

DOI: <https://doi.org/10.17650/2618-7019-2024-7-1-37-51>



ВОЗМОЖНОСТИ СОВРЕМЕННОЙ ЦИТОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ В ИССЛЕДОВАНИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ СЕРОЗНЫХ ВЫПОТОВ

Е.С. Федосеева¹, О.Л. Василева², С.Л. Воробьев², Е.С. Козорезова², Е.Ю. Фурминская³,
С.В. Прилучный³, Я.В. Василев⁴, В.Н. Гриневич^{1,5}

¹Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 249036 Обнинск, ул. Королева, 4;

²ООО «Национальный центр клинической морфологической диагностики»; Россия, 192071 Санкт-Петербург, проспект Славы, 32;

³ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента Российской Федерации; Россия, 121359 Москва, ул. Маршала Тимошенко, 15;

⁴ФГБУ «Северо-Западный окружной научно-клинический центр им. Л.Г. Соколова» ФМБА России; Россия, 194291 Санкт-Петербург, проспект Культуры, 4;

⁵Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, 3

Контакты: Евгения Сергеевна Федосеева fedoseevaes87@gmail.com

В обзоре представлены возможности современной цитопатологической диагностики выпотных жидкостей, включая иммуноцитохимию и иммуногистохимию, молекулярную генетику и цитогенетику. Отражены возможности и особенности работы с разными вариантами клеточных блоков, полученных из цитологического материала.

Ключевые слова: цитологическая диагностика, выпотные жидкости, клеточный блок, иммунохимия, молекулярная генетика

Для цитирования: Федосеева Е.С., Василева О.Л., Воробьев С.Л. и др. Возможности современной цитологической лаборатории в исследовании злокачественных серозных выпотов. Онкопатология 2024;7(1):37–51. DOI: <https://doi.org/10.17650/2618-7019-2024-7-1-37-51>

Capabilities of contemporary cytology laboratories in the examination of malignant serous effusions

E.S. Fedoseeva¹, O.L. Vasileva², S.L. Vorobyev², E.S. Kozorezova², E. Yu. Furminskaya³, S.V. Priluchny³,
Ya. V. Vasilev⁴, V.N. Grinevich^{1,5}

¹A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center – a branch of the National Medical Research Radiology Center, Ministry of Health of Russia; 4 Koroleva St., Obninsk 249036, Russia;

²National Center for Morphological Diagnostics; 32 Prospekt Slavy, Saint Petersburg 192071, Russia;

³Central Clinical Hospital with Polyclinic, Administration of the President of the Russian Federation; 15 Marshala Timoshenko St., Moscow 121359, Russia;

⁴L.G. Sokolov North-Western district scientific and clinical center, Federal Medical and Biological Agency; 4 Prospekt Kul'tury, Saint Petersburg 194291, Russia;

⁵P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – a branch of the National Medical Research Radiology Center, Ministry of Health of Russia; 3 2nd Botkinsky proezd, Moscow 125284, Russia

Contacts: Evgeniya Sergeevna Fedoseeva fedoseevaes87@gmail.com

This review presents a modern vision of serous effusion cytopathology, including immunocytochemistry, immunohistochemistry, molecular genetics, and cytogenetics. The features of working with various types of cell blocks obtained from cytological material are also reflected.

Keywords: cytological diagnostics, serous effusions, cell block, immunochemistry, molecular genetics

For citation: Fedoseeva E.S., Vasileva O.L. Vorobyev S.L., et al. Capabilities of contemporary cytology laboratories in the examination of malignant serous effusions. *Onkopatologiya = Oncopathology* 2023;7(1):37–51. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2618-7019-2024-7-1-37-51>

ВВЕДЕНИЕ

Цитологическая лаборатория может предложить клиническому специалисту и пациенту гораздо больше, чем традиционная цитоморфологическая диагностика. И это не только жидкостная цитология, постепенно занимающая в России свою нишу как скрининговый (для рака шейки матки) и вспомогательный диагностический метод, но и связанные с ее применением дополнительные возможности: в первую очередь иммунохимия и молекулярные исследования. Это также и технология клеточных блоков, существующая в разных модификациях и активно осваиваемая как цитологами, так и патологоанатомами. Злокачественные серозные выпоты — поистине неисчерпаемый ресурс для изучения индивидуального фенотипического портрета опухоли, определения предиктивных биомаркеров, создания биобанков и клеточных культур.

Цель обзора — систематизация актуальной информации о возможностях рутинной цитологической деятельности и освещение перспективных методов работы с выпотными жидкостями в онкологической практике.

Цитологический материал является не только основой морфологической диагностики на клеточном уровне, но и бесценным источником для изучения разных биомаркеров [1]. При выявлении злокачественной опухоли применение дополнительных методов исследования для уточнения ее фенотипического портрета, факторов предикции и прогноза уже стало повседневной практикой в крупных онкологических учреждениях. Причем, в зависимости от задачи, можно использовать и приготовленный традиционными методами материал в виде мазков или цитоспиновых препаратов, и материал жидкостной цитологии (ЖЦ), и срезы клеточных блоков (КБ). Все эти методы дополняют друг друга и расширяют возможности цитологической лаборатории [2]. Так, виалы для ЖЦ за счет спиртосодержащей консервирующей среды позволяют сохранять материал в холодильнике до нескольких месяцев. А КБ, которые могут быть приготовлены как из свежего образца (пунктата, аспирата и т.д.), так и из осадочного содержимого виалы для ЖЦ, позволяют обеспечить бессрочное хранение, что бесценно для проспективного и ретроспективного изучения индивидуальных характеристик опухоли [3].

При работе с клеточными суспензиями в лаборатории должна быть предусмотрена возможность гибкого подхода к их обработке, так как, с одной стороны, разнообразие преаналитических факторов (методик приготовления, фиксации и окрашивания препаратов)

ограничивает возможности стандартизации протоколов для вспомогательных методов исследования на цитологическом материале [4], а с другой, материал имеет переменный объем и клеточность, что делает изготовление тех же КБ не всегда выполнимым.

КЛЕТОЧНЫЕ БЛОКИ

О достоинствах КБ в отечественной и зарубежной научной литературе уже сказано немало, и если кратко резюмировать основные, то это:

- возможность бессрочного архивирования цитологического материала;
- применение дополнительных методов диагностики [иммунохимия, флуоресцентная гибридизация (*fluorescence in situ* hybridization, FISH), полимеразная цепная реакция (ПЦР), секвенирование и др.).

В России эта методика приобретает все большую популярность, особенно в последнее десятилетие [5–7]. Эволюция цитологической диагностики и постоянный поиск оптимальных вариантов взаимодействия с «капризным» материалом способствовали появлению множества разных сред для КБ — от «подручных» желатина, агара и плазмы-тромбина до готовых решений, в том числе автоматизированных (AgarCyto, HistoGel™, Shandon Cytoblock Kit™, Cellient™ Cell Block System и др.) [7–16].

Однако коммерческие наборы для приготовления КБ не всегда доступны, некоторые из таких методик трудоемки и в итоге оказываются экономически неэффективны. Кроме того, наиболее конкордантные результаты для иммунохимических (ИХ) и молекулярно-генетических исследований можно получить на тех КБ, протоколы приготовления которых максимально приближены к гистологическим (FFPE — formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks, фиксированные формалином и заключенные в парафин образцы). То есть с точки зрения стандартизации идеальный КБ — тот, который приготовлен методом фиксации клеточного осадка в 10 % забуференном формалине. Но на практике добиться формирования сгустка таким методом не всегда удается.

Решить эту проблему, помимо желирующих агентов, может спиртоформалиновая смесь (СФС), которая готовится из расчета: на 9 частей 90 % этилового спирта 1 часть 10 % забуференного формалина (рис. 1, а). Для приготовления КБ образец выпотной жидкости необходимо осадить в центрифужной пробирке (на скорости 1500 об/мин в течение 10 мин, либо 2400 об/мин в течение 5 мин), затем удалить супернатант (рис. 1, б, в). К осадку объемом не менее 200 мкл добавить СФС

из расчета: на 4 части СФС 1 часть осадка. Тщательно перемешать, оставить на 1 ч (рис. 1, а). Пробирку повторно центрифугировать на скорости 1500 об/мин в течение 10 мин, удалить супернатант (рис. 1, б, в). К осадку добавить забуференный 10 % формалин.

Оставить фиксироваться минимум на 6 ч для формирования плотного сгустка (рис. 1, ж). В оригинальной статье К.М. Desai и соавт. [17] предлагаемое время фиксации в формалине — 12 ч, после чего осуществляется протокол гистологической проводки. Однако в случае, если к моменту добавления формалина сгусток уже сформировался, это время можно сократить при условии, что КБ будет фиксироваться в формалине не менее 6 ч. Далее поместить сгусток в кассету для гистологической проводки (по протоколу малых биопсий (рис. 1, з). При необходимости использовать специальные прокладки.

Протокол гистологической проводки КБ, рекомендованный в оригинальной статье (каждый этап — 45 мин):

- 90 % метанол;
- 100 % метанол (×2);
- ацетон;
- ксилол (×2);
- залить материал в парафин;
- выполнить серийные срезы толщиной 4 мкм;
- окрасить срезы гематоксилином и эозином.

Воздействие спирта на цитологический материал, как отмечено в некоторых публикациях, может повлиять на качество ИХ-реакций, что требует валидации протокола КБ в каждой конкретной лаборатории [18].

