

На правах рукописи

Владимирова

Анна Владимировна

**ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА РАКА МОЛОЧНОЙ
ЖЕЛЕЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ
ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ
(ДЕНСИТОМОРФОМЕТРИЯ, ИММУНОЦИТОХИМИЯ)**

14.01.12 – онкология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург

2016 г.

Работа выполнена в ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник научной лаборатории морфологии опухолей ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России **Новик Виктор Иванович**

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор **Волченко Надежда Николаевна**, руководитель отделения онкоцитологии Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А.Герцена

Доктор медицинских наук, профессор **Нейштадт Эдуард Львович**, врач-патологоанатом Санкт-Петербургского Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Городское патологоанатомическое бюро»

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Минздрава России

Защита диссертации состоится «__» _____ 2016 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.052.01 при ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова» Минздрава России (197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68) и на сайте <http://www.niioncologii.ru/25/dissertations/index?id=148>.

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Бахидзе Елена Вилльевна

Актуальность темы

В структуре онкологической заболеваемости женского населения рак молочной железы (РМЖ) в мире и в России занимает первое место. Из всех новых случаев злокачественных новообразований различных органов, выявленных в мире, 10 % приходится на молочную железу. Если оценивать только женскую популяцию, удельный вес РМЖ возрастает до 22%, в промышленно развитых странах он ещё выше и составляет 27%. [В.Ф. Семиглазов, 2010]. Ежегодно в России выявляется более 52 тысяч новых случаев РМЖ [Чиссов В.И., 2013]. Злокачественные новообразования молочной железы, как причина смертности от онкологических заболеваний среди женщин, занимают также первое место как в России, так и в мире. Раннее выявление и своевременное лечение РМЖ являются ведущими факторами, снижающими смертность и увеличивающими вероятность полного выздоровления.

«Золотым стандартом» в обследовании пациенток с новообразованиями молочной железы в настоящее время является так называемый «тройной подход», включающий физикальный (осмотр, пальпация), лучевой (маммография, УЗИ) и морфологический методы исследования. Современная морфологическая диагностика РМЖ подразумевает детальную характеристику опухоли и точную оценку статуса регионарных лимфатических узлов, отвечая тем самым на ряд вопросов, имеющих решающее значение для планирования терапии и оценки прогноза заболевания. Тонкоигольная аспирационная биопсия (ТАБ) – это технически простой, безопасный, быстрый и сравнительно дешевый метод получения материала для морфологического исследования. Наиболее существенными недостатками ТАБ является довольно высокий процент получения неинформативного и малоинформативного материала, а также проблемы интерпретации цитологических картин при высококодифференцированном раке и некоторых пролиферативных процессах, что вызывает необходимость применения более сложных инвазивных методов диагностики (трепан-биопсия, эксцизионная биопсия). Рутинное цитологическое исследование (световая микроскопия) не может решить все задачи, которые ставятся клиницистами на современном этапе. Возникает необходимость поиска и применения дополнительных методов исследования. В настоящей работе рассмотрено значение денситоморфометрических и иммуноцитохимических (ИЦХ) исследований в диагностике РМЖ.

Цель исследования

Повышение эффективности цитологической диагностики РМЖ путем проведения цитогистологических сопоставлений и применения

дополнительных современных методов исследования (денситоморфометрия, иммуноцитохимия).

Задачи исследования

1. Провести сопоставление результатов цитологического исследования материала с гистологическим диагнозом. На основании полученных данных произвести расчет показателей эффективности цитологического метода исследования в диагностике новообразований молочной железы.

2. Выявить случаи, вызвавшие наибольшие затруднения в дифференциальной диагностике, проанализировать причины ошибочных цитологических заключений.

3. Произвести денситоморфометрические измерения ядер клеток при доброкачественных и злокачественных процессах и уточнить критерии цитоморфологической диагностики РМЖ.

4. Оценить информативность цитологического и ИЦХ методов в диагностике метастазов РМЖ в регионарные лимфатические узлы.

5. Определить молекулярно-генетический подтип опухоли на цитологическом материале и сопоставить полученные результаты с данными иммуногистохимического (ИГХ) исследования. Проанализировать целесообразность применения ИЦХ метода для определения прогностических маркеров при РМЖ.

Научная новизна

В работе оценена эффективность цитологической диагностики РМЖ, уточнены критерии дифференциальной цитоморфологической диагностики пролиферативных процессов и высокодифференцированного рака. Проведены денситоморфометрические измерения ядер клеток на представительном материале, включающем 12 групп наблюдения. Выявлено, что при преинвазивных формах РМЖ ядра клеток имеют большие размеры, чем при инвазивном раке. Также проанализирована целесообразность применения ИЦХ метода для определения прогностических маркеров при РМЖ и оценена информативность цитологического и ИЦХ методов в диагностике метастазов рака в лимфатические узлы.

Практическая значимость

Уточнение критериев дифференциальной цитоморфологической диагностики пролиферативных процессов и рака способствует повышению эффективности цитологического исследования в диагностике РМЖ. Определение прогностических и предиктивных факторов при РМЖ с

помощью ИЦХ исследования позволит определить молекулярно-генетический подтип опухоли, что облегчит планирование адекватного лечения больных РМЖ.

