

# Жидкостная цитология в оптимизации цитологической диагностики

Шабалова И.П.

Кафедра клинической лабораторной диагностики  
Российской медицинской академии  
последипломного образования

- В настоящее время увеличивается актуальность морфологических исследований в связи с возможностью уточнить характер заболевания и интерпретировать данные, полученные с помощью других методов

# ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

A microscopic image of a cytological smear. The background is a light, off-white color. There are several large, irregularly shaped cells with a pinkish-red cytoplasm and dark purple nuclei. Some cells are clustered together, while others are more isolated. There are also many smaller, individual cells with similar staining. The overall appearance is that of a typical cytological preparation used for diagnostic purposes.

Оценка морфологических особенностей клеток и неклеточных элементов в цитологическом препарате (мазке) с целью установления морфологического диагноза неопухолевых поражений, доброкачественной или злокачественной опухоли

- Цитологическое исследование-признанный метод морфологической диагностики
- Цитологический диагноз является равноценным гистологическому основанием к выбору метода лечения
- Точность цитологической диагностики приближается к результатам гистологического исследования или превосходит их

## Ограничения цитологической диагностики

- Материал не получен
- Клетки «пропущены» при осмотре
- Проблемы интерпретации
  - Недостаточный опыт цитолога
  - Объективные сложности
    - Редкие опухоли и опухолеподобные поражения
    - Опухоли, уточнение гистологической формы которых требует дополнительных методов диагностики
    - Сложные в диагностическом отношении поражения
    - Пограничные состояния
    - Неопухолевые поражения, морфологические сходные с опухолями
    - Прочие
- Инфекционные поражения, при которых необходимы дополнительные методы исследования

Жидкостная цитология – метод,  
основанный на стандартизации  
технологии приготовления  
цитологических препаратов из жидкой  
клеточной суспензии

Впервые цитоцентрифуга как аппарат, от принципа работы которого отталкиваются современные модели, описана Watson в 1966 году

- С помощью ЖЦ можно обрабатывать жидкости, содержащие клетки (спинномозговая, синовиальная, выпотные жидкости, моча, смывы физиологическим раствором, в том числе БАЛ (бронхоальвеолярный лаваж) и др.



# Öèòîöáíòðèòóãà Cytospin



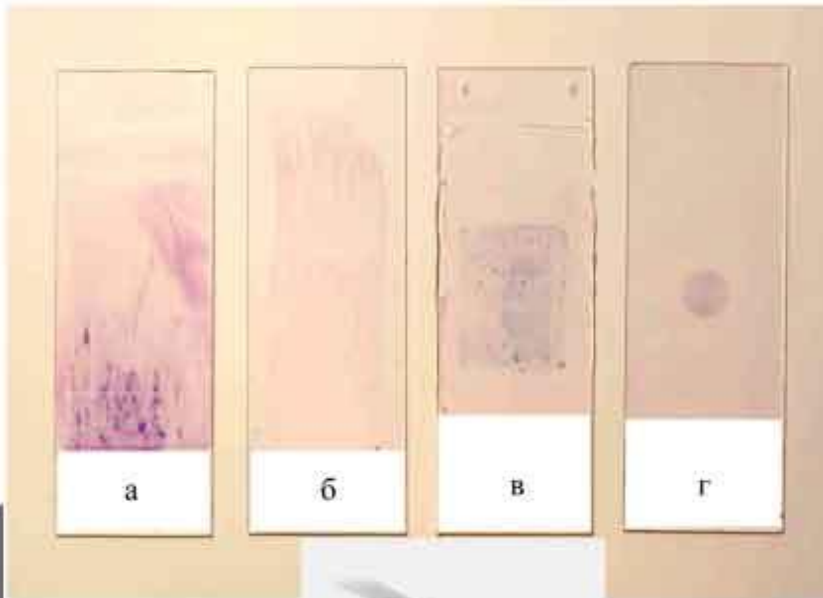
Традиционные  
препараты

Cytospin -  
препараты

# Преимущества метода

- Быстрое приготовление препарата (клеточный материал распределяется непосредственно на стекле)
- Стандартный тонкослойный препарат
- Можно использовать любой метод окрашивания
- Быстрый и удобный просмотр: препарат однослойный, занимает небольшую площадь (6 - 10 мм в диаметре)
- Благодаря «закрытой» системе снижен риск инфицирования персонала, который приготавливает препараты

# ЖИДКОСТИ (выпот, моча, спинномозговая, содержимое кист), мокрота



*Метод жидкостной цитологии*

*Приготовление тонкослойных цитологических препаратов*



Cellspin II

# Цитоцентрифуга Cellspin II

# *Метод жидкостной цитологии*

## *Приготовление тонкослойных цитологических препаратов*



цитоцентрифуга - ROTOFIX 32

**Метод жидкостной цитологии**  
*Приготовление тонкослойных цитологических  
препаратов*



# Эксфолиативный, функциональный, биопсийный материал

- помещается в специальный стабилизирующий раствор
- транспортная среда «консервирует» собранный клеточный материал, создает оптимальные условия доставки собранных клеток в лабораторию

# Метод жидкостной цитологии при исследовании пунктатов, эндоскопического материала



Микропробирки





- В зависимости от характеристик среды его можно хранить в течение нескольких месяцев и использовать для повторного приготовления препаратов (в том числе для иммуноцитохимического исследования), при необходимости применения молекулярно-генетических методов.
- Возможно приготовление из суспензии клеточных блоков.

# Жидкостная цитология

□ Ручной способ –  
Цитоцентрифугирование



□ Полуавтоматический способ –  
обогащение клеток на градиенте плотности



□ **Автоматический** способ –  
**цитологический процессор**



# Метод жидкостной цитологии в гинекологии



HSIL  
(тяжелая дисплазия)



x1000



# Материал

- 4745 женщин от 15 до 77 лет ( $32 \pm 9,55$  года)
- 8 (0,17%) - неинформативный материал

**1060** наблюдений с результатами ВПЧ-тестирования и наличием референтного гистологического диагноза

# Плоскоклеточные поражения выявлены

- при традиционном исследовании  
-  
у 35 (19,3%) пациенток
- При жидкостной цитологии –  
у 76 (41,5%)
- При прицельной биопсии  
у 101 (55,1%)

# Преимущества метода жидкостной цитологии:

- В контейнер попадает весь материал, взятый щеточкой
- Из одного контейнера можно приготовить несколько препаратов
- Тонкослойные препараты удобны для микроскопии
- Клетки сохраняют морфологические, молекулярно-биологические свойства
  - можно уточнить характер поражения без повторного гинекологического обследования (любое молекулярно-биологическое исследование)
- Длительный срок хранения исследуемого материала

# Особенности метода жидкостной цитологии

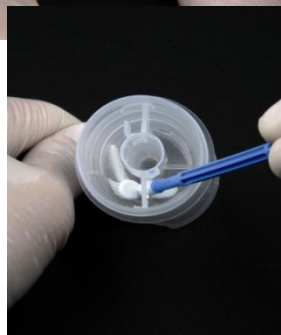
- Препарат представляет собой «усредненный» клеточный состав
- Желательно окрашивать препараты по Папаниколау или гематоксилин-эозином
- При окрашивании методом Романовского (Паппенгейма, Лейшмана и др.) плохо видна структура ядра



# Метод жидкостной цитологии в гинекологической практике



Щеточка CERVEX BRUSH



Контейнер NOVAPREP®



Щеточка для взятия материала –  
CYTOPREP, стабилизирующий  
раствор CYTO-screen



## Приготовление тонкослойных цитологических препаратов

- Возможность автоматизации приготовления препаратов
- Возможность автоматизации скрининга
- Возможность использования дополнительных молекулярных исследований

# Автоматизированные системы

- Автоматизированные системы для ЖЦ берут на себя большую часть однообразной работы.
- Впервые автоматизированные технологии приготовления цитологических препаратов с использованием жидкостной системы предложены в 1998 году в США (ThinPrep, AutoCyte Prep)

