

Чимитов А.А.¹, Шойхет Я.Н.², Стражев С.В.³, Лазарев А.Ф.², Ханхашанова Т.Д.¹, Болдохонов Ц.С.¹

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ И ГЕМОФИЛЬТРОЦИТОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

¹ГБУЗ «Бурятский республиканский клинический онкологический диспансер», 670047, г. Улан-Удэ, Республика Бурятия;

²ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, 656038, г. Барнаул, Алтайский край;

³ГБУЗ «Городская поликлиника №212 Департамента здравоохранения города Москвы», 119620, Москва

Иммунофлюоресценция является уникальным иммунохимическим методом, объединяющим в себе возможность проведения детального морфологического анализа и использование специфичности иммунологической реакции. Преимуществом метода иммунофлюоресценции являются его высокая чувствительность и разрешающая способность. Методом иммунофлюоресценции исследованы цитологические мазки-отпечатки фильтрата венозной крови онкологических больных, при этом были подтверждены успешные результаты выделения циркулирующих раковых клеток с помощью устройства для микропросеивания крови.

Ключевые слова: метод иммунофлюоресценции, циркулирующие раковые клетки, устройство для микропросеивания крови.

Для цитирования: Чимитов А.А., Шойхет Я.Н., Стражев С.В., Лазарев А.Ф., Ханхашанова Т.Д., Болдохонов Ц.С. Сравнительная оценка результатов проведения иммунофлюоресценции и гемофилтродитологического метода исследования у онкологических больных. *Российский онкологический журнал*. 2019; 24 (1–2): 24–26. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2019-24-1-2-24-26>.

Для корреспонденции: Болдохонов Цырен Степанович – врач онколог-радиотерапевт отделения «Радиотерапии», ГБУЗ «Бурятский республиканский клинический онкологический диспансер», 670047, г. Улан-Удэ, Республика Бурятия. E-mail: tsiren1993@yandex.ru

Chimitov A.A.¹, Shoihet J.N.², Strazhev S.V.³, Lazarev A.F.², Khankhashanova T.D.¹, Boldohonov T.S.¹

COMPARATIVE EVALUATION OF THE RESULTS OF IMMUNOFLUORESCENCE AND HEMOFILTROCYTOLOGICAL RESEARCH IN CANCER PATIENTS

¹Buryat Republic Clinical Oncology Dispensary, 670047, Ulan-Ude, Republic of Buryatia, Russian Federation;

²The Altai State Medical University, 656043, Barnaul, Altai region, Russian Federation;

³City Clinic #212 of the Moscow city Health Department, 119620, Moscow, Russian Federation

Annotation: Immunofluorescence is a unique immunochemical method that combines the ability to conduct a detailed morphological analysis and use the specificity of the immunological reaction. The advantage of the immunofluorescence method is its high sensitivity and resolution. The immunofluorescence method was used to survey cell films of venous blood filtrate of cancer patients, and with usage of an apparatus for blood micro-screening, the successful extraction of circulating cancer cells was confirmed.

Key words: immunofluorescence method, circulating cancer cells, apparatus for blood microscreening.

For citation: Chimitov A.A., Shoihet J.N., Strazhev S.V., Lazarev A.F., Khankhashanova T.D., Boldohonov T.S. Comparative evaluation of the results of immunofluorescence and hemofiltracytological research in cancer patients. *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal. (Russian Journal of Oncology)*. 2019; 24 (1–2): 24–26. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2019-24-1-2-24-26>.

For correspondence: Tsiren S. Boldokhonov, oncologist-radiotherapist of the Radiotherapy Department, Buryat Republic Clinical Oncology Dispensary, 670047, Ulan-Ude, Republic of Buryatia, Russian Federation. E-mail: tsiren1993@yandex.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 10 October 2019

Accepted 31 October 2019

Современные достижения науки и техники существенно расширили возможности распознавания злокачественных новообразований (ЗНО), тем не менее не ослабевает интерес исследователей к циркулирующим раковым клеткам (ЦРК), обусловленный постоянным поиском новых, более совершенных методов диагностики.

При специальном поиске клеток в циркулирующей крови обнаружить их удастся далеко не всегда. Традиционные биологические методы обнаружения карцинемии, суть которых заключается в перевивке

подопытным животным опухоли кровью, говорят о том, что карцинемия – закономерное явление. В ряде случаев перевиваемость опухоли кровью достигала 100% [1]. Однако, учитывая, что количество ЦРК очень малое, для их точного определения и наблюдения в динамике должны применяться надёжные системы, характеризующиеся высокой воспроизводимостью. На сегодняшний день таких пригодных для клинического использования систем немного. Одна из них система CellSearch – это полуавтоматический аппарат, использующий иммуномагнитную сорбцию

для определения ЦРК. Достоинства этой системы – воспроизводимость данных в разных лабораториях и возможность идентификации ЦРК при различных типах рака [2]. Более новые технологии извлекают преимущества из особых антигенов с эпителиальным покрытием, как молекула адгезии эпителиальной клетки (EpCAM) для избирательного захвата ЦРК. CellSearch – единственная одобренная Американской администрацией по контролю продуктов и лекарств автоматизированная система для захвата и оценки ЦРК с целью прогнозирования и мониторинга лечения при метастатическом раке молочных желёз, простаты и колоректальном раке. Метод основан на иммуномагнитном разделении [3–5], при котором EpCAM – сопряжённые магнитные шарики используются для захвата EpCAM – положительных ЦРК из крови под воздействием магнитного поля. И хотя множество клинических исследований подтверждали его прогнозную значимость, анализ дорогостоящий и трудозатратный, что, к сожалению, ограничивает его более широкое использование.

