

## Диагностическая ценность цитологического метода приследовании клеточного состава плевральной жидкости

1 — Алтайский филиал Российского онкологического центра им. Н.Н.Блохина РАМН

2 — ГУЗ "Алтайский краевой онкологический диспансер", г. Барнаул

O.G.Grigoruk, A.F.Lazarev, L.M.Bazulina

## Diagnostic value of cytologic investigation of cell count differential of pleural fluid

### Summary

The cell count differential of pleural fluid sample is of great importance for estimation of the nature of pleural effusion. In the present article, we compared the efficiencies of routine cytology method with light microscopy, cytological examination with centrifuge Cytospin-4 and immunocytochemical methods. We have studied cytological samples from 1597 patients, with pleural effusion. Effusions associated with malignancies were reported in 22.7 % of patients including carcinomatosis (74.6 %), primary tumors of pleura (21.5 %), effusions associated with non-epithelial malignancies (3.9 %). Benign pleural effusions were reactive (63.6 %), tuberculous (13.5 %), "cholesterol pleurisy" and chylothorax (0.2 %). Carcinomatous pleuritis was found in patients with lung carcinoma (55.4 %), breast cancer (21.8 %) and ovary cancer (12.2 %). Specific malignant features (direct and indirect) were noted in pleural fluid on breast cancer, carcinomas of ovary, stomach, kidney, small cell lung carcinoma and squamous cell lung carcinoma. These features are hardly detected in patients with malignancies of intestines, prostate and endometria because these types of tumours are rarely metastatic to pleura. We were failed to define particular features of lung adenocarcinoma. The centrifuge Cytospin-4 was used in the most difficult cases (13.5 %) providing minimal number of presumable diagnosis. Primary tumours of pleura are the most difficult for detection. Immunocytochemical analysis found monoclonal mesothelial cell of HBEM-1 clone, cytokeratin, vimentin to be positive and carcinoembryonic antigen, Ber-EP4, CD-15 to be negative in the studied tumors.

### Резюме

В дифференциальной диагностике природы экссудата изучение клеточного состава эвакуированной плевральной жидкости имеет чрезвычайно важное значение. В настоящем исследовании нами была поставлена цель оценить эффективность использования цитологического метода диагностики рутинным способом с использованием центрифуги *Cytospin-4* и методов иммуноцитохимии. Был изучен цитологический материал 1 597 больных с накоплением жидкости в плевральной полости. Плевриты при злокачественных опухолях были отмечены у 22,7 % больных, в числе которых карциноматозы (74,6 %), первичные опухоли плевры (21,5 %), плевриты при злокачественной неэпителиальной опухоли (3,9 %). Неопухольевые плевриты были представлены реактивными плевритами (63,6 %), туберкулезными (13,5 %), холестериновыми и хилезными (0,2 %). Карциноматозные плевриты чаще отмечены при раке легкого (55,4 %), молочной железы (21,8 %) и яичников (12,2 %). Патогномоничные признаки опухоли в плевральной жидкости (прямые или косвенные) отмечены при раке молочной железы, яичника, желудка и раке почки, а также при мелкоклеточном и плоскоклеточном раке легкого. Определить такие признаки при раке кишечника, предстательной железы и эндометрия в виду редких метастазов в плевре затруднительно. Особых признаков, характерных для аденогенного рака легкого, не обнаружено. В диагностически сложных наблюдениях были использованы возможности цитоцентрифуги *Cytospin-4* (13,5 %), с ее помощью количество предположительных цитологических диагнозов сведено к минимуму. Наиболее сложным для диагностики являются первичные опухоли плевры. При иммуноцитохимическом изучении исследуемые опухоли были положительны на опухолеспецифичный иммуноморфологический маркер мезотелиомы антитела клона HBME-1, цитокератина, виментин при отрицательной реакции на раково-эмбриональный антиген, Ber-EP4 и CD-15.

Известно более 50 этиологических факторов, ведущих к появлению жидкости в плевральных полостях [1]. Заболевание плевры выявляют в среднем через 2 нед. после обращения больного за медицинской помощью, верифицируют причину плеврита и назначают адекватное лечение в среднем через 47 дней от начала заболевания [2]. Причиной такого положения является отсутствие четких диагностических критериев у большинства больных с выпотом в плевральной полости.