Апробация диссертации

Основные положения диссертации доложены на 1-ом Российском онкологическом научно-образовательном форуме с международным участием «Белые Ночи – 2015» (Санкт-Петербург, 2015 г.); 11 съезде Ассоциации клинических цитологов России (г. Звенигород, 2015 г.); II Петербургском онкологическом форуме «Белые Ночи – 2016» (Санкт-Петербург, 2016 г.); конференции молодых ученых (Санкт-Петербург, 2016 г). По теме диссертации опубликовано 10 работ в отечественной печати, из которых 3 работы - в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 107 страницах машинописного текста, иллюстрирована 23 рисунками и 16 таблицами. Состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение результатов), выводов и списка литературы. Список литературы включает 153 источника, в том числе 27 отечественных и 126 зарубежных авторов.

Личный вклад соискателя

Автором самостоятельно выполнена работа с архивным материалом, создана база данных и проведены цито-гистологические сопоставления с ретроспективным пересмотром цитологических и гистологических препаратов. Выполнены денситоморфометрические исследования, а также проведен забор, обработка материала для иммуноцитохимических исследований, оценка их результатов и сопоставление с гистологическими данными.

Внедрение результатов работы в практику

Результаты исследования внедрены в практику работы лаборатории цитологии ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России и могут быть использованы врачами цитологами других онкологических учреждений страны.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В работе рассмотрено несколько аспектов цитологической диагностики новообразований молочной железы. Проведен ретроспективный анализ результатов цитологической диагностики опухолей молочной железы у 3415 пациентов. Для объективизации цитологических данных у 47 пациентов выполнены денситоморфометрические исследования. Оценка эффективности цитологической диагностики метастазов РМЖ в регионарные лимфатические узлы выполнена ретроспективно у 42 пациентов; еще у 42 проведены проспективные цитологические и ИЦХ исследования сигнальных лимфатических узлов. Определение молекулярно-генетического подтипа опухоли с помощью ИЦХ исследования выполнено у 70 больных РМЖ (табл. 1).

Таблица 1

Количество исследований и пациентов в различных аспектах цитологической диагностики новообразований молочной железы

Цитологический материал	Количество пациентов	Количество исследований
Ретроспективный анализ результатов цитологической диагностики новообразований молочной железы	3415	4091
Морфо-денситометрические исследования	47	5077*
Ретроспективный анализ результатов цитологического исследования лимфатических узлов	42	42
Цитологическое исследование мазков-отпечатков сигнальных лимфатических узлов	42	60
Иммуноцитохимическое исследование мазков-отпечатков сигнальных лимфатических узлов	10	10
Иммуноцитохимическое исследование соскобов с опухолей молочной железы	70	350

*количество измеренных ядер

Проведен ретроспективный анализ результатов цитологических исследований новообразований молочной железы, выполненных в лаборатории цитологии ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» МЗ РФ с января 2009 г. по декабрь 2013 г. За указанный период было выполнено 4091 исследование у 3415 пациентов, из которых 3378 (99%) составили женщины и 37 (1%) – мужчины. Средний возраст обследованных составил 50 лет (от 11 до 89 лет). В 3597 (88%) случаях материал для исследования был получен с помощью ТАБ, в 169 (4%) исследовались выделения из соска, в 237 (6%) -

отпечатки трепан-биоптата, и в 86 (2%) - соскобы с поверхности поражения или отпечатки с изъязвленной поверхности опухоли. Мазки фиксировали в спирте (96% этанол). В подавляющем большинстве случаев материал окрашивали гематоксилином и эозином, в некоторых случаях – азур-эозином по Лейшману.

У 1434 пациентов было проведено сопоставление цитологического заключения с результатами гистологического исследования. На основании полученных данных рассчитаны основные показатели эффективности цитологического метода исследования по общепринятым формулам:

Чувствительность = $\text{ИП} / \text{ИП} + \text{ЛО} * 100\%$

Специфичность = $\text{ИО} / \text{ИО} + \text{ЛП} * 100\%$

Предсказательное значение положительного теста = $\text{ИП} / \text{ИП} + \text{ЛП} * 100\%$

Предсказательное значение отрицательного теста = $\text{ИО} / \text{ИО} + \text{ЛО} * 100\%$

Точность = $\text{ИП} + \text{ИО} / \text{ИП} + \text{ЛП} + \text{ИО} + \text{ЛО} * 100\%$.

Для расчета этих показателей учитывались истинно положительные (ИП), истинно отрицательные (ИО), ложноположительные (ЛП) и ложноотрицательные (ЛО) в отношении рака цитологические заключения. Случаи цитологического подозрения на рак, а также неинформативный материал не учитывались.

При ретроспективном пересмотре цитологических препаратов с проведением цитогистологических сопоставлений были проанализированы ошибки цитологической диагностики и выявлены случаи, вызвавшие наибольшие затруднения в дифференциальной диагностике рака молочной железы и доброкачественных процессов.

С целью объективизации цитологических данных были произведены денситоморфометрические исследования у 47 пациентов (табл. 2).

