МОДИФИЦИРАНА ТЕХНИКА ЗА ИЗГОТВЯНЕ НА КЛЕТЪЧЕН БЛОК ПРИ ИЗЛИВИ В ТЕЛЕСНИ КУХИНИ

Георги Стоянов, Лиляна Петкова, Деян Дженков, Петър Генев

*Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология,
Факултет по медицина, Медицински университет – Варна*

MODIFIED TECHNIQUE FOR CELL-BLOCK PREPARATION IN EFFUSIONS

George St. Stoyanov, Lilyana Petkova, Deyan Dzhenkov, Peter Ghenev

*Department of General and Clinical Pathology, Forensic Medicine and Deontology,
Faculty of Medicine, Medical University of Varna*

РЕЗЮМЕ

Предоперативната и предтерапевтичната морфологична диагностика при лечението на малигнени състояния е златен стандарт в 21 век. Две са стандартизираните методики за осъществяването ѝ – цитологично и хистологично изследване, като и двете методики имат своите предимства и недостатъци. Междина методика за осъществяването на морфологично диагностициране при пациенти с изливи в телесните кухини и неясно първично огнище е осъществяването на клетъчен блок – филтрация и центрофугиране на големи обеми от телесни изливи, с цел извличане на максимален обем от клетки, агрегирането и фиксирането им подобно хистологичен материал, при което полученият клетъчен агрегат, взет максимално атравматично от пациента, може да бъде обработен подобно хистологична биопсия. Целта на настоящия доклад е изнасянето на симплифицирана методика за осъществяване на клетъчен блок посредством апаратура, широко застъпена в лабораторните центрове в България, позволяваща бързото и ефективно осъществяване на клетъчен блок, подходящ за имунохистохимична диагностика. Бяха използвани стандартизирана лабораторна центрофуга, хепаринизирани вакутейнери и 10% буфериран формалин. Пробите бяха осъществени от изливи при пациенти с три различни туморни локализации, като обемът на изследваната изливна течност беше между 5 и 50 мл, изцентрофугирана двойно на 5300 оборота в минута и фиксиран в 10% буфериран формалин. Описана-

ABSTRACT

Preoperative and pre-therapeutic morphological diagnosis in the treatment of malignant conditions is the gold standard in the 21st century. There are two standardized methodologies for its implementation - cytological and histological, both of which have their advantages and disadvantages. An intermediate methodology for performing morphological diagnosis in patients with effusions in body cavities and unclear primary locus is the implementation of a cellular block - filtration and centrifugation of large volumes of effusions to optimize the amount of cells, their aggregation, as a result of which the material, taken atraumatically from the patient can be processed similarly to a histological biopsy.

The aim of this report is to present a simplified methodology for the realization of a cellular block by means of equipment widely used in the laboratories in Bulgaria, allowing a rapid and efficient implementation suitable for immunohistochemical diagnostics.

A standardized laboratory centrifuge, heparinized vacuum containers and 10% buffered formalin were used. Samples from patients with three different tumor localizations were used, the volume of the test effluent being between 5 and 50 mL, centrifuged twice at 5300 rotations per minute and fixed in 10% buffered formalin. The described methodology provides a quick and easy way to morphologically diagnose patients with malignant effusions. The volume of the precipitated material, even with a small amount of biological fluid, is adequate to produce enough slides for diagnosis. The methodology combines the advantages of standard cytology and histology. Demonstrative

та методика дава бърз и лесен начин за морфологично диагностициране на пациенти с малигнен излив в телесните кухини. Обемът на утаения материал, дори и при малко количество биологична течност, е адекватен за изработване на множество срези, необходими за диагностика. Методиката комбинира преимуществата на стандартното цитологично и хистологично изследване. Показателна за ефективността на методиката е идентичната картина на имуноцитохимия и имунохистохимия при описания случай, където въпреки високите обороти на центрофугиране, са запазени както характеристиките на клетките, така и не са денатурирали диагностичните протеини за изследването.