Выделение ЦРК из венозной крови на основе размера раковой клетки при микрофилтрации проявило себя как потенциально эффективный, недорогой и быстрый способ выделения раковых клеток [6–9].

Материал и методы

У онкологических больных со злокачественными новообразованиями органов брюшной полости и лёгкого для выявления ЦРК в периферической венозной крови был применён гемофилтратоцитологический метод исследования (патент на изобретение № 2425385 Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам). Метод заключается в проведении микрофилтрации периферической венозной крови с последующим цитологическим исследованием отпечатка фильтрата венозной крови с целью определения в нём ЦРК. Микрофилтрация проводится с помощью устройства для микропросеивания крови, в котором применён фильтр с диаметром пор 6000 нанометров (патент на изобретение № 2414710 Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам). Для проведения гемофилтратоцитологического исследования венозную, стабилизированную ЭДТА кровь в количестве 12 мл, полученную от каждого из онкологических больных со ЗНО различной локализации, пропускали через нанофильтр с диаметром пор 6000 нм. Клетки, задержавшиеся на фильтре, наносили на предметное стекло. С каждого образца отфильтрованной крови делали по 3 мазка-отпечатка. Результат исследования считался положительным (+), если в мазках-отпечатках определялись циркулирующие раковые клетки и, соответственно, отрицательным (-), если циркулирующие раковые клетки в них не находили.

Имунофлюоресцентным методом была проведена оценка наличия EpCam (CD326)-положительных клеток в 24 мазках-отпечатках, полученных с помощью устройства для микропросеивания крови. Оценку наличия EpCam (CD326)-положительных клеток проводили методом имунофлюоресценции на флюоресцентном микроскопе Axiostarplus («CarlZeiss», Германия). Для этого фиксированные мазки-отпечатки обрабатывали протеиназой К («Dako», Дания) 15 мин при 37°C, отмывали PBS, затем проводили ин-

Сравнительная оценка результатов обследования больных методами гемофилтратоцитологического исследования и имунофлюоресценции

Больные	Возраст	№ мазков – отпечатков	Результаты исследования на наличие	
			ЦРК	EpCAM клеток
1	64	1-а	+	+
		1-б	-	-
		1-в	+	+
2	40	2-а	-	-
		2-б	+	-
		2-в	-	-
3	75	3-а	+	+
		3-б	+	+
		3-в	+	+
4	40	4-а	+	+
		4-б	+	+
		4-в	+	+
5	53	5-а	+	+
		5-б	+	+
		5-в	+	+
6	46	6-а	+	+
		6-б	-	-
		6-в	+	+
7	43	7-а	+	+
		7-б	-	-
		7-в	+	+
8	76	8-а	+	+
		8-б	+	-
		8-в	-	-

кубацию с флюоресцентным ядерным красителем PI (Invitrogen, США) и моноклональными антителами против человеческого EpCam (CD326) (клон B29.1 (VU-ID9)), меченных FITC («Abcam», Великобритания) в концентрации 5 мкг/мл. Результат считался положительным при наличии клеток, имеющих ядерное красное окрашивание (PI) совместно с зелёной меткой (EpCam-FITC).

Результаты и обсуждения

Как видно из таблицы, при проведении гемофилтратоцитологического исследования периферической венозной крови у всех 8 онкологических больных были выделены циркулирующие раковые клетки. Как было выше сказано, с образца отфильтрованной крови каждого больного делали 3 мазка-отпечатка.

Результаты распределились следующим образом: у 3 больных во всех 3 мазках-отпечатках (№ 3а–3в; 4а–4в и 5а–5в), у 4 пациентов в 2 мазках-отпечатках (№ 1а, 1в; 6а, 6в; 7а, 7в; 8а и 8б) и 1 больного в 1 мазке-отпечатке (№ 2б) обнаружены ЦРК. Такие разные результаты исследования объясняются неодинаковой стадией развития злокачественных новообразований у обследованных больных. Существует прямая связь

между стадией заболевания и степенью выраженности карцинемии: чем выше стадия, тем больше количество ЦРК в единице объёма периферического сосудистого русла [10].

Стадийность ЗНО, а также наличие или отсутствие метастазов в регионарных лимфоузлах у вышеуказанных пациентов подтверждены результатами патогистологического исследования операционного материала.