Основным методом диагностики экссудативного плеврита является рентгенологический метод в сочетании с компьютерными и ультразвуковыми исследованиями [1]. Особое значение в определении природы экссудата имеет изучение клеточного состава

эвакуированной плевральной жидкости [1, 3]. Учитывая разноречивые данные о возможностях цитологического исследования экссудатов при плевритах, нами была поставлена цель оценить эффективность использования цитологического метода диагностики рутинным способом с использованием центрифуги *Cytospin-4* и методов иммуноцитохимии.

### Материалы и методы

Были изучены данные цитологического материала 1 597 больных с плевритом за 2002–2005 гг. Плевральная жидкость на исследование чаще поступала из отделения поликлиники ГУЗ "Алтайский краевой онкологический диспансер" (ГУЗ АКОД), включая

Таблица 1  
Общая характеристика плевритов

№	Характеристика плеврита	Количество больных 2002–2005 гг.
I	Плеврит при химическом, лучевом воздействии, а также бактериальном, вирусном и асептическом воспалении	1 234
II	Плеврит при злокачественной опухоли	363
A	Карциноматозный плеврит	271
Б	Плеврит при злокачественной неэпителиальной опухоли	14
В	Плеврит при первичной опухоли плевры (мезотелиоме)	78
Всего обследуемых больных		1 597

дневной стационар (56,0 %). Из различных отделений ГУЗ АКОД, из противотуберкулезного диспансера и в качестве консультаций из различных ЛПУ города и края плевральные жидкости поступали на исследование соответственно в 26,9; 15,3 и 1,8 %.

Исследование начиналось с оценки макроскопического вида, цвета и консистенции доставленной жидкости. Затем ее центрифугировали по стандартным методикам, окрашивали по методике Паппенгейма, изучали на световом микроскопе. В части наблюдений использовали окраску Папаниколау, позволяющую лучше визуализировать ядерный хроматин. С помощью цитоцентрифуги *Cytospin-4* монослойные препараты готовились только у тех больных, у которых при исследовании обычного центрифугата возникали диагностические трудности. При необходимости использовали методики окрашивания на слизь и определение гликогена.

При подозрении на первичную опухоль плевры проводили иммуноцитохимическое исследование, подготовив препараты на цитоцентрифуге. Иммуноцитохимические исследования проводили по стандартной методике. Для визуализации реакции "антиген / антитело" использовали стрептавидин-биотин-овую тест-систему LSAB2 для CD-15 *EnVision+* ("ДАКО"). В качестве хромогена использовали DAB ("ДАКО"). Для верификации новообразования был использован набор маркеров, состоящий из антител к цитокератинам (С MNF 116, С AE1 / AE3), CEA, Ber-EP4, *Vimentin*, CD-15 и HBME-1 (*Mesothelial Cell*) [4, 5].

Полученные данные сопоставляли с последующим клиническим течением заболевания с учетом данных канцер-регистра и гистологическим изучением операционного материала первичной опухоли.

## Результаты

При проведении цитологической диагностики были необходимы полная клиническая информация о больном, предварительный клинический диагноз, из какой полости и в каком объеме получен выпот, интервалы между пункциями, если эвакуация жидкости проводилась неоднократно. О характере патологического процесса можно было судить после изучения всех имеющихся препаратов, принимая во внимание все цитологические признаки клеточных элементов, нередко с учетом динамики изменений в количественном и качественном соотношении.

Клетки пролиферирующего и реактивно измененного мезотелия, возникающие при химическом, лучевом воздействии на серозные оболочки, а также при бактериальном, вирусном и асептическом воспалении были обнаружены у 1 234 (77,3 %) больных (рис. 1). Карциноматоз серозных оболочек выявлен у 271 больного, злокачественная мезотелиома плевры была диагностирована в 78 наблюдениях, плеврит при злокачественной неэпителиальной опухоли обнаружен у 14 пациентов (табл. 1). Потребность ис-

пользования цитоцентрифуги *Cytospin-4* возникала в 13,5 %.

С целью подтверждения туберкулезной этиологии плеврита необходимо проведение бактериологического и бактериоскопического (окраска по Цилю–Нильсену) исследования экссудата. В настоящей работе исследование клеточного состава экссудата у больных из противотуберкулезного диспансера проводилось с целью исключения опухолевого процесса. Из противотуберкулезного диспансера была доставлена плевральная жидкость 232 больных, у 16 из которых были обнаружены клетки злокачественного новообразования (6,9 %). В 14 наблюдениях опухоль была представлена аденогенным раком, в 1 — плоскоклеточным и в 1 — мезотелиомой.

