

Изобретение относится к области онкологии и клинической цитологии и может использоваться для выявления метастазов рака в серозные полости организма.

В последние 10-15 лет в иммуногистохимических исследованиях стали использоваться пектины - белки не иммунного происхождения, способные определять углеводные детерминанты гликопротеидов и гликолипидов клеток. Нами был предложен способ определения рецепторов лектинов на мембранах лимфоидных клеток, который выбран нами в качестве прототипа.

Способ-прототип заключается в следующем: осаждают клеточные элементы из всего объема взятой для исследования экссудативной жидкости, дважды отмывают их ЗФР (физиологический раствор, забуференный фосфатным буфером, pH 7,2-7,4) путем центрифугирования в течение 5 мин при 200 g, разводят суспензию ЗФР до концентрации клеток 2×10^6 /мл, готовят цитологические препараты (мазки). Фиксируют мазки в растворе формол-аcetона, pH 6,6-6,8 в течение 45 с, промывают ЗФР, проводят блокирование альдегидных групп поверхностных мембран клеток, инкубируя мазки в 0,1 М растворе NH_4Cl 30 мин при 4°C, промывают ЗФР, обрабатывают раствором нейраминидазы для удаления сиаловых кислот (1 мл 0,02 М ацетатного буфера, pH 5,6, 1 mM Ca^{++} , 0,02 UE нейраминидазы) в течение 30 мин при 37°C, промывают ЗФР, инкубируют с лектинами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в разведении 1:1000 в течение 3 час при 4°C. Все этапы инкубации проводят во влажной камере. Затем мазки промывают ЗФР, высушивают, фиксируют в парах 10 %-ного нейтрального формалина в течение 3 мин, определяют цитохимически активность пероксидазы, докрашивают ядра клеток 2-ым раствором метилового зеленого в течение 1 мин. В исследованиях применяются общедоступные лектины: арахиса (PNA), сои (SBA), виноградной улитки (HPL), клещевины (RCA) и другие (М.Д.Луцки, Львовский филиал института биохимии им. В.А.Палладина АН Украины). Клетки, содержащие рецепторы пектинов, выявляются при просмотре мазков в световой микроскоп как имеющие цитоплазматическое или мембранное окрашивание коричневого цвета. При изучении способом-прототипом экссудативной жидкости обнаружено, что мезотелиальные клетки не имеют рецепторов использованных пектинов; гистиоциты и макрофаги отличаются ярким диффузным окрашиванием цитоплазмы при определении рецепторов PNA, HPL, SBA и RCA; раковые клетки экспрессируют рецепторы пектинов преимущественно на поверхностных мембранах и в меньшей степени - в цитоплазме клеток. В группе обследованных нами 32 онкологических больных на раковых клетках в экссудативной жидкости обнаружены рецепторы RCA (у 100 % больных), SBA (88 %), HPL (88 %), PNA (70 %). (Показана независимость нового класса маркеров от наличия на клетках опухолеассоциированных антигенов, таких как раково-эмбриональный (РЭА), антиген эпителиальных мембран (EMA), гликопротеид с м.м. 90 кД, Х-гаптен, и цитохимический особенностей раковых клеток (содержания PAS-положительных веществ, активность фермента щелочной фосфатазы).

Недостатком способа при применении его именно для изучения клеточных элементов экссудативной жидкости является сложность отличия ярко диффузно окрашенных гистиоцитов и макрофагов от раковых клеток, окрашенных преимущественно по мембране, особенно если содержание раковых клеток невелико, а основным клеточным элементом экссудативной жидкости являются активированные клетки гистиоцитарно-макрофагальной природы.

Задачей изобретения является создание способа определения раковых клеток в цитологических препаратах из экссудативной жидкости серозных полостей, при котором исключаются этапы обработки мазков нейраминидазой и сокращается время инкубации их с конъюгатами пектинов, что создает условия для изучения рецепторов пектинов на поверхностных мембранах, раковых клеток. Наличие рецепторов в к лектинам выявляют по ободку коричневого цвета по краю цитоплазмы клеток, что облегчает дифференциальный диагноз между раковыми клетками и гистиоцитами/макрофагами. Таким образом повышается специфичность и чувствительность способа с одной стороны, и достигается простота и доступность выполнения с другой.

Поставленная задача решается тем, что в способе выявления раковых клеток в экссудатах из серозных полостей с помощью пектинов, конъюгированных с пероксидазой хрена путем приготовления цитологического препарата, его фиксации, блокады альдегидных групп, инкубации с конъюгатами пектинов, согласно изобретению, инкубацию с конъюгатами пектинов проводят непосредственно после блокады альдегидных групп и время ее сокращают до 30-60 мин.