# Жидкостная цитология

□ Ручной способ –  
Цитоцентрифугирование



□ Полуавтоматический способ –  
обогащение клеток на градиенте плотности



□ **Автоматический способ –  
цитологический процессор**

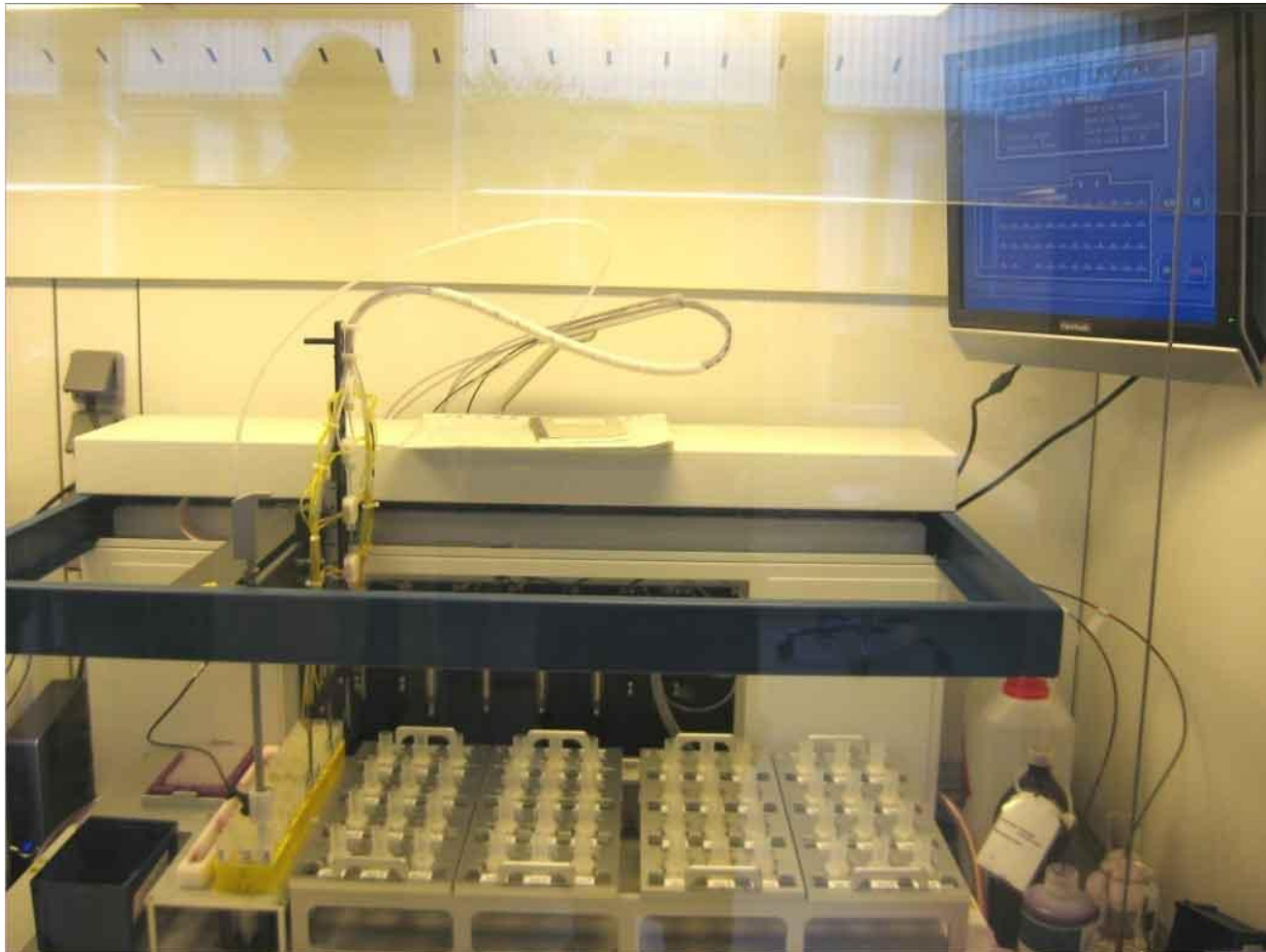




PrepMate®

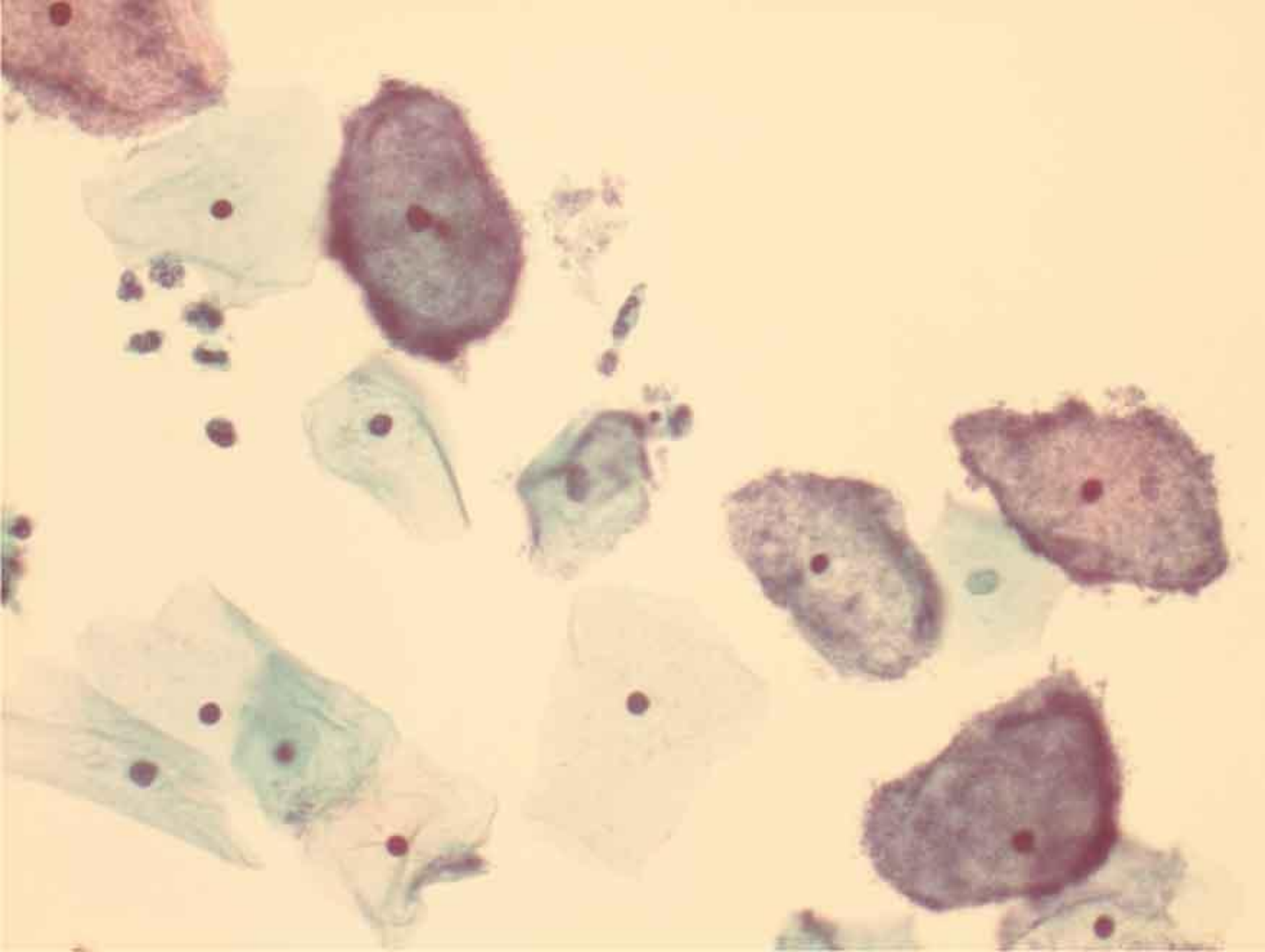
TriPath SurePath (BD)

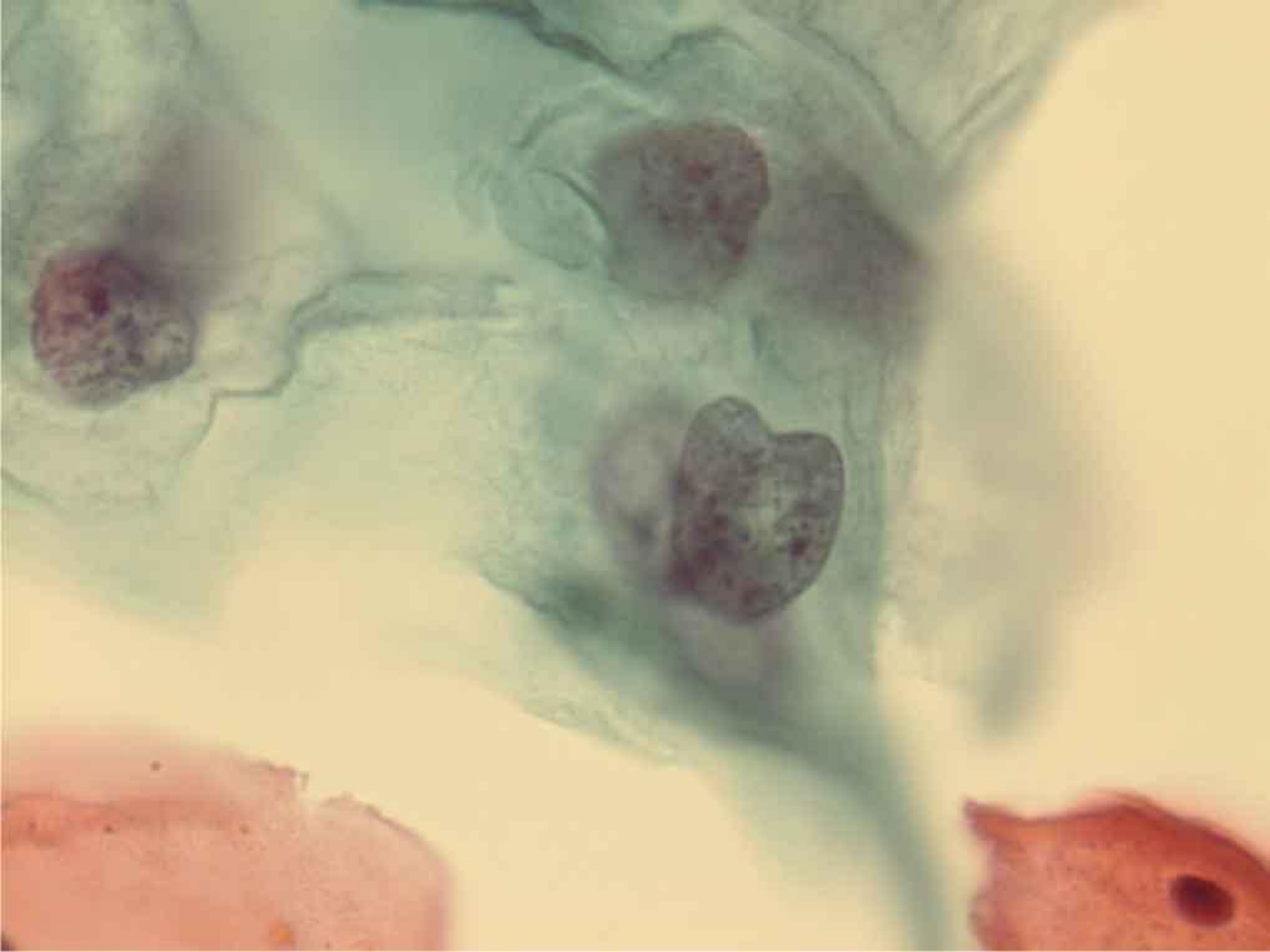
# PrepStain аппараты



FROM: 107851  
Q2008Z-2870  
01

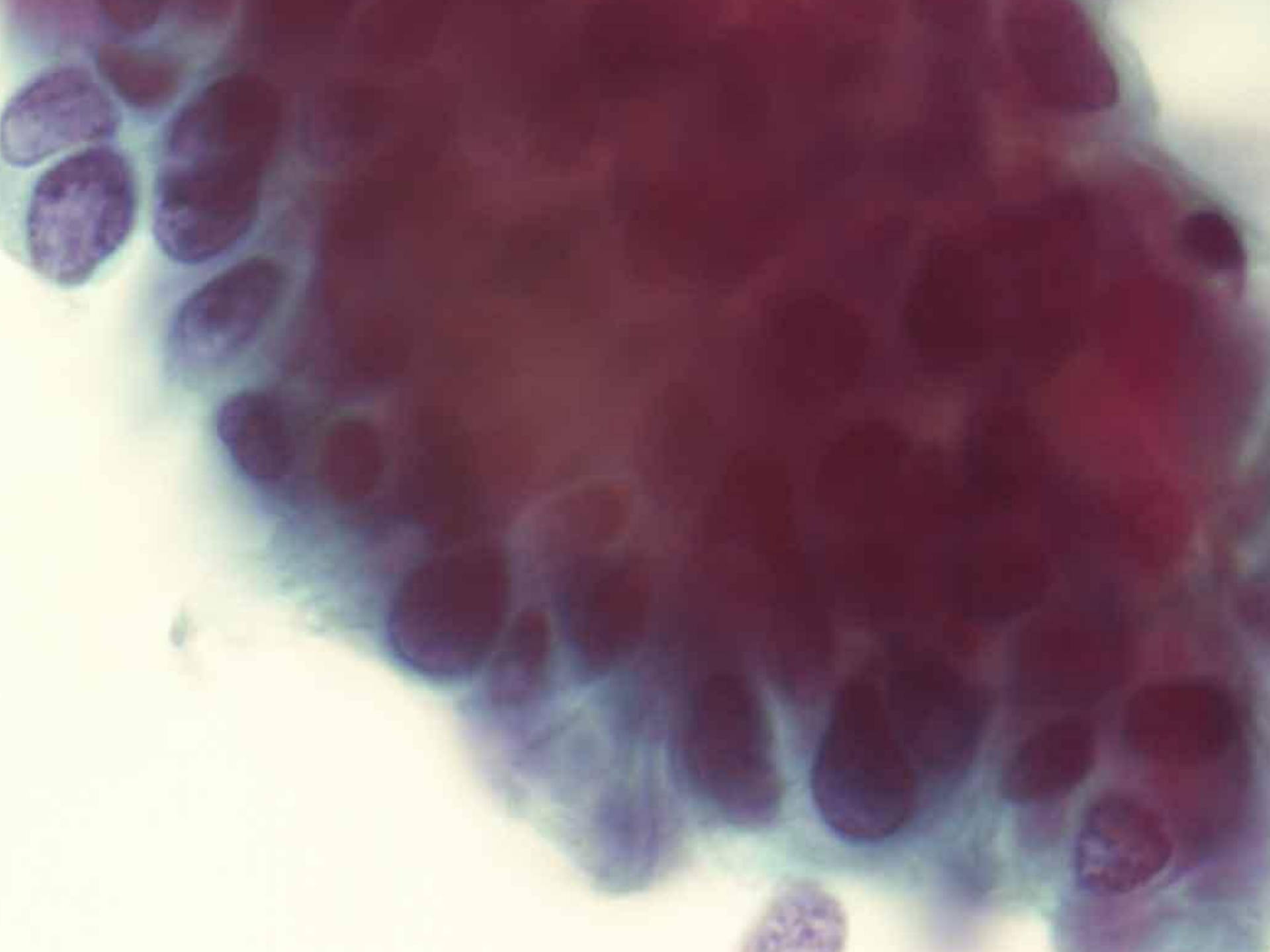












# Жидкостная цитология

□ Ручной способ –  
Цитоцентрифугирование



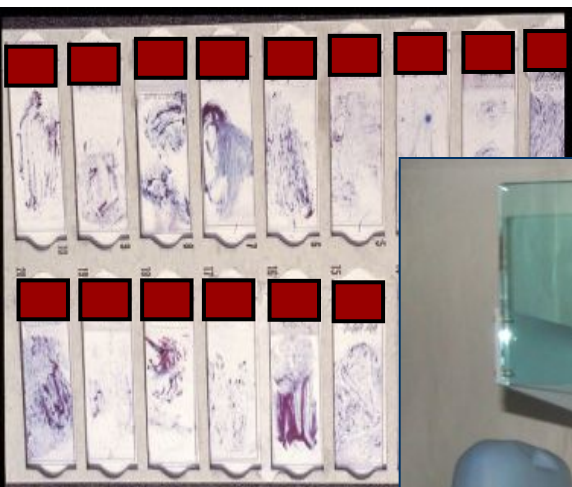
□ Полуавтоматический способ –  
обогащение клеток на градиенте плотности