Таблица 2

Количество обследованных пациентов в различных группах наблюдений

Окончательный морфологический диагноз	Количество пациентов	Количество измеренных ядер
Доброкачественные опухоли (ДО)	5	548
Атипическая протоковая гиперплазия (АПГ)	8	730
Высокодифференцированная протоковая карцинома in situ (ВДПКИС)	3	330
Умеренно- и низкодифференцированная протоковая карцинома in situ (УНДПКИС)	5	542
Дольковая карцинома in situ (ДКИС)	5	598
Инвазивный дольковый рак (ИДР)	4	408
Высокодифференцированный инвазивный протоковый рак (ИПР G1)	3	321
Умеренно-дифференцированный инвазивный	4	448

протоковый рак (ИПР G2)		
Низкодифференцированный протоковый рак (ИПР G3)	инвазивный	3
Внутрипротоковая папиллома (ВПП)		259
Внутрипротоковый папиллярный рак (ВППР)		196
Инвазивная папиллярная карцинома (ИПК)		384
ВСЕГО		5077

С помощью монохромной цифровой камеры BMR-1340 LM-DE (фирма EZ-experts, СПб, Россия) черно-белые изображения ядер эпителиальных клеток молочной железы в цитологических мазках, окрашенных гематоксилином и эозином, записывали в формате BMP при увеличении объектива 40x (МИ) и стабилизированном освещении. Параметры ядер клеток (площадь ядра, периметр, максимальный и минимальный диаметры, оптическая плотность окраски - ОП, интегральная оптическая плотность – ИОП) определяли с помощью программы ВидеоТест Морфо 5.2. В каждом случае измеряли не менее 100 клеток. Для статистического анализа полученных данных использовали программу Statgraphics Plus 5.1. Результаты считались значимыми при $p < 0,05$.

Проведен ретроспективный анализ результатов цитологических исследований лимфатических узлов, выполненных в лаборатории цитологии НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова с 2009 г. по 2014 г. В исследование вошло 42 пациента с гистологически подтвержденным диагнозом РМЖ, которым между проведением ТАБ и операцией не проводилось никакого лечения.

У 42 пациентов выполнено проспективное цитологическое и ИЦХ исследование мазков-отпечатков сигнальных лимфатических узлов.

Материал, полученный при ТАБ, окрашивали азур-эозином по Лейшману, мазки-отпечатки сигнальных лимфатических узлов - методом срочной окраски (Leukodif) в течение 1 минуты. ИЦХ реакции выполняли на обычных мазках с использованием системы визуализации Novolink Polymer Detection System, Leica, и антител к эпителиальному антигену (клон BerEP-4) и цитокератину (клон MNF-116) фирмы «Dako».

Для определения молекулярно-генетического подтипа опухоли были отобраны 78 пациентов (77 женщин и 1 мужчина). У большинства пациентов (66) клинический диагноз РМЖ был установлен впервые и подтвержден морфологическими методами, у 9 по данным инструментального и клинического обследования высказано подозрение на рак, у 3 пациенток выявлен рецидив РМЖ после проведенного ранее хирургического лечения. У 12 больных проводилась неоадьювантная химиотерапия. Все пациенты подвергнуты оперативному вмешательству. Материал для цитологического исследования получали с разреза удаленного новообразования путем соскоба материала с поверхности опухолевого узла (или с наиболее подозрительных участков при отсутствии четко выраженного узла опухоли). Соскоб

помещали в специальную транспортную среду, состоящую из альбумина, полиглюкина и раствора Хенкса, и доставляли в лабораторию. Далее материал обрабатывали с помощью цитоцентрифуги Shandon Cytospin 4 (Thermo, США). В каждом случае готовили и окрашивали один препарат по рутинной методике (гематоксилин-эозин) для морфологической оценки и подсчёта количества клеток. Если клеток было достаточно (не менее 300), готовили еще 5 препаратов (4 препарата для ИЦХ реакций и 1 для отрицательного контроля). Мазки подсушивали на воздухе, фиксировали 96% спиртом в течение 10 минут. Далее проводилась демаскировка антигенов в цитратном буфере (pH=6) на водяной бане при температуре 98 °С в течение 20 минут (для HER-2 - 40 минут). Затем выполняли протокол ИЦХ реакции в соответствии с инструкцией производителя. Для выявления ER, PR и Ki-67 использовали систему детекции Novolink Polymer Detection System (Leica, Великобритания). Для определения экспрессии HER-2 использовали набор HercepTest (Dako, Германия). Антитела к ER (клон 1D5, Dako), PR (клон PgR636, Dako) и Ki-67 (клон SP6, Diagnostic Biosystems) разводили согласно инструкции. Препараты инкубировали в течение 30 минут во влажной камере. При определении HER-2 в каждой серии ставили позитивный и негативный контроль.

Для определения экспрессии рецепторов гормонов использовалась система подсчета баллов по системе Оллреда. Подсчитывали процент окрашенных клеток (proportional score, PS, от 0 до 5 баллов) и интенсивность окрашивания ядер (intensity score, IS, от 0 до 3 баллов). Общее заключение давалось на основании подсчета общего балла (total score, TC), который рассчитывался как сумма IS и PS (максимум 8 баллов).

Маркер пролиферативной активности Ki-67 подсчитывали в процентах. Для подсчета выбирали участки препарата, где процент окрашенных клеток был наибольшим. Минимальное число клеток для подсчета 300. Пороговое значение принято равным 20%.

