении иммуноцитохимических методов [11]. При использовании маркерных реакций удается идентифицировать иногда немногочисленные злокачественно трансформированные клетки и отличить их от морфологически изме-

ненных клеточных элементов неопухоловой природы [11, 12].

В табл. 3 представлен характер реакции раковых клеток, мезотелия и гистиоцитов/макрофагов с МкАТ к эпитопам ряда антигенов.

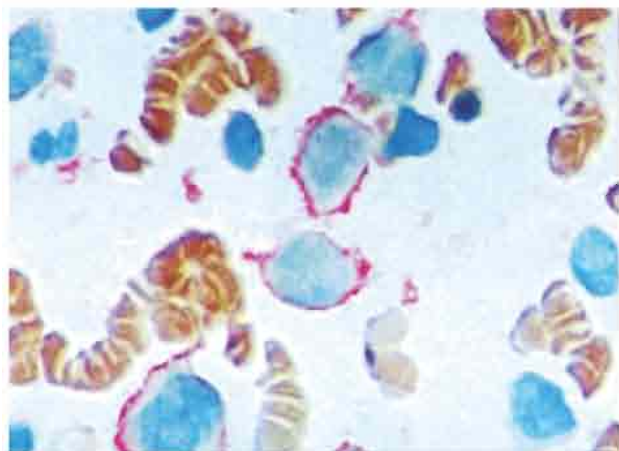
Таблица 3
Иммуноцитохимические реакции клеток экссудатов из серозных полостей

Антигены	Мезотелиальные клетки	Гистиоциты/макрофаги	Раковые клетки
Цитокератины	+	-	+
Виментин	+	+	+
РЭА-1	-	-	+(44%)
РЭА-4	-	-	+(47%)
EMA	+	+	+
PMЖ-1	-	-	+(68%)
Вег-EP4	-	-	+(63%)
Вб.2	-	-	+(66%)

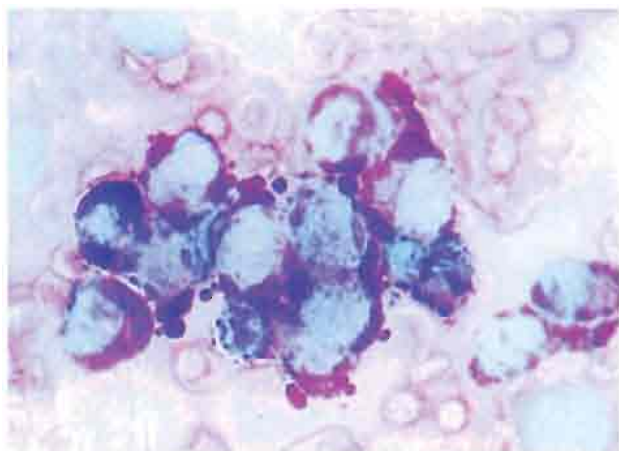
Нами были проведены цитохимические и иммуноцитохимические исследования экссудатов из серозных полостей у 129 онкологических больных и 81 пациента с неопухоловыми заболеваниями. У 101 больного первой группы клетки метастазов были обнаружены при рутинном цитологическом исследовании. В 28 случаях верифицированного



a



б

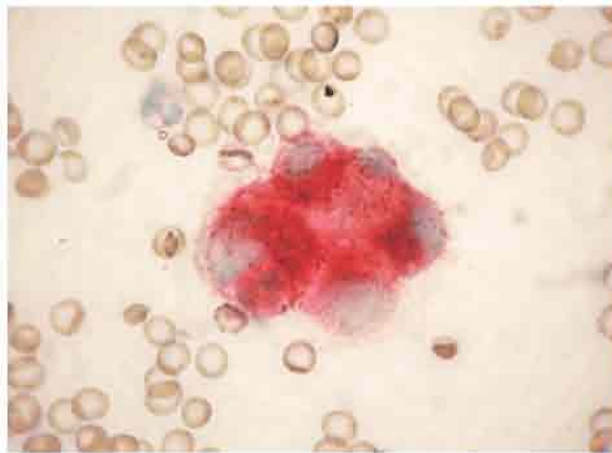


в

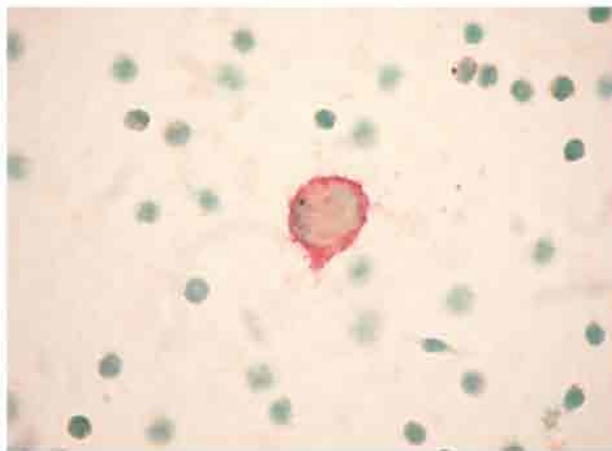
Рис. 5. Метастазы рабдомиосаркомы в костном мозге: *a* — окраска по Паппенгейму; *б* — реакция с MkAT к десмину; *в* — гликоген в цитоплазме клеток при PAS-реакции. Ув. × 1000

рака легкого при обычном цитоморфологическом исследовании опухолевые клетки не удалось выявить. Идентификация их стала возможной лишь при иммуноцитохимическом исследовании с использованием представленной выше панели MkAT (рис. 6).