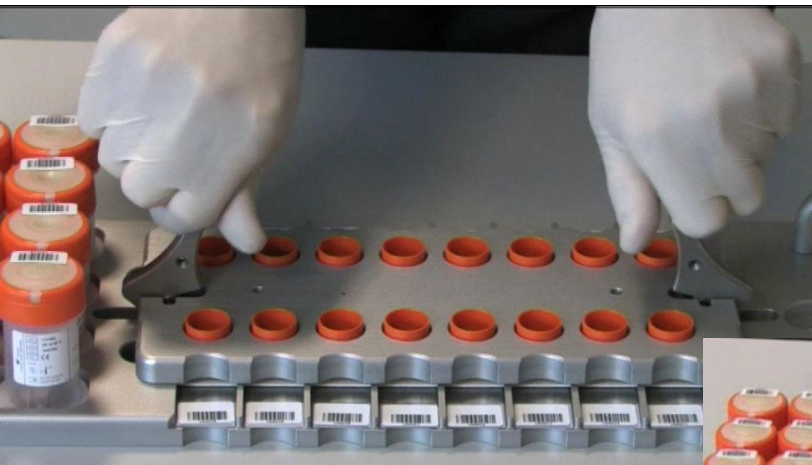


□ **Автоматический способ –  
цитологический процессор**



# Аппарат для автоматизированной жидкостной цитологической диагностики NOVAPREP® "NPS"





Двойное обогащение клеточного состава



Абсорбция жидкости – тонкослойный препарат



Отбор проб для молекулярного  
тестирования

- Существуют системы, выполняющие и часть рутинной работы, связанной с просмотром препаратов.
- Цитотехнику или врачу-цитологу остается только просмотреть выделенные клетки, которые компьютер идентифицировал как отличающиеся от нормы, оценить их и установить диагноз.



# Автоматизированный просмотр препаратов

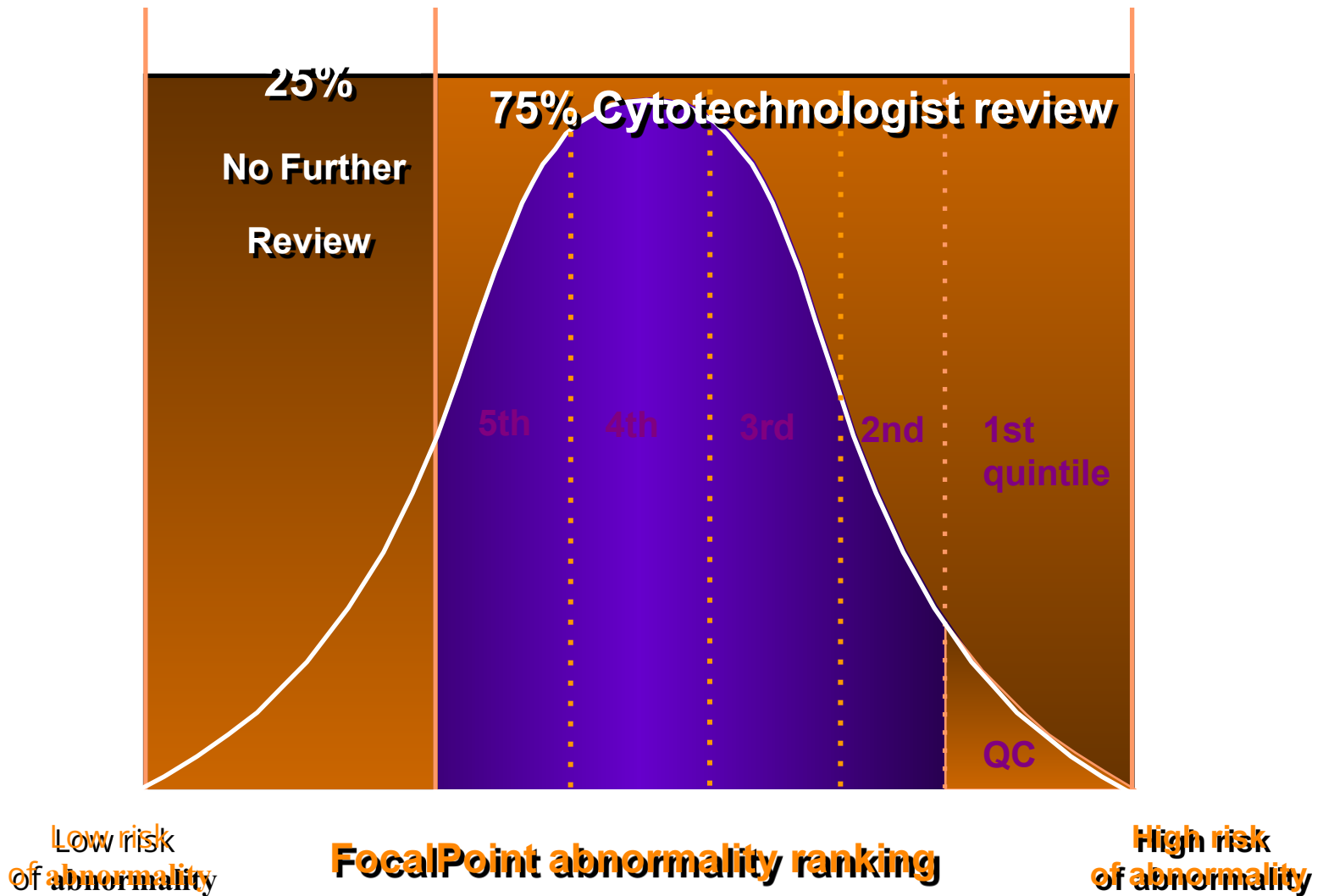
FocalPoint

8 препаратов в  
кассете

До 36 кассет  
одновременно (288  
стекла)



# FocalPoint Slide Scoring



Slide Selection

Enter Slide ID:

00-0065239-0

- 00-0065634-0
- 00-0065353-0
- M 00-0065354-0
- 00-0065355-0
- 00-0065236-0
- M 00-0065062-0
- M 00-0065061-0
- M 00-0065062-0
- 00-0065245-0
- 00-0065239-0
- 00-0065240-0
- M 00-0065241-0
- 00-0065242-0
- 00-0065243-0
- M 00-0065356-0
- 00-0065357-0
- 00-0065358-0
- 00-0065359-0
- 00-0065360-0
- 00-0065056-0
- 00-0065057-0
- 00-0065058-0
- 00-0065059-0
- 00-0065060-0
- M 00-0065633-0
- 00-0065632-0
- M 00-0065635-0
- M 00-0065636-0

Description	Value
Barcode	00-0065239-0
FocalPoint Action	Review
Quintile Ranking	4th
Report Message	
Slide Status	Not reviewed
Endocervical Component	Detected
Squamous Cells	Detected
Percentile Ranking	64%
Numeric Ranking	19/30
User	FocalPoint
Slide Preparation Type	SurePath Glass
Processing Date	3/9/2005 12:21:46 PM
FocalPoint Instrument	instr126
Print Set	2
Process Status	Scan completed

Control

Slide

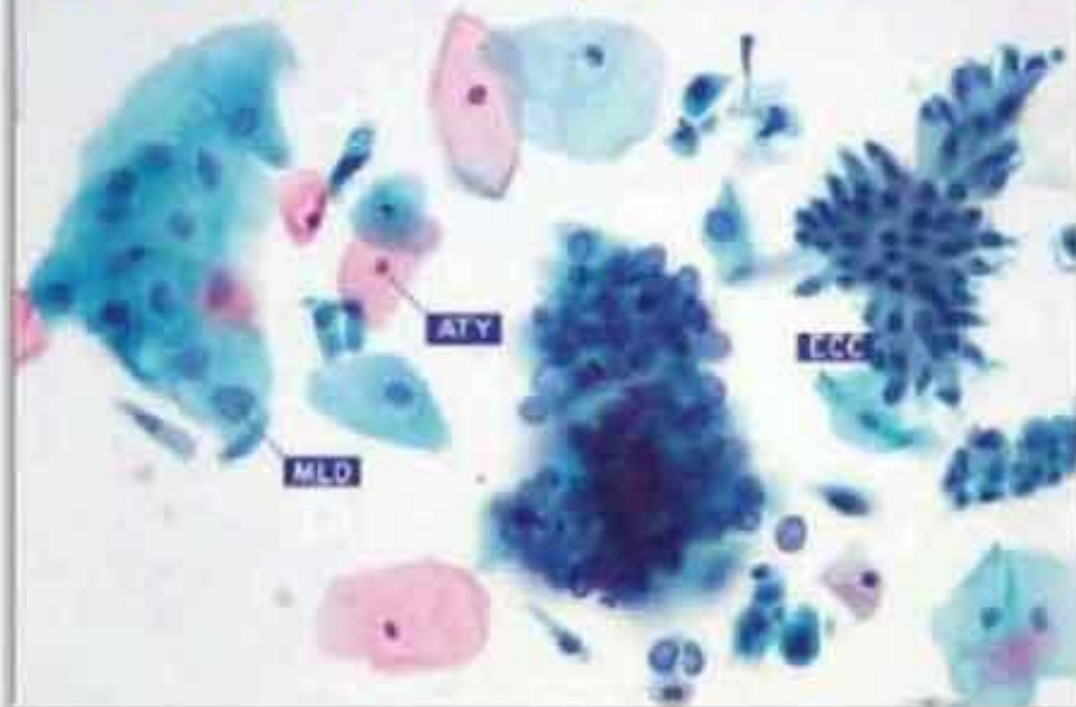
Review

Eval

No Eval

Calibrate

# FocalPoint GS SYSTEM Computer Monitor



Preview

MLD

Dysplasia

- MLD
- MCD
- ICD
- ATY

Atypical

- ACD
- ATY
- ACC

Malignant

- OS
- ISC

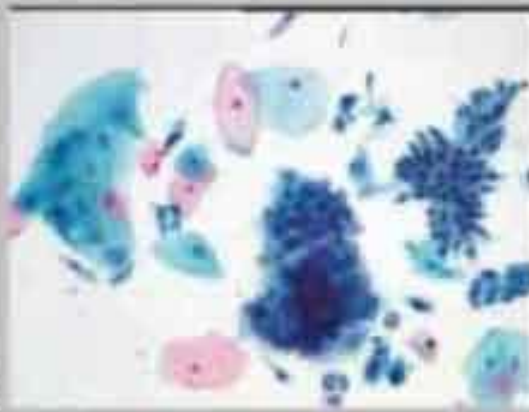
Detail

Print

Close

Zoom

Diagram



# Просмотр препаратов



- **Просмотр препарата под микроскопом**
- **При нажатии специальной педали или стрелки – автоматический перевод на следующую отмеченную точку(10x)**
- **При необходимости – традиционный просмотр с любым увеличением**

# Автоматизированный просмотр препаратов

- Поиск патологических изменений
  - При их отсутствии – заключение о норме
  - При их наличии – трактовка обнаруженных изменений

Работа цитотехников из рутинной  
утомительной работы способна  
превратиться в творческий процесс –  
ИСКУССТВО интерпретации