ИММУНОХИМИЯ

Серозный выпот при диссеминированной злокачественной опухоли, как правило, — богатый материал для уточнения ее гистогенеза, определения гормонального статуса (например, при раке молочной железы, тела и придатков матки) и предиктивных маркеров, актуальность анализа которых очевидна по мере

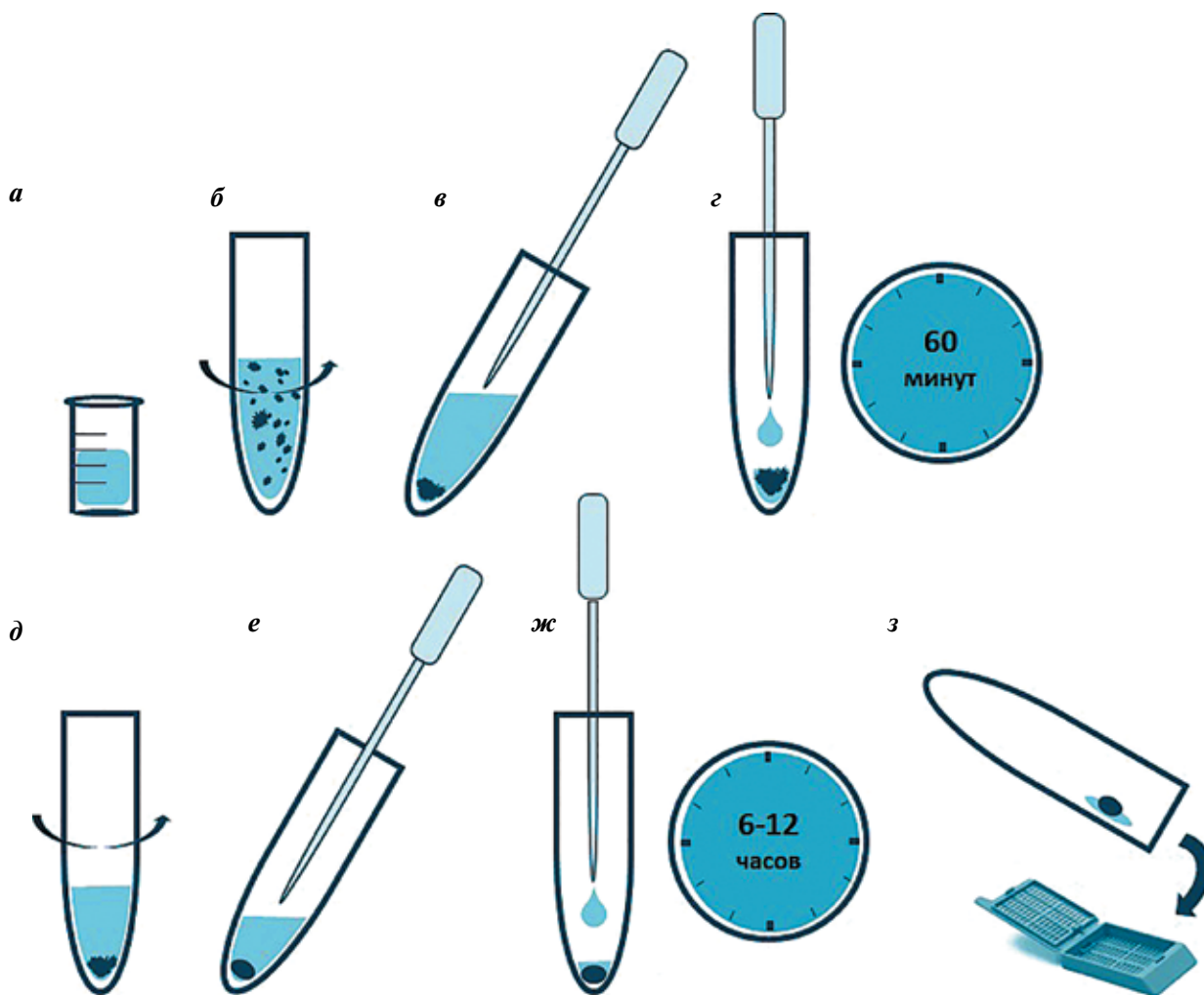


Рис. 1. Подготовка клеточного блока с помощью спиртоформалиновой фиксации. Подробное описание см. в тексте

Fig. 1. Preparation of a cell block by means of formalin-alcohol fixation. See text for detailed description

появления новых таргетных препаратов и развития иммунотерапии.

В частности, для некоторых вариантов карцином, например, рака легкого, терапией первой линии являются селективные ингибиторы тирозинкиназы или ингибиторы контрольных точек иммунного ответа (чекпойнт-ингибиторы), успешно определяемые иммуногистохимически. Таким образом, изучение иммунохимического профиля метастатической опухоли позволяет клиницисту скорректировать прогноз и лечение, а пациенту дает перспективу получения эффективной терапии либо включения в клинические исследования.

Рассмотрим несколько наиболее актуальных для цитолога ситуаций на практических примерах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРЕДИКТИВНЫХ БИОМАРКЕРОВ НА МАТЕРИАЛЕ КБ ПРИ РАСПРОСТРАНЕННОМ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО

В лабораторию поступает плевральная жидкость от *пациентки*, 84 лет, с подозрением на карциному яичников, множественными образованиями в легких, правосторонним гидротораксом. В цитологическом материале выявлены клетки метастатической аденокарциномы (рис. 2, а). Препараты клеточные, объем выпота составляет 800 мл, что позволяет приготовить КБ (рис. 2, б). На материале КБ выполнено иммуногистохимическое (ИГХ) исследование, демонстрирующее в клетках опухоли следующие реакции: CK7+, PAX8-, GATA-3-, ER-, TTF-1-, Napsin A+ (рис. 2, в–з), что дает возможность диагностировать метастаз аденокарциномы легкого.

Поскольку у пациентки выявлен распространенный немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), следующим этапом материал КБ отправляется на молекулярно-генетическое исследование для тестирования на наиболее распространенные мутации в генах *EGFR*, *BRAF*, *KRAS* и *HER2* методом ПЦР (в данном клиническом наблюдении патологических aberrаций не обнаружено).

Также параллельно ИГХ-методом был оценен уровень экспрессии PD-L1 для определения перспектив иммунной терапии (рис. 3).

Трансмембранный белок PD-L1 в норме экспрессируется многими типами клеток и связывается с соответствующим рецептором иммунокомпетентных клеток (PD-1), подавляя иммунный ответ и ошибочное разрушение клеток организма-хозяина. Опухолевые клетки используют этот механизм для ускользания от иммунного ответа. Уровень экспрессии PD-L1 в клетках опухоли во многом определяет успешность ответа на иммунотерапию, блокирующую образование комплекса PD-1/PD-L1. В настоящее время существует несколько валидированных клонов антител к PD-L1 для ИГХ-тестирования; оценка экспрессии PD-L1 мо-

жет проводиться на опухолевых клетках и/или окружающих иммунных клетках. Выбор тест-системы и алгоритм подсчета зависит от типа опухоли и таргетного препарата, который планируется назначить пациенту.

В отношении НМРЛ эффективность иммунотерапии определяется экспрессией PD-L1 именно в опухолевых клетках, что делает возможной оценку маркера на цитологическом материале. Подсчитывается Tumor proportion score (TPS) – отношение позитивно окрашенных опухолевых клеток к их общему числу (для подсчета необходимо не менее 100 опухолевых клеток). Результат иммунохимического тестирования считается позитивным при наличии полного или частичного мембранного окрашивания любой степени интенсивности. Например, для назначения пациенту иммунопрепарата пембролизумаба (Китруда®) в качестве монотерапии первой линии пороговое значение TPS должно составлять не менее 50 %.

Также необходимо помнить, что в выпотных жидкостях зачастую присутствуют физиологически PD-L1-позитивные макрофаги, поэтому интерпретировать экспрессию этого белка следует с осторожностью.

Вместе с тем пока немногочисленные публикации показывают высокую сопоставимость в оценке результатов PD-L1-тестирования на гистологическом материале и КБ [19–21]. Цитологические препараты (традиционные и жидкостные) также могут использоваться в этих целях, что, однако, требует дальнейшей валидации ввиду менее отчетливого окрашивания мембран опухолевых клеток [22–24].

Наряду с результатами ПЦР-тестирования, иммуногистохимически также были определены ALK- и ROS1-статус опухоли (в данном наблюдении ALK-статус оказался негативным, а ROS1-статус – позитивным, ввиду чего назначена терапия кризотинибом).

Рецепторные тирозинкиназы ROS1 и ALK активируются при разных карциномах, в том числе и при НМРЛ (частота выявления транслокаций с участием гена *ROS1* составляет 1–2 %, с участием гена *ALK* – 5 %) [25–27]. Показана высокая эффективность таргетных препаратов-ингибиторов тирозинкиназ, поэтому тестирование на перестройки *ROS1* и *ALK* для таких пациентов является обязательным [28].

Для ROS1-тестирования ИГХ-исследование считается экономически более предпочтительным, однако рекомендовано только в качестве скринингового теста, требующего при положительном результате подтверждения с помощью «золотого стандарта» (FISH, real-time ПЦР или РНК-секвенирования нового поколения). Такой подход обусловлен гетерогенностью экспрессии ROS1 в опухолевых клетках с данной транслокацией и высокой частотой ложноположительных результатов [26, 29, 30]. Однако есть немало публикаций, сообщающих о 100 % сопоставимости результатов ROS1-тестирования, проведенного иммуногистохимическим