Цитологическое заключение при плеврите туберкулезной этиологии, как правило, носило описательный характер. Принцип постоянства клеточного состава экссудатов — преобладание лимфоцитов — положен в основу цитологической диагностики туберкулезных плевритов (рис. 2). Большинство авторов указывают на преимущественно лимфоцитарный клеточный состав экссудатов как выражение туберкулезного влияния [6]. Однако при остро развивающемся выпоте туберкулезного характера обнаруживается большое число сегментоядерных

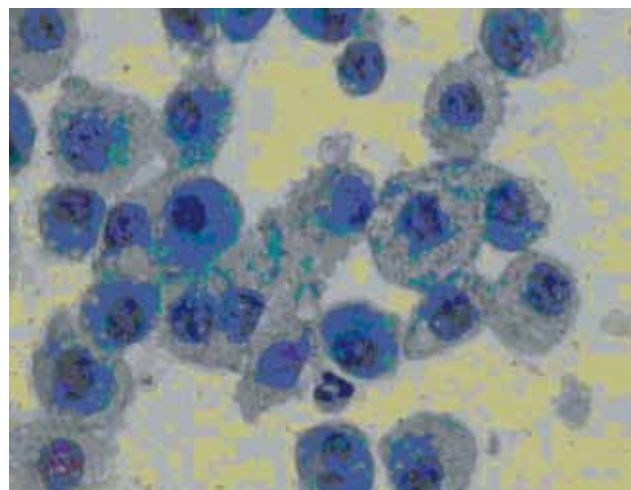


Рис. 1. Проплиферация мезотелиоцитов. Окраска по Май-Грюнвальду; × 400

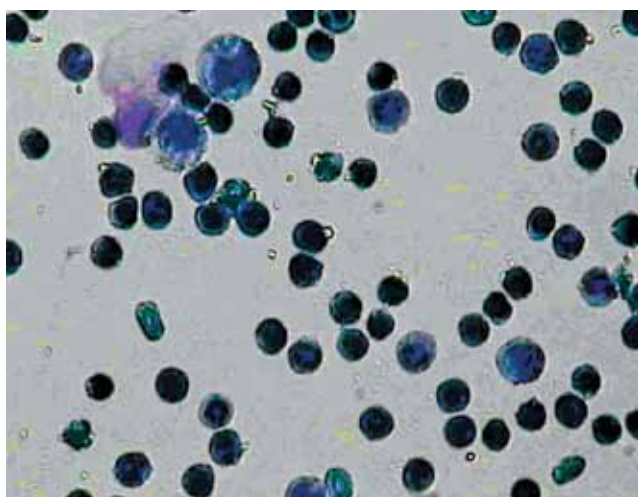


Рис. 2. Преобладание зрелых лимфоцитов (косвенный признак туберкулезного плеврита). Окраска по Май-Грюнвальду;  $\times 400$

нейтрофилов. Иногда в плевритах туберкулезной этиологии нарастает число эозинофилов. Продукты творожистого распада, эпителиоидные клетки, многоядерные клетки Пирогова—Лангханса в плевральной жидкости в настоящем исследовании обнаружены не были.

При хронической сердечной недостаточности в плевральной жидкости обнаруживаются характерные многоядерные клетки "симпласты" с большим числом светлых монотрофных ядер, расположенных скученно в центре "симпласта" или по кругу. Подобная цитограмма была обнаружена у 15 больных (0,9 %), плевральная жидкость которых была доставлена на консультацию преимущественно из кардиологического центра.

К числу неопухолевых экссудатов относятся также холестериновые и хилезные, которые в практической работе встречаются редко (3 наблюдения — 0,2 %). Холестериновый плеврит — это застарелый осумкованный плеврит, при пункции которого обычно с трудом удается добыть густую жидкость желтоватого цвета. При микроскопии холестерино-

вого экссудата обнаруживаются ромбовидные пластинки холестерина с надломленными в виде ступенчатых углами (рис. 3). Хилезные экссудаты возникают при патологических процессах, влекущих за собой нарушение целостности лимфатических сосудов и излияние лимфы в плевральную полость без развития воспалительной реакции со стороны плевральных листков. По внешнему виду такой плевральный выпот напоминает молоко. При микроскопическом исследовании хилезного экссудата определяются капельки жира.

