

# Цитологические методы в онкологии: новые возможности и перспективы

**4** апреля в конференц-зале Национального института рака МЗ Украины состоялся научно-практический семинар «Цитологические исследования в современной комплексной диагностике злокачественных опухолей», приуроченный к 90-летию со дня рождения профессора А.М. Мельника. В рамках мероприятия цитологи из разных регионов Украины смогли услышать актуальную информацию о новых возможностях цитологической диагностики.



Цитологическое исследование играет важную роль в верификации онкологического диагноза; кроме того, цитологический скрининг признан классическим методом исследования в онкологии и рекомендован ВОЗ для проведения в масштабах национальных программ. В частности, в нашей стране крайне актуальна проблема организации скрининга рака шейки матки (РШМ) с применением цитологического исследования, которое отвечает всем требованиям, предъявляемым к оптимальному скрининговому тесту. И хотя в Украине рекомендован ежегодный профилактический осмотр женщин с проведением цитологического исследования, для его успешной реализации необходимо решить ряд проблем, в том числе связанных с улучшением качества цитологических исследований, которое прямо зависит от информативности получаемого гинекологами диагностического материала.

Совершенствование цитологической диагностики с применением дополнительных методов исследования и развитие украинской цитологической службы освещалось практически во всех представленных на мероприятии докладах. Семинар позволил не только обсудить новейшие научные тенденции, но и вспомнить историю становления цитологической службы в нашей стране и особенности ее развития.

Заседание открылось выступлением, посвященным памяти профессора Анатолия Никитича Мельника – известного отечественного ученого, внесшего неоценимый вклад в развитие цитологических исследований в нашей стране. Заведующая научно-исследовательской лабораторией клинической цитологии Национального института рака МЗ Украины Людмила Севастьяновна Болгова рассказала о вкладе в науку и о значимых моментах жизни этого выдающегося ученого. А.Н. Мельник еще в 1970-х гг. прошлого столетия организовал и внедрил цитологический скрининг рака шейки матки, что позволило выявить и вылечить предраковые состояния шейки матки и благодаря этому сохранить жизнь сотням украинских женщин. Своими воспоминаниями также поделились коллеги профессора А.Н. Мельника и сотрудники организованной им научно-исследовательской лаборатории клинической цитологии Национального института рака, а также его сын – Е.А. Мельник.

Научная программа семинара была составлена таким образом, чтобы охватить наиболее актуальные вопросы, способные повлиять на дальнейшее развитие цитологических исследований в Украине. Особое внимание уделялось вопросам ранней диагностики рака шейки матки, развитие которой позволит значимо увеличить показатели выживаемости больных.



Большой интерес у присутствующих вызвал доклад «Использование иммуноцитохимических маркеров для прогнозирования течения дисплазии шейки матки», который представил **Алексей Александрович Селезнев**. Как подчеркнул докладчик, специфика РШМ состоит в том,

что при условии ранней диагностики заболевание успешно излечивается, позволяя женщине вернуться к нормальной жизни, сохранить репродуктивную функцию. Поэтому одной из основных проблем, связанных с лечением РШМ, является позднее выявление заболевания: так, в 2008 г. около 20% случаев РШМ выявлено на III стадии или позднее, а в некоторых регионах Украины этот показатель достигал 40%.

В настоящее время связь РШМ с инфицированием вирусом папилломы человека (ВПЧ) не вызывает сомнения.

ВПЧ относится к числу наиболее распространенных инфекций, передающихся половым путем. В то же время в подавляющем большинстве случаев вирус спонтанно элиминируется из организма. Среди всех женщин, инфицированных ВПЧ, рак шейки матки развивается только у 0,3%; кроме того, на 1 случай РШМ в Украине приходится >180 случаев других ВПЧ-ассоциированных заболеваний (предраковых состояний, дисплазий, генитальных кондилом).

Отсутствие стандартов ведения пациенток с дисплазиями приводит к необоснованному медикаментозному и хирургическому лечению женщин, инфицированных ВПЧ, с реактивными, потенциально обратимыми изменениями плоского эпителия. Это обуславливает особую актуальность прогнозирования течения указанных изменений.