Результат тестирования HER-2 оценивался в соответствии с рекомендациями ASCO/CAP для ИГХ исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты цитогистологических сопоставлений и оценка эффективности цитологического исследования

В период с 2009 по 2013 гг. было выполнено 4091 цитологическое исследование у 3415 пациентов с новообразованиями молочной железы. У 1434 (42%) больных результат цитологического исследования был сопоставлен с данными гистологического исследования. Злокачественные

процессы при окончательном гистологическом исследовании выявлены у 1165 (81,3%) из 1434 пациентов, доброкачественные процессы - у 269 (18,7%). При цитологическом исследовании у 898 (62,6%) пациентов диагностирован рак, у 145 (10,1%) – высказано подозрение на рак, у 196 (13,7%) выявлены доброкачественные процессы, у 194 (13,5%) получен неинформативный материал. Сопоставление данных цитологического и гистологического исследований представлено в таблице 3.

Таблица 3

Сопоставление данных цитологического и гистологического исследований новообразований молочной железы

Цитологический диагноз	Количество наблюдений	Гистологический диагноз	
		Рак	Доброкачественный процесс
Рак	898	885 (ИП)	13 (ЛП)
Подозрение на рак	145	122	23
Доброкачественный процесс	196	8 (ЛО)	188 (ИО)
Неинформативный материал	194	150	45
Всего	1434	1165	269

Примечание: ИП – истинно положительное в отношении рака цитологическое заключение, ИО – истинно отрицательное заключение, ЛП – ложноположительное заключение, ЛО – ложноотрицательное заключение.

Как видно из таблицы 3, у 1007 (86,4%) из 1165 больных, у которых гистологически было подтверждено наличие рака, он был выявлен (885, 76%) или заподозрен (122, 10%). Ложноотрицательные в отношении рака цитологические заключения даны в 8 (0,7%) случаях. Неинформативный материал при РМЖ получен у 150 больных (12,8%). Правильные отрицательные в отношении рака цитологические заключения даны у 188 (70%) из 269 больных. У 13 (4,8%) пациентов были даны ложноположительные в отношении рака заключения, и у 23 (8,5%) цитологическое подозрение на рак впоследствии не подтвердилось.

Полученные данные позволили рассчитать основные показатели эффективности цитологического исследования. Результаты этих расчетов, произведенных по общепринятым формулам, без учета подозрительных заключений и неинформативного материала, приведены в таблице 4.

Результаты цитологической диагностики опухолей молочной железы

Показатель	Результат	Формула расчета
Чувствительность	99,1%	$(ИП/ИП+ЛО) \times 100$
Специфичность	93,5%	$(ИО/ИО+ЛП) \times 100$
Предсказательное значение положительного теста	98,5%	$(ИП/ИП+ЛП) \times 100$
Предсказательное значение отрицательного теста	95,9%	$(ИО/ИО+ЛО) \times 100$
Точность	98%	$(ИП+ИО/ИП+ИО+ЛП+ЛО) \times 100$

Анализ неопределенных и ошибочных цитологических заключений

При проведении цитогистологических сопоставлений и ретроспективном пересмотре препаратов были выявлены основные причины ошибочных заключений и проанализированы цитологические особенности материала, послужившие причиной ошибки. Наиболее частой причиной ложноотрицательного цитологического заключения при РМЖ является малоинформативный материал. Из 1165 пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом РМЖ неинформативный цитологический материал получен у 150 (12,9%), тогда как ошибочное отрицательное в отношении рака заключение дано в 8 (0,7%) наблюдениях. При гистологическом исследовании в 5 из них выявлен ИПР (в том числе неинвазивные формы у 2 пациенток), в 1 наблюдении – внутрикистозный папиллярный рак, в 2-х – слизистый рак.

Таким образом, причинами ложноотрицательных в отношении рака цитологических заключений является чаще всего получение неинформативного материала. Меньший процент ошибок связан с объективными сложностями диагностики процессов, при которых признаки клеточной атипии выражены минимально. По нашим данным, наиболее частыми процессами, приводящими к гиподиагностике рака, являются протоковый рак (5 случаев из 8, причем в двух наблюдениях – неинвазивная и микроинвазивная формы) и слизистый рак (2 случая). Минимальное число ошибочных заключений обусловлено недооценкой степени атипии клеток вследствие недостаточной подготовленности специалиста, проводящего анализ.

Ложноположительные заключения были даны в 13 наблюдениях. Наиболее часто причиной ложноположительных заключений является гиперплазия протокового эпителия. Из 13 ложноположительных заключений атипическая гиперплазия эпителия выявлена в 4 случаях, простая протоковая гиперплазия – в двух. Второй по частоте нозологической формой,

приводящей к гипердиагностике рака, является фиброаденома. В нашем исследовании фиброаденома была диагностирована у 3 из 13 пациентов с ложноположительным цитологическим диагнозом. Затем следует внутрипротоковая папиллома (2 случая). Остальные процессы реже приводят к ошибкам диагностики. Большинство ошибок при перечисленных процессах обусловлено присутствием в мазках выраженной эпителиальной пролиферации с участками клеточной и ядерной атипии. Ошибки, обусловленные переоценкой степени атипии вследствие недостаточного опыта врача-цитолога или низкого качества материала, также имеют место, и во многих случаях причиной ложноположительных и ложноподозрительных заключений является малоинформативный материал.

Результаты денситоморфометрических измерений ядер клеток при доброкачественных процессах и раке молочной железы

Для объективизации цитологической диагностики были проведены денситоморфометрические измерения параметров ядер клеток у 47 пациентов. Всего было сформировано 12 групп наблюдения с различными доброкачественными и злокачественными заболеваниями молочной железы – АПГ (8 пациентов), ВДПКИС (3), УНДПКИС (5), ДКИС (5), ИДР (4), ИПР G1 (3), ИПР G2 (4), ИПР G3 (3), ВПП (2), ВППР (2), ИПК (3). Всего было измерено 5077 ядер (таблица 2).