Диссеминация злокачественных опухолей по серозным оболочкам является частой причиной накопления жидкости в плевральной полости у онкологических больных. Полученные цитологические данные о больных с наличием опухолевых элементов в плевральной жидкости были сопоставлены с данными о последующем клиническом течении заболевания изучаемых пациентов с учетом данных канцер-регистра диспансера и гистологического изучения операционного материала первичной опухоли.

Чаще других онкологических заболеваний в плевральной жидкости был обнаружен аденогенный рак — 242 пациента (табл. 2). Накопление жидкости в плевральной полости при раке легкого было выявлено у 150 больных, что составило большую часть карциноматозов — 55,4 % и 41,3 % всех наблюдений злокачественных плевритов (табл. 2). Мелкоклеточный и плоскоклеточный рак легкого наблюдали у 12 и 8 больных (7,4 %). Рак молочной железы с накоплением плевральных выпотов обнаружен в 21,8 % от числа всех карциноматозов, рак яичников — в 2,2 %, рак желудка — в 5,1 %, рак почки — в 2,6 %, другие злокачественные эпителиальные опухоли — в 3,0 % (табл. 2). Были изучены и оценены клеточные элементы, характерные для карциноматозных плевритов. При микроскопии метастазов аденогенного рака различных локализаций во всех наблюдениях обнаружены железистоподобные структуры, кото-

Таблица 2

*Характеристика карциноматозных плевритов*

№	Карциноматозный плеврит	Количество больных 2002–2005 гг.
1	Аденокарцинома:	242
	легкое	130
	молочная железа	59
	яичники	33
	желудок	14
	тело матки	3
	прямая кишка	1
	сигмовидная кишка	1
	предстательная железа	1
2	Плоскоклеточный рак легкого	8
3	Мелкоклеточный рак	12
4	Почечно-клеточный рак	7
5	Плоскоклеточный рак пищевода	2
	Всего обследуемых больных	271

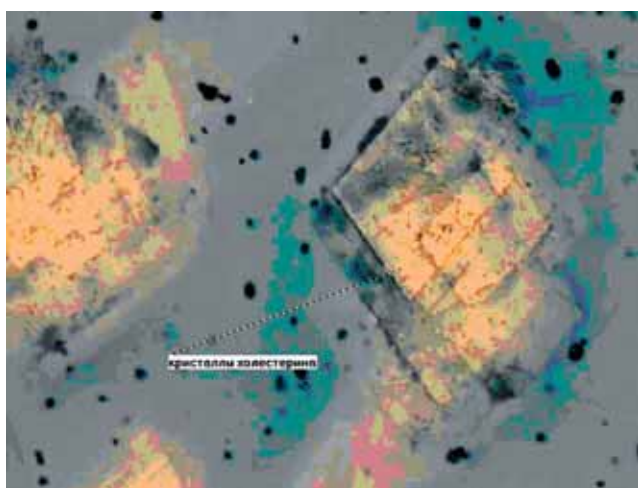


Рис. 3. Кристаллы холестерина. Окраска по Май-Грюнвальду;  $\times 400$



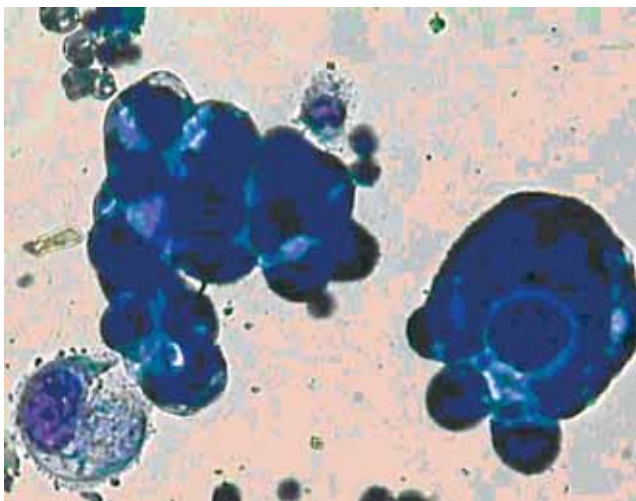


Рис. 4. Аденогенный рак (легкое). Окраска по Май-Грюнвальду;  $\times 400$

рые имеют больше однотипных признаков опухолевых клеток, чем различий. Предполагать первичную локализацию опухоли весьма проблематично.