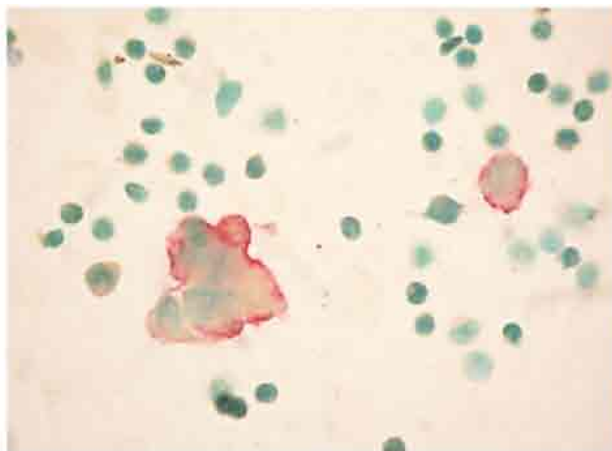
В дифференциально-диагностическом плане иммуноцитохимические методы могут быть также эф-



a



б



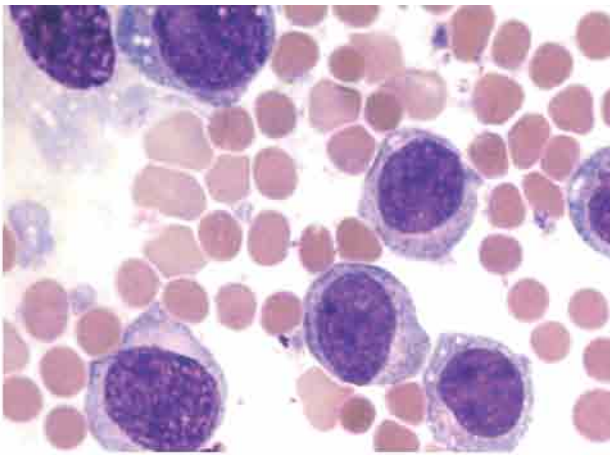
в

Рис. 6. Обнаруженные в плевральном экссудате клетки при раке молочной железы: *a* — реакция на кислую фосфатазу; *б* — экспрессия антигена Her-2/Er4; *в* — экспрессия антигена EMA. Ув. × 1000

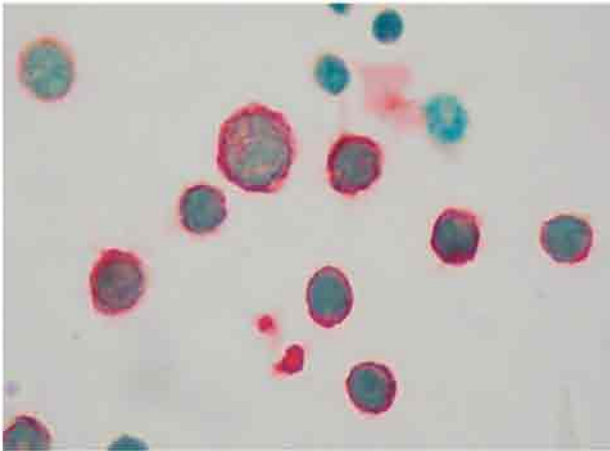
фективно использованы для определения в экссудатах клеток при различных типах лимфом (рис. 7).

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ НЕОПЛАСТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ

Нами разработаны и внедряются в клиническую практику иммуноцитохимические мето-



а



б

Рис. 7. Первичная лимфома экссудатов: а — окраска по Пап-пенгейму; б — экспрессия антигена CD38. Ув. × 1000

ды исследования цитоцентрифужных препаратов спинномозговой жидкости с целью выявления неопластических клеток при первичных опухолях и метастатическом поражении головного мозга (рис. 8). Особое внимание уделяется верификации частных форм астроцитарных опухолей [13], составляющих более 60% всех первичных новообразований, опухолям из клеток мозговых оболочек и бластомам эмбрионального происхождения.