- 750 лабораторий в США используют автоматизированные системы скрининга
- 70% тонкослойных препаратов исследуются с помощью компьютерного анализа изображений

- Let's make adjustment to better culture of metaplastic and endocervical cells
- 750 laboratories in the U.S. use T15
- 70% of ThinPrep slides in U.S. are evaluated using T15

CYTOL  
2010

1350





- 750 лабораторий в США используют автоматизированные системы скрининга
- 70% тонкослойных препаратов исследуются с помощью компьютерного анализа изображений

### ThinPrep Imaging System - Summary

- At least as accurate as manual screening.
- As with FocalPoint, false-negatives do occur.
- Sensitivity enhancement (25-50%) than

Чувствительность скрининга в выявлении LSIL по традиционным препаратам – 86%, автоматизированный метод – 92%, В выявлении HSIL соответственно 93% и 97%

CYTOLOGY  
2010

b SCC



CY

b

# Жидкостная цитология и молекулярные исследования

*Иммуноцитохимическое исследование*

*Проточная цитометрия*

*Гибридизация in situ на цитологическом материале*

ISH FISH CISH SISH

*Генетический анализ на цитологическом материале*

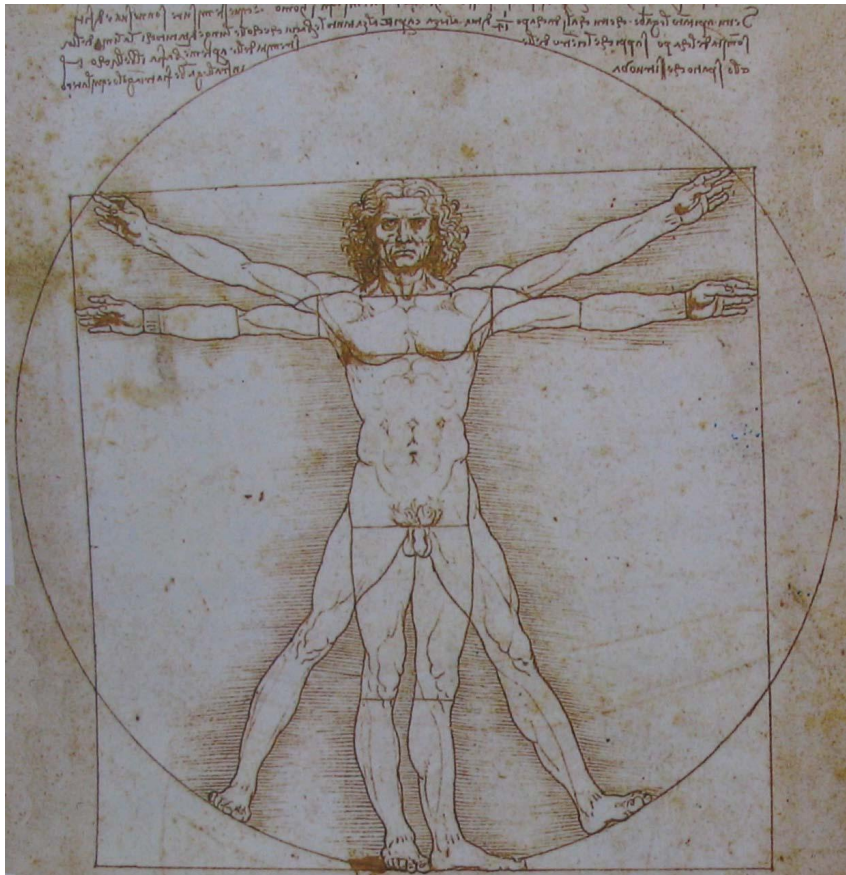
Мутации

PCR секвенирование

Экспрессия мРНК

RT-PCR

qRT-PCR



## Практически здоровый человек

- Геномика (ДНК – около 25 000 генов)
- Функциональная геномика (транскриптомика) (мРНК 100.000 мРНК)
- Протеомика (100.000.000 белков)
- Метаболомика (2500 молекул)

- Есть изменения в клетках – установить причину и характер
- Есть данные о патологическом процессе, полученные другими методами – определить, есть ли изменения в клетках

Белки:

Экспрессия, гиперэкспрессия

Гены:

Амплификация

Делеция

Транслокация

Мутация,

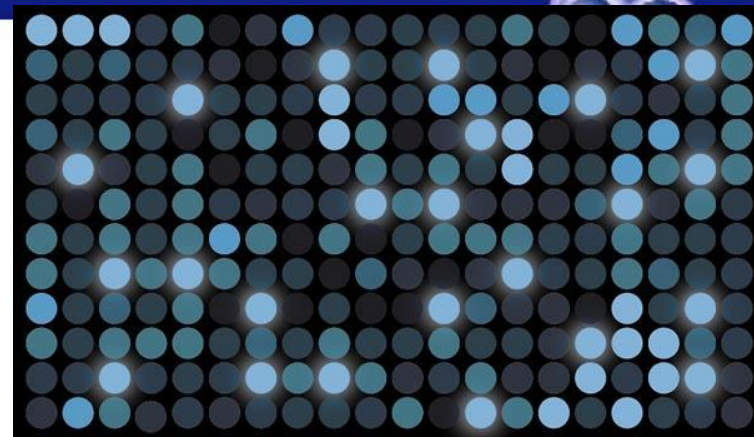
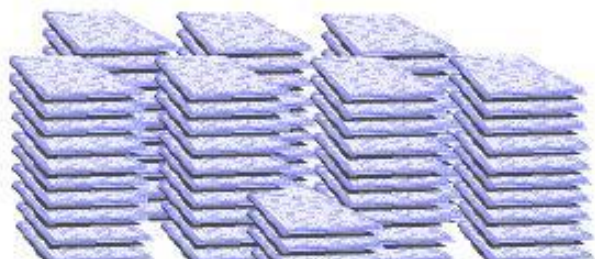
в том числе SNP (single nucleotide polymorphism),

точечная мутация

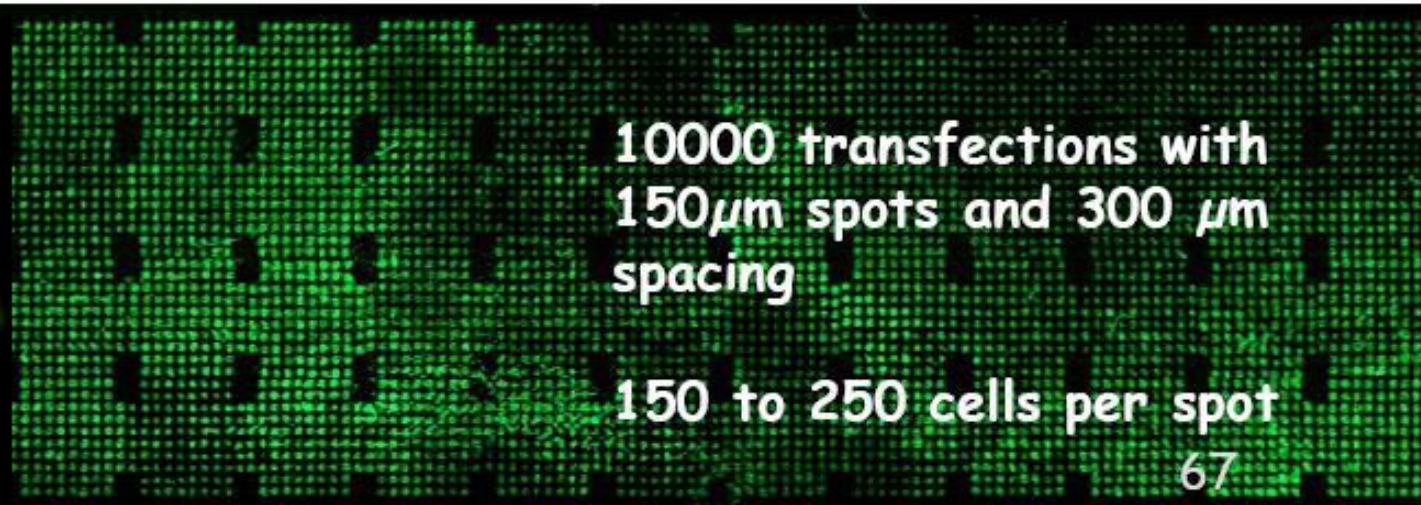
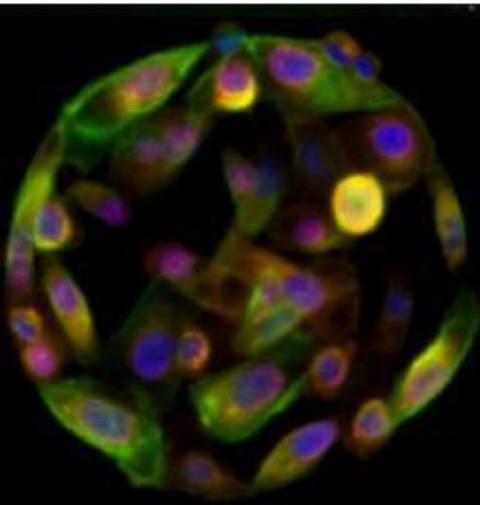
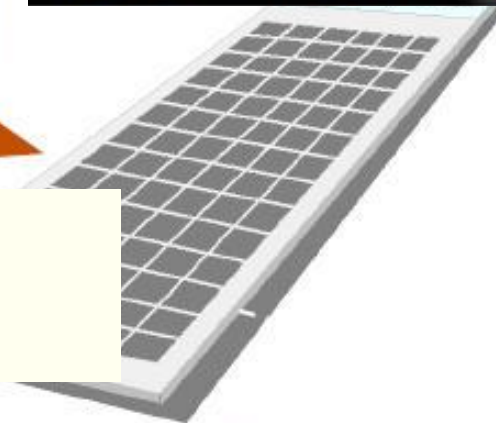
Установление диагноза рака  
Подтверждение диагноза  
Прогноз  
Лечение

# Микрочипы, биочипы

siRNAs from 20 x 384 well plates  
printed as a microarray



поломки в генетическом аппарате клеток на  
клеточном материале, нанесенном на  
«микрочипы»



10000 transfections with  
150 $\mu$ m spots and 300  $\mu$ m  
spacing

150 to 250 cells per spot

# Микрочипы

- Генетические поломки
- Белки
- Антигены
- Рецепторы

# ПЦР, RT-PCR, Hybrid Capture, NASBA и др.

Возможны ложноположительные  
и ложноотрицательные результаты  
И ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО  
И МОЛЕКУЛЯРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ



# Молекулярные исследования при заболеваниях шейки матки

- **Совместное применение** цитологического метода и тестов на ДНК ВПЧ значительно снижает риск «проскальзывания» больных через «сеть» цитологического скрининга.

