

М.Г. ЛЕОНОВ¹, д.м.н., В.И. НОВИК², д.м.н., профессор, С.А. БЕЛЯЕВА¹, Я.Х.-Б. ЕРШОВА¹, Ж.П. СЕЛИФОНОВА¹, д.биол.н.¹ ГБУЗ «Онкологический диспансер №3», Новороссийск² ФГБУ «Научно-исследовательский онкологический институт им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

НОВЫЙ СПОСОБ

КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНОГО МАТЕРИАЛА ЭКССУДАТОВ

Цель. Совершенствование способа концентрирования клеточного материала экссудатов серозных полостей для цитологического исследования.

Материалы и методы. На основе метода седиментации с использованием капельной воронки при исследовании 28 образцов экссудатов (плевральных и абдоминальных), полученных от 24 больных раком яичников, определено оптимальное время накопления клеточных образцов в выпотных жидкостях.

Проведено сравнение двух способов концентрирования клеточного материала экссудата: с использованием капельной воронки и с использованием цилиндра.

Результаты. Установлено, что при использовании капельной воронки для концентрирования клеточного материала экссудатов оптимальной является экспозиция времени отстаивания 60 мин.

Заключение. Оптимальным является использование капельной воронки для концентрирования клеточного материала экссудатов, при этом в исследуемых препаратах содержится достаточное количество клеточного материала для цитологического исследования и клеточные комплексы более крупные, чем при использовании цилиндра.

Ключевые слова: экссудат, злокачественные новообразования, рак яичников, цитологическая диагностика, способ седиментации.

M.G. LEONOV¹, V.I. NOVIK², S.A. BELYAEVA¹, Ya.H.-B. ERSHOVA¹, Zh.P. SELIFONOVA¹¹ Oncological Dispensary No 3, State Budgetary Healthcare Institution, Novorossiysk² N.N. Petrov Research Oncological Institute of the Ministry of Health of Russia, St. Petersburg

A NEW WAY OF CONCENTRATING THE CELLULAR MATERIAL OF EXUDATES

Objective. Improve the method for concentrating the cellular material of serous cavities exudates for cytological investigation.

Materials and methods. The optimal time of accumulation of cell samples in effusion liquids was determined on the basis of the sedimentation method using a dropping funnel by examining 28 samples of exudates (pleural and abdominal) obtained from 24 patients with ovarian cancer.

The two methods for concentrating the cellular material of exudate were compared: the method using a dropping funnel and the method using a cylinder.

Results. It was found that the 60-minute exposure time was optimal in using a dropping funnel to concentrate the cellular material of exudates.

Conclusion. Using a dropping funnel to concentrate the cellular material of the exudates is optimal. In this case, the investigational preparations contain a sufficient amount of cellular material for the cytological study and the cell complexes are larger than those in using the cylinder.

Keywords: exudate, malignant neoplasms, ovarian cancer, cytological diagnosis, sedimentation method.

ВВЕДЕНИЕ

Основным методом диагностики злокачественных новообразований при наличии выпотов в серозных полостях является цитологическое исследование экссудатов. Однако диагностическая точность существующего традиционного цитологического исследования выпотных жидкостей не превышает 40–60%, что недостаточно для установления точного морфологического диагноза [2, 4].

Одной из причин низкой точности классического цитологического метода исследования выпотных жидкостей является недостаточное содержание в экссудатах опухолевых и мезотелиальных клеток [3].

Известен метод седиментации, который заключается в осаждении дисперсной фазы из дисперсионной среды под действием силы тяжести для концентрирования дисперсионной фазы [1]. Этот способ применяется в том

числе для разделения дисперсионной системы. Несмотря на то что экссудат является дисперсионной системой, при проведении цитологических исследований для концентрирования клеточного материала в выпотных жидкостях способ седиментации не используется.

Целью исследования явилось совершенствование способа концентрирования клеточного материала экссудатов серозных полостей для цитологического исследования.

Материалы и методы исследования. В исследование были включены 24 больных раком яичников, из которых после проведенного обследования с использованием методов лучевой диагностики (ультразвуковое сканирование, РКТ, МРТ) было установлено наличие абдоминального экссудата – у 16, плеврального экссудата – у 4 и плеврального и абдоминального выпотов – у 4. Всем больным выполнена пункция серозных полостей. К экссудату, полученному с помощью лапароцентеза или пневноцентеза, добавляли раствор цитрата натрия 5% для

предотвращения образования фибринового сгустка в соотношении 1:10. При проведении пнеumoцентеза для цитологического исследования собирали весь объем экссудата, а при выполнении лапароцентеза собирали три порции экссудата по 500 мл – в начале, середине и в конце пункции. К экссудату добавляли раствор цитрата натрия 5% для предотвращения коагуляции белка.