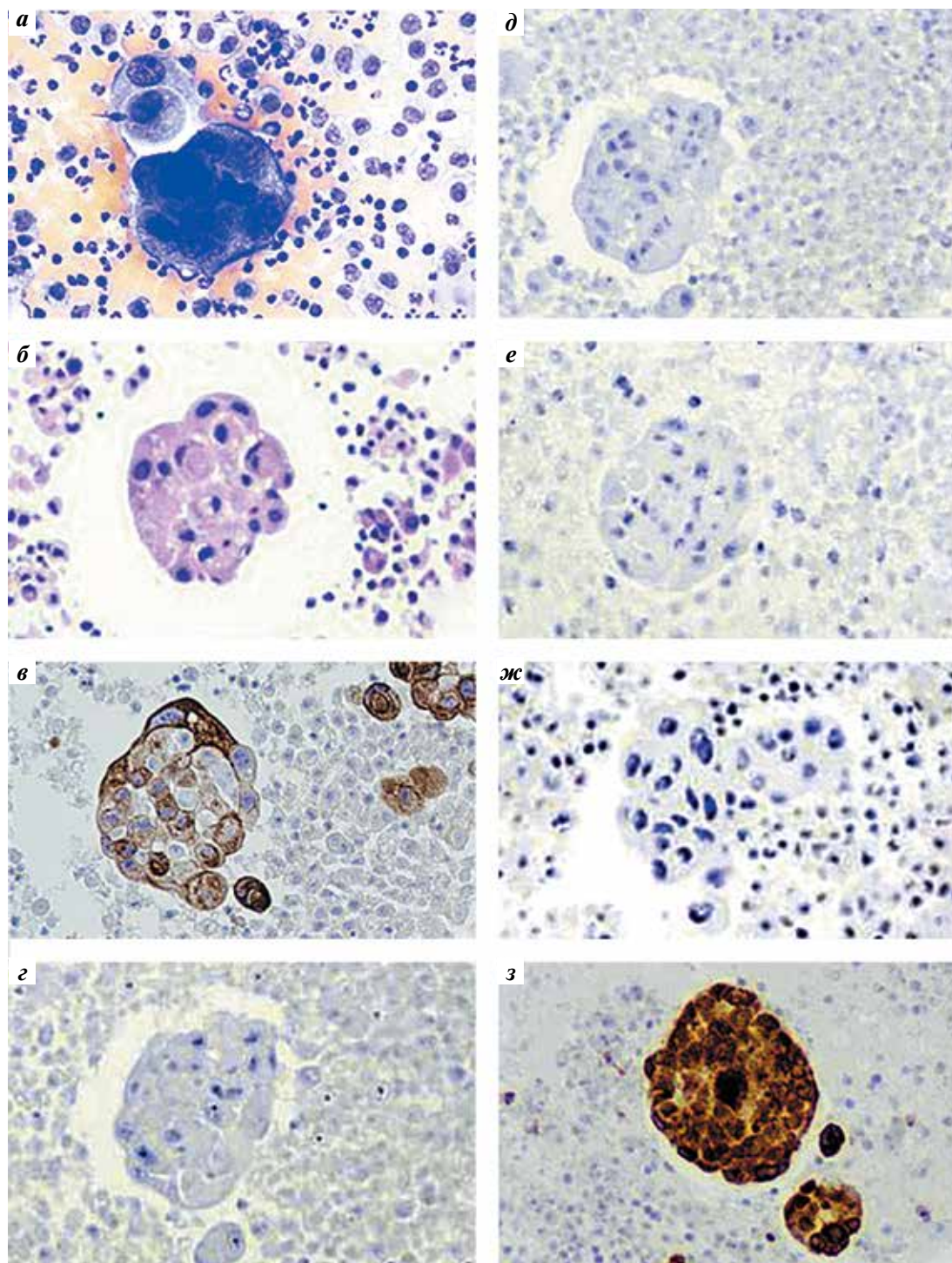


Рис. 2. Плевральная жидкость пациентки, 84 лет, с подозрением на карциному яичников, множественные образования в легких, правосторонний гидроторакс: а – традиционный цитологический препарат, окраска по Маю–Грюнвальду–Гимзе, $\times 400$: комплекс клеток метастатической аденокарциномы; б – клеточный блок (КБ), приготовленный на основе агара, окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$: комплекс клеток метастатической аденокарциномы; в – иммуногистохимическое (ИГХ) исследование на материале КБ: умеренно выраженная мембранно-цитоплазматическая экспрессия CK7 в клетках опухоли, $\times 400$; г–ж – ИГХ-исследование на материале КБ: отсутствие экспрессии PAX8, GATA-3, ER и TTF-1 в клетках опухоли, $\times 400$; з – ИГХ исследование на материале КБ: выраженная цитоплазматическая экспрессия Napsin A в клетках опухоли, $\times 400$

Fig. 2. Pleural fluid of an 84-year-old patient with a suspected ovarian carcinoma; multiple lesions in the lungs, right-sided hydrothorax: a – conventional cytology preparation, May–Grünwald–Giemsa stain, $\times 400$: metastatic adenocarcinoma cell complex; б – agar-based cell block, hematoxylin and eosin stain, $\times 400$: metastatic adenocarcinoma cell complex; в – cell block (CB) immunohistochemistry (IHC): moderate membrane-cytoplasmic expression of CK7 in tumor cells, $\times 400$; г–ж – CB IHC: absence of PAX8, GATA 3, ER and TTF 1 expression in tumor cells, $\times 400$; з – CB IHC: marked cytoplasmic expression of Napsin A in tumor cells, $\times 400$

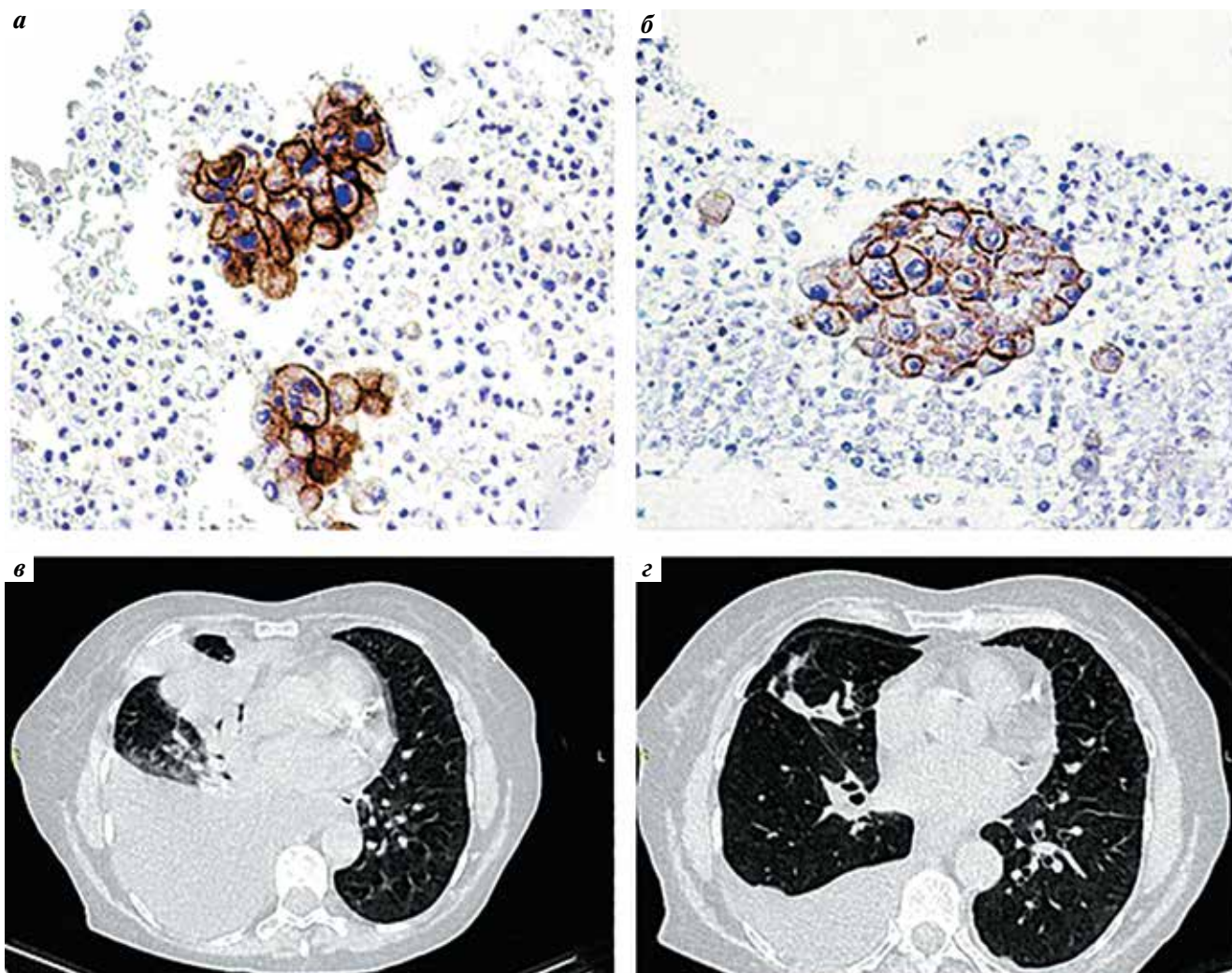


Рис. 3. Определение уровня экспрессии PD-L1 и ROS-1 при распространенном немелкоклеточном раке легкого в плевральной жидкости. Результаты таргетной терапии кризотинибом: а – ИГХ-исследование на материале КБ: позитивная мембранная экспрессия PD-L1 (тест-система SP263, Ventana) более чем в 50 % опухолевых клеток; б – ИГХ-исследование на материале КБ: позитивная экспрессия ROS-1 (клон D4D6, Cell Signaling Technology); в, з – результаты компьютерной томографии с разницей в 5 мес: положительная динамика на фоне терапии кризотинибом, назначенным в связи с позитивным ROS-1 статусом

Fig. 3. Determination of the level of PD L1 and ROS 1 expression in advanced non-small cell lung cancer in pleural fluid. Results of target therapy with crizotinib: а – CB IHC: positive membrane expression of PD L1 (SP263 test system, Ventana) in more than 50 % of tumor cells; б – CB IHC: positive expression of ROS 1 (clone D4D6, Cell Signaling Technology); в, з – results of computed tomography 5 months apart: positive response to treatment with crizotinib prescribed due to positive ROS 1 status

и другими молекулярно-генетическими методами как на цитологическом материале, так и на КБ [31–33].

При оценке экспрессии ROS1, как и в случае с PD-L1, важно учитывать возможную физиологическую экспрессию, в частности, в активированных альвеоцитах II типа и макрофагах.

В отношении ALK-тестирования, напротив, стандартом является именно иммунохимия (и, в частности, тест-система Ventana ALK, клон D5F3), поскольку доказана высокая сопоставимость ее результатов с FISH, ранее считавшимся эталонным методом [28]. Но поскольку и тот, и другой методы могут давать ложноположительные и ложноотрицательные результаты, по возможности рекомендуется использовать оба

варианта тестирования. Многочисленные исследования показывают, что для ALK-тестирования наравне с гистологическим материалом могут использоваться и КБ, и цитологические препараты – конкордантность в выявлении транслокаций *ALK* достигает 100 % [34–37].

Среди мишеней для таргетной терапии, вызывающих научный и практический интерес, можно также выделить опухоли с мутациями изоформ гена *NTRK* (*NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*), кодирующего тропомиозиновый киназный рецептор (TRK). Перестройки *NTRK* встречаются и в НМПЛ, и в колоректальных карциномах с *KRAS*-мутациями; кроме того, уже существует одобренный FDA (Food and Drug Administration,

Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов в США) препарат, воздействующий на любые варианты TRK-позитивных карцином [38]. Как и в случае с ROS1, ИГХ-тестирование с антителом рап-TRK следует использовать лишь на скрининговом этапе [39, 40]. Поскольку есть данные о ложноотрицательных результатах, ИГХ-реакции следует подтверждать с помощью ПНК-секвенирования нового поколения (NGS) [41]. А вот эффективность иммунохимического окрашивания с помощью рап-TRK на цитологическом материале в настоящее время изучена недостаточно.

Наряду с уровнем экспрессии PD-L1, особенно для колоректального рака и других аденокарцином, отбор пациентов для иммунотерапии определяется микросателлитной нестабильностью опухоли (MSI), которая является следствием потери белков репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR): PMS2, MLH1, MSH2, MSH6 [42, 43].

Наиболее удобным и экономически оптимальным вариантом тестирования является ИГХ-тестирование, однако «золотым стандартом» принято считать прямое секвенирование или мультиплексную ПЦР. О микросателлитной нестабильности опухоли свидетельствует одновременная потеря пары белков PMS2 и MLH1 либо пары MSH2 и MSH6 [44]. В отношении КБ и цитологического материала в данный момент по MMR-тестированию надежных рекомендаций нет.

По мере накопления научных знаний о механизмах развития онкологических заболеваний неуклонно растет и список потенциально предиктивных иммунохимических маркеров. К ним можно отнести, например, ARID1A [45], кодируемый одноименным геном-опухолевым супрессором – мутации ARID1A особенно распространены при уротелиальной карциноме (до 20 %) и светлоклеточной карциноме яичников (50 %).

Недостаточность ARID1A является перспективной мишенью для противоопухолевой терапии ингибиторами контрольных точек иммунного ответа и коррелирует с лучшим ответом в комплексе, например, с химиотерапией гемцитабином или с антиоксидантом глутатионом [46, 47].

В отдельных публикациях при изучении потери экспрессии ARID1A была показана высокая сопоставимость ИХ-реакций на цитологическом и гистологическом материале, поэтому он может служить полезным предиктивным маркером, особенно для метастатических выпотов при карциномах яичников [48].