# Молекулярные исследования при заболеваниях шейки матки

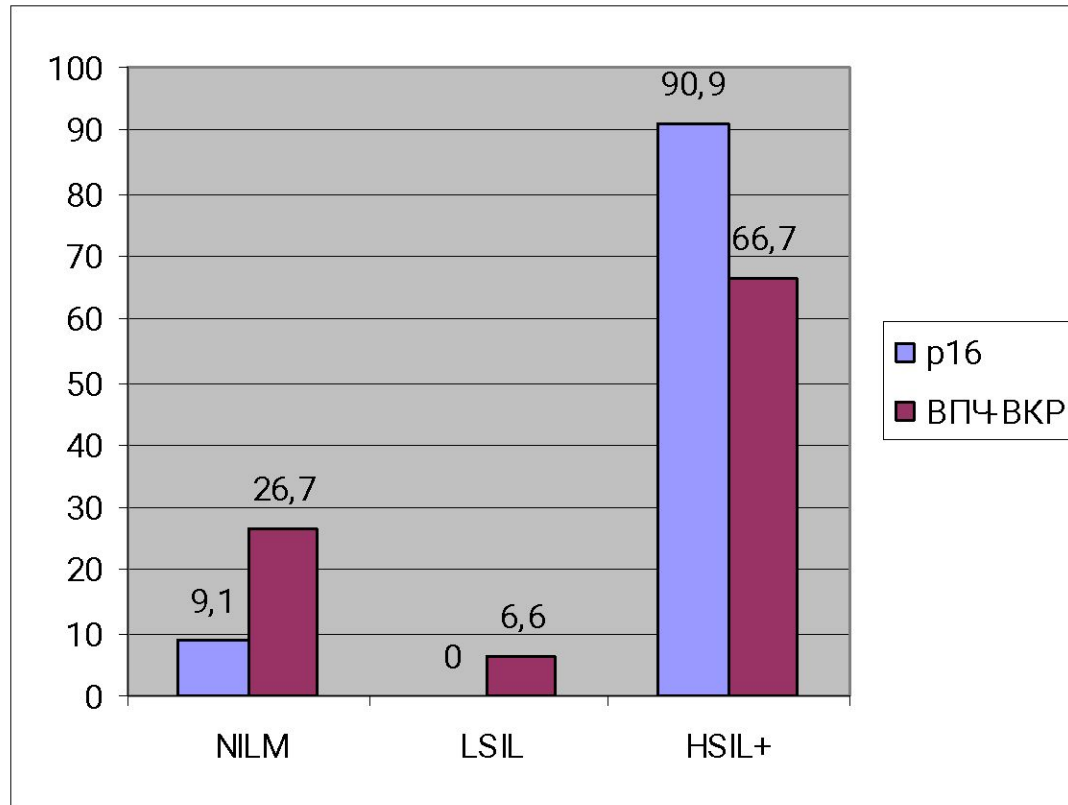
Диагностика и прогноз развития интраэпителиальной неоплазии

- p16, p53
- Метилирование ДНК

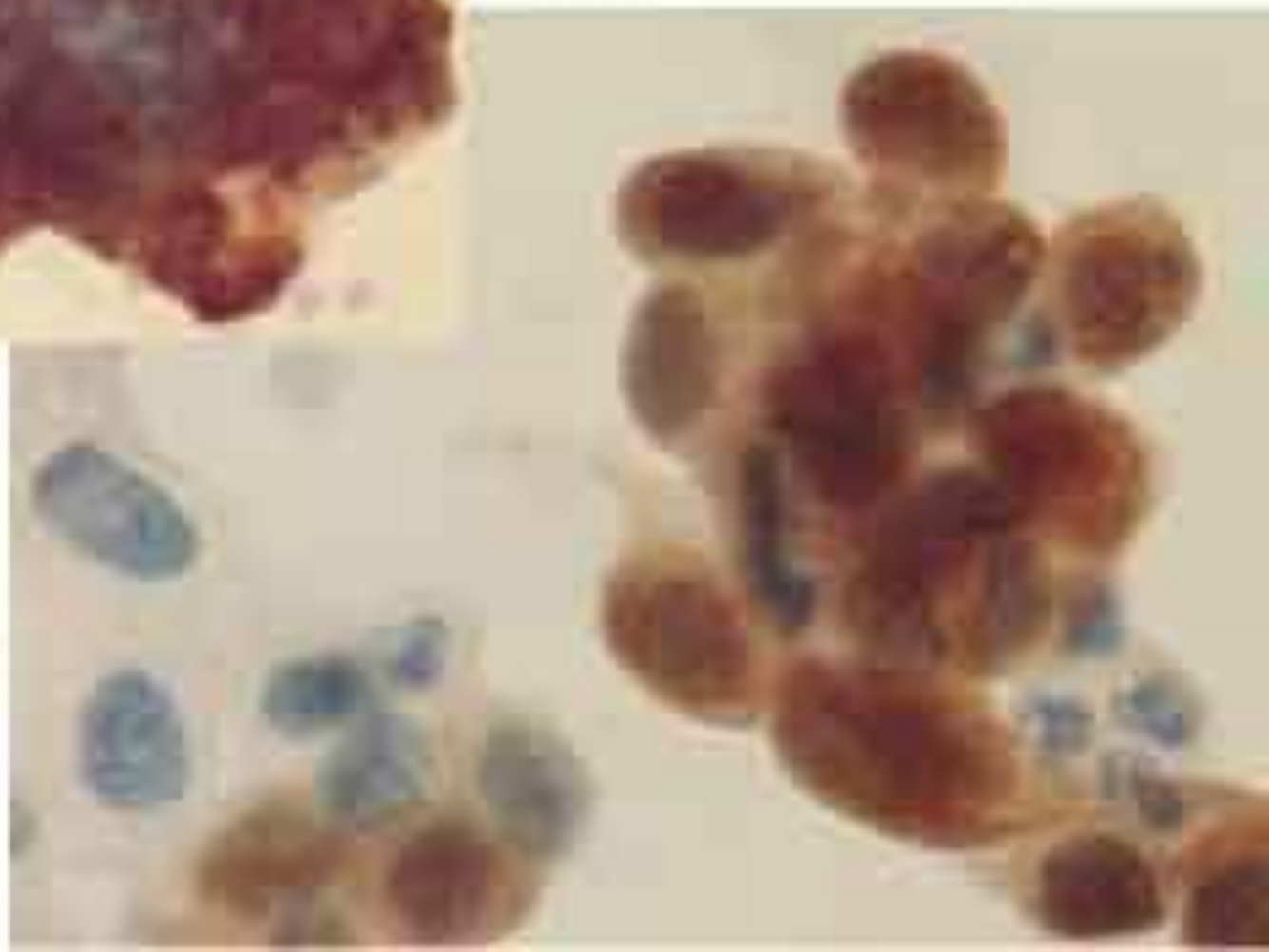
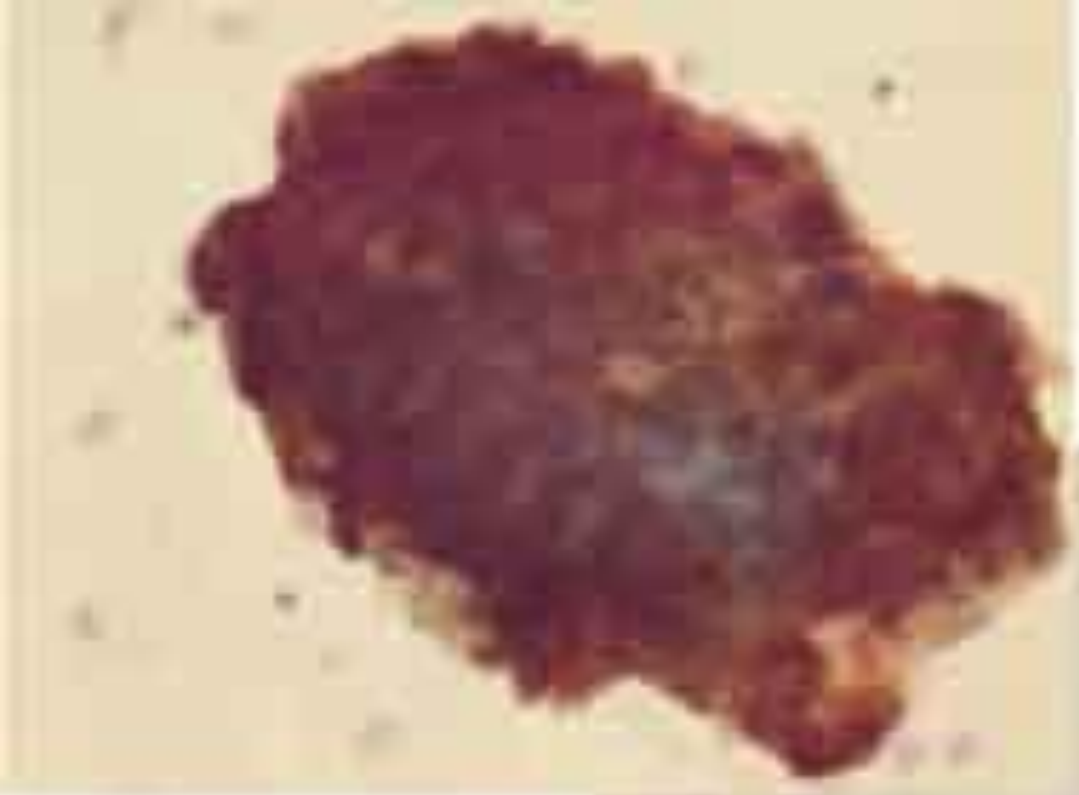
Гены DAPK, HIN1, MGMT, RAR- $\beta$ , RASSF1A, SHP1 – увеличение с увеличением степени дисплазии