В каждой группе проводились измерения следующих параметров ядер клеток - площадь ядра, периметр, максимальный и минимальный диаметры, оптическая плотность окраски, интегральная оптическая плотность. Данные морфо-денситометрических измерений представлены в таблице 5.

Таблица 5

Данные морфо-денситометрических измерений в различных группах наблюдений ($M \pm m$)

Группы наблюдений	Площадь (мкм ²)	Периметр (мкм)	Д. макс. (мкм)	Д. мин. (мкм)	ОП (отн. ед.)	ИОП (усл. ед.)
ДО	45,34 +/- 1,47	24,27 +/- 0,38	8,85 +/- 0,14	6,65 +/- 0,12	0,27 +/- 0,004	1044,26 +/- 26,23
АПГ	95,67 +/- 2,66	35,79 +/- 0,50	12,77 +/- 0,18	9,76 +/- 0,15	0,235 +/- 0,004	1947,62 +/- 58,77
ВДПКИС	71,59 +/- 1,99	31,25 +/- 0,47	11,15 +/- 0,18	8,62 +/- 0,14	0,218 +/- 0,003	1360,99 +/- 32,72
УНДПКИС	151,68 +/- 4,35	44,88 +/- 0,63	15,97 +/- 0,24	12,30 +/- 0,20	0,262 +/- 0,003	3430,86 +/- 91,08
ДКИС	73,68 +/- 2,8	31,59 +/- 0,64	11,24 +/- 0,24	8,73 +/- 0,19	0,233 +/- 0,004	1474,49 58,03
ИДР	77,51	32,00	11,57	8,74	0,21	1427,85

	+/- 2,35	+/- 0,45	+/- 0,17	+/- 0,16	+/- 0,005	+/- 42,26
ИПР G1	52,60 +/- 1,74	26,84 +/- 0,72	9,80 +/- 0,32	7,19 +/- 0,14	0,27 +/- 0,003	1276,4 +/- 37,30
ИПР G2	80,79 +/- 3,024	32,76 +/- 0,61	11,92 +/- 0,22	8,80 +/- 0,18	0,23 +/- 0,004	1580,83 +/- 43,71
ИПР G3	104,72 +/- 5,62	37,09 +/- 0,95	13,31 +/- 0,34	10,09 +/- 0,27	0,26 +/- 0,004	2458,61 +/- 140,97
ВПП	58,13 +/- 2,26	28,48 +/- 0,58	10,58 +/- 0,21	7,34 +/- 0,18	0,261 +/- 0,004	1317,24 +/- 45,53
ВППР	48,84 +/- 2,33	26,33 +/- 0,69	9,80 +/- 0,29	6,67 +/- 0,19	0,249 +/- 0,005	1059,93 +/- 48,98
ИПК	73,53 2,04	31,63 +/- 0,49	11,35 +/- 0,21	8,68 +/- 0,14	0,200 +/- 0,004	1260,82 +/- 31,46

Как видно из таблицы 5, наименьшие морфометрические показатели и интегральная оптическая плотность отмечены при доброкачественных опухолях.

Среди предопухолевых заболеваний и ранних форм рака наиболее высокие морфометрические и денситометрические показатели ядер клеток отмечены при УНДПКИС по сравнению с АПГ и при АПГ по сравнению с ВДПКИС ($p < 0,05$). При АПГ все параметры имели значительно более высокие показатели по сравнению с ДКИС, за исключением ОП ($p > 0,05$). Не отмечено существенных различий морфометрических показателей ядер атипических клеток при ДКИС и ВДПКИС, однако денситометрические параметры (ОП и ИОП) были более высокими при ДКИС по сравнению с ВДПКИС ($p < 0,05$). Сравнение ядерных параметров при ДКИС и ИДР не выявило статистически значимых различий между ними ($p > 0,05$), за исключением максимального диаметра ядер и оптической плотности. Однако при сравнении морфометрических и денситометрических показателей ядер ВДПКИС и УНДПКИС с соответствующими показателями при инвазивных протоковых раках соответствующей степени дифференцировки (ВДПКИС против ИПР G1 и УНДПКИС против ИПР G2 и G3) оказалось, что при инвазивных формах рака эти показатели имеют значительно меньшие значения, чем при внутрипротоковых (карциноме *in situ*). При сравнении морфометрических и денситометрических показателей ядер (за исключением ОП) в группе инвазивных протоковых раков установлены значительно более высокие показатели при низкодифференцированном раке (G3) по сравнению с умереннодифференцированным (G2) раком и последнего с высокодифференцированным (G1) раком.

В группе папиллярных опухолей молочной железы при ВПП все морфометрические и денситометрические показатели ядер имели меньшие значения, чем при ИПК, но большие значения, чем при ВППР ($p < 0,05$). Небольшое количество наблюдений в этих группах требует проведения дальнейших исследований.