ОПРЕДЕЛЕНИЕ HER-2 И РЕЦЕПТОРНОГО СТАТУСА НА МАТЕРИАЛЕ КБ ПРИ РАСПРОСТРАНЕННОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

В лабораторию поступает плевральная жидкость от *пациентки*, 56 лет, получавшей комбинированное лечение по поводу карциномы правой молочной же-

лезы (люминальный тип В). Совокупно с богатым цитологическим материалом (рис. 4, а) получен и запрос от онколога: установить гормональный и HER2-статус метастатической опухоли для определения дальнейшей тактики лечения.

На материале КБ (рис. 4, б) выполнено ИГХ-исследование, подтверждающее диссеминацию рака молочной железы по плевре: CK7+, маммаглобин+, GCDFFP-15+ (рис. 4, в–д). Вторым этапом проводится оценка экспрессии рецепторов к эстрогену (ER), рецепторов к прогестерону (PR) и онкопротеина c-erbB-2 (HER2/neu) (рис. 4, е, з), демонстрирующая тот же иммунофенотипический портрет опухоли, что и в первичном очаге.

Выраженная экспрессия белка c-erbB-2, как в данном примере, связана с амплификацией одноименного гена *HER2/neu* в клетках опухоли, отмечается примерно в 20 % случаев карциномы молочной железы и ассоциирована с неблагоприятным прогнозом [49]. Таргетная анти-HER2 терапия применяется не только при раке молочной железы. Ее эффективность исследуется, например, при раке желудка, желчных протоков, колоректальном раке, НМРЛ, раке мочевого пузыря [50]. «Золотым стандартом» в определении HER2-статуса опухоли является FISH-исследование на гистологическом материале, однако для ИГХ была показана высокая сопоставимость результатов, что с учетом наличия четких критериев оценки реакций позволяет использовать этот метод в первичном звене диагностики [51, 52].

Для цитолога особенно важно знать, что успешное определение HER2-статуса метастатической карциномы молочной железы возможно и на материале КБ [53, 54], что подтверждает и наш собственный опыт. При этом обязательным требованием к объекту исследования является фиксация материала в 10 % забуференном формалине [52]. На цитологических препаратах (традиционных или жидкостных) оценить экспрессию HER2/neu иммунохимически сложнее ввиду отсутствия стандартизации и различий в условиях пробоподготовки; однако в отечественной и зарубежной литературе есть публикации, показывающие высокий уровень конкордантности иммуноцитохимических (ИЦХ) и ИГХ-реакций [55, 56]. Тем не менее, ввиду недостаточной изученности вопроса и низкой воспроизводимости результатов, в рутинной практике прибегать к ИЦХ-исследованию не рекомендуется, а в отсутствие доступного гистологического материала предпочтение отдается FISH-исследованию на цитологическом материале [52]. В метастатических опухолевых очагах HER2-статус, как правило, остается неизменным, однако, по данным литературы, варибельность результатов FISH-исследования отмечается почти в 8 % случаев, что может быть связано как с трудностями в интерпретации амплификации на цитологических препаратах, так и с гетерогенностью опухоли [57].

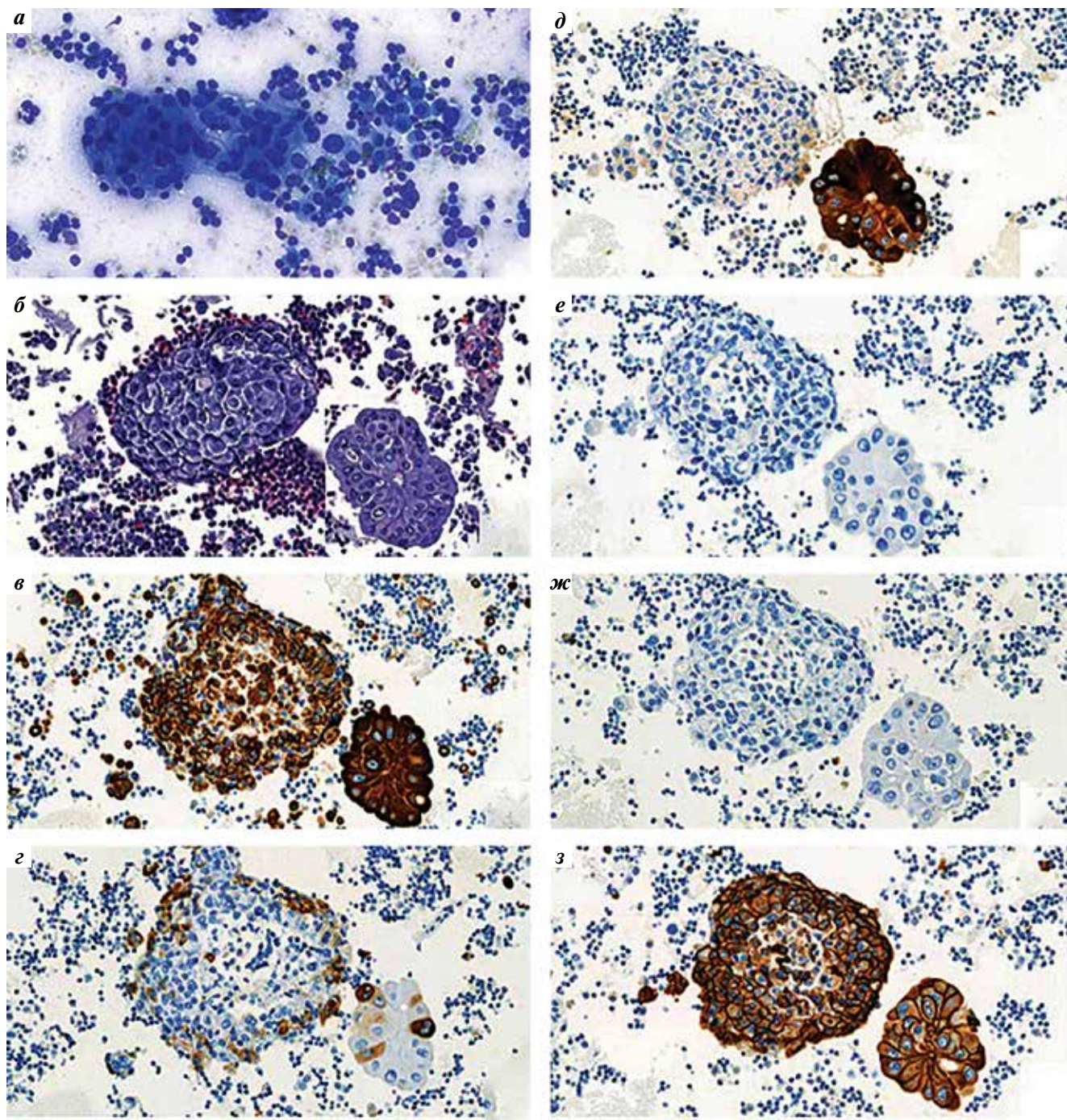


Рис. 4. Плевральная жидкость **пациентки**, 56 лет. В анамнезе: рак правой молочной железы T2N0M0, люминальный тип B (Her2-статус 3+), состояние после химио-, таргетной и гормональной терапии: а – цитологический препарат, приготовленный с помощью цитоцентрифуги, окраска по Романовскому, $\times 200$; клетки метастатической карциномы; б – КБ, приготовленный с помощью спиртоформалиновой фиксации, окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$; комплексы клеток метастатической карциномы; в – ИГХ-исследование на материале КБ: умеренная и выраженная мембранно-цитоплазматическая экспрессия CK7 в клетках опухоли, $\times 200$; г – ИГХ-исследование на материале КБ: умеренная цитоплазматическая экспрессия маммаглобина в части опухолевых клеток, $\times 200$; д – ИГХ-исследование на материале КБ: выраженная цитоплазматическая экспрессия GCDFP-15 в части опухолевых клеток, $\times 200$; е, ж – ИГХ-исследование на материале КБ: отсутствие экспрессии ER и PR в клетках опухоли, $\times 200$; з – ИГХ-исследование на материале КБ: выраженная мембранная экспрессия HER2 (3+) в клетках опухоли $\times 200$

Fig. 4. Pleural fluid of a 56-year-old patient. Medical history: right breast T2N0M0 cancer, luminal type B (HER2 status 3+), status post chemo-, target and hormone therapy: а – cytology preparation made by means of cytocentrifugation, Romanovsky stain, $\times 200$; metastatic carcinoma cells; б – cell block prepared by means of formalin-alcohol fixation, hematoxylin and eosin stain, $\times 200$; metastatic carcinoma cell complexes; в – CB IHC: moderate and marked membrane-cytoplasmic expression of CK7 in tumor cells, $\times 200$; г – CB IHC: moderate cytoplasmic expression of mammaglobin in some tumor cells, $\times 200$; д – CB IHC: marked cytoplasmic expression of GCDFP 15 in some tumor cells, $\times 200$; е, ж – CB IHC: absence of ER or PR expression in tumor cells, $\times 200$; з – CB IHC: marked membrane expression of HER2 (3+) in tumor cells, $\times 200$

