

ЦИТОМОРФОМЕТРИЯ КЛЕТОК ПАПИЛЛЯРНОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЕТОДОМ КОГЕРЕНТНОЙ ФАЗОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Клемяшов И.В., Тычинский В.П., Славнова Е.Н.*

(Исследования проводятся на созданном в лаборатории «Когерентной оптики» МИРЭА микроскопе «Эйрискан» - научн. руководитель профессор Тычинский В.П. по совместной с ФГУ Росмедтехнологий Московский научноисследовательский онкологический институт* при поддержке гранта РФФИ 07-04-00473.) E-mail: ivklem@mail.ru

Несмотря на высокую точность цитологического исследования в ряде случаев существует ряд трудностей в интерпретации цитологической картины. Случаи ошибочных заключений цитолога показывают необходимость совершенствовать цитологические методы исследований клеточного материала с привлечением других методов. Одним из таких методов является Когерентная Фазовая Микроскопия, позволяющая получать дополнительную количественную цитологическую информацию.

Папиллярный рак щитовидной железы является наиболее часто встречающейся формой рака щитовидной железы (ЩЖ) и составляет около 80% всех видов карцином ЩЖ. Своевременная диагностика позволяет добиться полного излечения. Единственным методом предоперационной морфологической диагностики рака щитовидной железы (РЩЖ) является цитологический метод. Несмотря на высокую точность цитологического исследования в ряде случаев существует ряд трудностей в интерпретации цитологической картины. Существование этих трудностей привело к появлению термина – фолликулярная опухоль, куда входят как аденома, так и фолликулярный вариант папиллярного рака ЩЖ. Кроме того, существование папиллярных структур при зобах, при тиреоидитах может привести к ошибочным заключениям цитолога о наличии папиллярного рака. Все эти случаи показывают необходимость совершенствовать цитологические методы исследований клеточного материала с привлечением других методов.

Одним из таких методов является разработанный в МИРЭА под руководством проф. Тычинского В.П. метод Когерентной Фазовой Микроскопии (КФМ).

Метод КФМ.

КФМ позволяет получить изображение объекта в виде двумерного распределения оптической разности хода (оптической толщины, ОТ) $h(x, y)$, где x, y – координаты в плоскости объекта. В предположении сферической или цилиндрической формы объекта его рефрактерность, равная разности среднего по объему показателя преломления объекта и внешней среды n_0 , $\Delta n = \langle n(x, y, z) \rangle - n_0 = \Delta h/d = \Delta h/H$, где H - геометрическая толщина $H \approx d$ равна поперечному размеру, Δh - максимальное значение фазовой толщины.

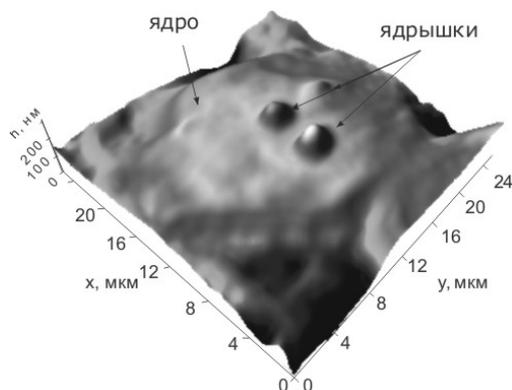


Рис. 1

В трехмерном фазовом изображении клетки (рис.1) обнаруживается ядро и на его фоне оптически более плотные ядрышки. Рефрактерность ядрышка $\Delta n = \Delta h/d$, определяющая его контраст в фазовом изображении, зависит от превышения Δh его ОТ над ядром. Реальный показатель преломления ядрышка $\langle n \rangle$ можно выразить суммой:

$$\langle n \rangle = n_0 + \langle n_N \rangle + \Delta n,$$

где $\langle n_N \rangle$ - показатель преломления ядра $\langle n_N \rangle = \Delta h_N / d_N$, Δh_N - оптическая толщина ядра, d_N - диаметр.

Подробно методика освещена в работах [4,5]. (В этих работах впервые было продемонстрировано действие химеотерапевтических препаратов на отдельные нативные опухолевые клетки в реальном времени).

Целью нашей совместной работы являлась объективизация цитологической диагностики папиллярного рака ЩЖ путём морфометрии с использованием метода КФМ.

Было исследовано 150 клеток от семи больных с ПРЩЖ.

На рис.2 показана сравнительная морфология характерных клеток ЩЖ в норме и при папиллярном раке. Фазовые изображения (топограммы) получены методом КФМ на нативном материале.