Цитологическая картина экссудата при метастазе рака легкого в большинстве наблюдений имела обильный клеточный состав, состоящий из комплексов опухолевых клеток в виде папиллярных и различного вида железистоподобных структур (рис. 4). Особые признаки, характерные для аденогенного рака легкого, не обнаружены. При мелкоклеточном раке легкого в плевральной жидкости сохраняется характерный признак клеточной "притертости", также как наличие ракеткообразных и ладевидных клеток среди детритных масс при плоскоклеточном раке.

Опухолевые клетки в экссудатах при раке молочной железы образуют комплексы шаровидной формы с радиальным упорядоченным расположением однотипных опухолевых клеток [7]. Такие патогномоничные структуры обнаружены в 80,6 % наблюдений метастазов рака молочной железы в плевру. Клетки с признаками своеобразной секреции — вен-

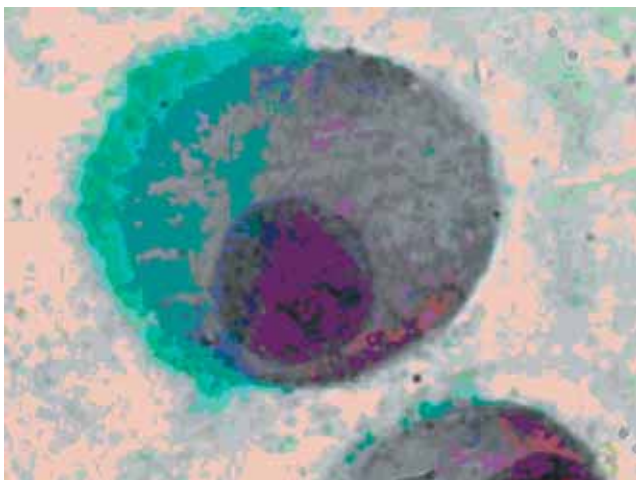


Рис. 5. "Венчик" слизи при аденокарциноме яичника. Окраска альциановым синим;  $\times 1\,000$

чик тонких волокон с одного полюса клетки, напоминающих реснички, характерен для рака яичника (рис. 5). Опухолевые клетки рака желудка у 10 больных были представлены аденокарциномой, в 4 наблюдениях — перстневидно-клеточным раком, при котором отдельные клетки принимают форму перстня с деформированным ядром и вакуолью со слизью, занимающей почти все клеточное тело. При обычном окрашивании цитоплазма с вакуолью выглядит "пустой", при окрашивании альциановым синим слизь принимает голубой цвет. При метастазе рака тела матки в плевральную полость отмечаются многомерные комплексы железистого строения, вишневатого переходящие один в другой. Особенностью почечно-клеточных раков является интенсивно вакуолизированная "кружевная" цитоплазма. В числе метастатических поражений плевры обнаружены по 1 наблюдению рак пищевода, прямой и сигмовидной кишки, а также предстательной железы (0,4 %).

Злокачественные опухоли неэпителиальной природы были в 9 наблюдениях представлены неходжкинской лимфомой. В материале из осадка жидкости при лимфоме обнаружены опухолевые клетки лимфоцитарного ряда той или иной степени зрелости. У двух больных были обнаружены опухолевые клетки саркомы при первичной плеоморфной рабдомиосаркоме плеча и остеогенной саркоме верхней челюсти. Одно наблюдение эпителиоидноклеточной меланомы выявлено при первичном образовании на волосистой части головы и другое — при плазмоцитоме. При меланоме в экссудате обнаружены полиморфные опухолевые клетки с обильной цитоплазмой, содержащей гранулы меланина с признаками "траурной каймы". При плазмоцитоме опухолевые клетки имели большое сходство с плазмócитами, отличались более крупными размерами и многоядерностью.