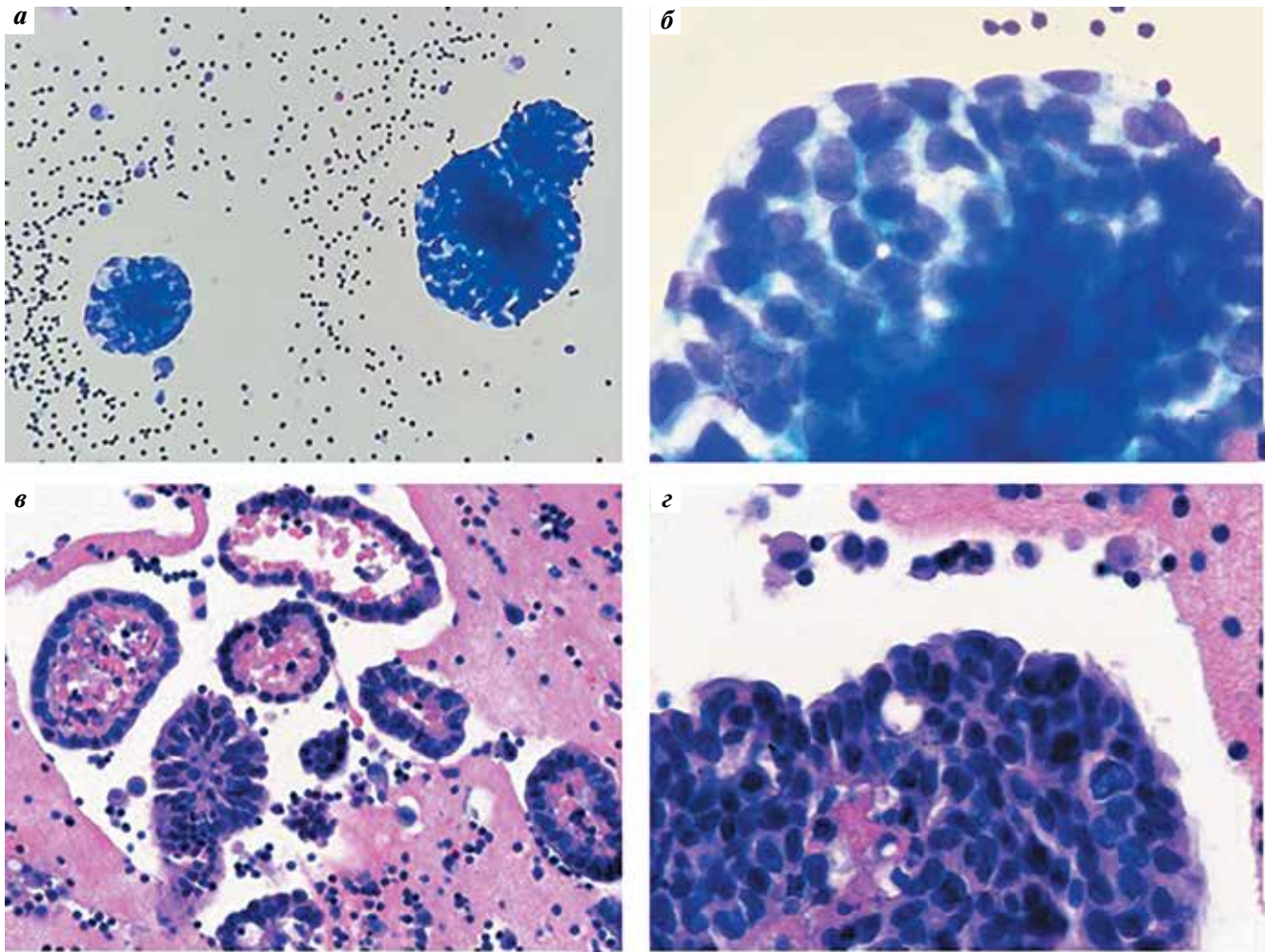


Рис. 5. Плевральная жидкость **пациентки**, 69 лет, с карциноматозом плевры в анамнезе: гистологически верифицированный инвазивный рак левой молочной железы неспецифицированного типа, 1 степени злокачественности (2+2+1) по Ноттингемской системе. При ИГХ-исследовании: ER: TS=8 баллов, PR: TS=5 баллов (по системе Allred), Her-2/neu: отсутствие четкой мембранной экспрессии (0), Ki-67≈35 %: а, б – цитологический препарат, приготовленный с помощью цитоцентрифуги, окраска по Романовскому, ×100–400: комплексы клеток метастатической карциномы; в, г – КБ, приготовленный на основе желатина, окраска гематоксилином и эозином, ×100–400: комплексы клеток метастатической карциномы

Fig. 5. Pleural fluid of a 69-year-old patient with pleural carcinomatosis. Medical history: histologically verified invasive left breast cancer of an unspecified type, Nottingham grade 1 malignancy (2+2+1). IHC findings: ER: TS = 8 points, PR: TS = 5 points (as per Allred score); HER2/neu: absence of clear membrane expression (0), Ki 67 ≈ 35 %: а, б – cytology preparation made by means of cytocentrifugation, Romanovsky stain, ×100–400: metastatic carcinoma cell complexes; в, г – gelatin foam cell block, hematoxylin and eosin stain, ×100–400: metastatic carcinoma cell complexes

В еще одном клиническом наблюдении с диссеминацией опухолевого процесса по плевре была исследована плевральная жидкость от **пациентки**, 69 лет, с инвазивным раком левой молочной железы G1 в анамнезе. Онкологом был поставлен вопрос: действительно ли это метастаз рака молочной железы и если да, то отличается ли он от первичной опухоли по рецепторному и HER2 статусам? И материал цитоспиновых препаратов (рис. 5, а, б), и срезы КБ (рис. 5, в, г) продемонстрировали высокую клеточность, с характерными для метастатического поражения серозных оболочек рака молочной железы шаровидными структурами.

По нашему опыту, в подобной ситуации (при отсутствии уверенности в источнике метастатической

карциномы) в выпотной жидкости оптимально проводить иммунохимическое исследование в два этапа. Таким образом, на первом этапе подтверждается гистогенез опухоли: CK7+, CK20-, TTF-1-, маммаглобин+, что соответствует карциноме молочной железы (рис. 6, а–г). Затем определяется уровень экспрессии ER, PR, HER2. Опционально возможно определение и маркера пролиферативной активности Ki-67 [56, 58] с прогностической целью (подобный запрос также может поступить от лечащего врача), однако количественный подсчет следует проводить только при наличии четкого структурообразования в препарате во избежание некорректной трактовки физиологически позитивных ядер доброкачественных клеток (элементов воспаления и мезотелия). В данном

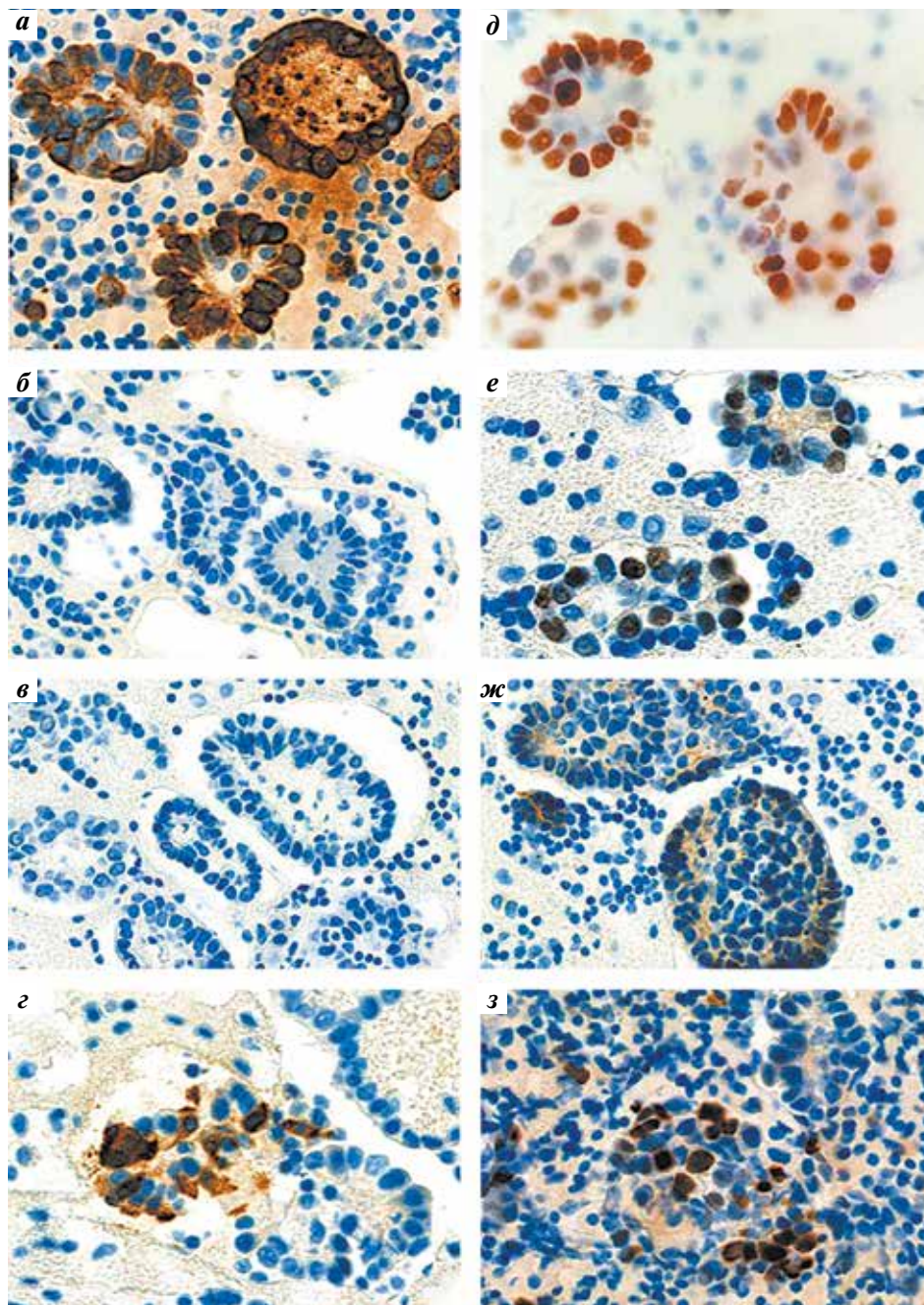


Рис. 6. Плевральная жидкость пациентки, 69 лет, с канцероматозом плевры. В анамнезе: гистологически верифицированный инвазивный рак левой молочной железы неспецифицированного типа, I степени злокачественности (2+2+1) по Ноттингемской системе. При ИГХ-исследовании экспрессия ER: TS=8 баллов, PR: TS=5 баллов (по системе Allred), Her-2/neu: отсутствие четкой мембранной экспрессии (0), Ki-67≈35 %: а – ИГХ-исследование на материале КБ: выраженная мембранно-цитоплазматическая экспрессия СК7 в клетках опухоли, ×400; б, в – ИГХ-исследование на материале КБ: отсутствие экспрессии СК20 и TTF-1 в клетках опухоли, ×200; г – ИГХ-исследование на материале КБ: умеренная цитоплазматическая экспрессия маммаглобина в части опухолевых клеток, ×400; д – ИГХ-исследование на материале КБ: ядерная экспрессия рецепторов к эстрогену ER: TS=8 баллов (по системе Allred), ×400; е – ИГХ-исследование на материале КБ: ядерная экспрессия рецепторов к прогестерону PR: TS=5 баллов (по системе Allred), ×400; ж – ИГХ-исследование на материале КБ: отсутствие четкой мембранной экспрессии HER2 (0) в клетках опухоли, ×200; з – ИГХ-исследование на материале КБ: экспрессия маркера пролиферативной активности Ki-67 в ядрах от 5 до 30 % клеток опухоли, ×400

Fig. 6. Pleural fluid of a 69-year-old patient with pleural carcinomatosis. Medical history: histologically verified invasive left breast cancer of an unspecified type, Nottingham grade I malignancy (2+2+1). IHC findings: ER: TS = 8 points, PR: TS = 5 points (as per Allred score); HER2/neu: absence of clear membrane expression (0), Ki 67 ≈ 35 %: a – CB IHC: marked membrane-cytoplasmic expression of CK7 in tumor cells, ×400; б, в – CB IHC: absence of CK20 or TTF 1 expression in tumor cells, ×200; г – CB IHC: moderate cytoplasmic expression of mammaglobin in some tumor cells, ×400; д – nuclear estrogen receptor (ER) expression: TS = 8 points (as per Allred score), ×400; е – CB IHC: nuclear progesteron receptor (PR) expression: TS = 5 points (as per Allred score), ×400; ж – CB IHC: absence of clear membrane expression of HER2 (0) in tumor cells, ×200; з – CB IHC: nuclear expression of Ki 67 proliferation marker in 5 to 30 % of tumor cells, ×400

клиническом примере результаты оценки иммунофенотипа метастатической опухоли на материале КБ (рис. 6, д–з) практически полностью совпали с результатами, полученными ранее на гистологическом материале из первичного очага.