Каким образом можно определить индивидуальный риск прогрессирования диспластических изменений? В оценке риска большую роль играет определение содержания большого капсидного белка (БКБ) ВПЧ. Экспрессия



Открытие семинара

данного белка в клетке запускает иммунные механизмы, обеспечивающие элиминацию вируса из организма. БКБ обнаруживается в 80-85% случаев в ядрах эпителиоцитов при интраэпителиальных поражениях плоского эпителия легкой степени выраженности (LSIL) или изменениях плоского эпителия с неопределенным значением (ASCUS), вызванных ВПЧ. В то же время БКБ исчезает после интеграции вирусной ДНК в геном эпителиальных клеток, которая и приводит к запуску механизмов онкогенеза. Таким образом, иммуноцитохимическое определение экспрессии БКБ может служить значимым прогностическим фактором.

Исследования показали, что у женщин с внутриэпителиальными поражениями низкой степени выраженности (LSIL) наличие экспрессии БКБ определяется в 54% случаев, при высокой степени выраженности (HSIL) – в 38% случаев, а ее отсутствие – в 62% случаев. Дальнейшие наблюдения за больными в течение 36-42 мес показали, что у пациенток, положительных по БКБ, в группе LSIL прогрессирование дисплазии отмечалось в 22% случаев, ремиссия – в 66%, у 12% – изменений не наблюдалось. В группе HSIL прогрессирование выявлено у 28%, ремиссия – у 57%, без изменений – у 15% пациенток. В то же время у больных, у которых при первом исследовании не выявлено экспрессии БКБ, прогрессирование заболевания в группах LSIL и HSIL отмечено в 58 и 79% случаев соответственно.

Таким образом, наличие ядерной экспрессии БКБ у пациенток с цитологическим диагнозом LSIL (PAP-тест) является прогностическим маркером отсутствия прогрессирования диспластических изменений эпителия шейки матки в 75% случаев. Отсутствие ядерной экспрессии БКБ у женщин данной группы является прогностическим признаком прогрессирования диспластических изменений в 72% случаев.



**Ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории клинической цитологии Национального института рака МЗ Украины, кандидат медицинских наук Тамара Николаевна Туганова** представила доклад «Ядрышковые организаторы в эпителии шейки матки с признаками ранней малигнизации».

По ее словам, цитологическое исследование мазков из шейки матки позволяет выявить внутриэпителиальные поражения на ранних стадиях РШМ, которые чаще всего развиваются в зоне трансформации. Благодаря своевременному выявлению и лечению предопухолевых состояний и ранних форм рака при применении программы массового скрининга значительно снижается смертность от РШМ. Патологический процесс сопровождается рядом изменений со стороны ядра эпителиальных клеток: увеличением размеров ядра, нарушением ядерно-цитоплазматического соотношения, неравномерным распределением хроматина и др. Большинство из этих признаков могут наблюдаться также при реактивных изменениях эпителия либо дисплазии, однако такие изменения, как увеличение числа, размеров и формы ядрышек, позволяют дифференцировать доброкачественные и злокачественные процессы.

Дисплазия представляет собой патологический процесс, при котором нарушается способность клетки к дифференцировке и в части толщи эпителиального слоя появляются клетки с различными признаками атипии. Основной тенденция развития диспластических изменений состоит в том, что с нарастанием степени дисплазии незрелые клетки с атипией и более выраженными изменениями ядер (дискарисом) занимают все большую часть эпителиального пласта. В пользу дисплазии свидетельствуют клетки с крупными ядрами, неровными контурами ядерной мембраны, участками конденсации хроматина. Диспластические изменения могут возникать в многослойном плоском эпителии влажной части шейки матки, в участках плоскоклеточной метаплазии слизистой оболочки в зоне трансформации, а также в цервикальном канале.