Методом иммунофлюоресценции исследовано 24 цитологических мазка-отпечатка, полученных с помощью устройства для микропросеивания венозной крови с нанопористым диаметром 6000 нм. С использованием мышиных моноклональных антител против человеческого EpCAM (CD326) (клонD29.1 (VU-ID9)), меченных FITC, и ядерного флюоресцентного красителя PI на микроскопе AxioStarplus («Carl Zeiss», Германия) определяли наличие циркулирующих раковых клеток в мазках-отпечатках. Поскольку мазков-отпечатков было 24, соответственно, всего было проведено методом иммунофлюоресценции 24 пробы-исследования. В результате исследования было установлено, что в 16 пробах из 24 наблюдалось наличие EpCAM-положительных клеток.

В 6 пробах с мазками-отпечатками (№ 1-б, 2-а, 2-в, 6-б, 7-б и 8-в) с (-) результатами на ЦРК при проведении иммунофлюоресценции так же получены отрицательные результаты. В 2 пробах с мазками-отпечатками (№ 2б и 8б с (+) результатами на присутствии ЦРК) наличие EpCAM-положительных клеток при проведении исследования методом иммунофлюоресценции не установлено. Следовательно, процент совпадений всех результатов для 2 сопоставленных методов исследования как положительных на ЦРК, так и отрицательных составил 91,6%.

Таким образом, результаты исследования методом иммунофлюоресценции подтверждают высокую эффективность выделения циркулирующих раковых клеток из венозной крови с помощью устройства для микропросеивания, имеющего нанопористый диаметр пор 6000 нм.

На основании полученных данных можно прийти к следующим выводам:

- ✓ гемофилтритроцитологическое исследование, по сравнению с методом иммунофлюоресценции, является недорогим методом исследования;
- ✓ гемофилтритроцитологический метод исследования простой в исполнении, даёт в 2,5 раза быстрее результат по сравнению с методом иммунофлюоресценции;
- ✓ гемофилтритроцитологическое исследование – тоже эффективный метод исследования, мало уступающий иммунофлюоресцентному методу в точности определения циркулирующих раковых клеток.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Напалков Н.П. *Общая онкология: Руководство для врачей.* Ленинград: Медицина, 1989: 161.
2. Allard W.J. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with

nonmalignant diseases. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10 (20): 6897–904.

3. Benez A. Detection of circulating melanoma cells by immunomagnetic cell sorting. *J. Clin. Lab. Anal.* 1999; 13 (5): 229–33.
4. Racila E. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998; 5 (8): 4589–94.
5. Riethdorf S. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the cell search system. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 920–8.
6. Kahn H.J. Enumeration of circulating tumor cells in the blood of breast cancer patients after filtration enrichment: correlation with disease stage. *Breast Cancer Res. Treat.* 2004; 86 (3): 237–47.
7. Pinzani P., Salvadori B. Isolation by size of epithelial tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation with real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction results and feasibility of molecular analysis by laser microdissection. *Hum. Pathol.* 2006; 37 (6): 711–8.
8. Vona G., Sabile A. Isolation by size of epithelial tumor cells – A new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am. J. Pathol.* 2000; 156 (1): 57–63.
9. Vona G., Beroud C. Enrichment, immunomorphological, and genetic characterization of fetal cells circulating in maternal blood. *Am. J. Pathol.* 2002; 160 (1): 51–8.
10. Helo P., Cronin A.M., Danila D.C. Circulating prostate tumor cells detected by reverse transcription-PCR in men with localized or castration-refractory prostate cancer: concordance with CellSearch assay and association with bone metastases and with survival. *Clin. Chem.* 2009; 55: 765–73.

REFERENCES

1. Napalkov N.P. *General oncology. Manual for doctors.* [Obschaya onkologiya: rukovodstvo dlya vrachey.] Leningrad: Medicine, 1989: 161.
2. Allard W.J. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10 (20): 6897–904.
3. Benez A. Detection of circulating melanoma cells by immunomagnetic cell sorting. *J. Clin. Lab. Anal.* 1999; 13 (5): 229–33.
4. Racila E. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998; 5 (8): 4589–94.
5. Riethdorf S. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the cell search system. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 920–8.
6. Kahn H.J. Enumeration of circulating tumor cells in the blood of breast cancer patients after filtration enrichment: correlation with disease stage. *Breast Cancer Res. Treat.* 2004; 86 (3): 237–47.
7. Pinzani P., Salvadori B. Isolation by size of epithelial tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation with real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction results and feasibility of molecular analysis by laser microdissection. *Hum. Pathol.* 2006; 37 (6): 711–8.
8. Vona G., Sabile A. Isolation by size of epithelial tumor cells—A new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am. J. Pathol.* 2000; 156 (1): 57–63.
9. Vona G., Beroud C. Enrichment, immunomorphological, and genetic characterization of fetal cells circulating in maternal blood. *Am. J. Pathol.* 2002; 160 (1): 51–8.
10. Helo P., Cronin A.M., Danila D.C. Circulating prostate tumor cells detected by reverse transcription-PCR in men with localized or castration-refractory prostate cancer: concordance with CellSearch assay and association with bone metastases and with survival. *Clin. Chem.* 2009; 55: 765–73.

Поступила 10.10.2019

Принята к печати 31.10.2019