При распространении рака молочной железы по серозным оболочкам, в отсутствие доступного гистологического образца, иммунохимическое исследование на цитологическом материале может стать единственным способом установить, является ли пациент кандидатом на гормонотерапию. И хотя высокая степень корреляции данных показана для любого варианта цитологического материала, тонкоигольных аспирационных биопсий и выпотов, на предметных стеклах и срезах КБ [55, 56, 58–61], определять уровень экспрессии ER и PR предпочтительнее на материале КБ, поскольку протокол его изготовления максимально приближен к гистологическому, что повышает валидность полученных результатов.

FISH

Роль FISH-исследования в диагностике злокачественных новообразований сложно переоценить. Однако в силу трудоемкости процедуры и высокой стоимости расходных материалов и оборудования данный метод едва ли можно назвать рутинным. Тем не менее мы считаем важным осветить современный взгляд на возможности этого метода в оценке предиктивных биомаркеров.

Многие зарубежные лаборатории адаптировали дополнительные методы исследования к материалу, фиксированному в формалине и заключенному в парафин (FFPE) [3], поэтому в большинстве случаев молекулярные, ИХ и FISH-исследования проводятся и на КБ. Тем не менее для FISH более предпочтительны цитологические препараты как традиционные, так и жидкостные – ДНК опухолевых клеток, в силу отсутствия воздействия формалина, сохраняется лучше, позволяя более достоверно оценить количество флуоресцентных сигналов [62]. FISH-исследование можно проводить на любом материале, в том числе окрашенном и использованном для ИЦХ. Если же количество материала ограничено, целесообразно прибегнуть к первоначальной оцифровке цитологического препарата с последующей прицельной (таргетной) FISH на том же стекле: такой подход обеспечивает наибольшую эффективность метода [63].

Актуальность FISH при исследовании выпотных жидкостей особенно возрастает при подозрении на мезотелиому: гомозиготная делеция *p16/CDKN2A* (9p21) определяется в 56–79 % случаев мезотелиом, диагностируемых в плевральных выпотах цитологически [64]; реакция проводится с помощью того же набора, который применяется для диагностики уротелиальных карцином (UroVysion®, Abbot Laboratories, США). Хотя делеция 9p21 специфична для мезотелиом, она также

часто обнаруживается при других типах карцином, например, при НМРЛ [65]. Поэтому вначале следует удостовериться в мезотелиальной природе опухолевых клеток с помощью ИХ-реакций.

Современная диагностика мезотелиомы подразумевает цитологическое или гистологическое заключение, подтвержденное иммунохимически потерей экспрессии BRCA1-ассоциированного белка 1 (BAP1), обнаруживаемой в 60–70 % мезотелиом плевры [66], либо упомянутой выше гомозиготной делецией 9p21 при соответствующей клинико-рентгенологической картине [64, 67]. В качестве альтернативы FISH-исследованию большой перспективой обладает иммунохимический тест на метилтиоаденозин-фосфорилазу (МТАФ), потеря экспрессии которой является индикатором делеции 9p21 (и, соответственно, малигнизации процесса) в 91–100 % случаев [68–70].

Помимо мезотелиомы, FISH также может быть использована в диагностике неходжкинских лимфом, протекающих с вовлечением плевры: исследование на транслокации *MYC*, *BCL2* и *BCL6* – для В-клеточных лимфом, перестройки *ALK* – для анапластической крупноклеточной лимфомы, мутация *TCL1* – для Т-пролимфоцитарной лимфомы [71]. Кроме того, в силу ограниченных возможностей ИХ, в диагностике лимфопролиферативных поражений серозных оболочек на материале выпотных жидкостей наиболее целесообразно прибегнуть к проточной цитометрии [72].

По сравнению с другими молекулярно-генетическими методами FISH обладает преимуществом в изучении малоклеточных образцов (менее 100 клеток). И, как уже упоминалось ранее, FISH-исследование имеет большое значение в оценке предиктивных генных реаранжировок: *ALK*, *ROS1*, *RET* и *NTRK1-3*; амплификации *HER2*, *MET*. В отношении HER2-статуса FISH-исследование является диагностическим стандартом и обязательно проводится при неопределенных результатах ИГХ-реакций (2+). При невозможности технического проведения FISH допустимо использовать методику хромосомной гибридизацией *in situ* (CISH) [54].

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА

Современная молекулярная генетика в приложении к исследованию выпотных жидкостей предлагает цитологу множество опций: это секвенирование нового поколения (NGS), секвенирование по Сэнгеру, пиросеквенирование, различные их подвиды и модификации. Все эти методы применимы в диагностике метастатических выпотов и оценке предиктивных биомаркеров (например, минимально необходимая панель при НМРЛ включает *EGFR*, *ALK*, *ROS1* и *BRAF*) [28, 73]. Основное их ограничение – необходимость в достаточном количестве опухолевых клеток. Решить эту задачу можно с помощью методов обогащения образцов, например, одноклеточного секвенирования

или лазерной захватывающей микродиссекции (LCM), позволяющей как отбирать опухолевые клетки, так и удалять контаминирующие элементы [74].

Также к перспективным методам молекулярной диагностики относятся эпигенетические исследования (определение уровня метилирования ДНК), цифровая ПЦР, определение РНК злокачественных клеток и др., позволяющие выявлять те же предиктивные биомаркеры в материале выпотных жидкостей с сопоставимой и иногда даже более высокой чувствительностью [75–78]. Причем для исследования подходят не только клеточные осадки, но и супернатант – важный источник информации о разрушенных клетках опухоли.

Еще одной интенсивно развивающейся технологией в онкопатологии является определение микроРНК, являющихся важнейшими регуляторами экспрессии генов. Так, помимо рака легкого, исследование микроРНК может помочь в диагностировании мезотелиомы – их экспрессия выявляется и во внеклеточных везикулах, экзосомах [79–81].

БИОБАНКИНГ, ОРГАНОИДЫ И КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ

Серозный выпот является питательной средой, что позволяет успешно культивировать из образцов метастатических выпотов линии опухолевых клеток. Такой подход может обеспечить всестороннее изучение молекулярно-генетического портрета опухоли и использовать клеточные линии в качестве объекта доклинических испытаний противоопухолевых препаратов *in vitro* [82–84]. Осажденные клетки без потери их жизнеспособности можно хранить в холодильнике в течение 1–2 дней, а также замораживать или сохранять в виде КБ.

Культивирование клеток *ex vivo* можно также ускорить с помощью условного репрограммирования (CR): совместного высевания раковых клеток с питающими облученными фибробластами мыши в присутствии

ингибитора Rho-киназы – его можно использовать и для обогащения раковыми клетками образцов мочи и плевральных выпотов [85–88]. Подобные технологии позволяют создать неисчерпаемую базу для фундаментальных научных и прикладных исследований.

Среди культивируемых культур особенно выделяются органоиды, или сфероиды (трехмерные модели раковых клеток *ex vivo*), которые воспроизводят особенности опухолей человека, в том числе их генетическую и фенотипическую гетерогенность [89]. Это чрезвычайно перспективная, но пока недостаточно разработанная методика, призванная обеспечить персонализированную терапию онкологических больных [90–92].

Более подробно методы, освещенные в этом обзоре и не вошедшие в него, представлены в недавно опубликованной книге, приуроченной к выходу Международной классификации цитопатологии выпотных жидкостей 2019 г. [93].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выпотные жидкости – одна из редких разновидностей биоматериала, которую цитолог может исследовать всесторонне, не ограничиваясь морфологическим заключением. Знание о современных возможностях иммунохимии, молекулярной генетики и рекомендованных протоколах преаналитики позволяет грамотно распорядиться биологическим материалом, выбрать из дополнительных диагностических методов наиболее оптимальный с учетом объема и точности серозного выпота, технологических и технических возможностей лаборатории. Злокачественные выпоты являются важнейшим субстратом для тестирования предиктивных биомаркеров при распространенном опухолевом процессе, что дает возможность клиницисту получить максимум разнообразной полезной информации и оптимизировать тактику лечения пациента.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Rekhman N., Roy-Chowdhuri S. Cytology specimens: a goldmine for molecular testing. *Arch Pathol Lab Med* 2016;140(11):1189–90. DOI: <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0379-ED>
2. da Cunha Santos G., Saieg M.A. Preanalytical specimen triage: smears, cell blocks, cytospin preparations, transplant media and cytobanking. *Cancer Cytopathol* 2017;125(S6):455–64. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncy.21850>
3. Nambirajan A., Jain D. Cell blocks in cytopathology: an update. *Cytopathology* 2018;29(6):505–24. DOI: <https://doi.org/10.1111/cyt.12627>
4. Engels M., Michael C., Dobra K. et al. Management of cytological material, pre-analytical procedures and bio-banking in effusion cytopathology. *Cytopathology* 2019;30(1):31–8. DOI: <https://doi.org/10.1111/cyt.12654>
5. Савостикова М.В., Федосеева Е.С., Фурминская Е.Ю., Горбань Н.А. Клеточные блоки на основе желатина: опыт применения в цитологической лаборатории. *Онкопатология* 2021;4(1–2):10–7. [Savostikova M.V., Fedoseeva E.S., Furminskaya E.Yu., Gorban N.A. Gelatin cell blocks: experience of use in a cytology laboratory. *Onkopatologiya = Oncopathology* 2021;4(1–2):10–7. (In Russ.)]. DOI: <https://doi.org/10.17650/2618-7019-2021-4-1-2-10-17>
6. Сметанина С.В., Славнова Е.Н. Возможности цитологической диагностики карцином печени. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена* 2020;9(2):68–73. [Smetanina SV, Slavnova EN. Possibilities of cytological diagnosis of liver carcinomas. *P.A. Herzen Journal of Oncology* 2020;9(2):68–73. (In Russ.)]. DOI: <https://doi.org/10.17116/onkolog2020902168>
7. Волченко Н.Н., Борисова О.В., Баранова И.Б. Технология «клеточный блок» в цитологической практике. *Клиническая лабораторная диагностика* 2015;60(8):37–39. [Volchenko N.N., Borisova O.V., Baranova I.B. The technology “cell block”