Полученные результаты, возможно, отражают определенные закономерности морфогенеза при развитии и прогрессировании злокачественного процесса при различных гистологических формах рака молочной железы. Выявленные закономерности, в совокупности с другими цитоморфологическими данными, могут учитываться при проведении дифференциальной цитоморфологической диагностики. Из таблицы 5 видно, что в случаях атипической протоковой гиперплазии в мазках имелись довольно крупные, часто гиперхромные ядра, параметры которых были выше, чем при других формах начального рака молочной железы (за исключением умеренно- и низкодифференцированной протоковой карциномы *in situ*). Возможно, именно это послужило причиной ложноположительных в отношении рака цитологических заключений. Наоборот, слабо выраженные признаки атипии, особенно при высокодифференцированном протоковом раке и внутрипротоковом папиллярном раке, могли быть причиной ложноотрицательных заключений.

Вместе с тем, отмечалась значительная вариабельность ядерных параметров, как между различными группами наблюдений, так и в пределах одной группы. В разных группах наблюдений встречались случаи со сходными морфометрическими параметрами. Эти данные объективно свидетельствуют о трудностях проведения дифференциальной цитоморфологической диагностики в ряде случаев, заставляющих формулировать цитологическое заключение в предположительной форме.

Результаты цитологического и ИЦХ исследования лимфатических узлов при РМЖ

Проведен ретроспективный анализ результатов цитологических исследований материала ТАБ лимфатических узлов у 42 пациенток с гистологически подтвержденным диагнозом РМЖ. У 37 пациенток из 42 цитологически установлено метастатическое поражение лимфатических узлов, которое во всех случаях подтверждено при гистологическом исследовании. У трех из них цитологически был выявлен метастаз злокачественной опухоли, однако гистогенез установлен неверно (меланома, плазмочитома, папиллярный рак щитовидной железы). В 4 случаях (9,5%) материал ТАБ был неинформативным. Случаи ложноположительных и ложноотрицательных заключений отсутствовали. Точность цитологического исследования составила 90,5%. Чувствительность (без учета неинформативного материала) составила 100%.

У 42 пациенток выполнено проспективное цитологическое исследование мазков-отпечатков сигнальных лимфатических узлов во время оперативного вмешательства. У 10 из них при плановом гистологическом исследовании выявлены метастазы, в том числе у двух - микрометастазы (размером менее 2 мм). В этих случаях проводилась дополнительная вырезка материала и исследовались серийно-ступенчатые срезы. Цитологически из этих 10 случаев метастазы удалось обнаружить в 5 наблюдениях, при срочном гистологическом исследовании – в 6. При ретроспективном пересмотре цитологических препаратов в 5 наблюдениях, в том числе в 2-х с микрометастазами, опухолевые клетки выявить не удалось. Для их поиска было выполнено иммуноцитохимическое исследование с антителами к эпителиальному антигену (клон Ber-EP4); в 4 случаях окрашивание отсутствовало, в 1 выявлены изолированные окрашенные клетки и единичные комплексы окрашенных клеток. В 1 наблюдении в мазке-отпечатке сигнального лимфатического узла удалось обнаружить изолированные клеточные кластеры РМЖ, в то время как ни при срочном, ни при плановом гистологическом исследовании опухолевые клетки не были выявлены. В этом случае также было проведено иммуноцитохимическое исследование с антителами к эпителиальному антигену (Ber-EP4) и цитокератину (MNF-116), получено четкое выраженное окрашивание опухолевых клеток.

Определение молекулярно-генетического подтипа опухоли с помощью ИЦХ исследования

Для выполнения ИЦХ исследований были отобраны 78 пациентов с клиническим диагнозом РМЖ или подозрение на рак. Исследования выполняли на материале, полученном путем соскоба с поверхности опухоли, удаленной во время хирургического вмешательства.

При гистологическом исследовании операционного материала у 76 пациентов диагностированы различные формы РМЖ, у одной пациентки отсутствовала остаточная опухоль после проведения неоадьювантной химиотерапии, и у одной выявлен доброкачественный процесс. При цитологическом исследовании материала у двух пациенток опухолевые клетки в соскобе отсутствовали. У одной пациентки диагностирован доброкачественный процесс. В 5 случаях опухолевые клетки в цитологических препаратах были выявлены, но их количество было недостаточным для проведения ИЦХ исследования. В остальных 70 случаях выполнено ИЦХ исследование.

В каждом случае оценивали экспрессию рецепторов эстрогена, рецепторов прогестерона, Ki-67 и онкопротеина HER-2. Результат ИЦХ сопоставляли с результатами ИГХ исследования операционного материала.

По результатам ИЦХ исследования, в 57 из 70 случаев экспрессия ER была позитивной, в 13 - негативной. При сравнении ИЦХ и ИГХ экспрессии

ER в 63 (90%) случаях результаты совпали. В 7 (10%) наблюдениях наблюдалось расхождение результатов. В 4 случаях по данным ИЦХ экспрессия ER оценена как положительная, тогда как по данным ИГХ экспрессия не выявлена, и в трех случаях результат ИЦХ определения ER отрицательный, а результат ИГХ – положительный. Таким образом, 4 случая расценены как ложнопозитивные, и 3 – как ложнонегативные (таблица 6).

Таблица 6

Результаты ИЦХ и ИГХ определения рецепторов эстрогена

Результат	Иммуноцитохимическое исследование	Иммуногистохимическое исследование	
		Позитивный	Негативный
Позитивный (3-8 баллов)	57	53	4
Негативный (0-2 баллов)	13	3	10
Всего	70	56	14

При ИЦХ определении экспрессии PR 56 случаев из 70 были положительными, 14 – отрицательными. Совпадение результатов ИЦХ и ИГХ отмечено в 57 (81,5%) наблюдениях. Расхождение результатов наблюдалось в 13 (18,5%) случаях. В 8 случаях результат ИЦХ оказался ложнопозитивным, в 5 случаях - ложнонегативным (таблица 7).