MGMT, RAR- $\beta$ , Twist – увеличение частоты метилирования при HSIL-Cr

# Результаты тестов: p16 и ВПЧ при проблемах интерпретации (ASC-US/ASC-H)



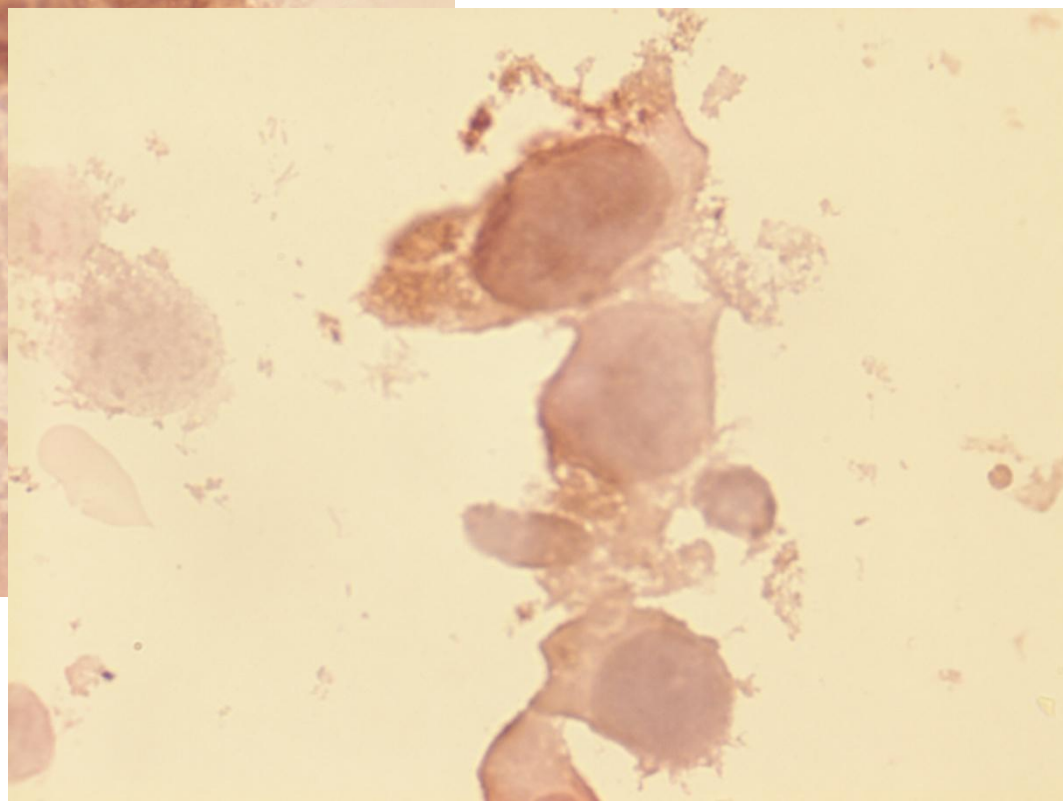
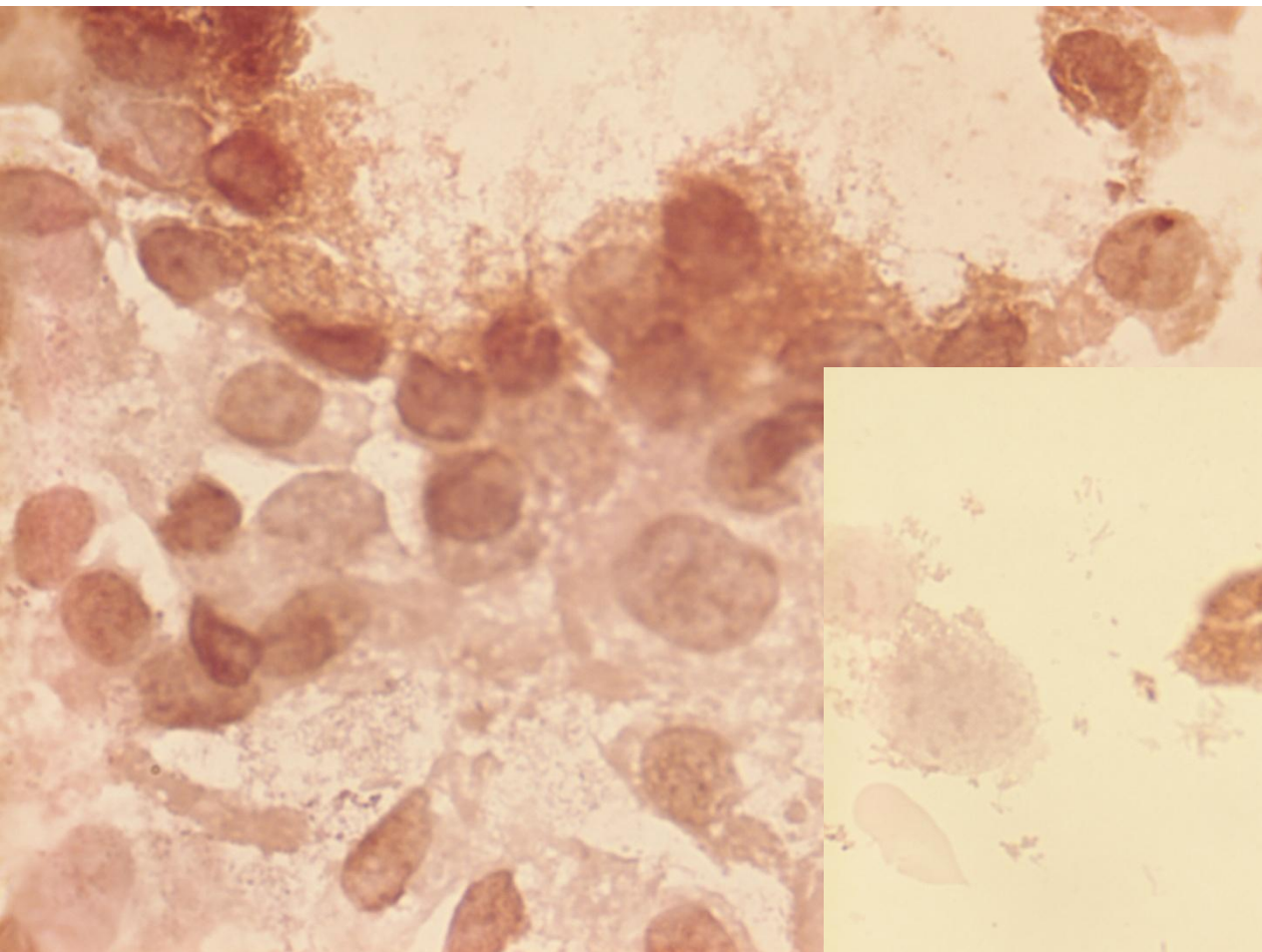
- В 11 из 17 наблюдений с ASC-US/ ASC-H отмечена экспрессия p16, причем в 10 из них гистологически выявлены HSIL+



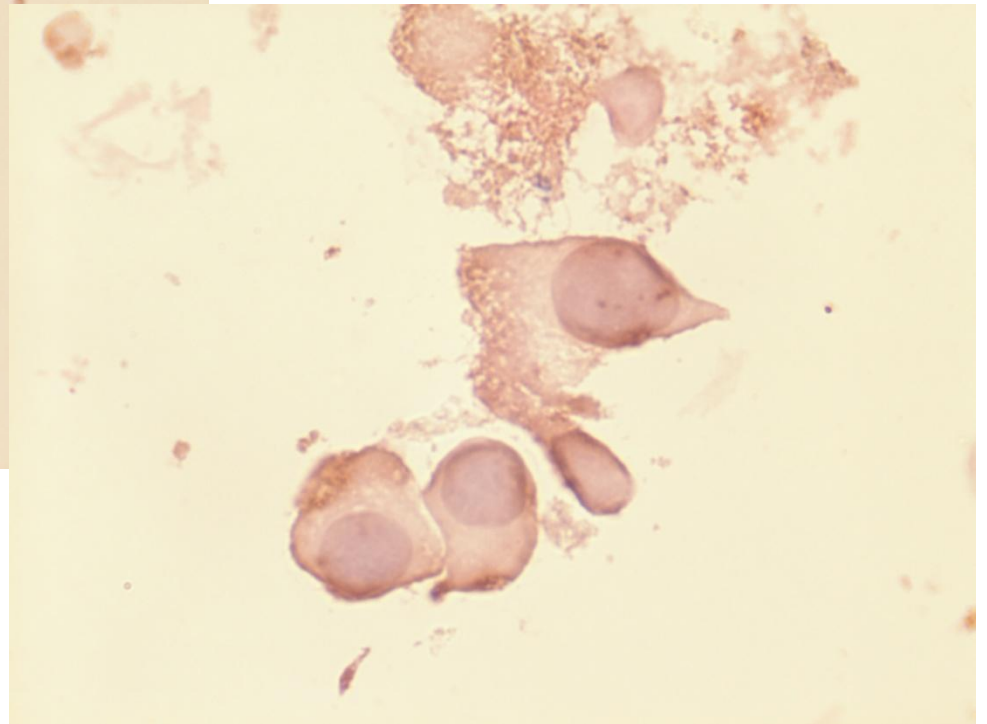
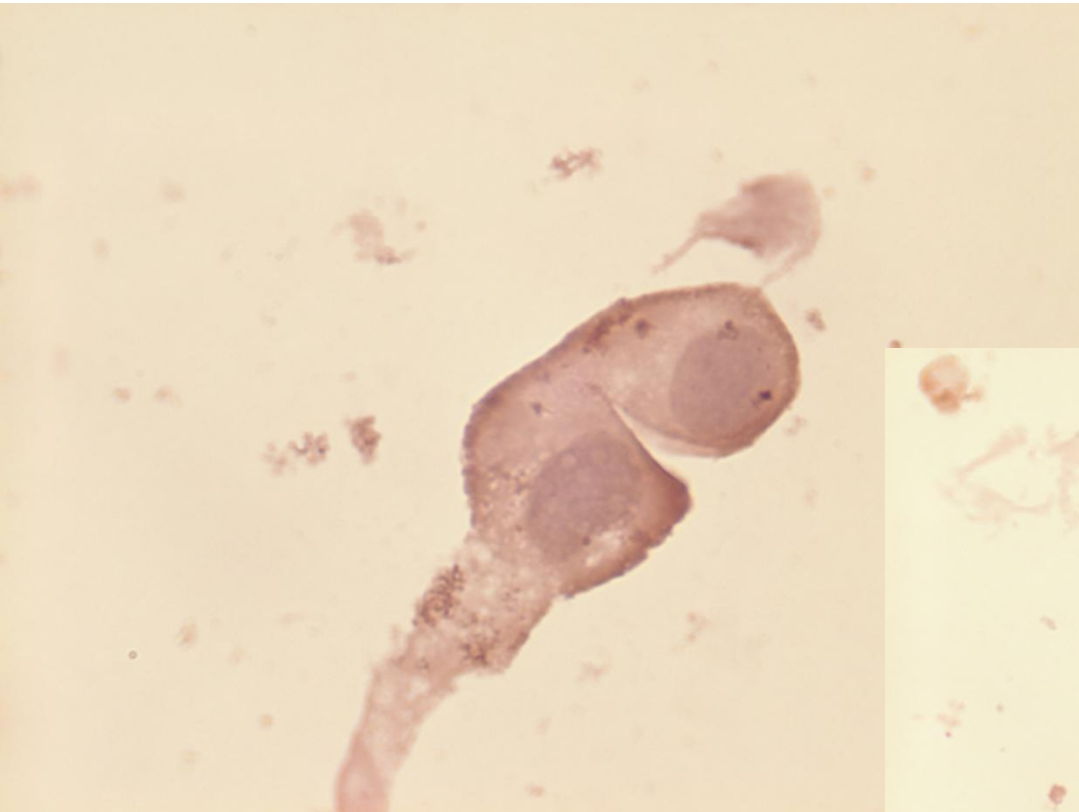
HSIL(CIS)

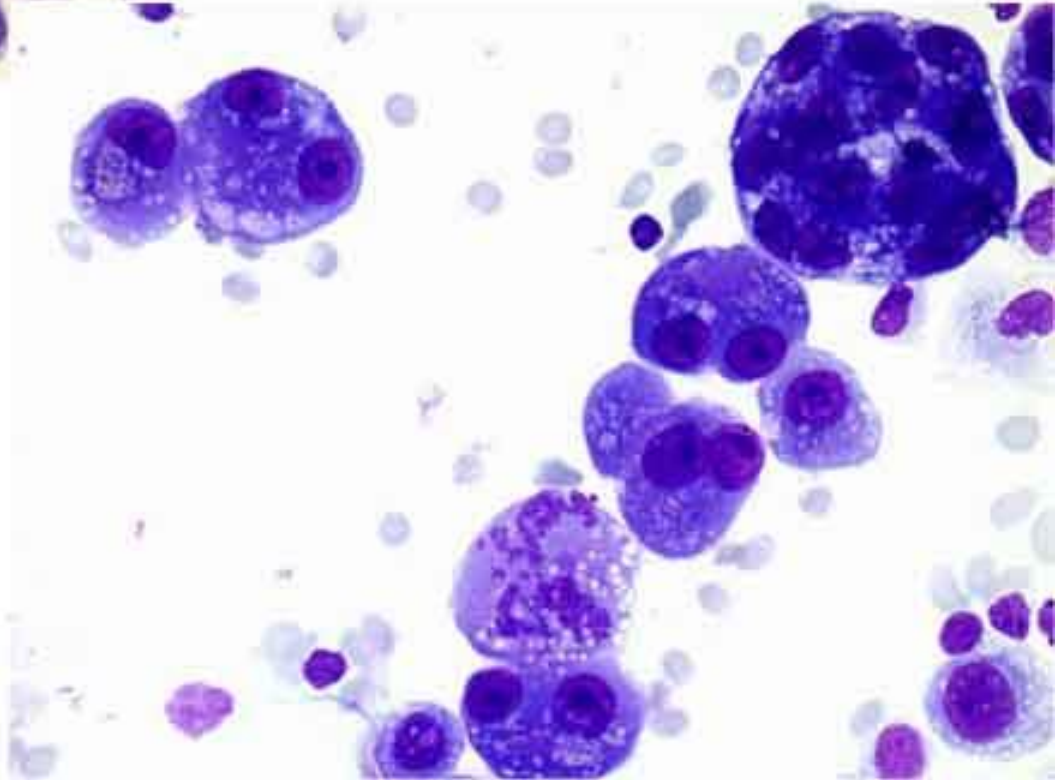
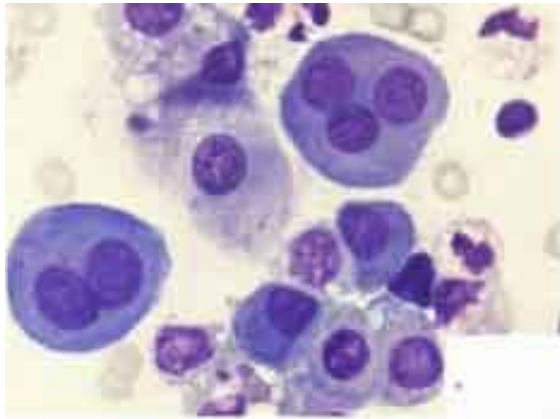
- ЖЦ признана наиболее информативным методом скрининга заболеваний ШМ, рекомендованным ВОЗ в качестве «золотого стандарта» для исследований цервикальных мазков
- ЖЦ используется в скрининговых программах в некоторых странах и регионах Европы (в частности Великобритании), США, Австралии

# Иммуноцитохимическое исследование Суспензия из биоптата желудка (РЭА) Аденокарцинома



Иммуноцитохимическое исследование  
Суспензия из биоптата желудка.  
HER2-New (CERb) Аденокарцинома





Реактивный?  
Мезотелиома?