Заявляемый способ выявления раковых клеток в экссудатах из серозных полостей осуществляют следующим образом: осаждают клеточные элементы из всего объема взятой для исследования экссудативной жидкости, дважды отмывают их ЗФР путем центрифугирования в течение 5 мин при 200 g, разводят суспензию ЗФР до концентрации клеток 2×10^6 /мл, готовят цитологические препараты - мазки. Фиксируют мазки в растворе формол-аcetона, pH 6,6-6,8 в течение 45 с, промывают ЗФР, проводят блокирование альдегидных групп поверхностных мембран клеток, инкубируя мазки в 0,1 М растворе NH_4Cl 30 мин при 4°C, промывают ЗФР, инкубируют с пектинами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в разведении 1:1000 в течение 30-60 мин при 4°C. Все этапы инкубации проводят во влажной камере. Затем мазки промывают ЗФР, высушивают, фиксируют в парах 10 %-ного нейтрального формалина в течение 3 мин, определяют цитохимически активность пероксидазы, докрашивают ядра клеток 2 %-ным раствором метилового зеленого в течение 1 мин.

Низкая сиализация раковых клеток в экссудатах, позволяет исключить этап обработки клеток нейраминидазой поскольку сиаловые кислоты не экранируют углеводные остатки на поверхностных мембранах раковых клеток в отличие от лимфоидных и других неопухолевых клеток. Значительно большее количество рецепторов лектинов на поверхности раковых клеток в экссудатах позволяет определять злокачественные клетки после краткосрочной инкубации с лектинами.

Сущность заявляемого нами изобретения более подробно раскрывают следующие примеры.

Пример 1. Исследовали экссудативную жидкость больного П. (диагноз: рак легкого. Метастазы в плевральную полость?). Осаждали клеточные элементы из всего объема взятой для исследования жидкости (400 мл), дважды отмывали ЗФР путем центрифугирования при 200 g в течение 5 мин, разводили ЗФР до концентрации клеток 2×10^6 /мл, готовили мазки. Фиксировали мазки в растворе формол-аcetона pH 6,6 в течение 45 с, промывали ЗФР, инкубировали мазки в 0,1 М растворе NH_4Cl в течение 30 мин во влажной камере при 4°C. В дальнейшем исследование осуществляли по способу-прототипу и по заявляемому способу.

По способу прототипу: после блокады альдегидных групп мазки промывали ЗФР, обрабатывали раствором нейраминидазы в течение 30 мин во влажной камере при 37°C, промывали ЗФР и инкубировали с лектинами PCA, HPL, PMA, SBA, конъюгированными с пероксидазой хрена, в разведении 1:1000 в течение 3 час при 4° С во

влажной камере. Затем мазки промывали 3ФР, высушивали, фиксировали в парах 10 %-ного нейтрального формалина в течение 3 мин., определяли активность пероксидазы цитохимически, докрашивали ядра клеток 2 %-ным раствором метиленового зеленого в течение 1 мин. При просмотре препаратов в световой микроскоп выявлено большое содержание в экссудативной жидкости активированных гистиоцитов/макрофагов, имеющих значительное количество рецепторов пектинов PNA, HPL, SBA и RCA в цитоплазме. Идентифицировать на их фоне раковые клетки не представилось возможным.

По заявляемому способу: после блокады альдегидных групп мазки промывали 3ФР, инкубировали с конъюгатами лектинов PNA, HPL, SBA и RCA в разведении 1:1000 в течение 60 мин во влажной камере при 4°C. Затем мазки промывали 3ФР, высушивали, фиксировали в парах 10 %-ного нейтрального формалина в течение 3 мин, определяли активность пероксидазы, докрашивали ядра клеток 2 %-ным раствором метиленового зеленого. При просмотре препаратов на фойе неокрашенных клеток гистиоцитарно/макрофагальной природы обнаружены единичные изолированные крупные клетки с ярким ободком коричневого цвета по краю цитоплазмы при определении рецепторов лектинов PNA, HPL, SBA, что позволило поставить диагноз: метастазы рака в плевральную полость. Одновременно проводимое иммуно-цитохимическое определение экспрессии опухолеассоциированных антигенов РЭА, ЕМА, гликопротеида с м.м. 90 кД ПАП-методом (17) подтвердило поставленный диагноз. В то же время при определении рецепторов пектина RCA обнаружено окрашивание не только раковых, но частично и гистиоцитарных клеток.

Таким образом, в тех случаях, когда основными клетками экссудативной жидкости являются активированные гистиоциты и макрофаги, выявление единичных раковых клеток по способу прототипу затруднено, а с помощью заявляемого способа становится возможным.