Таблица 7

Результаты ИЦХ и ИГХ определения рецепторов прогестерона

Результат	Иммуноцитохимическое исследование	Иммуногистохимическое исследование	
		Позитивный	Негативный
Позитивный (3-8 баллов)	56	48	8
Негативный (0-2 баллов)	14	5	9
Всего	70	53	17

Сравнение ИЦХ и ИГХ экспрессии Ki-67 выполнено у 66 больных. Совпадение данных ИЦХ и ИГХ отмечено в 58 (88%) случаях, расхождение в

8 (12%). Ложноположительных результатов было 5, ложноотрицательных – 3 (таблица 8).

Таблица 8

Результаты ИЦХ и ИГХ определения маркера пролиферации Ki-67

Индекс Ki-67	ИЦХ исследование	ИГХ исследование	
		Высокий (20% и выше)	Низкий (менее 20%)
Высокий (20% и выше)	42	37	5
Низкий (менее 20%)	24	3	21
Всего	66	40	26

Сравнение ИГХ и ИЦХ определения HER-2 проведено у 43 пациентов. Совпадение данных ИЦХ и ИГХ отмечено в 41 (95,3%) наблюдениях. По результатам ИЦХ опухоль была HER-2 негативной у 37 пациентов. Из них по данным ИГХ у одной пациентки выявлена экспрессия HER-2 «3+», у трех – «2+», и у 33 – экспрессия «1+» или «0». У пациенток с неопределенным заключением ИГХ выполнено FISH-исследование, амплификация гена не выявлена ни в одном из трех наблюдений. Таким образом, при ИЦХ исследовании в одном случае дано ложноотрицательное заключение. У 6 пациенток по данным ИЦХ была выявлена HER-2 позитивная (3+) опухоль. У 5 из них по результатам ИГХ экспрессия HER-2 также позитивная «3+», у одной пациентки – негативная «1+». Таким образом, 1 случай расценен как ложнопозитивный (табл.9).

Таблица 9

Результаты ИЦХ и ИГХ определения онкопротеина HER-2

Экспрессия HER-2	ИЦХ исследование	ИГХ исследование	
		Позитивная	Негативная
Позитивная	6	5	1
Негативная	37	1	33+3*
Всего	43	6	37

*Примечание: у 3 пациенток по результатам ИГХ экспрессия HER-2 оценена как неопределенная (2+). По результатам FISH-анализа в этих трех образцах амплификация гена не выявлена.

Сопоставление всех 4 маркеров (ER, PR, Ki-67 и HER-2) и установление молекулярно-генетического подтипа опухоли было проведено у 40 больных (табл.10). По результатам ИЦХ исследования люминальный А подтип был определен у 15 (37,5%) пациентов, люминальный В HER-2 негативный – у 14 (35%), люминальный В HER-2 позитивный – у 5 (12,5%), нелюминальный HER-2 позитивный – у 1 (2,5%), трижды-негативный у 5 (12,5%) больных. По данным ИГХ у 14 (35%) больных определен люминальный А подтип, у 15 (37,5%) – люминальный В, у 4 (10%) – люминальный HER-2 позитивный, у 2 (5%) – HER-2 позитивный нелюминальный, и у 5 (12,5%) – трижды-негативный подтип. Совпадение результатов ИЦХ и ИГХ наблюдалось у 31 (77,5%) пациента.

Таким образом, иммуноцитохимический метод определения биологических маркеров при РМЖ является достаточно точным. Совпадение результатов ИЦХ и ИГХ исследования отмечено в 90%, 81,5%, 88% и 95,3% для ER, PR, Ki-67 и HER-2 соответственно. Полное совпадение молекулярно-генетического подтипа получено в 77,5% наблюдений.

Таблица 10

Молекулярно-генетические подтипы РМЖ

Подтип РМЖ	Иммуногистохимическая характеристика	Количество пациентов	
		ИЦХ	ИГХ
Люминальный А	ER/PrR (+) Her-2 (-) Ki-67 < 20%	15 (37,5%)	14 (35%)
Люминальный В HER-2 негативный	ER/PrR (+) Her-2 (-) Ki-67 > 20%	14 (35%)	15 (37,5%)
Люминальный В HER-2 позитивный	ER/PrR (+) Her-2 (+) Ki-67 > 20%	5 (12,5%)	4 (10%)
Нелюминальный HER-2 позитивный	ER/PrR (-) Her-2 (+) Ki-67 > 20%	1 (2,5%)	2 (5%)
Трижды- негативный	ER/PrR (-) Her-2 (-) Ki-67 > 20%	5 (12,5%)	5 (12,5%)
Всего		40	40

ВЫВОДЫ

1. Показатели эффективности цитологической диагностики РМЖ довольно высоки и составляют: чувствительность – 99,1%, специфичность – 93,5%, предсказательное значение положительного теста – 98,5%, предсказательное значение отрицательного теста – 95,9%, точность – 98%.

2. Среди доброкачественных процессов наибольшее число ложноположительных в отношении рака цитологических заключений выявлено при атипичной гиперплазии протокового эпителия (30% всех ЛП ответов), фиброаденоме (23%) и внутрипротоковой папилломе (15%). Ложноотрицательные заключения наиболее часто (62,5% всех ЛО результатов) встречались при протоковом (в том числе, при неинвазивных формах) и слизистом раке (25%).