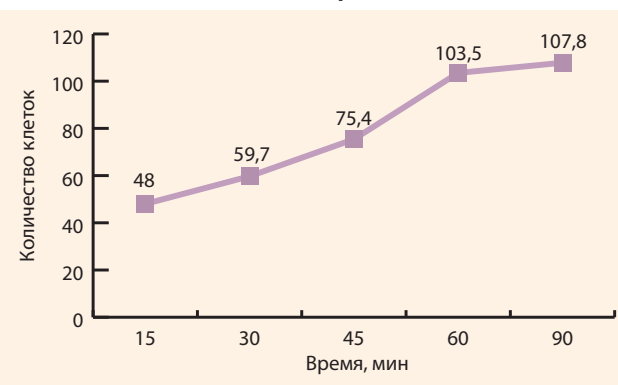
Три порции абдоминального экссудата, полученного после лапароцентеза, переливали в колбу и перемешивали. Затем экссудат (плевральный или абдоминальный) делили на пять равных частей и переливали в капельные воронки для отстаивания и концентрирования клеточного осадка в придонной части выпотной жидкости (рис. 1). Первую порцию отстаивали в течение 15 мин, вторую – 30 мин, третью – 45 мин, четвертую – 60 мин, пятую – 90 мин для определения оптимального времени накопления клеточных образцов в придонном слое экссудата.

По истечении времени экспозиции отстаивания экссудата обогащенный клеточными элементами придонный слой из капельной воронки сливали в 5–6 центрифужных пробирок. Центрифугировали экссудат на центрифуге Электрон ЦЛМН-Р10-01 в течение 10 мин при скорости 2 000 об/мин и проводили оценку клеточности в каждом исследуемом образце. Для этого каплю клеточного осадка переносили на предметное стекло, покрывали покровным стеклом и проводили подсчет клеток

Рисунок 1. Отстаивание экссудата в капельной воронке



Рисунок 2. Количество клеточных образцов в экссудате в зависимости от экспозиции времени отстаивания



(опухолевых клеток и клеток мезотелия без подсчета клеточных элементов крови) в нативном препарате при увеличении 280х (объектив 40х, окуляр 7х) в 3–5 полях зрения. Из полученного сконцентрированного клеточного осадка готовили микропрепараты для цитологического исследования.

Проводили сравнение двух способов концентрирования клеточного материала экссудата (с использованием капельной воронки и использованием цилиндра). Было исследовано три образца асцитической жидкости, полученной у больных, имеющих цитологическую верификацию диагноза рак яичников. Перед началом накопления клеточного материала определяли клеточность образцов экссудатов. Затем экссудат переносили в два цилиндра и в две капельные воронки в равном объеме, проводили его отстаивание в течение 30 и 60 мин и определяли количество клеточных образцов и клеточных комплексов.

Через 15 мин отстаивания среднее количество клеток в 28 исследуемых образцах экссудатов составило 48 в поле зрения, через 30 минут – 59,7, через 45 минут – 75,4, через 60 мин – 103,5, через 90 минут – 107,8. На рисунке 2 представлена кривая осаждения клеточных образцов экссудатов в зависимости от времени их отстаивания.

Количество клеточных образцов в экссудате при экспозиции времени его отстаивания 60 мин больше в 1,7 раза (на 73,3%), чем при экспозиции времени 30 мин. Дальнейшее пролонгирование времени экспозиции не имеет значимого увеличения клеточных образцов в исследуемых экссудатах.

В настоящее время в клинической лабораторной практике используется способ концентрирования клеточного материала экссудата путем его отстаивания в цилиндре с последующим забором обогащенного клеточными образцами придонного слоя выпотной жидкости, его центрифугирования и приготовления цитологических препаратов из клеточного осадка.

Нами проведено сравнение двух способов концентрирования клеточного материала в выпотных жидкостях для получения цитологических препаратов: с использованием капельной воронки и приготовления цитологиче-

ских препаратов из обогащенного клеточными образцами придонного слоя экссудата путем его отстаивания в цилиндре.

Согласно данным *таблицы*, среднее количество клеточных образцов, подсчитанных в асцитической жидкости сразу после ее получения, составило 12,3 в поле зрения, а клеточных комплексов – 1,7. После отстаивания выпотной жидкости через 30 мин среднее количество клеточных образцов в цилиндре составило 17,3 в поле зрения, а клеточных комплексов – 2,3. В капельной воронке – 27,3 и 3,7 соответственно. Через 60 минут отстаивания экссудата количество клеточных образцов в цилиндре составило 60 в поле зрения и 4,3 комплекса в поле зрения, а в капельной воронке – 79 и 7 соответственно.