Пример 2. Исследовали экссудативную жидкость больной Я. (диагноз - рак молочной железы, состояние после мастэктомии, метастазы в плевральную полость?). Выделяли клетки экссудативной жидкости путем центрифугирования и отмывок 3ФР, разводили 3ФР до концентрации 2×10^6 /мл, готовили мазки, фиксировали их в растворе формол-ацетона, pH 6,7 в течение 45 с. В дальнейшем исследование вели по способу-прототипу и по заявляемому способу.

По способу-прототипу: провели блокирование альдегидных групп поверхностных мембран клеток путём инкубации мазков 8 0,1 М растворе NH_4Cl в течение 30 мин при 4°C во влажной камере, промыли 3ФР, инкубировали мазки с раствором нейраминидазы в течение 30 мин при 37°C во влажной камере, промыли 3ФР, инкубировали с конъюгатами пектинов HPL, PNA, SBA, RCA в течение 3 ч во влажной камере при 4°C. Затем мазки высушивали, фиксировали в парах 10 %-ного нейтрального формалина, цитохимически определяли активность пероксидазы, докрашивали ядра клеток 2 %-ным раствором метиленового зеленого. При просмотре мазков раковые клетки выделялись на фоне доброкачественных клеток экссудативной жидкости ярким окрашиванием поверхностных мембран при определении рецепторов лектинов PNA, SBA, HPL, RCA, однако отмечалось и диффузное окрашивание гистиоцитов/макрофагов.

По заявляемому способу: после фиксации мазки промывали 3ФР, инкубировали в 0,1 М растворе NH_4Cl в течение 30 мин при 4°C во влажной камере, промывали 3ФР и инкубировали с конъюгатами лектинов PNA, HPL, SBA, RCA во влажной камере при 4°C в течение 30 мин. Затем мазки высушивали, фиксировали в парах 10 %-ного нейтрального формалина, определяли активность пероксидазы, докрашивали ядра клеток 2 %-ным раствором метиленового зеленого. При просмотре мазков окраски доброкачественных клеток экссудативной жидкости при определении рецепторов лектинов PNA, SBA, HPL не наблюдалось, при определении рецепторов пектина RCA - окраска гистиоцитарных клеток была очень слабая. Раковые клетки четко идентифицировались среди остальных клеток экссудата, окраска их мембран была интенсивной при выявлении рецепторов лектинов HPL и RCA, умеренной - при определении рецепторов SBA и PNA.

Одновременно проводимое иммуноцитохимическое определение антигенов поверхностных мембран с помощью мКАТ к РЭА и ЕМА подтвердило наличие раковых клеток в исследуемой экссудативной жидкости.

Таким образом, в тех случаях, когда при применении способа-прототипа можно выделить раковые клетки среди остальных клеток экссудата, проводя дифференциацию различных типов окраски, с помощью заявляемого способа обнаружение раковых клеток проводится значительно легче, так как они единственные имеют цитохимическое окрашивание.

Пример 3. Исследовали экссудативную жидкость больной А. (диагноз - метастазы рака яичника в плевральную полость). Выделяли клетки из всего объема взятой для исследования жидкости (250 мл), отмывали 3ФР, разводили до концентрации 2×10^6 /мл, готовили мазки, фиксировали их в растворе формол-ацетона, pH 6,6 в течение 45 с, промывали 3ФР, инкубировали в растворе 0,1 М NH_4Cl в течение 30 мин во влажной камере при 4°C. Затем мазки инкубировали с конъюгатами лектинов PNA, HPL, SBA, RCA в разведении 1:1000 во влажной камере при 4°C в течение 15, 30, 60 мин и 2, 3 ч. После этого мазки промывают 3ФР, высушивали, фиксировали в парах 10 %-ного нейтрального формалина в течение 3 мин, определяли активность пероксидазы, докрашивали ядра клеток 2 %-ным раствором метиленового зеленого в течение 1 мин. Результаты исследования следующие:

- при инкубации с конъюгатами лектинов в течение 15 мин наблюдается очень слабое окрашивание раковых клеток пектинами HPL и RCA;
- при инкубации с конъюгатами лектинов в течение 30 мин наблюдается яркое окрашивание мембран раковых клеток пектинами HPL и RCA, и умеренное - лектинами SBA и PNA;
- при инкубации с конъюгатами пектинов в течение 60 мин наблюдается интенсивное окрашивание раковых клеток всеми использованными пектинами. Окраски гистиоцитов/макрофагов, как и при времени инкубации с пектинами 15 и 30 мин, не отмечено, за исключением слабого окрашивания гистиоцитов пектином RCA;
- при инкубации с конъюгатами лектинов в течение 2 ч окрашивание раковых клеток всеми пектинами интенсивное, однако отмечается умеренно выраженное окрашивание цитоплазмы гистиоцитов/макрофагов;
- при инкубации с конъюгатами пектинов в течение 3 ч наряду с интенсивным окрашиванием раковых клеток наблюдается выраженное окрашивание цитоплазмы гистиоцитов, что затрудняет дифференциацию этих двух типов клеток.