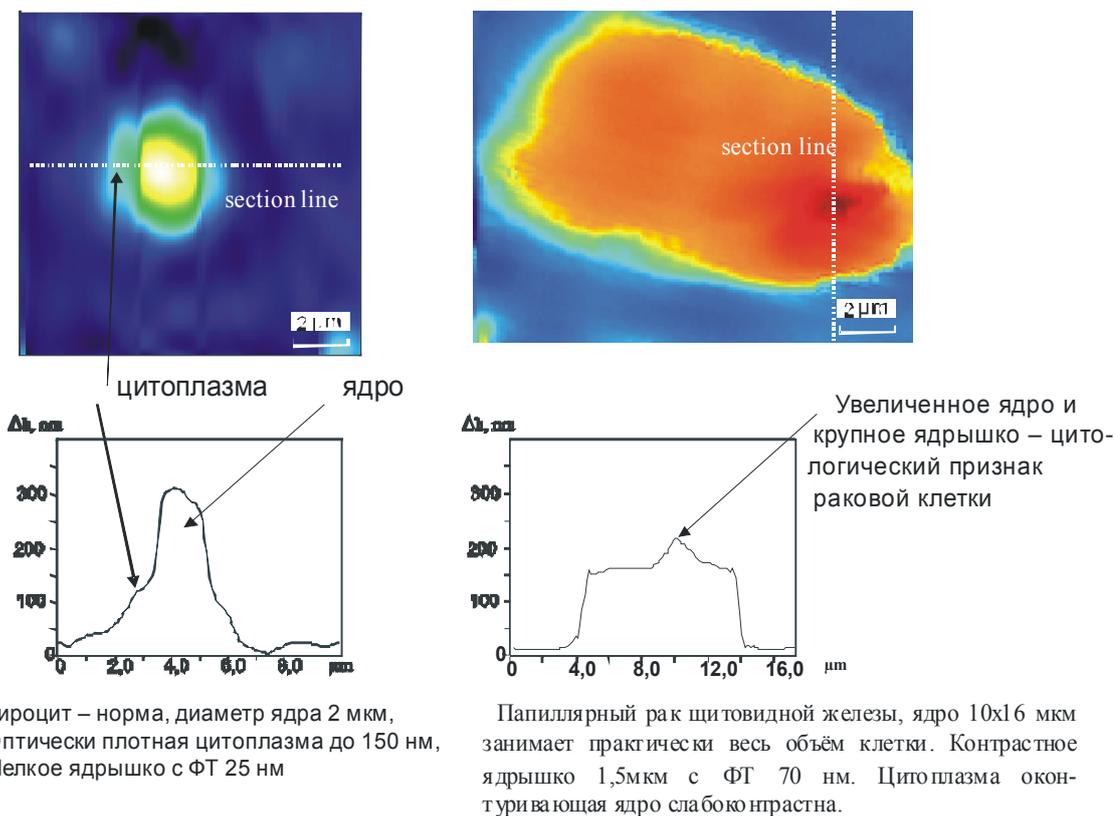


Рис.2

Ниже приведена фотография клеток папиллярного рака ЩЖ, полученная на фиксированных клетках по стандартной методике (рис.3)

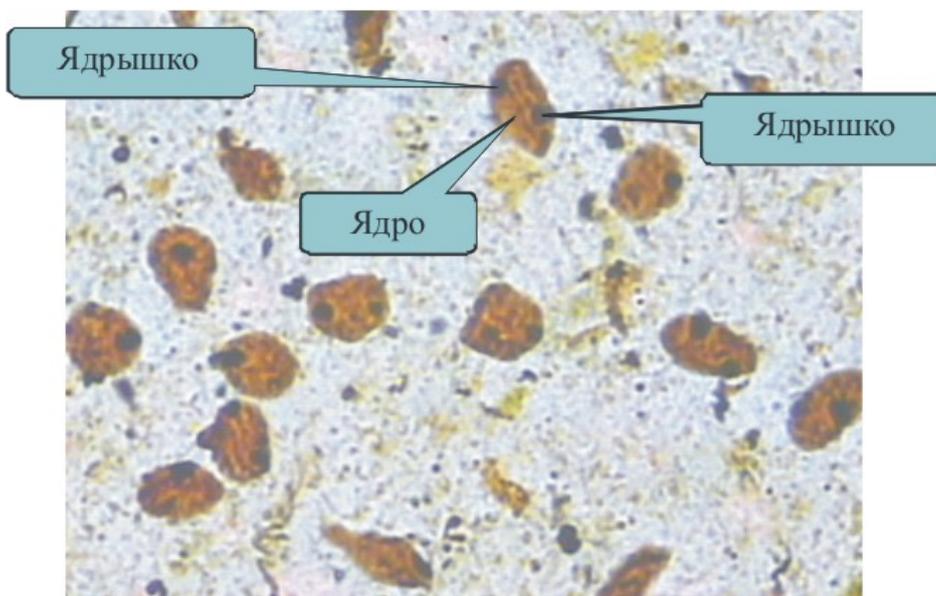


Рис. 3.