Злокачественная мезотелиома диагностирована у 78 больных. Первичные опухоли плевры отличались наибольшими трудностями диагностики. У 13 больных (16,7 %) только многократные исследования жидкости позволили обнаружить опухолевые клетки мезотелиомы, в 25 наблюдениях (32,1 %) цитологически констатировали злокачественную опухоль, предполагали мезотелиому. Эпителиальная мезотелиома определена в 71 наблюдении (91,0 %). Двухфазная (смешанная) мезотелиома диагностирована в 6 (7,7 %) и в 1 (1,3 %) — саркомоподобная мезотелиома.

Клеточный состав мезотелиомы чрезвычайно разнообразен [7]. Клетки опухоли имеют большое сходство с железистым раком. Нередко признаки анаплазии клеток при мезотелиоме отсутствуют, тогда их трудно дифференцировать с пролиферирующими мезотелиоцитами [8]. При высокодифференцированной эпителиальной мезотелиоме наблюдаются плотные округлые однотипные образования в виде "шаров", состоящие из мелких клеток (рис. 6). Во всех 29 наблюдениях отмечено сходство цитограмм.

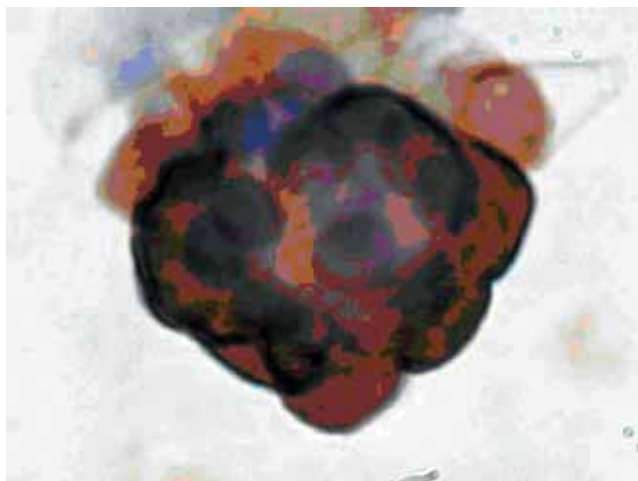


Рис. 6. Положительная иммуноцитохимическая реакция на мезотелин (HBME-1) в комплексе клеток эпителиальной мезотелиомы;  $\times 1\,000$

При эпителиальной мезотелиоме низкой дифференцировки выражен полиморфизм клеток с многочисленными митозами (до 4 в поле зрения).

При двухфазной мезотелиоме клеточные скопления напоминают эпителиальные, а также клетки, характерные для фибросаркомы [9]. В саркомоподобной мезотелиоме обнаружены обширные клеточные скопления из гиперхромных фибробластоподобных клеток, образующих плотные с небольшими ответвлениями структуры.

При использовании цитоцентрифуги *Cytospin-4* диагноз мезотелиомы стало возможным установить у 20 больных (25,6 %), в 13 наблюдениях (16,7 %) при отрицательной окраске на слизь клетки опухоли имели положительную реакцию на гликоген. Иммуноцитохимическое исследование было проведено у 37 (47,4 %) больных мезотелиомой, при отрицательной реакции на раково-эмбриональный антиген (CEA), Ber-EP4 и CD-15 клетки опухоли положительны на HBME-1 (*Mesothelial Cell*), *Vimentin* и цитокератины (С MNF 116, С AE1 / AE3) [10]. Дифференцировали мезотелиому с аденогенным раком в 30 наблюдениях, из которых 18 при использовании дополнительных методик окрашивания в окончательном диагнозе были отнесены к мезотелиоме. В 8 из этих наблюдений был установлен диагноз аденогенного рака легкого, в 2 — рак яичника, в 2 — молочной железы.

## Обсуждение

При экссудативном плеврите неясного генеза главная цель — установить диагноз. Высокая реактивность серозного покрова обуславливает большое разнообразие мезотелиального клеточного состава жидкостей серозных полостей. Выраженная пролиферация и реактивные изменения мезотелия возникают при воспалении. Клетки слущенного мезотелия варьируют по объему, в разной интенсивности окрашиваются, создают впечатление "полиморфизма" клеток, что мо-

жет вызвать ошибочное предположение о наличии опухоли. В настоящей работе пролиферирующий мезотелий был заподозрен в отношении принадлежности к клеткам опухоли в 4 наблюдениях (0,3 %).

