

## Внутрилабораторная воспроизводимость при диагностике рака молочной железы

Н.А.Горбань, к.м.н.  
ФГБУ «ГВКГ им. Н.Н.Бурденко»

III Ежегодный Конгресс Онкопатологов России  
Казань, 20-21 апреля 2018 г.

## Исследование материала при РМЖ

- Вариант
- Степень злокачественности
- Наличие карциномы in situ
- Лимфоваскулярная инвазия
- Рецепторный статус
- C-erbB-2
- Пролиферативная активность (Ki-67)

## Ноттингемская градирующая система

- **Основана на полуколичественной оценке морфологических характеристик опухоли**
  - насколько опухоль напоминает нормальные терминальные протоково-дольковые единицы (т.е. степень дифференцировки по направлению к нормальным протокам и долькам)
  - степень ядерного полиморфизма
  - количество митотических фигур, как показатель пролиферации.

Ноттингемская модификация системы Скарфа-Блума-Ричардсона известна как Ноттингемская градирующая система, рекомендована различными профессиональными организациями на международном уровне (ВОЗ, AJCC, EU и королевская коллегия патологов)

*Для точной гистологической градации необходим препарат хорошего качества!*

- Адекватная и своевременная фиксация
- Препарат должен быть хорошего качества, 4-5 микрон, если толще – не видны детали.
- Должен быть выбран репрезентативный блок опухоли и особенно периферии. Количество блоков зависит от размера опухоли, обычно достаточно 4 блоков.

**Препарат низкого качества оценивать нельзя!**

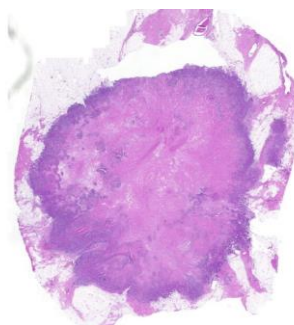
## Градирование РМЖ

- Гистологическое градирование требует обязательного и строгого соблюдения принятого протокола.
- Метод подразумевает оценку 3 компонентов, каждый из которых оценивается от 1 до 3 баллов:
  - Тубулярные/ацинарные/железистые структуры
  - Ядерная атипия/полиморфизм
  - Количество митозов
- Дополнительно дается общая гистологическая градация.

**Градированию подлежат только инвазивный компонент карциномы, но не in situ!  
Производится градирование всех типов карцином.**

## Опухолевая гетерогенность

- В разных частях опухоль может иметь разные характеристики, что особенно актуально для опухолей смешанного строения.
- Оценка железистых структур производится при просмотре всех участков.
- Ядерный полиморфизм и количество митозов надо оценивать в «худших» участках опухоли, которые наиболее часто располагаются по периферии опухолевого узла.



## Методология гистологической оценки

- Железистая дифференцировка:
  - 1 балл - >75% опухолевого поля формирует железистые/тубулярные структуры
  - 2 балла - от 10% до 75% опухоли
  - 3 балла - <10% опухоли
- **Необходимо просмотреть все участки опухоли на малом увеличении.**
- Должны учитываться только структуры с четко определяемым центральным просветом, окруженным поляризованными опухолевыми клетками.

**Нельзя принимать артефициальные щели за просветы.**

## Ядерный полиморфизм

- Ядерный полиморфизм – морфологическое проявление опухолевой дифференцировки на цитологическом уровне, а с генетической точки зрения, может отражать уровень анеуплоидии, генетической нестабильности и транскрипции.
- Оценка ядерного полиморфизма наиболее субъективный элемент гистологической градации.

**Но! Факт, что очень мало опухолей с ядерным полиморфизмом 1!**

## Критерии оценки ядерного полиморфизма

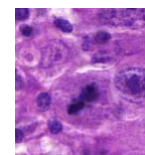
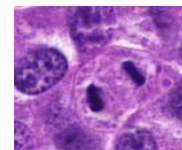
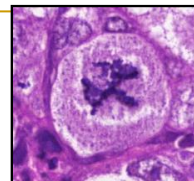
- **1 балл** - ядра маленькие, немного увеличены по сравнению с эпителием нормальных структур, с правильными очертаниями, моноформным ядерным хроматином, небольшой вариацией в размерах
- **2 балла** - клетки больше, чем нормальные эпителиальные клетки, с везикулярными ядрами, заметными ядрышками, умеренными различиями в размерах и форме.
- **3 балла** - везикулярные ядра, часто с заметными ядрышками, выраженные различия по форме и размеру, иногда с очень крупными и причудливыми формами.

- Чтобы объективизировать этот показатель, используют сравнение с нормальными эпителиальными клетками молочной железы в прилежащей ткани.
- Если нормальные эпителиальные клетки не идентифицируются, как суррогат можно использовать стромальные лимфоидные клетки.