На коротком участке акроцентрического хромосом имеются участки ДНК, кодирующие образование рибосомальной РНК, образующей ядрышко. Рибосомы, формирующиеся в этом участке, осуществляют синтез кислых негистоновых белков, обладающих аргирофильными свойствами. Для идентификации ядрышковых организаторов широко используют окрашивание нитратом серебра. В интерфазном ядре аргирофилия ядрышек прямо пропорциональна его потенциальной активности, причем интенсивность окраски достоверно отражает общую активность клеток.

В последние годы метод серебрения ядрышковых организаторов привлекает пристальное внимание исследователей, работающих в области онкологии. По словам выступающей, выявление белков области ядрышковых организаторов является одним из доступных объективных методов, имеющих большую диагностическую значимость. Высокоспецифичная методика серебрения позволяет выявлять и объективно оценивать степень активности ядрышкообразующих регионов хромосом, которая является непосредственным отражением функционального состояния исследуемых клеток. Изменение степени визуализации различных вариантов морфофункциональных типов ядрышек и их количественного содержания является отражением уровня транскрипционной активности рРНК, усиления активации рибосомальных генов и указывает на динамическую перестройку ядрышкового аппарата. Появление ядрышек переходного типа, увеличение их количества, наличие в них аргирофилии средних и крупных градаций



свидетельствует об усилении функциональной активности, нарастании внутриклеточных метаболических процессов. Проведенные исследования свидетельствуют об информативности выявления зон ядрышковых организаторов в качестве дополнительного дифференциально-диагностического критерия при цитологическом исследовании дисплазии легкой степени в плоском и цилиндрическом эпителии шейки матки для выявления начальных стадий малигнизации.



Старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории клинической цитологии Национального института рака МЗ Украины, кандидат медицинских наук Оксана Ивановна Алексеевко рассказала о возможностях цитологической диагностики опухолей поджелудочной железы

(ПЖ). Как известно, рак ПЖ занимает четвертое место среди злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта (после рака желудка, рака толстой кишки и рака пищевода) и составляет 2-3% от всех раковых опухолей.

По словам выступающей, тонкоигольная аспирационная биопсия опухолей ПЖ под контролем ультразвукового исследования с последующей цитологической оценкой является эффективным методом морфологической диагностики онкологических заболеваний этого органа. По данным литературы, диагностическая специфичность при этом может достигать 100%. Общая чувствительность тонкоигольной аспирационной биопсии объемных новообразований ПЖ под контролем УЗИ достигает 88%.

В 2009 г. в лаборатории клинической цитологии Национального института рака было исследовано 140 пунктатов от 113 больных с объемными новообразованиями ПЖ. При цитологическом исследовании у 54,9% пациентов подтверждено наличие злокачественного процесса, у 1,8% выявлены доброкачественные опухоли (кисты), а у 5,3% больных цитогрामма позволила заподозрить наличие злокачественной опухоли. Признаки атипии отмечены в цитологических препаратах у 7,1% больных, в 0,8% случаев материал оказался неинформативным. Диагностическая ценность цитологической диагностики злокачественных новообразований ПЖ при этом составила 80%, чувствительность – 88%.

Задачи цитологического исследования опухолей ПЖ заключаются в дифференциальной диагностике доброкачественного и злокачественного характера процесса, определении гистогенеза опухоли, определении первичного или метастатического характера процесса, а также морфологического варианта опухоли. Также докладчик ознакомила присутствующих с современной гистологической классификацией опухолей ПЖ и цитоморфологическими признаками основных новообразований.



Заведующая научно-исследовательской лабораторией клинической цитологии Национального института рака МЗ Украины, доктор медицинских наук, профессор Людмила Севастьяновна Болгова посвятила выступление вопросам цитологической диагностики опухолей мягких тканей.

Известно, цитологический метод отличается простотой выполнения, сравнительно невысокой стоимостью, малотравматичностью. Однако «легкость» этого метода обманчива, так как цитологическое исследование должно завершаться формулировкой заключения, на основании которого будет разрабатываться тактика лечения.