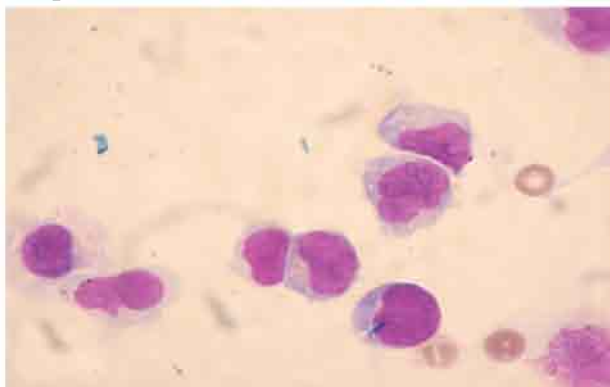


Рис. 8. Клетки медуллобластомы в цитоцентрифужных препаратах спинномозговой жидкости. Окраска по Пап-пенгейму. Ув. × 1000

Работа выполнена при поддержке ООО «Клиника персонализированного дизайна диагностики и терапии «Онкотераностика».

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abramov MG. Clinical Cytology. M: Meditsina, 1974. 336 p. (in Russian).
2. Manual on Immunohistochemical Diagnosis of Human Tumors, 4th ed. Petrov SV, Raikhlin NT (eds). Kazan, 2012. 624 p. (in Russian).
3. Cardozo LL. Atlas of Clinical Cytology. Amsterdam: Elsevier, 1975. 732 p.
4. Gown AM. Manual on Diagnostic Immunohistochemistry. Seattle: PhenoPath, 1999. 89 p.
5. Volchenko NN, Savostikova MV. Atlas of Cytological and Immunocytochemical Diagnosis of Tumors. M: Repotsentr, 2010. 235 p. (in Russian).
6. Pinchuk VG, Gluzman DF, Nadgornaya VA, et al. Immunocytochemistry and Monoclonal Antibodies in Oncohematology. Kyiv: Naukova Dumka, 1990. 232 p. (in Russian).
7. Gluzman DF, Sklyarenko LM, Nadgornaya VA, Kriachok IA. Diagnostic Immunocytochemistry of Tumors. Kyiv: Morion, 2003. 156 p. (in Russian).
8. Shevchenko IT, Dashtayants GA. Metastatic Tumors of Bones. Kyiv: Zdorovia, 1967. 203 p. (in Russian).
9. Gluzman DF, Sklyarenko LM, Nadgornaya VA, Klymniuk GI. Immunocytochemical Diagnosis of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues in Children. Kyiv: DIA, 2005. 216 p. (in Russian).
10. Yanovskii DN, Chepeleva MA. Atlas of Cytology of Exudates and Transsudates. Kyiv: Zdorovia, 1968. 68 p. (in Russian).
11. Gluzman DF, Abramenko IV, Sklyarenko LM, Pisiachevskaia GV. Immunocytochemical Diagnosis of Malignant Exudates. Kyiv: Naukova Dumka, 1993. 173 p. (in Russian).
12. Volchenko NN, Borisova OV. Diagnosis of Malignant Tumors based on Serous Exudates: Cytological Atlas. M: Geotar-Media, 2017. 144 p. (in Russian).
13. Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System. Kleihus P, Cavena WK (eds). Lyon: IARC Press, 2009. 314 p.

ІМУНОЦИТОХІМІЧНІ МАРКЕРИ ПРИ ВИЯВЛЕННІ МІКРОМЕТАСТАЗІВ ПУХЛИН

Д.Ф. Глузман, Л.М. Скляренко,
Т.С. Іванівська, А.С. Поліщук

Інститут експериментальної патології, онкології
і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України,
Київ, Україна

Резюме. Наведено результати застосування сучасних імуноцитохімічних методів з метою визначення мікрометастазів різних типів пухлин у дорослих і дітей. Встановлено, що використання спеціально підібраної панелі моноклональних антитіл до онкофетальних, органо- та тканиноспецифічних антигенів, білків цитоскелета полегшує пошук невеликої кількості пухлинних клітин у мазках кісткового мозку, екссудатах із серозних порожнин і в спинномозковій рідині пацієнтів.

Ключові слова: імуноцитохімія, моноклональні антитіла, мікрометастази, кістковий мозок, серозний екссудат.

**IMMUNOCYTOCHEMICAL MARKERS
IN DETECTION OF TUMOR
MICROMETASTASES**

*D.F. Gluzman, L.M. Sklyarenko,
T.S. Ivanivska, A.S. Polishchuk*

*R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine,
Kyiv, Ukraine*

Summary. *The results of application of modern immunocytochemical methods for detection of micrometastases in different types of tumors both in adults and children have been presented. It may be stated that the selected panel of monoclonal antibodies to oncofetal, organ and tissue-specific antigens, cytoskeleton proteins sim-*

plifies the identification of small number of cancer cells in bone marrow, pleural, peritoneal serous effusions and cerebrospinal fluid of the patients.

Key Words: immunocytochemistry, monoclonal antibodies, micrometastasis, bone marrow, serous effusions.

Адрес для переписки:

Глузман Д.Ф.
03022, Киев, ул. Васильковская, 45
Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины
E-mail: gluzman@onconet.kiev.ua

Получено: 07.11.2018