**Если имеются единичные очень крупные или причудливые клетки, то это 2 балла, а не 3!!!!**

## Количество митозов

- Количество митозов отражает пролиферативную активность опухоли и, возможно, наиболее прогностически значимый компонент гистологической градации.
- Должны быть подсчитаны только достоверные фигуры митоза, отражающие разные его стадии.



Плохая фиксация может серьезно отражаться на результатах, и приводить к занижению результата.

- Митозы подсчитывают в 10 полях зрения по периферии опухолевого узла, где наиболее более выраженная пролиферативная активность.
- ***Если опухоль гетерогенная и частота митозов разная, то подсчет проводят в митотически более активных участках.***

***Количество митозов зависит от площади поля зрения!!!!***

Надо знать объем поля зрения на окуляре и показатели объектива!!!

## Общая градация

- Состоит из суммы 3 компонентов
- I степень злокачественности = сумма от 3 до 5
- II степень злокачественности = сумма 6 или 7
- III степень злокачественности = сумма 8 или 9

## Причины, побудившие провести исследование и тренинг

- Серьезные расхождения между результатами биопсии и операционного материала.
- Серьезные расхождения между гистологическим ответом и результатом иммуногистохимического исследования.
  - Например, ИПР G1, ER0, PR0, HER2+2, Ki-67=60%.
- Серьезный анализ проведенной в отделении работы при подготовке годового отчета.
  - Соотношение G1:G2:G3, распределение по типам, и др.
- Опыт консультативной работы с материалом из различных учреждений.

## Дизайн исследования

- Принимали участие 9 врачей
  - 4 врача со стажем более 20 лет
  - 1 врач – около 10
  - 3 врача около 5 лет
  - 1 врач – 2 года
- Предлагалось посмотреть препарат и заполнить опросный лист

Вариант рака	G	Дополнит находки	ЭР	ПР	HER2	Ki-67

- После заполнения опросного листа проводилось обсуждение каждого препарата и разбор ошибок
- Проведен анализ первых 35 случаев