- in cytological practice. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015;60(8):37–39. (In Russ.).
8. Balassanian R., Woo G.D., Olejnik-Nave J. et al. A superior method for cell block preparation for fine-needle aspiration biopsies. *Cancer Cytopathol* 2016;124:508–18. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncy.21722>
 9. Kerstens H.M., Robben J.C., Poddighe P.J. et al. AgarCyto: a novel cell-processing method for multiple molecular diagnostic analyses of the uterine cervix. *J Histochem Cytochem* 2000;48(5):709–18. DOI: <https://doi.org/10.1177/002215540004800515>
 10. Khan S., Omar T., Michelou P. Effectiveness of the cell block technique in diagnostic cytopathology. *J Cytol* 2012;29(3):177–182. DOI: <https://doi.org/10.4103/0970-9371.101167>
 11. Benkovich V., Cuda J., Khalbuss W. et al. Comparison of Cell Block Preparation Using HistoGel and Plasma Thrombin Techniques 2012;1(1):S114–15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jasc.2012.08.249>
 12. Rekhtman N., Buonocore D.J., Rudomina D. et al. Novel Modification of HistoGel-Based Cell Block Preparation Method: Improved Sufficiency for Molecular Studies. *Arch Pathol Lab Med* 2018;142(4):529–35. DOI: <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0030-OA>
 13. van Hemel B.M., Suurmeijer A.J. Effective application of the methanol-based PreservCyt™ fixative and the Cellient™ automated cell block processor to diagnostic cytopathology, immunocytochemistry, and molecular biology. *Diagn Cytopathol* 2013;41(8):734–41. DOI: <https://doi.org/10.1002/dc.22963>
 14. Kruger A.M., Stevens M.W., Kerley K.J., Carter C.D. Comparison of the Cellient™ automated cell block system and agar cell block method. *Cytopathology* 2014;25(6):381–88. DOI: <https://doi.org/10.1111/cyt.12216>
 15. Xing W., Hou A.Y., Fischer A. et al. The Cellient automated cell block system is useful in the differential diagnosis of atypical glandular cells in Papanicolaou tests. *Cancer Cytopathol* 2014;122(1):8–14. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncy.21343>
 16. Michael C.W., Davidson B. Pre-analytical issues in effusion cytology. *Pleura Peritoneum* 2016;1(1):45–56. DOI: <https://doi.org/10.1515/pp-2016-0001>
 17. Desai K.M., Angadi P.V., Kale A.D., Hallikerimath S. Modified Alcohol-Formalin Cell Block Technique in Head and Neck Pathology Diagnosis. *Acta Cytologica* 2018;62:39–43. DOI: <https://doi.org/10.1159/000484195>
 18. Jain D., Nambirajan A., Borczuk A. et al. Immunocytochemistry for predictive biomarker testing in lung cancer cytology. *Cancer Cytopathol* 2019;127(5):325–39. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncy.22137>
 19. Wang G., Ionescu D.N., Lee C.H. et al. PD-L1 testing on the EBUS-FNA cytology specimens of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2019;136:1–5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2019.07.033>
 20. Torous V.F., Rangachari D., Gallant B.P. et al. PD-L1 testing using the clone 22C3 pharmDx kit for selection of patients with non-small cell lung cancer to receive immune checkpoint inhibitor therapy: are cytology cell blocks a viable option? *J Am Soc Cytopathol* 2018;7(3):133–41. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jasc.2018.02.003>
 21. Heymann J.J., Bulman W.A., Swinarski D. et al. PD-L1 expression in non-small cell lung carcinoma: comparison among cytology, small biopsy, and surgical resection specimens. *Cancer Cytopathol* 2017;125(12):896–907. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncy.21937>
 22. Prince S.S., Bubendorf L. Predictive potential and need for standardization of PD-L1 immunohistochemistry. *Virchows Arch* 2019; 474(4):475–84. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2445-7>
 23. Munari E., Zamboni G., Sighele G. et al. Expression of programmed cell death ligand 1 in non-small cell lung cancer: comparison between cytologic smears, core biopsies, and whole sections using the SP263 assay. *Cancer Cytopathol* 2019;127(1): 52–61. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncy.22083>
 24. Bubendorf L., Lantuejoul S., de Langen A.J., Thunnissen E. Nonsmall cell lung carcinoma: diagnostic difficulties in small biopsies and cytological specimens: number 2 in the series “pathology for the clinician” edited by Peter Dorfmueller and Alberto Cavazza. *Eur Respir Rev* 2017;26(144):170007. DOI: <https://doi.org/10.1183/16000617.0007-2017>
 25. Sholl L.M., Sun H., Butaney M. et al. ROS1 immunohistochemistry for detection of ROS1- rearranged lung adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol* 2013;37(9):1441–49. DOI: <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182960fa7>
 26. Davies K.D., Le A.T., Theodoro M.F. et al. Identifying and targeting ROS1 gene fusions in nonsmall cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2012;18(17):4570–79. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0550>
 27. Kwak E.L., Bang Y.J., Camidge D.R. et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-smallcell lung cancer. *N Engl J Med* 2010;363(18):1693–703. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1006448>
 28. Lindeman N.I., Cagle P.T., Aisner D.L. et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol* 2018;13(3):323–58. DOI: <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0388-CP>
 29. Shan L., Lian F., Guo L. et al. Detection of ROS1 gene rearrangement in lung adenocarcinoma: comparison of IHC, FISH and real-time RT-PCR. *PLoS One* 2015;10(3):e0120422. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120422>
 30. Yoshida A., Tsuta K., Wakai S. et al. Immunohistochemical detection of ROS1 is useful for identifying ROS1 rearrangements in lung cancers. *Mod Pathol* 2014;27(5):711–20. DOI: <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.192>
 31. Vlainic T., Savic S., Barascud A. et al. Detection of ROS1-positive non-small cell lung cancer on cytological specimens using immunocytochemistry. *Cancer Cytopathol* 2018;126(6):421–29. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncy.21983>
 32. Boyle T.A., Masago K., Ellison K.E. et al. ROS1 immunohistochemistry among major genotypes of non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2015;16(2):106–11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clc.2014.10.003>
 33. Bubendorf L., Buttner R., Al-Dayel F. et al. Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: a review with recommendations. *Virchows Arch* 2016;469(5):489–503. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00428-016-2000-3>
 34. Liu L., Zhan P., Zhou X. et al. Detection of EML4-ALK in lung adenocarcinoma using pleural effusion with FISH, IHC, and RT-PCR methods. *PLoS One* 2015;10(3):e0117032. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117032>
 35. Zhou J., Yao H., Zhao J. et al. Cell block samples from malignant pleural effusion might be valid alternative samples for anaplastic lymphoma kinase detection in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Histopathology* 2015;66(7):949–54. DOI: <https://doi.org/10.1111/his.12560>
 36. Wang Z., Wu X., Han H. et al. ALK gene expression status in pleural effusion predicts tumor responsiveness to crizotinib in Chinese patients with lung adenocarcinoma. *Chin J Cancer Res* 2016;28(6):606–16. DOI: <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2016.06.07>
 37. Wang W., Tang Y., Li J., et al. Detection of ALK rearrangements in malignant pleural effusion cell blocks from patients with advanced non-small cell lung cancer: a comparison of Ventana immunohistochemistry and fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Cytopathol* 2015;123(2):117–22. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncy.21510>
 38. Drilon A., Laetsch T.W., Kummar S. et al. Efficacy of larotrectinib in TRK fusion-positive cancers in adults and children. *N Engl J Med* 2018;378(8):731–39. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1714448>