Было получено ядерно-цитоплазматическое соотношение по площади в 1,5-2 раза больше, чем в доброкачественных образованиях или норме.

Это хорошо видно из гистограмм фазовых толщин (ФТ) представленных ниже, рис.4а-норма, б –ПРЦЖ. По оси x отложена ФТ в ангстремах. Перемножая интервалы, относящиеся к ядру и ядрышку на число повторений, получаем значения фазовых объёмов.

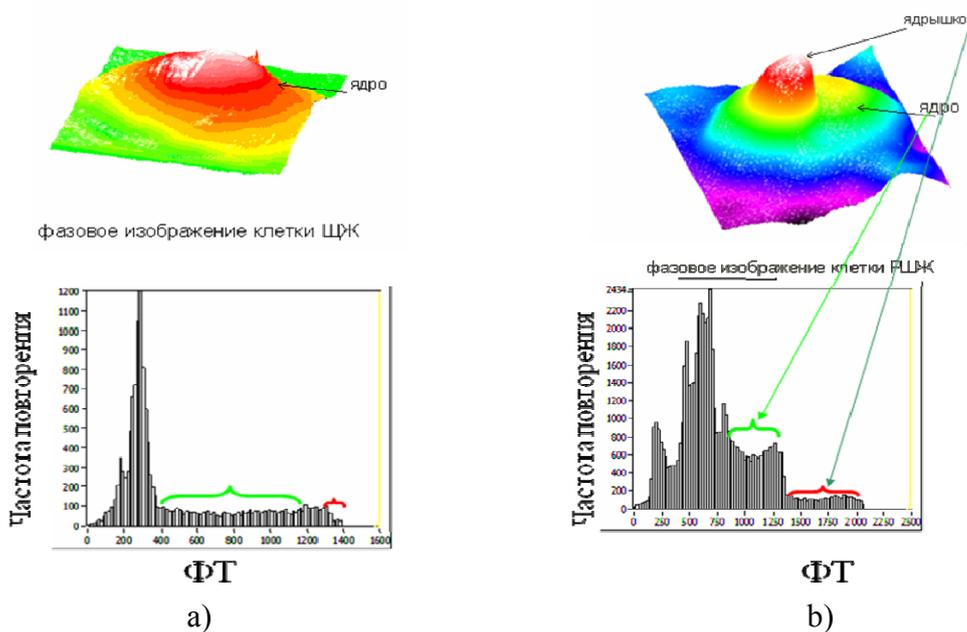


Рис.4

- Цитологические критерии папиллярного рака достаточно хорошо известны:
- наличие папиллярных структур (взаимное расположение клеток);
 - наличие симпластов (когда клетки объединены одной цитоплазмой) (рис.5);
 - наличие внутриядерных включений цитоплазмы (рис.6);
 - тягучий коллоид (синтезируется клетками и занимает межклеточное пространство);
 - увеличение в пунктатах количества клеток;
 - псаммомные тельца в 30-60% карцином;

- плоскоклеточная метаплазия (наблюдается в небольшом проценте случаев-уплощение клеток);
- количество ядрышек может быть меньше, но общая средняя площадь, занимаемая ядрышками в ядре больше, чем при доброкачественных процессах а ядрышково-ядерное соотношение в 1,5-2 раза выше (КФМ позволил получить количественные данные) ;
- встречается от одного до четырех ядрышек на клетку, редко больше; при зобе присутствуют мелкие ядрышки в больших количествах – до 8 (очень редко до 11).