Ключови думи: биопсия, цитология, клетъчен блок, изливи, неоплазми

ВЪВЕДЕНИЕ

Цитологичната диагностика върху изливи в телесните кухини (перикардна торбичка, плеврална и коремна кухина, тестикуларни обвивки, арахноидално пространство и ставни кухини) е рутинна практика, позволяваща сравнително атравматично за пациента получаване на клетъчен материал, с минимизиране на възможността от поява на усложнения – пневмоторакс, органна перфорация, масивни кръвоизливи и инфекция (1). Понякога цитодиагностиката е много трудна и това е област, в която диагностичните грешки са чести. Трудностите се обуславят от няколко групи причини: на първо място играе роля течната среда, която окръгля всички клетки, както мезотелни, така и туморни, създавайки прилика помежду им. На второ място стоят големите пластични възможности на мезотела и способността му да имитира други клетки – туморни и нетуморни (2-3). Понякога диагностичните клетки в излива са много малко и при обичайните методи за концентриране не попадат в препаратите, което води до хиподиагностика или да бъдат недостатъчни за адекватност на морфологичната оценка. Осъществяването на по-високоспециализирани изследвания, като имуноцитохимични, често е трудно или невъзможно, поради малкото количество клетъчен материал, трудната фиксация и антигенно разкриване и множеството артефакти, даващи възможност за фалшиво позитивни или негативни резултати. Адекватното хистологично изслед-

for the efficiency of the methodology is the identical picture of immunocytochemistry and immunohistochemistry in the case described, where despite the high centrifugation rates both the characteristics of the cells have been retained and the diagnostic proteins have not undergone denaturation.

Keywords: biopsy, cytology, cell block, effusions, neoplasms

ване дава необходим обем материал със запазена структура и клетъчност, подходящ както за стандартно оцветяване с хематоксилин и еозин, така и за хистохимични и имунохистохимични изследвания (4). Получаването на такъв материал обаче посредством пункционните методи понякога е свързано с възникването на усложнения за пациента, а ендоскопските методи често са не само неприятни, но и контраиндирани, освен това изискват и болнично наблюдение след извършване на процедурата. Многократните имуноцитохимични изследвания, свързани с висок разход, често не водят до постигане на диагностична яснота.

Методика с по-висока диагностична достоверност от конвенционалната при пациенти с изливи в телесните кухини и неясно първично огнище е клетъчният блок – клетъчна флотация чрез центрофугиране на телесни изливи с добиване на максимален обем от клетки, с агрегиране и фиксиране, подобно на хистологичен материал, при което полученият клетъчен агрегат, взет максимално атравматично от пациента, може да бъде обработен като тъканна биопсия (5).

Тези методики обаче изискват скъпоструваща апаратура, дълъг период на обработка и високо обучен екип от лаборанти, обработващи пробата. По тези причини клетъчните блокове са недостатъчно застъпени и популярни в България, което рефлектира в чести хистологични биопсии за уточняване на окончателната диагно-

за, най-вече при пациенти с множество органични лезии и неясно първично огнище (6).

Целта на настоящия доклад е представяне на симплифицирана методика за осъществяване на клетъчен блок посредством апаратура, обичайна за патоморфологичните лаборатории в България, позволяваща бързото и ефективно обработване на цитологичен материал, подходящ за имунохистохимична диагностика.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Използвани са стандартизирана лабораторна центрофуга, хепаринизирани вакутейнери и 10% буфериран формалин.

Пробите бяха осъществени от изливи при пациенти с три различни туморни локализации, като обемът на изследваната биологична течност е между 5 и 50 мл.

Използвахме паралелно конвенционално имуноцитохимично изследване на биологична течност и имунохистохимично изследване на клетъчен блок от материала, с последващо сравняване на профила за валидиране на предложената методика.

Инжектирахме изливната течност в хепаринизирани вакутейнери, така че вакутейнерът да поеме сам необходимото количество изследван материал. Последва центрофугиране на 5300 оборота за 20 минути.

След центрофугирането, посредством стерил еднократен капкомер, утайките от вакутейнерите бяха аспирирани, преместени в нов хепа-

ринизиран вакутейнер и отново центрофугирани 20 минути на 5300 оборота.

Образуваният клетъчен агрегат на дъното на съда съдържа утаените клетки и фибрин, спомагащ клетъчната консолидация.

За фиксиране на материала остатъчната течност внимателно се отстрани и замести с 10% буфериран формалин с време за фиксация, в зависимост от обема на утаения материал, като се има предвид, че фиксиращата способност на формалина е 1 мм тъканен обем за час.

След извършване на адекватна фиксация, утаените материали бяха включени в парафиново блокче за рутинна хистологична и имунохистохимична обработка върху парафинови срези.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

И в трите случая се осъществи адекватно утаяване на клетъчен материал:

В първия случай – пациентка с малигнен плеврален излив и белодробни лезии, обем на изследвания материал 5 мл, от който се изработи парафинов блок с достатъчен материал в него за адекватно хистологично и имунохистохимично изследване. От неупотребения за клетъчен блок материал се извърши и стандартно (конвенционално) имуноцитохимично изследване, като резултатите, получени по двата метода, показват еднаква по интензивност и локализация реакция – сравнителният анализ на резултатите установи импонентност и еднаквост на заключението (Фиг. 1).