## Мезотелиома? Аденокарцинома?

### иммуноцитохимические маркеры

- В качестве маркеров мезотелиомы
  - **D2-40 (чувств. – 92%, специф. – 93%),**
  - **WT-1(чувств. – 96%, специф. – 84%)**
  - **Калретинин (чувств. – 100%, специф.– 85%)**
  - Мезотелин
  - CK5/6
- В качестве маркеров аденокарциномы
  - **CEA,**
  - **ВerEP4,**
  - МОС31,
  - TTF-1,
  - Napsin A

- В нашей стране ЖЦ появилась сравнительно недавно, однако она уже апробирована в некоторых лечебно-диагностических учреждениях.
- Результаты масштабных исследований новой технологии за рубежом, а также исследования в нашей стране позволяют с уверенностью констатировать, что ЖЦ – это несомненно, большое достижение для практической медицины.

## Медицина «4 P»

- **P**ersonalized – Персонализированная, (индивидуализированная)
- **P**rophylactic – Профилактическая, предупредительная
- **P**articipated – С участием пациента, которого обучают, о котором заботятся
- **P**redictive – Предсказательная

Leroy Hood, США, 2008

## Терапия

- Адресная, целевая (Targeted)

Цитолог «созревает» долго

**Для полноценной диагностики врач должен не менее трех лет заниматься исследованием цитологических препаратов под руководством опытного специалиста, консультируясь с ним во всех сложных случаях**



Призвание

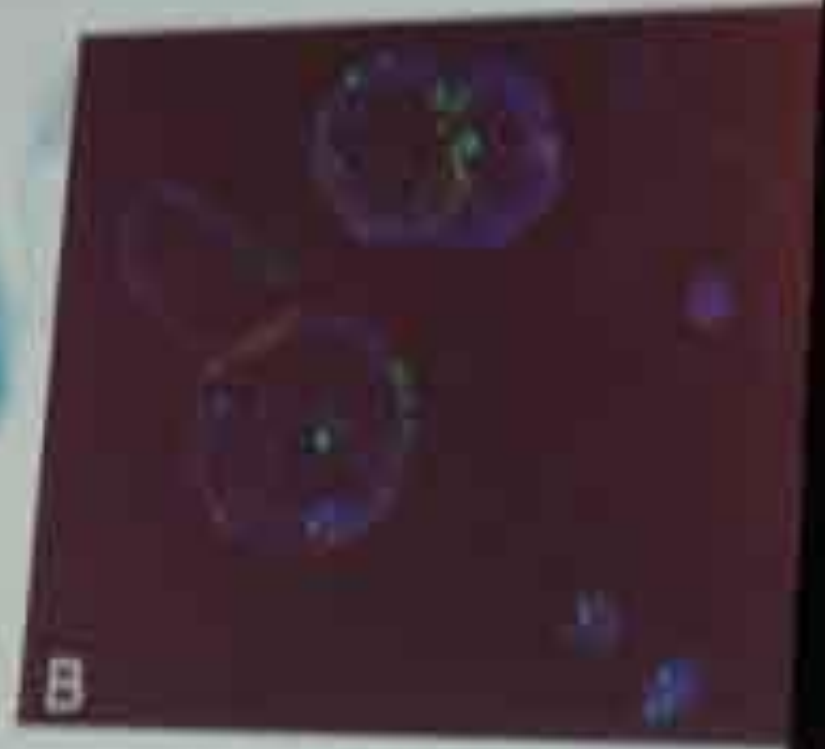
- Знания
- Умения
- Навыки

# ВОЗМОЖНОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ РАБОТЫ ЦИТОЛОГА:

- ЦЕНТРАЛИЗОВАННАЯ  
ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ
- ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ  
В ОНКОЛОГИЧЕСКОМ  
ДИСПАНСЕРЕ И НАУЧНО-  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОМ ИНСТИТУТЕ
- КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ  
ЛАБОРАТОРИЯ
- ОТДЕЛ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ  
АНАТОМИИ



A



B

*"Clazy chromosomes" in benign (polyploid) cells*

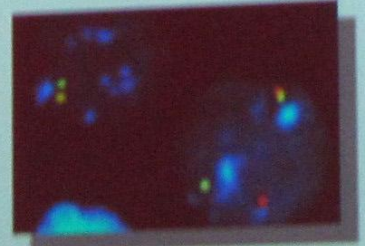
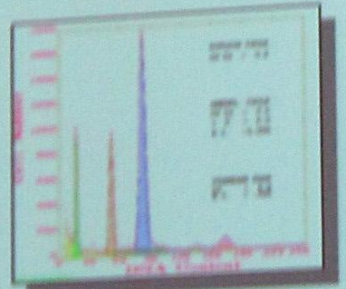
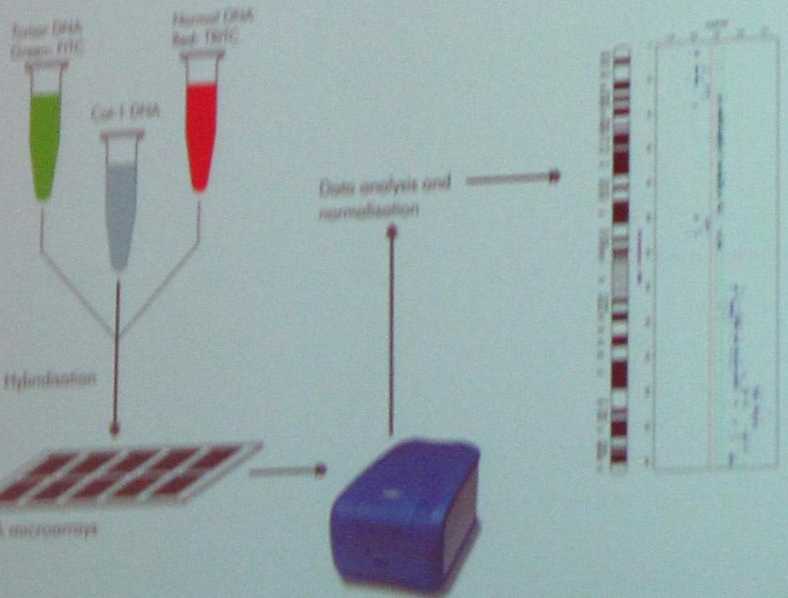
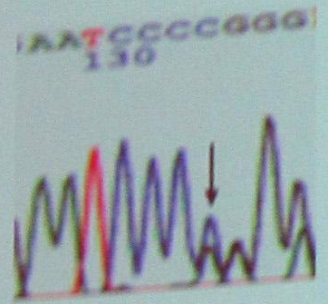
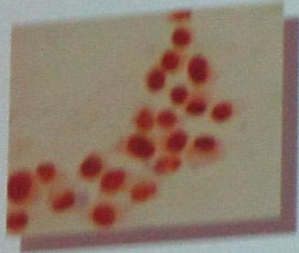
Доброкачественная полиплоидная клетка

Volume 51  
**How Technology is Reshaping the Practice of  
Nongynecologic Cytology**  
*Frontiers of Cytology Symposium*

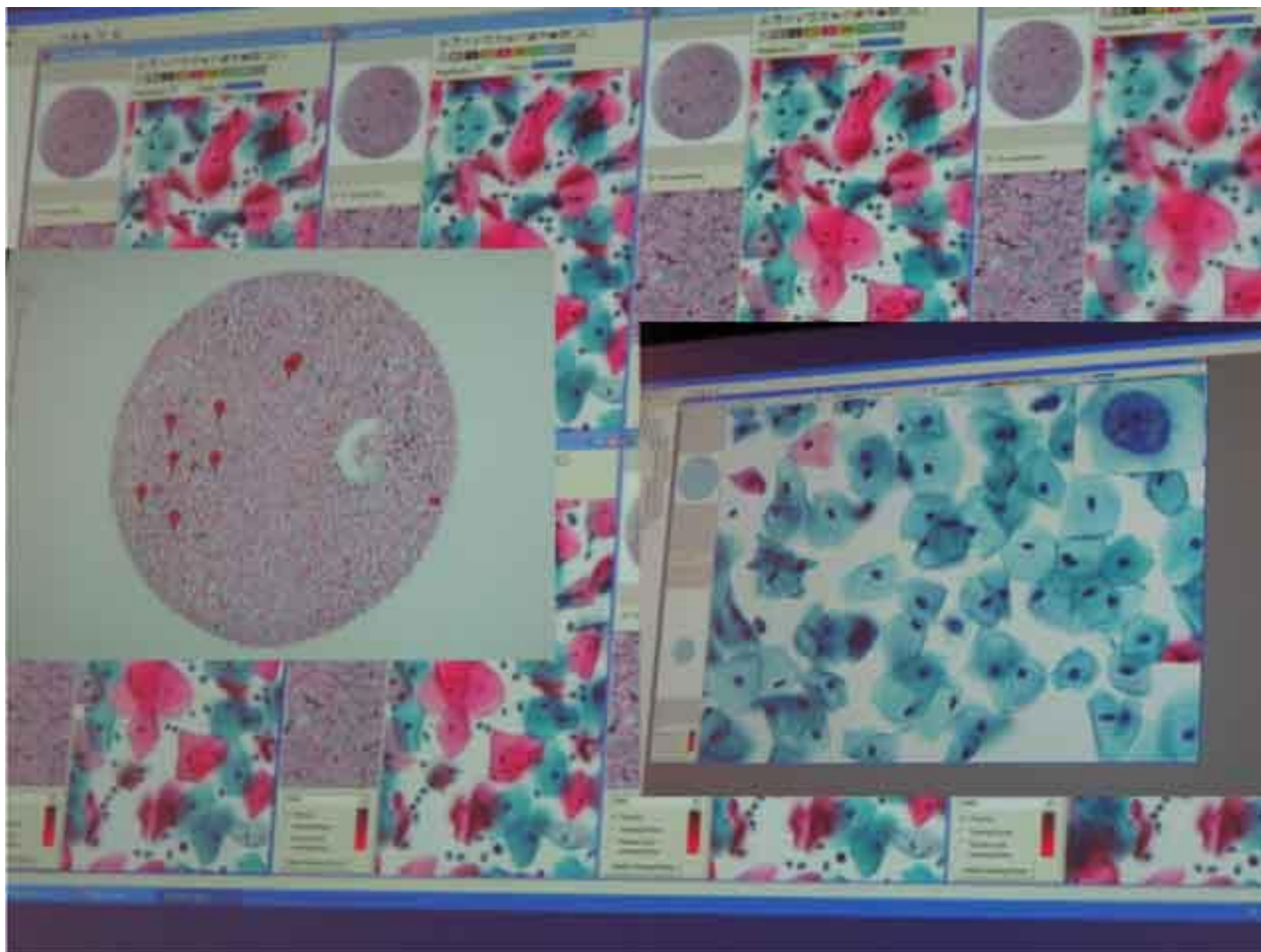
*Moderator and Editor*  
**Marluce Bibbo, M.D., Sc.D., F.A.S.C.P., F.I.A.C.**