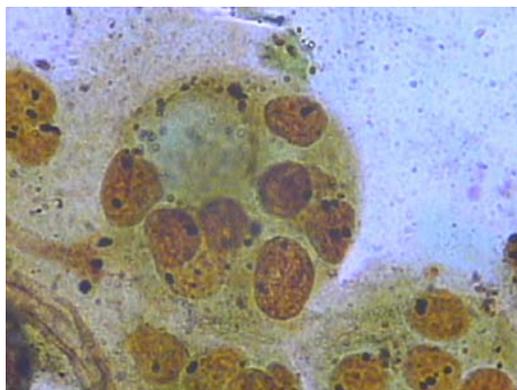


Рис.5

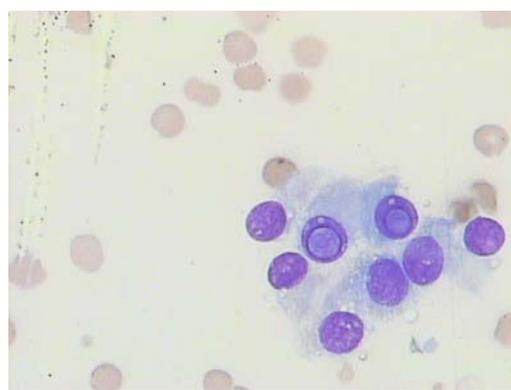


Рис.6

Когерентный фазовый микроскоп позволяет выявлять области активности, соответствующие происходящим в клетке метаболическим процессам (рис.7):

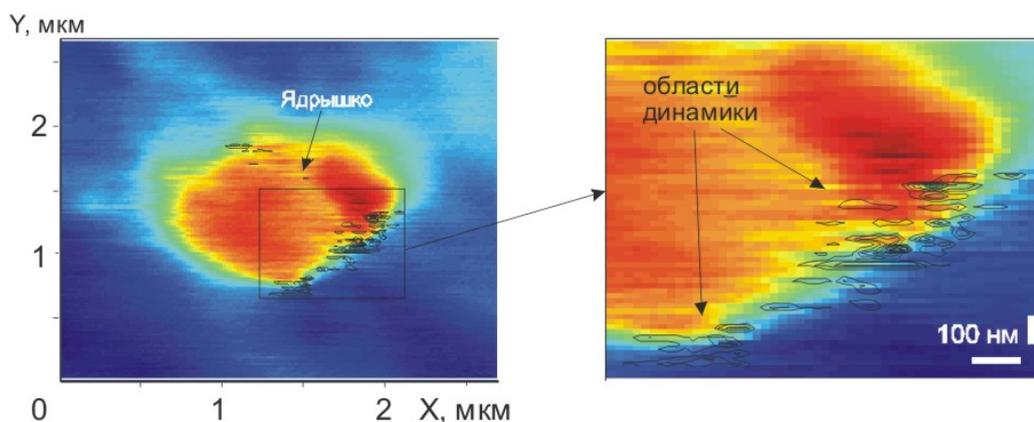


Рис.7

Итак, метод КФМ позволил объективизировать данные цитологических исследований с получением количественных значений морфологических параметров клетки; появилась возможность выявления областей метаболической внутриклеточной активности с получением динамических параметров [3], рис.7.

1. В.П. Тычинский, А.В. Кретушев, И.В. Клемяшов, Т.В. Вышенская, А.А. Штиль, О.В. Зацепина, Когерентная фазовая микроскопия – новый подход к исследованию физиологического состояния ядрышка. *Докл. РАН, серия Биофизика, Биохимия и Мол. Биология*, 405(4): 432-436 (2005).

2. V. P. Tychinsky, A.V. Kretushev, I.V. Klemyashov, T.V. Vyshenskaya, A.A. Shtil, O.V. Zatsepina, Coherent phase microscopy, a novel approach to study the physiological state of the nucleolus, *Doklady Biochemistry and Biophysics* 405(4): 432-436 (2005).

3. В.И. Чиссов, В.П. Тычинский, Н.Н. Волченко, И.В. Решетов, А.В. Кретушев, Т.В. Вышенская, Е.Н. Славнова, В.В. Барыгина, И.В. Клемяшов, Когерентная фазовая микроскопия опухолей на модели рака молочной железы, *Российский Онкологический Журнал*, 2: 11-15 (2006).

4. В.П. Тычинский, А.В. Кретушев, И.В. Клемяшов, Т.В. Вышенская, Н.А. Филиппова, Н.Т. Райхлин, А.А. Штиль, Исследование оптических параметров ядрышек при действии ингибиторов транскрипции методом когерентной фазовой микроскопии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 142(10), 465-470, (2006).

5. В.П. Тычинский, А.В. Кретушев, И.В. Клемяшов, Т.В. Вышенская, А.Б. Иванов, П.С.Игнатъев, Н.А. Филиппова, Н.Т. Райхлин, А.А. Штиль, Снижение фазовой толщины – характерная реакция ядрышек на различные токсические воздействия при исследовании методом когерентной фазовой микроскопии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, (4), 473-477, (2007).