Фиг. 1. Сравнение на конвенционална цитология и имуноцитохимия с клетъчен блок и имунохистохимия, осъществени от един и същ материал: А – конвенционална цитология, показваща туморни клетки (стрелка), оцветяване по Гимза, оригинално увеличение 400х; В – конвенционална имуноцитохимия без реакция, маркиране с ALK, оригинално увеличение 400х; С – конвенционална имуноцитохимия с позитивна реакция (стрелка), маркиране с CK7, оригинално увеличение 400х; D – конвенционална имуноцитохимия с позитивна реакция (стрелка), маркиране с TTF1, оригинално увеличение 400х; E – клетъчен блок, показващ туморни клетки (стрелка), оцветяване с хематоксилин и еозин, оригинално увеличение 400х; F – клетъчен блок без реакция, имунохистохимично маркиране с ALK, оригинално увеличение 400х; G – клетъчен блок с позитивна реакция (стрелка), имунохистохимично маркиране с CK7, оригинално увеличение 400х; H – с позитивна реакция (стрелка), имунохистохимично маркиране с TTF1, оригинално увеличение 400х.

Вторият случай е от пациентка с малигнен асцит, множество туморни локализации във висцерални органи, обем на изследвания абдоминален излив 25 мл, също с достатъчно утаен материал за включване в парафинов блок и изработване само на един срез, оцветен с ХЕ, доказващ тумор с първична яйчникова локализация (хистологично верифициран).

Третият случай е от пациент с диагностициран при аутопсия хепатоцелуларен карцином и асцит, обем на изследваната течност 50 мл. Утаен стълб с ширина 1 и височина 4 см, предоставен за включване в повече от един парафинов блок. Бе взета и тъкан от първична чернодробна лезия за сравнение. Изследването на материала от клетъчния блок показва наличие на реактивни мезотелни клетки и неутрофили без малигнен епителни клетки в изследвания материал, със заключение – бактериален перитонит. Хистологичното изследване на първичното огнище установи хепатоцелуларен карцином.

Описаната методика дава бърз и лесен начин за морфологично диагностициране на пациенти с малигнени изливи в телесните кухини. Обемът на утаения материал, дори и при малко количество биологична течност, е адекватен за изработване на множество срези, необходими за диагностика.

Методиката комбинира преимуществата на стандартното цитологично и хистологично изследване.

Изработването на клетъчен блок изисква повече време от стандартното цитологично изследване, но е с по-висока диагностична достоверност.

Резултатите са идентични при конвенционално имуноцитохимично изследване на клетки от изливи в телесни кухини и имунохистохимично изследване върху срези от клетъчен блок, изработен по предложения метод.

При клетъчния блок са запазени морфологичните характеристики на клетките и изследвания протеинен състав в достатъчен обем, което дава възможност и за молекулярно биологично и генетично изследване върху материала.

ИЗВОДИ

Представена е ефективна методика за осъществяване на клетъчен блок, неизискваща скъпоструваща апаратура, даваща адекватни по обем и качество материали за включване в парафинов блок и имунохистохимично изследване.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fribley WJ. Fine-needle aspiration biopsy: a review. *Hum Pathol* (1983) 4(1):9-28. doi:10.1016/s0046-8177(83)80042-2
2. Dekker PA, Bupp PA. Cytology of serous effusions. An investigation into the usefulness of cell blocks versus smears. *Am J Clin Pathol* (1978) 70(6):855-60. doi:10.1093/ajcp/70.6.855
3. Mishra R, Sharma A, Goyal V, Goyal V, Thapar M. Critical analysis of cell block versus smear examination in effusions. *J. Cytol.* (2009). doi:10.4103/0970-9371.55223
4. Massad L S, Collins YC. Strength of correlations between colposcopic impression and biopsy histology. *Gynecol Oncol* (2003) 26(2):60-4. doi:10.1016/S0090-8258(03)00082-9
5. Nathan NA, Narayan E, Smith MM, Horn MJ. Cell Block Cytology. *Am J Clin Pathol* (2004) 114(4):599-606. doi:10.1309/g035-p2mm-d1tm-t5qe
6. Fetsch PA, Simsir A, Brosky K, Abati A. Comparison of three commonly used cytologic preparations in effusion immunocytochemistry. *Diagn Cytopathol* (2002) 26(1):61-6. doi:10.1002/dc.10039

Адрес за кореспонденция:

Георги Стоянов
Катедра по обща и клинична патология,
съдебна медицина и деонтология
Медицински университет – Варна
ул. „Марин Дринов“ 55
Варна 9002
e-mail: georgi.geesh@gmail.com