Комплекс современных диагностических методов должен включать клинико-лабораторное обследование, ультразвуковое исследование для оценки распространенности опухоли, компьютерную томографию для определения объема хирургического вмешательства и контроля эффективности лечения, а также дооперационное морфологическое подтверждение диагноза (цитологическое или гистологическое). Только применение совокупности этих методов позволяет осуществить адекватную оценку наличия и распространенности опухоли, ее гистологический тип, от чего зависит метод лечения и прогноз.

По данным литературы, достоверность цитологической диагностики опухолей мягких тканей (то есть процент совпадений цитологических и гистологических результатов) составляет 65-93%. Частота неинформативных случаев достигает 5-12,3%. Кроме того, частота ложноотрицательных результатов превышает таковую ложноположительных, что приводит к гиподиагностике опухолевого процесса.

С целью уточнения возможностей и объективных трудностей цитологической диагностики опухолей мягких тканей под руководством профессора Л.С. Болговой был



Почетные гости семинара

проведен анализ цитологической диагностики у 70 больных в возрасте 20-76 лет, обследованных в Национальном институте рака в 2006 г. Результаты были сопоставлены с гистологическими заключениями (цитологические препараты окрашивались по методу Паппенгейма; нозологические формы устанавливались согласно Международной гистологической классификации).

В результате совпадение по характеру процесса выявлено в 80,85% случаев, совпадение по характеру и генезу процесса – в 72,34%, количество ложноотрицательных результатов – 10,63%, неинформативных препаратов – 8,51%. Ложноположительные результаты отсутствовали. Что касается распределения исследованных новообразований по генезу, в данном перечне доминировали жировая, мышечная и сосудистая гистологические формы опухолей (25,0; 17,5 и 12,5% соответственно). Низкодифференцированные опухоли без указания гистологического типа встречались в 7,5% случаев.

Таким образом, при цитологической диагностике опухолей мягких тканей характер процесса установлен в 80,85% случаев; в 72,34% случаев распознается генез опухоли при наличии диагностических клеток. Сложность диагностики обусловлена получением малоинформативного материала, что зависит от качества проведенной пункции. Кроме того, в исследовании установлена сложность диагностики липосарком и рабдомиосарком, которые представлены в цитограмах малым количеством опухолевых клеток с невыраженными признаками атипии и/или признаками дистрофии. Небольшое количество опухолевых клеток в цитограмах требует тщательного изучения их цитоморфологических признаков с учетом клинических данных для уточнения патологического процесса.



Врач лаборатории цитологической диагностики Национального института рака МЗ Украины Вячеславовна Мариненко рассказала о возможностях применения иммуноцитохимических (ИЦХ) методов в онкологии, которые приобретают все большую популярность и являются альтернативой иммуногистохимическим исследованиям. Методы ИЦХ внедряются в научно-исследовательской лаборатории клинической цитологии Национального института рака МЗ Украины. В основе данных методов лежит принцип специфического взаимодействия клеточных антигенов человека со специально полученными мечеными антителами. На сегодняшний день получение антител практически к любому антигену не представляет трудностей.

ИЦХ-метод позволяет определить экспрессию молекулярных маркеров на клеточном уровне. Следует отметить, что мембранные и цитоплазматические маркеры чаще положительно окрашиваются в цитологических, чем в гистологических препаратах (возможно, это связано с более щадящей обработкой цитопрепаратов, отсутствием потери и маскировки антигенов при проводке и депарафинизации материала). ИЦХ-реакции оцениваются как качественно – при уточнении гистогенеза опухоли, наличии метастаза в лимфатическом узле или другом органе, иммунофенотипировании лимфом, так и количественно – при оценке пролиферативной активности, экспрессии рецепторов гормонов в опухоли, онкопротеина c-erbB-2 и т. д. ИЦХ-реакция может быть ядерной, цитоплазматической и мембранной. Ядерная реакция определяется при исследовании рецепторов эстрогена и прогестерона, Ki-67, PCNA, p53 и т. д. Цитоплазматическая реакция характеризуется диффузным окрашиванием цитоплазмы или отложением гранул в виде грубых пятен и зерен. Цитоплазматическое окрашивание дают хромогранин, синаптофизин,

белок S-100, виментин, десмин, тиреоглобулин, кальцитонин, цитокератины, bcl-2 и т. д. Мембранное окрашивание наблюдается при проведении реакции с онкопротеином c-erbB-2 и эпителиальным мембранным антигеном.

