

Метод атомно-силовой микроскопии в диагностике опухолей молочной и щитовидной железы

Волченко Н.Н., Решетов И.В., Славнова Е.Н., Сухарев С.С.

Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена

Цель исследования: Разработка и усовершенствование метода цитологической диагностики опухолей и предопухолевых заболеваний молочной, щитовидной железы путем применения атомно-силовой микроскопии.

Материалы и методы: В работе использовался исследовательский Атомно Силовой Микроскоп (АСМ) производства «ЗАО НТ НДТ» г. Зеленоград, Россия.

Исследовали 120 цитологических препаратов опухолей молочной и щитовидной желез, полученные методом тонкоигольной аспирационной биопсии под контролем ультразвукового исследования и соскобы с операционного материала. Исследовали 15 иммуноцитохимических препаратов рака молочной железы. Иммуноцитохимию проводили методом Ultra Vision для определения экспрессии онкобелка Her2/neu (c-erbB-2) при раке молочной железы. Все препараты исследовались с помощью обычной световой микроскопии, а затем с помощью АСМ.

Результаты: С помощью АСМ решены три задачи цитологической диагностики:

1. Разработаны объективные критерии дифференциальной диагностики между нормальными клетками и клетками рака молочной железы (РМЖ), папиллярного рака щитовидной железы (ПР ЩЖ). Подобраны объективные морфометрические показатели, имеющие дифференциально-диагностическое значение.

Молочная железа

При проведении АСМ в клетках инвазивного протокового РМЖ отмечался грубый микрорельеф поверхности ядер, ядрышки хорошо просматриваются в виде локальных возвышений над поверхностью ядра, ядерно-цитоплазменное соотношение сдвинуто в сторону ядра. Контуры ядра и цитоплазмы неровными. Высота ядра составляет – 574 ± 143 нм. Высота цитоплазмы – 248 ± 94 нм, соотношение высоты ядра к высоте цитоплазмы составляет 2.5 ± 1 . Высота ядрышек над поверхностью ядра – 156 ± 90 нм.

Методом АСМ при фиброаденоме (ФА) в клетках эпителия хорошо определялась сглаженность микрорельефа ядер. Контуры ядра и цитоплазмы были ровными. Если провести сечение клеток плоскостью, параллельной вертикальной оси, определяются высота ядра – 417 ± 89 нм и цитоплазмы – 239 ± 57 нм. Соотношение высот ядра и цитоплазмы 1.8 ± 0.4 . Этот параметр может служить объективным критерием дифференциальной диагностики ФА и РМЖ (при раке – 2.5 ± 1 , при ФА – 1.8 ± 0.4 , $p < 0.05$).

Щитовидная железа

При исследовании ПР ЩЖ методом АСМ обращает на себя внимание грубый микрорельеф поверхности ядер. Обнаруживаются ядрышки в виде локальных возвышений. Одним из важных диагностических признаков является обнаружение внутриядерных включений цитоплазмы (инвагинаций цитоплазмы), глубина которых 290 ± 82 нм. Следует отметить небольшое увеличение размеров ядер при ПР ЩЖ, высота цитоплазмы – 266 ± 74 нм, высота ядра – 605 ± 103 нм, высота

ядрышек (над ядром) – 353 ± 216 нм. Соотношение высоты ядра к высоте цитоплазмы – 2.5 ± 1.2 . Отношение высоты ядрышка над ядром к высоте ядра – 0.34 ± 0.21 .

Измерения морфометрических параметров с помощью АСМ при фолликулярной аденоме щитовидной железы показали, что высота цитоплазмы 277 ± 64 нм, высота ядра – 547 ± 151 нм. Соотношение высоты ядра к высоте цитоплазмы – 2 ± 0.5 . Отношение высоты ядрышка над ядром к высоте ядра – 0.63 ± 0.43 . Значения отношения высоты ядрышка к высоте ядра отличаются при ПР ЩЖ и фолликулярной аденоме и могут служить объективными критериями дифференциальной диагностики между этими патологическими процессами (для ПР ЩЖ – 0.63 ± 0.43 , для фолликулярной аденомы 0.34 ± 0.21 , $p < 0.05$).

На сканах коллоидного зоба, полученных средствами АСМ, видны клетки правильной округлой формы, со сглаженным микрорельефом ядер, отсутствием ядрышек, небольшой цитоплазмой. Высота ядра – 315 ± 82 нм, высота цитоплазмы – 169 ± 42 нм. Соотношение высоты ядра к высоте цитоплазмы 1.9 ± 0.6 . Наши измерения показали, что клетки коллоидного зоба ЩЖ и ПР ЩЖ различаются статистически значимо ($p < 0.05$) по следующим параметрам: высота цитоплазмы, высота ядра, соотношение высот ядра и цитоплазмы (для коллоидного зоба 1.9 ± 0.6 , для ПР ЩЖ – 2.5 ± 1.2).

2. Разработаны объективные критерии различных степеней дифференцировки инвазивного протокового рака молочной железы.

Важным показателем степени дифференцировки рака молочной железы служит структура и размеры ядрышек. В наших исследованиях наблюдались 3 вида ядрышек: при высокодифференцированном раке преобладали ядрышки цилиндрической формы диаметром в среднем $0,6$ мкм с толщиной стенок около 200 нм и высотой над ядром порядка 20 нм, при умеренно-дифференцированном – цилиндрические с диаметром около 3 мкм, толщиной стенок порядка 1 мкм и высотой над ядром порядка 50 нм, при низкодифференцированном – в виде сплошного (нецилиндрического) возвышения диаметром 2 мкм и высотой над ядром около 150 нм.

Таким образом, были получены объективные дифференциально-диагностические критерии между различными степенями дифференцировки рака МЖ по форме и размеру ядрышек.

3. Определены объективные критерии иммуноцитохимической реакции (ИЦХ) гиперэкспрессии онкопротеина HER2/neu при раке молочной железы. АСМ иммуноцитохимических препаратов с гиперэкспрессией Her2/neu позволяет четко идентифицировать увеличение и уплотнение мембраны опухолевых клеток. При АСМ гиперэкспрессия Her2/neu проявляется возвышением мембраны клеток на 850 нм. Методом АСМ возможна оценка интенсивности иммуноцитохимической реакции по высоте окрашенной мембраны, которая меняется от практически нулевой до 850 нм в зависимости от степени экспрессии онкопротеина Her2/neu. Легко оценивать и замкнутость окраски мембраны. Важность определения при раке молочной железы гиперэкспрессии рецептора эпидермального фактора роста 2-го типа Her2/neu, придающего клеткам свойство неограниченного деления, определяется тем, что эти опухоли с одной стороны имеют плохой прогноз, но в то же время хорошо поддаются таргетной терапии герцептином.