Плевральный выпот, в котором более 50 % клеток составляют зрелые лимфоциты, в большинстве случаев свидетельствует о туберкулезе. Как правило, при этом мезотелиальные клетки единичные. При лимфоме обнаруживаемые лимфоциты атипичные и значительно больше число пролиферирующих мезотелиоцитов.

Патогномоничные признаки опухоли в плевральной жидкости (прямые или косвенные) наблюдались при раке молочной железы, яичника, желудка и раке почки. Определить такие признаки при раке толстой кишки, предстательной железы и эндометрия в виду редких метастазов в плевру затруднительно. Необходимость использования цитоцентрифуги возникла в 13,5 % исследований всех плевральных жидкостей. Использование цитоцентрифуги *Cytospin-4* позволило сократить предположительные цитологические диагнозы.

Дифференциальная цитологическая диагностика мезотелиомы и аденогенного рака вызывает наибольшие трудности при исследовании экссудатов. В большинстве наблюдений (89,7 %) диагноз мезотелиомы стал возможным при внедрении в клиническую практику новых методов обработки жидкостного материала (использование цитоцентрифуги *Cytospin-4*), применении наряду с классическими цитологическими методами уточняющих методов исследований (цитохимических и иммуноцитохимических).

## Заключение

Злокачественные опухоли в плевральной жидкости выявлены в 22,7 % от числа всех больных с накоплением экссудата в плевральной полости. Карциноматоз серозных оболочек наблюдали чаще всего — у 74,6 %, первичные опухоли составили 21,5 %, неэпителиальные — 3,9 %. Злокачественная опухоль обнаружена у 6,9 % больных из противотуберкулезного диспансера.

Определенные цитологические признаки позволяют диагностировать рак молочной железы с накоплением плевральных выпотов, рак яичника, желудка и почки (41,7 %). Особые признаки, характерные для аденогенного рака легкого, не обнаружены. Диагностика мелкоклеточного и плоскоклеточного рака возможна, патогномоничные признаки опухолевых клеток сохраняются.

Диагноз мезотелиомы при цитологическом исследовании вызывает наибольшие трудности. Установить диагноз мезотелиомы удалось при использовании дополнительных методов обработки и окрашивания жидкости: применения цитоцентрифуги (25,6 %), цитохимических окрасок на слизь и гликоген (16,7 %), иммуноцитохимических исследований на мезотелин, виментин, цитокератины

(47,4 %). В дифференциальной диагностике аденогенного рака и мезотелиомы иммуногистохимические исследования являются необходимыми, позволяя установить окончательный морфологический диагноз.

## Литература

1. Добровольский С.Р., Белостоцкий А.В. Диагностика и лечение экссудативного плеврита. Хирургия 2002; 3: 52–57.
2. Ханин А.Л., Варин А.А. Врачебные ошибки в ведении больных с заболеваниями плевры. Клин. мед. 1999; 77 (5): 49–52.
3. Light R.W. Diagnostic principles in pleural disease. Eur. Respir. J. 1997; 10 (2): 476–481.
4. Глузман Д.Ф., Скляренко Л.М., Надгорная В.А., Крячок И.А. Диагностическая иммуноцитохимия опухолей. Киев: Морион; 2003.
5. Dejmek A., Brockstedt U., Hjerpe A. Optimization of a battery using nine immunocytochemical variables for distinguishing betwin epithelial mesothelioma and adenocarcinoma. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scan. 1997; 105: 889–894.
6. Тюхтин Н.С., Строгова Н.А. Экссудативный плеврит у детей и подростков. Пробл. туб. 1997; 5: 31–32.
7. Липова В.А., Котов В.А. Дифференциальная диагностика опухолей по клеточному составу серозных жидкостей. СПб.; 2003.
8. Бычков М.Б., Шапилов А.К., Иванова Ф.Г., Горбунова В.А. Мезотелиома плевры и брюшины. Рос. онкол. журн. 1997; 4: 48–51.
9. Travis W.D., Colby T.V., Corrin B. et al. Histological typing of lung and pleural tumors. New York: Springer Verlag; 1999.
10. Kayser K., Bohm G., Blum S. et al. Glyco- and immunohistochemical refinement of the differential diagnosis between mesothelioma and metastatic carcinoma and survival analysis of patients. J. Pathol. 2001; 193 (2): 175–180.

Поступила 22.02.06  
© Коллектив авторов, 2007  
**УДК 616.25-008.8-076.5**