Таким образом, результаты исследования показали, что оптимальным временем инкубации с конъюгатами лектинов является 30-60 мин. При этом положительная окраска обнаруживается только по мембране раковых клеток, а остальные клеточные элементы экссудата остаются не окрашенными. Удлинение времени инкубации с конъюгатами лектинов до 2-3 ч приводит к появлению диффузного окрашивания гистиоцитов и макрофагов.

Укорочение времени инкубации до 15 мин недостаточно для взаимодействия лектинов с соответствующими клеточными рецепторами.

Упрощение способа заключается в том, что в ходе постановки реакции исключается этап обработки мазков нейраминидазой и сокращается время инкубации мазков с конъюгатами лектинов. Благодаря этому почти на 50 % сокращается время проведения исследований по выявлению раковых клеток в экссудативной жидкости заявляемым способом (2-2,5 ч) по сравнению с прототипом (5-5,5 ч), удешевляется стоимость анализа за счет экономии нейраминидазы. Подобное упрощение способа необходимо для изучения рецепторов лектинов на поверхностных мембранах не лимфоидных, а раковых клеток. Сущность данного упрощения заключается в создании условий, при которых выявление рецепторов лектинов лимфоцитов, гистиоцитов и макрофагов становится невозможным, а мембраны раковых клеток, метастазировавших в серозные полости организма, сохраняют способность взаимодействовать с пектинами. Для изучения же рецепторов лектинов на поверхности гемопозитических клеток (лимфоцитов и гистиоцитов/макрофагов) заявляемый способ не пригоден, и оптимальным остается способ-прототип.

Повышение информативности заявляемого способа заключается в том, что по сравнению с прототипом облегчается дифференциальный диагноз между раковыми клетками и гистиоцитами/макрофагами, поскольку рецепторы пектинов выявляются только на поверхности раковых клеток, а цитоплазма гистиоцитов/макрофагов (а также лимфоидных и мезотелиальных клеток) остается неокрашенной. Таким образом, если при применении способа-прототипа нужно дифференцировать между собой два типа различно окрашенных клеток - раковые и гистиоцитарные, то при использовании заявляемого способа на фоне невзаимодействующих с пектинами доброкачественных клеток экссудата окрашенными видны лишь раковые клетки (выявляются как имеющие ободок коричневого цвета по краю цитоплазмы). Следовательно, повышается специфичность и чувствительность способа. Особенно очевидным подобное преимущество становится при исследовании экссудатов, богатых активированными гистиоцитами/макрофагами, в которых раковые клетки встречаются в незначительном количестве, не в виде комплексов или железисто-подобных структур, а изолированных клеток. В подобных ситуациях способ-прототип не позволяет обнаружить раковые клетки и поставить правильный диагноз. При применении заявляемого способа это возможно. В целом, при применении заявляемого способа значительно облегчена постановка правильного диагноза, сокращается время просмотра мазков в световой микроскоп. Заявляемый способ не требует столь высокой квалификации и большого опыта исследователя, как прототип, и, следовательно, более доступен.

Благодаря высокой специфичности, чувствительности и достаточной простоте выполнения, заявляемый нами способ может быть использован в диагностических исследованиях в клинических и цитологических лабораториях.

Среди апробированных нами лектинов для осуществления способа пригодны пектины арахиса, улитки, сои, клещевины. Мы применяли также и другие лектины: чечевицы, вики, коры бобовника анагирилистного. Хотя они и не взаимодействовали с доброкачественными элементами экссудата при использовании заявляемого способа, частота выявления с их помощью раковых клеток низка, и они имеют вспомогательное значение.

Заявляемый способ пригоден для выявления раковых клеток различного происхождения: метастазов рака легкого, молочной железы, яичника, желудка, что проверено нами. Особенно эффективно его применение возможно в комплексе с известными способами, основанными на других принципах выявления раковых клеток, к примеру, в комбинации с определением экспрессии онкофетальных и опухолеассоциированных антигенов с помощью мКАТ и иммуноферментных методов, с изучением активности внутриклеточных ферментов.