При сравнении двух способов концентрирования клеточного материала экссудата с традиционным цитологическим методом количество клеточных образцов через 30 мин отстаивания биологической жидкости в цилиндре увеличивается на 40%, в капельной воронке – на 121%, а через 60 мин увеличивается в 3,9 и 5,4 раза соответственно. Также необходимо отметить следующую закономерность: при отстаивании экссудата в капельной воронке происходит увеличение не только количества клеточных образцов и клеточных комплексов, но и количества клеточных элементов в клеточных комплексах по сравнению с образцами, полученными из обогащенного придонного слоя выпотной жидкости в цилиндре (*рис. 3, 4*).

Рисунок 3. Нативный микропрепарат. Клеточный осадок, полученный из обогащенного придонного слоя асцитической жидкости (цилиндр)

Время экспозиции отстаивания 60 минут. Ув. об. 40×

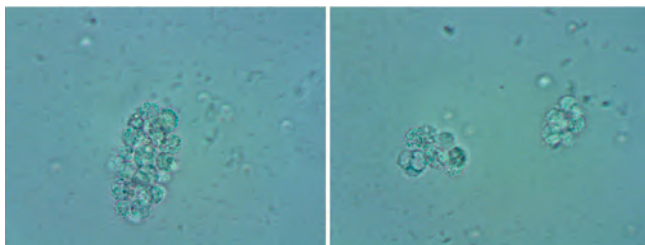


Рисунок 4. Нативный микропрепарат. Клеточный осадок, полученный из обогащенного придонного слоя асцитической жидкости (капельная воронка)

Время экспозиции отстаивания 60 минут. Ув. об. 40×

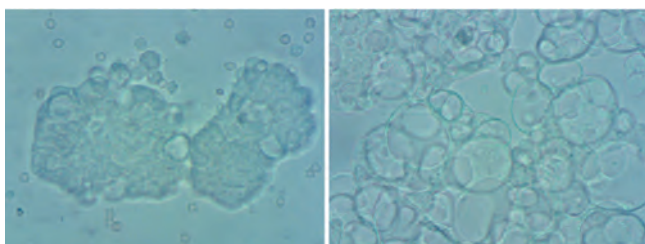


Таблица. Количество клеточных образцов в асцитической жидкости, полученных из капельной воронки и цилиндра, в зависимости от экспозиции времени отстаивания

Количество клеток/комплексов после получения асцитической жидкости	Количество клеток/комплексов через 30 мин		Количество клеток/комплексов через 60 мин	
	цилиндр	капельная воронка	цилиндр	капельная воронка
10/1	15/3	20/5	60/8	125/10
18/2	20/1	30/2	28/3	50/6
9/2	17/2	32/4	20/2	62/5
Среднее количество клеток/комплексов				
12,3/1,7	17,3/2,3	27,3/3,7	60/4,3	79/7

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, использование капельной воронки для концентрирования клеточного материала экссудатов с экспозицией времени отстаивания экссудата 60 мин является оптимальным для получения качественных микропрепаратов, содержащих достаточное количество клеточного материала для цитологического исследования. Использование капельной воронки для накопления клеточных образцов в экссудате позволяет получить более крупные клеточные комплексы, чем использование цилиндра.



Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в ходе написания данной статьи.

ЛИТЕРАТУРА

- Балезин С.А., Ерофеев Б.В., Подобаев Н.И. Основы физической и коллоидной химии: уч. пособие. М.: Просвещение, 1975. 398 с. / Balezin SA, Erofeev BV, Podobayev NI. Fundamentals of physical and colloidal chemistry: a textbook. Moscow: Prosveshchenie, 1975. 398 p.
- Волченко Н.Н., Савостикова М.В. Питательная среда накопления образца клеток для последующего цитологического и/или иммуноцитохимического анализа. М., 2003. Патент РФ №2246110. Опубликовано 10.02.2005 г. / Volchenko NN, Savostikov MV. A nutrient medium accumulating cell samples for subsequent cytological and/or immunocytochemical analysis. M., 2003. Patent of the Russian Federation No. 2246110. Published on February 10, 2005
- Долгов В.В., Шабалова И.П., Миронова И.И. и соавт. Выпотные жидкости. Лабораторное исследование. М., 2006. 161 с. / Dolgov VV, Shabalova IP, Mironova II, et al. Ejection fluids. Laboratory research. M., 2006. 161 p.
- Савостикова М.В. Жидкостная цитология и иммуноцитохимическое исследование в цитологической диагностике биологических жидкостей и смывов с брюшины при онкогинекологических заболеваниях. *Онкогинекология*, 2013, 4: 42–43. / Savostikova MV. Liquid cytology and immunocytochemical study in cytological diagnostics of biological fluids and washings from the peritoneum in oncogynecological diseases. *Oncogynecologiya*, 2013, 4: 42–43.