*Participants*

**Mina Akerman, M.D., Ph.D., F.I.A.C., Venando A. F. Alves, M.D., Ph.D., Lukas Bubendorf, M.D., M.I.A.C., Terence J. Colgan, M.D., F.R.C.P.C., F.C.A.P., M.I.A.C., Hiroshi Itoh, C.T.I.A.C., M.I.A.C., Kusum Kapila, M.D., F.A.M.S., F.R.C.Path., F.I.A.C., Ruth L. Katz, M.D., M.I.A.C., Gerardine Mitchell, B.App.Sc. (Medical Technology), ASC, M.A.I.M.S., Nicholas J. Mulvany, MB, BCh, BAQ, D.C.P., F.I.A.C., F.R.C.P.A., Joseph F. Nasuti, M.D., F.C.A.P., F.A.S.C.P., Wal Kuan Ng, MBBS, F.R.C.P.A., F.I.A.C., F.R.C.P.A., Joseph F. Nasuti, M.D., F.C.A.P., F.A.S.C.P., Robert Y. Osamura, M.D., F.I.A.C., José P. Schalker, M.D., M.I.A.C., Fernando Carlos Schmitt, M.D., Ph.D., F.I.A.C., Akhiko Sarizawa, C.T.I.A.C., Alain P. Verbest, M.D., Ph.D., F.I.A.C., and Philippe Visih, M.D., Ph.D., M.I.A.C.**



Развитие огромного числа новых дополнительных методов приводит к тому, что клиническая цитология становится одной из крупнейших диагностических специальностей  
M.Bibbo, Acta Cytol, 51, 2007



Сканирование всего препарата



# Возможный алгоритм использования жидкостной цитологии в клинической практике

*Диагностика или скрининг (эксфолиативный материал, эндоскопический, пунктаты, жидкости)*

После получения материала готовятся традиционные мазки

Остальной материал помещается в жидкую среду (контейнеры, пробирки, микропробирки)

После получения материала весь материал помещается в жидкую среду

Из клеточной суспензии готовятся однослойные препараты

При цитологическом исследовании выявлены патологические изменения и необходимо уточнить диагноз

Однослойные мазки, дополнительные методы окрашивания, дополнительные методы диагностики, в том числе молекулярно-биологические

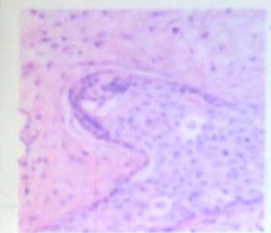
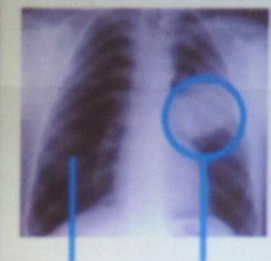
# ЖЦ и персонализированная медицина

Клинические данные

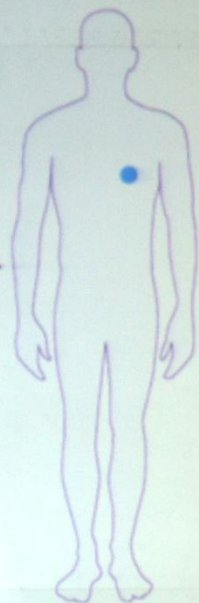
Данные УЗИ,  
рентгенологические,  
эндоскопические и др.

Жидкостная цитология

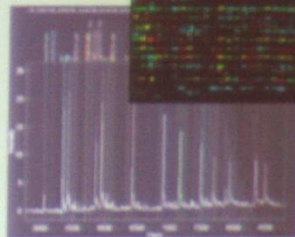
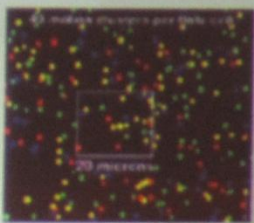




Cancerous



Extract tumor biopsy



Extract DNA from tumor to profile for somatic alterations

Gene	Mut	Amp	Del	Trans
ABL				yes
AKT1				
BRAF				
CDK4				
EGFR	yes			
ERBB2				
FGFR				
FLT3				
JAK				
KIT				
KRAS				
MET				
PDGFRa				
PIK3CA				
PTEN				
RET				

Define "actionable" mutation profile of tumor



Use genetic alteration profile to choose individualized targeted therapeutic

# При необходимости расширение спектра исследований и/или коллегиальное решение

Гистология

Клеточные блоки

Цитология

Гематология

Общеклинические иссл.

Биохимия

Онкомаркеры

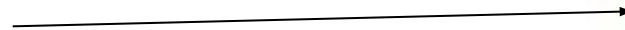
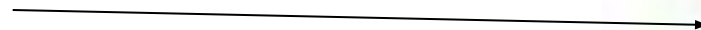
Иммуноморфология

Другие молекулярные  
исследования

Генетика

Микробиология

Вирусология



При необходимости коллегиальное решение  
с учетом и анализом полученных данных

Гистология

Клеточные блоки

Цитология

Гематология

Общеклинические иссл.

Биохимия

Онкомаркеры

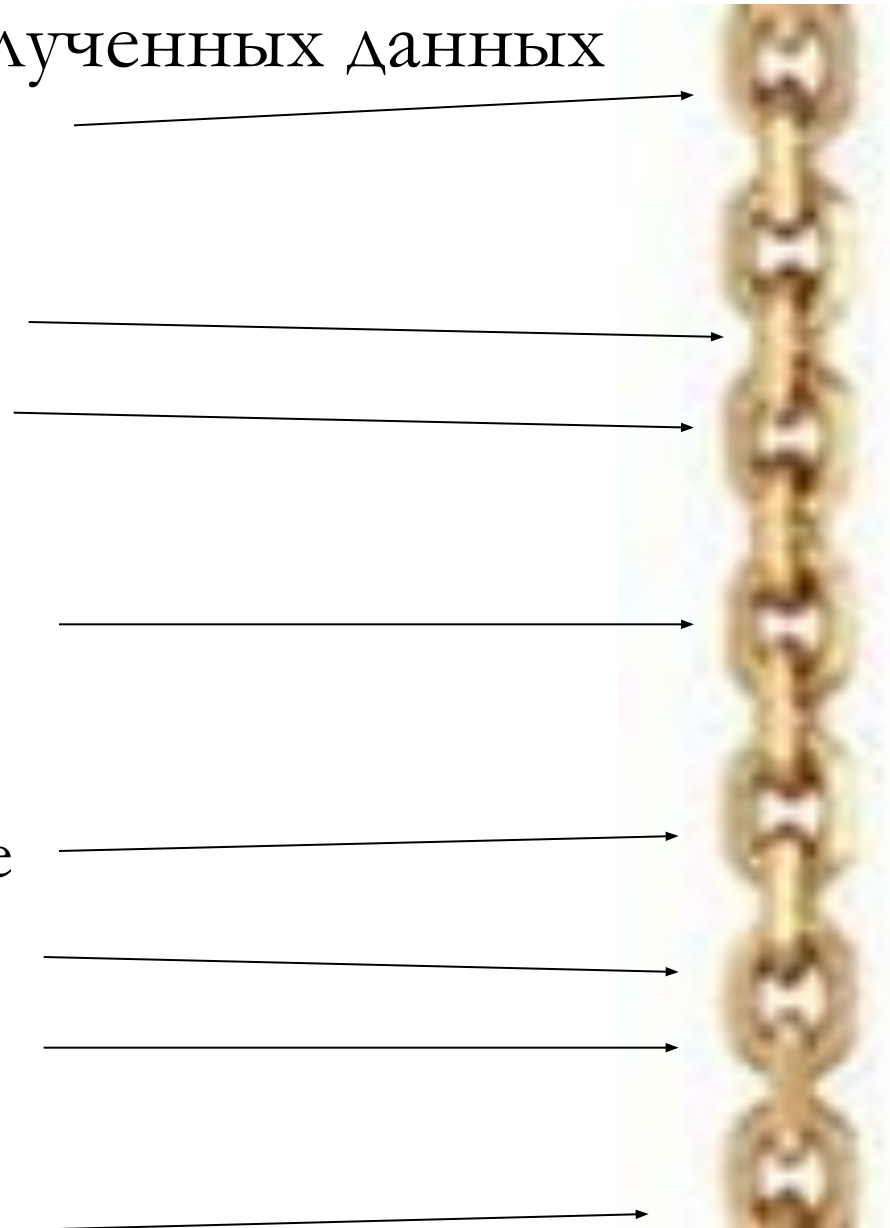
Иммуноморфология

Другие молекулярные  
исследования

Генетика

Микробиология

Вирусология



# При необходимости коллегиальное решение

Гистология

Клеточные блоки

Цитология

Гематология

Общеклинические иссл.

Биохимия

Онкомаркеры

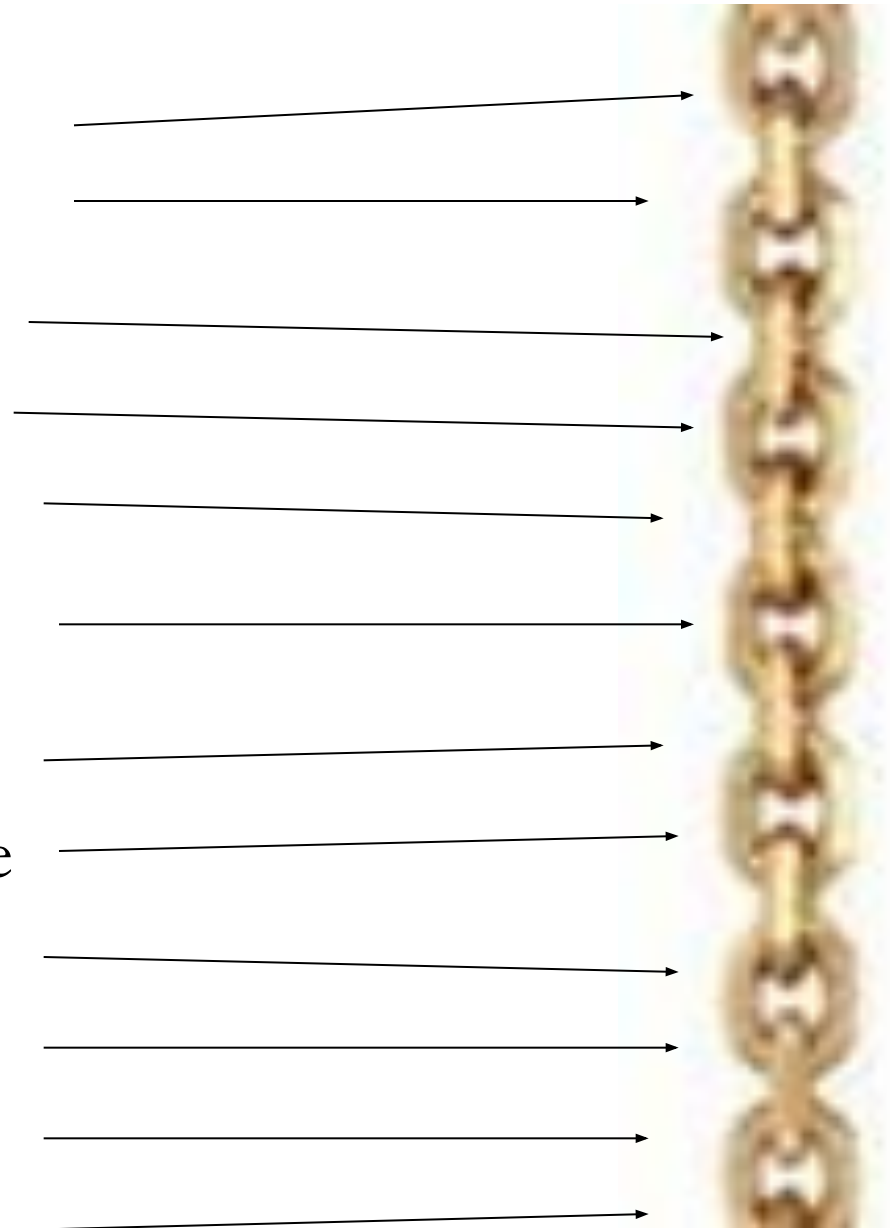
Иммуноморфология

Другие молекулярные  
исследования

Генетика

Микробиология

Вирусология



- Врачебное мастерство!
- Искусство врачевания!

Предотвращение заболевания!  
Выявление заболевания на возможно  
более ранней стадии!  
Помощь больному человеку!