Широкая панель ИЦХ-реакций позволяет определить тканевую и органную принадлежность, тип опухоли, маркеры пролиферации, прогноз заболевания, чувствительность к гормональной терапии. Клеточный материал для ИЦХ-исследования получают путем пункционной биопсии – относительно простой и малотравматичной процедуры, практически не сопровождающейся осложнениями. Необходимое оборудование для проведения ИЦХ-реакций существует в каждой лаборатории (дистиллятор, рН-метр, весы, термостат, автоматические дозаторы); проблема его повсеместного внедрения объясняется только высокой стоимостью реактивов (антител). Использование ИЦХ-метода позволяет расширить возможности современных морфологических методов исследования и на дооперационном этапе оценить прогностические факторы, выявить пролиферативные свойства опухоли и прогнозировать чувствительность к химиогормональному лечению.

Кроме того, в рамках научно-практического семинара было сказано о современном методе жидкостной цитологии и возможности его применения для обнаружения диспластических или раковых клеток шейки матки. Стремление усилить эффективность скрининговых обследований привело не только к разработке новых методов забора материала в транспортные среды, но и к созданию альтернативных способов приготовления мазка.

Кирилл Юрьевич Воронин отметил, что по сравнению с обычным цитологическим исследованием метод жидкостной цитологии позволяет резко уменьшить количество непригодных для исследования мазков, обеспечивает точность и эффективность исследования клеток за счет стандартизированного метода подготовки, и приводит к повышению эффективности работы лаборатории в целом. Репрезентативный тонкий слой клеток на препарате, полученном методом жидкостной цитологии, не содержит загрязнений и наслоений, создавая оптимальную возможность как можно более раннего распознавания патологических изменений. В специальный раствор переносятся практически 100% взятых клеток. Проба немедленно консервируется и отправляется в лабораторию.

Забор биоматериала из шейки матки производится специальной щеточкой, которая после забора опускается в контейнер с жидкой транспортной средой. Консервирующая транспортная среда препятствует повреждению клеток, позволяет избежать бактериального загрязнения и в оптимальных условиях доставить материал в лабораторию. Помимо этого, такой материал устойчив к колебаниям температуры, его можно хранить в течение нескольких месяцев и использовать для генетической детекции на онкогенность. В лаборатории путем центрифугирования образца тонкий слой суспензии равномерно помещается на стекло и окрашивается для последующего изучения. Такой подход позволяет сконцентрировать малое количество клеток в одном поле на стекле. Полученный мазок получается максимально тонким (однослойным), равномерной толщины на всем протяжении; процесс получения цитологического мазка полностью автоматизирован.

Очевидно, что использование жидкостной цитологии уменьшает число неудовлетворительных мазков и затраты времени для получения образцов; уменьшает число ложноотрицательных результатов по сравнению с PAP-тестом. К сожалению, в Украине на сегодняшний день этот метод практически недоступен и его внедрение является важным перспективным направлением.

В рамках форума проходила выставка оборудования для цитологических исследований. Кроме того, большой интерес присутствующих вызвала презентация новых учебных пособий для врачей: «Питоморфологическая диагностика заболеваний грудной железы» (Л.С. Болгова, Т.Н. Туганова, И.И. Смоланка; Киев, 2010), а также «Методы получения материала для цитологической диагностики опухолей» (Л.С. Болгова, Т.Н. Туганова, С.А. Родзаевский, В.С. Процьк, Л.И. Воробьева, В.В. Попсуй; Киев, 2011). Последнее пособие адресовано всем хирургам, онкологам и другим врачам, которые заинтересованы в получении информативного материала для цитологической и гистологической диагностики заболевания.

Подготовила Катерина Котенко  
Фото автора