39. Hechtman J.F., Benayed R., Hyman D.M. et al. Pan-Trk immunohistochemistry is an efficient and reliable screen for the detection of NTRK fusions. *Am J Surg Pathol* 2017;41(11):1547–51. DOI: <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000911>
40. Bourhis A., Redoulez G., Quintin-Roue I. et al. Screening for NTRK- rearranged tumors using immunohistochemistry: comparison of 2 different pan-TRK clones in melanoma samples. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2020;28(3):194–96. DOI: <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000708>
41. Gatalica Z., Xiu J., Swensen J., Vranic S. Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. *Mod Pathol* 2019;32(1):147–53. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41379-018-0118-3>
42. Zhao P., Li L., Jiang X., Li Q. Mismatch repair deficiency/microsatellite instability-high as a predictor for anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy efficacy. *J Hematol Oncol* 2019;12(1):54. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0738-1>
43. Chang L., Chang M., Chang H.M., Chang F. Microsatellite instability: a predictive biomarker for cancer immunotherapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2018;26(2):e15–21. DOI: <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000575>
44. Longacre T.A., Broaddus R., Chuang L.T. et al. for the C.o.A.P. members of the Cancer Biomarker Reporting Committee. Template for reporting results of biomarker testing of specimens from patients with carcinoma of the endometrium. *Arch Pathol Lab Med* 2017;141(11):1508–12. DOI: <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0450-CP>
45. Hu G., Tu W., Yang L. et al. ARID1A deficiency and immune checkpoint blockade therapy: from mechanisms to clinical application. *Cancer Lett* 2020;473:148–55. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.01.001>
46. Shen J., Ju Z., Zhao W. et al. ARID1A deficiency promotes mutability and potentiates therapeutic antitumor immunity unleashed by immune checkpoint blockade. *Nat Med* 2018;24:556–62.
47. Sasaki M., Chiwaki F., Kuroda T. et al. Efficacy of glutathione inhibitors for the treatment of ARID1A-deficient diffuse-type gastric cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 2020;522(2):342–47. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.11.078>
48. Khalique S., Naidoo K., Attygalle A.D. et al. Optimised ARID1A immunohistochemistry is an accurate predictor of ARID1A mutational status in gynaecological cancers. *J Pathol Clin Res* 2018;4(3):154–66. DOI: <https://doi.org/10.1002/cjp2.103>
49. Meric-Bernstam F., Johnson A.M., Dumbreva E.E.I. et al. Advances in HER2-targeted therapy: novel agents and opportunities beyond breast and gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2019;25(7):2033–41. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2275>
50. Oh D.Y., Bang Y.J. HER2-targeted therapies – a role beyond breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2020;17(1):33–48. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0268-3>
51. Bahreini F., Soltanian A.R., Mehdipour P. A meta-analysis on concordance between immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) to detect *HER2* gene overexpression in breast cancer. *Breast Cancer* 2015;22(6):615–25. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12282-014-0528-0>
52. Wolff A.C., Hammond M.E.H., Allison K.H. et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline focused update. *J Clin Oncol* 2018;36(20):2105–22. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.77.8738>
53. Shabaik A., Lin G., Peterson M. et al. Reliability of Her2/neu, estrogen receptor, and progesterone receptor testing by immunohistochemistry on cell block of FNA and serous effusions from patients with primary and metastatic breast carcinoma. *Diagn Cytopathol* 2011;39(5):328–32. DOI: <https://doi.org/10.1002/dc.21389>
54. Edelweiss M., Sebastiao A.P.M., Oen H. et al. HER2 assessment by bright-field dual in situ hybridization in cell blocks of recurrent and metastatic breast carcinoma. *Cancer Cytopathol* 2019;127(11):684–90. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncy.22184>
55. Pareja F., Murray M.P., Jean R.D. et al. Cytologic assessment of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 status in metastatic breast carcinoma. *J Am Soc Cytopathol* 2017;6(1):33–40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jasc.2016.10.001>
56. Савостикова М.В., Коротких И.Ю., Лактионов К.П. Иммуноцитохимическое определение важнейших факторов прогноза у больных раком молочной железы. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена* 2014;3(1):33–36. [Savostikova MV, Korotkikh IYu, Laktionov KP. Immunocytochemical determination of the most important prognostic factors in patients with breast cancer. *PA. Herzen Journal of Oncology* 2014;3(1):33–36. (In Russ.).]
57. Tapia C., Savic S., Wagner U. et al. HER2 gene status in primary breast cancers and matched distant metastases. *Breast Cancer Res* 2007;9(3):R31. DOI: <https://doi.org/10.1186/bcr1676>
58. Pinto D., Schmitt F.C. Immunohistochemistry Applied to Breast Cytological Material. *Pathobiology*. 2022;89(5):343–358. DOI: <https://doi.org/10.1159/000522542>
59. Kirbis S.I., Krasovec U.M., Pogacnik A., Strojnan F.M. Optimization and validation of immunocytochemical detection of oestrogen receptors on cytopspins prepared from fine needle aspiration (FNA) samples of breast cancer. *Cytopathology* 2015;26(2):88–98. DOI: <https://doi.org/10.1111/cyt.12143>
60. Pu R.T., Giordano T.J., Michael C.W. Utility of cytology microarray constructed from effusion cell blocks for immunomarker validation. *Cancer* 2008;114(5):300–6. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncr.23797>
61. Mossler J.A., McCarty K.S. Jr., Johnston W.W. The correlation of cytologic grade and steroid receptor content in effusions of metastatic breast carcinoma. *Acta Cytol* 1981;25(6):653–58.
62. Srinivasan M., Sedmak D., Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 2002;161(6):1961–71. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64472-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64472-0)
63. Vlainic T., Somaini G., Savic S. et al. Targeted multiprobe fluorescence in situ hybridization analysis for elucidation of inconclusive pancreatobiliary cytology. *Cancer Cytopathol* 2014;122(8):627–34. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncy.21429>
64. Husain A.N., Colby T.V., Ordonez N.G. et al. Guidelines for pathologic diagnosis of malignant mesothelioma 2017 update of the consensus statement from the International Mesothelioma Interest Group. *Arch Pathol Lab Med* 2018;142(1):89–108. DOI: <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0124-RA>
65. Savic S., Franco N., Grilli B. et al. Fluorescence in situ hybridization in the definitive diagnosis of malignant mesothelioma in effusion cytology. *Chest* 2010;138(1):137–44. DOI: <https://doi.org/10.1378/chest.09-1951>
66. Cigognetti M., Lonardi S., Fisogni S. et al. BAP1 (BRCA1-associated protein 1) is a highly specific marker for differentiating mesothelioma from reactive mesothelial proliferations. *Mod Pathol* 2015;28(8):1043–57. DOI: <https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.65>
67. Siddiqui M.T., Schmitt F., Churg A. Proceedings of the American Society of Cytopathology companion session at the 2019 United States and Canadian Academy of Pathology Annual meeting, part 2: effusion cytology with focus on theranostics and diagnosis of malignant mesothelioma. *J Am Soc Cytopathol* 2019;8(6):352–61. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jasc.2019.07.005>
68. Berg K.B., Churg A.M., Cheung S., Dacic S. Usefulness of methylthioadenosine phosphorylase and BRCA-associated protein 1 immunohistochemistry in the diagnosis of malignant mesothelioma in effusion cytology specimens. *Cancer Cytopathol* 2020;128(2):126–32. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncy.22221>
69. Berg K.B., Dacic S., Miller C. et al. Utility of methylthioadenosine phosphorylase compared with BAP1 immunohistochemistry, and CDKN2A and NF2 fluorescence in situ hybridization in separating reactive mesothelial proliferations from epithelioid malignant mesotheliomas. *Arch Pathol Lab Med*

- 2018;142(12):1549–53.
DOI: <https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0273-OA>
70. Ma G.Y., Shi S., Wang P. et al. Clinical significance of 9P21 gene combined with BAP1 and MTAP protein expression in diagnosis and prognosis of mesothelioma serous effusion. *Biomed Rep* 2022;17(2):66.
DOI: <https://doi.org/10.1002/br.2022.1549>
71. Patel T., Patel P., Mehta S. et al. The value of cytology in diagnosis of serous effusions in malignant lymphomas: an experience of a tertiary care center. *Diagn Cytopathol* 2019;47(8):776–82.
DOI: <https://doi.org/10.1002/dc.24197>
72. Bode-Lesniewska B. Flow Cytometry and Effusions in Lymphoproliferative Processes and Other Hematologic Neoplasias. *Acta Cytologica* 2016;60(4):354–364.
DOI: <https://doi.org/10.1159/000448325>
73. Kalemkerian G.P., Narula N., Kennedy E.B. et al. Molecular testing guideline for the selection of patients with lung cancer for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: American Society of Clinical Oncology endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2018;36(9):911–19.
DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.7293>
74. Ellison G., Zhu G., Moulis A. et al. EGFR mutation testing in lung cancer: a review of available methods and their use for analysis of tumour tissue and cytology samples. *J Clin Pathol* 2013;66(2):79–89.
DOI: <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2012-201194>
75. Moran S., Martinez-Cardus A., Sayols S. et al. Epigenetic profiling to classify cancer of unknown primary: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2016;17(10):1386–95.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30297-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30297-2)
76. Botana-Rial M., De Chiara L., Valverde D. et al. Prognostic value of aberrant hypermethylation in pleural effusion of lung adenocarcinoma. *Cancer Bio Ther* 2012;13(14):1436–42.
DOI: <https://doi.org/10.4161/cbt.22004>
77. Li X., Liu Y., Shi W. et al. Droplet digital PCR improved the EGFR mutation diagnosis with pleural fluid samples in non-small-cell lung cancer patients. *Clin Chim Acta* 2017;471:177–84.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.06.007>
78. Tsai T.H., Su K.Y., Wu S.G. et al. RNA is favourable for analysing EGFR mutations in malignant pleural effusion of lung cancer. *Eur Respir J* 2012;39(3):677–84.
DOI: <https://doi.org/10.1183/09031936.00043511>
79. Cappellesso R., Nicole L., Caroccia B. et al. Young investigator challenge: MicroRNA-21/microRNA-126 profiling as a novel tool for the diagnosis of malignant mesothelioma in pleural effusion cytology. *Cancer Cytopathol* 2016;124(1):28–37.
DOI: <https://doi.org/10.1002/cncy.21646>
80. Lin J., Wang Y., Zou Y.Q. et al. Differential miRNA expression in pleural effusions derived from extracellular vesicles of patients with lung cancer, pulmonary tuberculosis, or pneumonia. *Tumour Biol* 2016; DOI: <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5410-6>
81. Wang Y., Xu Y.M., Zou Y.Q. et al. Identification of differential expressed PE exosomal miRNA in lung adenocarcinoma, tuberculosis, and other benign lesions. *Medicine (Baltimore)* 2017;96(44):e8361.
DOI: <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000008361>
82. Roscilli G., De Vitis C., Ferrara F.F. et al. Human lung adenocarcinoma cell cultures derived from malignant pleural effusions as model system to predict patients chemosensitivity. *J Transl Med* 2016;14:61.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0816-x>
83. Vinayanuwattikun C., Prakhongcheep O., Tungsukruthai S. et al. Feasibility technique of low-passage in vitro drug sensitivity testing of malignant pleural effusion from advanced-stage non-small cell lung cancer for prediction of clinical outcome. *Anticancer Res* 2019;39(12):6981–88. DOI: <https://doi.org/10.21873/anticancerres.13920>
84. Cailleau R., Mackay B., Young R.K., Reeves W.J. Jr. Tissue culture studies on pleural effusions from breast carcinoma patients. *Cancer Res* 1974;34(4):801–9.
85. Ruiz C., Kustermann S., Pietilae E. et al. Culture and drug profiling of patient derived malignant pleural effusions for personalized cancer medicine. *PLoS One* 2016;11(8):e0160807.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160807>
86. Liu X., Krawczyk E., Supryniewicz F.A. et al. Conditional reprogramming and long-term expansion of normal and tumor cells from human biospecimens. *Nat Protoc* 2017;12(2):439–51.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.174>
87. Jiang S., Wang J., Yang C. et al. Continuous culture of urine-derived bladder cancer cells for precision medicine. *Protein Cell* 2019;10(12):902–7. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13238-019-0649-5>
88. Palechor-Ceron N., Krawczyk E., Dakic A. et al. Conditional reprogramming for patient-derived cancer models and next-generation Living biobanks. *Cell* 2019;8(11).
DOI: <https://doi.org/10.3390/cells8111327>
89. Schutgens F., Clevers H. Human organoids: tools for understanding biology and treating diseases. *Ann Rev Pathol* 2020;15:211–34.
DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032611>
90. Bleijs M., van de Wetering M., Clevers H., Drost J. Xenograft and organoid model systems in cancer research. *EMBO J* 2019;38(15):e101654. DOI: <https://doi.org/10.15252/embj.2019101654>
91. Tuveson D., Clevers H. Cancer modeling meets human organoid technology. *Science* 2019;364(6444):952–55.
DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aaw6985>
92. Onder C.E., Ziegler T.J., Becker R. et al. Advancing Cancer Therapy Predictions with Patient-Derived Organoid Models of Metastatic Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 2023;15(14):3602.
DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers15143602>
93. Chandra A., Crothers B., Kurtycz D., Schmitt F. *The International System for Serous Fluid Cytopathology*. Springer International Publishing, 2020.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.С. Федосеева / E.S. Fedoseeva: <https://orcid.org/0000-0003-0812-5601>
О.Л. Василева / O.L. Vasileva: <https://orcid.org/0000-0002-6789-8527>
С.Л. Воробьев / S.L. Vorobyev: <https://orcid.org/0000-0002-7817-9069>
Е.С. Козорезова / E.S. Kozorezova: <https://orcid.org/0000-0002-3659-7510>
Е.Ю. Фурминская / E.Yu. Furminskaya: <https://orcid.org/0000-0003-3705-60>
С.В. Прилучный / S.V. Priluchny: <https://orcid.org/0009-0004-2306-1663>
Я.В. Василев / Ya.V. Vasilev: <https://orcid.org/0009-0001-0979-6004>
В.Н. Гриневич / V. N. Grinevich: <https://orcid.org/0000-0003-1908-2256>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.
Funding. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 30.01.2024. **Принята к публикации:** 26.02.2024.
Article submitted: 30.01.2024. **Accepted for publication:** 26.02.2024.