3. Наши данные не подтверждают представление о линейном последовательном увеличении морфометрических параметров ядер эпителиальных клеток в ряду простая гиперплазия – атипичная гиперплазия – карцинома *in situ* – инвазивный рак молочной железы. Как морфометрические, так и денситометрические показатели при АПГ были значительно более высокими по сравнению с ВДПКИС, а также при карциномах *in situ* по сравнению с инвазивными формами рака соответствующей степени дифференцировки.

4. Значительная вариабельность морфометрических и денситометрических показателей, как в различных группах наблюдений, так и в пределах одной группы, в ряде случаев не позволяет четко отнести процесс к доброкачественной или злокачественной диагностической категории, что является причиной трудностей дифференциальной цитоморфологической диагностики и заставляет формулировать цитологическое заключение в предположительной форме.

5. Чувствительность цитологического исследования в диагностике метастазов РМЖ в регионарные лимфатические узлы равна 100%. Специфичность исследования, близкая к 100%, и крайне низкое количество ложноположительных заключений позволяет в случае положительного цитологического ответа избежать выполнения биопсии сигнальных лимфатических узлов и непосредственно приступить к подмышечной лимфаденэктомии. Отрицательный результат ТАБ требует дальнейшей оценки статуса регионарных лимфатических узлов посредством биопсии сигнального лимфатического узла.

6. При выполнении биопсии сигнальных лимфатических узлов параллельно с гистологическим исследованием можно выполнять цитологическое исследование мазков-отпечатков, которое в некоторых наблюдениях позволяет обнаружить единичные опухолевые клетки и микрометастазы, не выявленные при срочном гистологическом исследовании.

7. ИЦХ определение биологических маркеров при РМЖ является достаточно надежным методом. Совпадение результатов ИЦХ и ИГХ для ER, PR, Ki-67 и HER-2 отмечено в 90%, 81,5%, 88% и 95,3% соответственно. Таким образом, ИЦХ метод может являться альтернативой ИГХ исследованию в случаях рецидива, метастазов или прогрессирования опухоли для оценки иммунофенотипа во вторичных очагах ранее диагностированного рака, а также в ситуациях, когда получение материала для гистологического исследования сопряжено с трудностями или высоким риском осложнений.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

- 1. Владимирова А.В., Новик В.И., Красильникова Л.А. и др. Оценка эффективности цитологической диагностики новообразований молочной железы // Вопросы онкологии. – Т. 61. – № 4. – с. 614-618.**
- 2. Новик В.И., Владимирова А.В. Морфо-денситометрические исследования ядер клеток при атипичской гиперплазии и начальном раке молочной железы // Вопросы онкологии. – 2016. – Т. 62. – № 2. – с. 310 – 313.**
- 3. Владимирова А.В., Новик В.И. Эффективность цитологической диагностики метастазов рака молочной железы в регионарные лимфатические узлы // Вопросы онкологии. – 2016. – Т.62. – №3. – с.465-469.**
4. Новик В.И., Владимирова А.В. Анализ морфо-денситометрических параметров ядер клеток при доброкачественных опухолях и раке молочной железы // Новости клинической цитологии России. – 2015. – Т.19. - №3-4. – С.25-29.
5. Владимирова А.В., Новик В.И. Цитоморфологические особенности атипичской гиперплазии и начального рака молочной железы. // 1-й Российский онкологический научно-образовательный форум с международным участием «Белые Ночи – 2015». Сборник тезисов. М., 2015. – с. 295 – 296.
6. Владимирова А.В., Новик В.И. Эффективность цитологической диагностики метастазов рака молочной железы в регионарные лимфатические узлы // 1-й Российский онкологический научно-образовательный форум с международным участием «Белые Ночи – 2015». Сборник тезисов. М., 2015. – с. 296 – 297.
7. Новик В.И., Владимирова А.В. Цитометрические исследования атипичской гиперплазии и начального рака молочной железы // Новости клинической цитологии России. – 2015. – Т. 19. – № 1-2. – с. 52.

8. **Владими́рова А.В.**, Новик В.И. Возможности цитологической диагностики метастазов рака молочной железы в регионарные лимфатические узлы // Новости клинической цитологии России. – 2015. – Т. 19. – № 1-2. – с. 35.
9. **Владими́рова А.В.** Оценка экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона, маркера пролиферации Ki-67 и онкопротеина HER-2 в клетках рака молочной железы с помощью иммуноцитохимического исследования // Сборник научных трудов молодых ученых. – 2016. – с. 23-27.
10. **Владими́рова А.В.**, Артемьева А.С., Новик В.И. Сравнение результатов иммуноцитохимического (ИЦХ) и иммуногистохимического (ИГХ) методов в определении биологических маркеров (рецепторы гормонов, HER-2, Ki-67) при раке молочной железы // II Петербургский онкологический форум «Белые Ночи – 2016». Сборник тезисов. М., 2016. – с. 316-317.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую благодарность за помощь в работе и ценные рекомендации научному руководителю – доктору медицинских наук, профессору Новик В.И. Виктору Ивановичу.

Благодарю за поддержку и содействие в проделанной работе всех сотрудников научного отдела морфологии опухолей ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.