**Цель: оценить уровень диагностики внутри лаборатории, найти болевые точки и повысить профессиональный уровень.**

<p>Дата 01.08.17 № исследования 6018 6/0 Врач</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>Вариант рака</th> <th>G</th> <th>Дополнит находки</th> <th>ЭР</th> <th>ПР</th> <th>HER2</th> <th>Ki-67</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>неясно</td> <td>3+3 5/5</td> <td>Зителон</td> <td>8</td> <td>8/3 6</td> <td>23</td> <td>80-90%</td> </tr> </tbody> </table> <p>Дата 01.08.17 № исследования 6018 6/0 Врач</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>Вариант рака</th> <th>G</th> <th>Дополнит находки</th> <th>ЭР</th> <th>ПР</th> <th>HER2</th> <th>Ki-67</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>неясно</td> <td>3+3 +2 7</td> <td>все митозы</td> <td>8/8</td> <td>6</td> <td>3+</td> <td>50-60%</td> </tr> </tbody> </table> <p>Дата 01.08.17 № исследования 6018 6/0 Врач</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>Вариант рака</th> <th>G</th> <th>Дополнит находки</th> <th>ЭР</th> <th>ПР</th> <th>HER2</th> <th>Ki-67</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>неясно</td> <td>3+3 5/5</td> <td>Зителон (1) и 90% (1)</td> <td>8</td> <td>6</td> <td>4/3</td> <td>80-90%</td> </tr> </tbody> </table> <p>Дата 01.08.17 № исследования 6018 6/0 Врач</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>Вариант рака</th> <th>G</th> <th>Дополнит находки</th> <th>ЭР</th> <th>ПР</th> <th>HER2</th> <th>Ki-67</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>неясно</td> <td>3 3+3</td> <td>Зителон</td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>	Вариант рака	G	Дополнит находки	ЭР	ПР	HER2	Ki-67	неясно	3+3 5/5	Зителон	8	8/3 6	23	80-90%	Вариант рака	G	Дополнит находки	ЭР	ПР	HER2	Ki-67	неясно	3+3 +2 7	все митозы	8/8	6	3+	50-60%	Вариант рака	G	Дополнит находки	ЭР	ПР	HER2	Ki-67	неясно	3+3 5/5	Зителон (1) и 90% (1)	8	6	4/3	80-90%	Вариант рака	G	Дополнит находки	ЭР	ПР	HER2	Ki-67	неясно	3 3+3	Зителон					<p>Дата 1.08.17 № исследования 6018 6/0 Врач</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>Вариант рака</th> <th>G</th> <th>Дополнит находки</th> <th>ЭР</th> <th>ПР</th> <th>HER2</th> <th>Ki-67</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Простата</td> <td>3+3 5/5</td> <td>in situ метаст?</td> <td>3+5 8</td> <td>1+2 3</td> <td>+3</td> <td>&gt;40%</td> </tr> </tbody> </table> <p>Дата 01.08.17 № исследования 6018 6/0 Врач</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>Вариант рака</th> <th>G</th> <th>Дополнит находки</th> <th>ЭР</th> <th>ПР</th> <th>HER2</th> <th>Ki-67</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>ЦЕР</td> <td>3+3 7</td> <td>8</td> <td>8</td> <td>3+3</td> <td>+2</td> <td>80-90%</td> </tr> </tbody> </table> <p>Дата 01.08.17 № исследования 6018 6/0 Врач</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>Вариант рака</th> <th>G</th> <th>Дополнит находки</th> <th>ЭР</th> <th>ПР</th> <th>HER2</th> <th>Ki-67</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Простата</td> <td>3+3 5</td> <td> </td> <td>3+3 8</td> <td>5+3 3</td> <td>+2</td> <td>&lt;10%</td> </tr> </tbody> </table> <p>Дата 01.08.17 № исследования 6018 6/0 Врач</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>Вариант рака</th> <th>G</th> <th>Дополнит находки</th> <th>ЭР</th> <th>ПР</th> <th>HER2</th> <th>Ki-67</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>неясно</td> <td>3 3+3</td> <td>Зителон</td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>	Вариант рака	G	Дополнит находки	ЭР	ПР	HER2	Ki-67	Простата	3+3 5/5	in situ метаст?	3+5 8	1+2 3	+3	>40%	Вариант рака	G	Дополнит находки	ЭР	ПР	HER2	Ki-67	ЦЕР	3+3 7	8	8	3+3	+2	80-90%	Вариант рака	G	Дополнит находки	ЭР	ПР	HER2	Ki-67	Простата	3+3 5		3+3 8	5+3 3	+2	<10%	Вариант рака	G	Дополнит находки	ЭР	ПР	HER2	Ki-67	неясно	3 3+3	Зителон				
Вариант рака	G	Дополнит находки	ЭР	ПР	HER2	Ki-67																																																																																																											
неясно	3+3 5/5	Зителон	8	8/3 6	23	80-90%																																																																																																											
Вариант рака	G	Дополнит находки	ЭР	ПР	HER2	Ki-67																																																																																																											
неясно	3+3 +2 7	все митозы	8/8	6	3+	50-60%																																																																																																											
Вариант рака	G	Дополнит находки	ЭР	ПР	HER2	Ki-67																																																																																																											
неясно	3+3 5/5	Зителон (1) и 90% (1)	8	6	4/3	80-90%																																																																																																											
Вариант рака	G	Дополнит находки	ЭР	ПР	HER2	Ki-67																																																																																																											
неясно	3 3+3	Зителон																																																																																																															
Вариант рака	G	Дополнит находки	ЭР	ПР	HER2	Ki-67																																																																																																											
Простата	3+3 5/5	in situ метаст?	3+5 8	1+2 3	+3	>40%																																																																																																											
Вариант рака	G	Дополнит находки	ЭР	ПР	HER2	Ki-67																																																																																																											
ЦЕР	3+3 7	8	8	3+3	+2	80-90%																																																																																																											
Вариант рака	G	Дополнит находки	ЭР	ПР	HER2	Ki-67																																																																																																											
Простата	3+3 5		3+3 8	5+3 3	+2	<10%																																																																																																											
Вариант рака	G	Дополнит находки	ЭР	ПР	HER2	Ki-67																																																																																																											
неясно	3 3+3	Зителон																																																																																																															





## Результат. Вариант опухоли

- **ИПР верифицирован правильно 24 случая**
- **Дольковый рак 2 случая**
  - 1 случай - верифицировал только 1 врач
  - 2 случая - 2 врача высказали подозрение на ИДР
- **ИПР с апокриновыми признаками**
  - 4 врача ИПР
  - 1 врач – комбинированный ИПР+ИДР
  - 1 врач – апокриновый рак,
- **ИПР G1**
  - 2 врача оценили как тубулярный,
  - 1 врач высказал подозрение на рак
  - 1 врач оценил как склерозирующий аденоз
- **ИПР+микропапиллярный 2 случая**
  - правильно верифицировал 1 врач
  - правильно верифицировали 2 врач
- **Муцинозный 2 случая**
  - узнали все кроме самого молодого
  - Узнали все
- **DCIS+ микроинвазия**
  - правильно оценили 2 врача, для остальных это ИПР

## Структурообразование

- **Совпадение балла: 9 (30%) случаев, преимущественно 3 балла**
- **1 или 2 балла - 6 случаев**
  - Завышение балла - 6
- **2 или 3 балла - 12 случаев**
  - Завышение балла - 5
  - Занижение балла - 7
- **Разброс мнений 1,2 и 3 балла - 3 (10%)**

## Полиморфизм

- **Совпадение: 7 (23%)**
- **1 или 2 балла - 2**
  - Завышение балла - 1
  - Занижение балла - 1
- **2 или 3 балла - 19**
  - Завышение балла 10
  - Занижение балла 9
- **Разброс мнений 1,2 и 3 балла 2 (7%)**

## Митотическая активность

- **Совпадение: 7 (23%)**
- **1 или 2 балла 8**
  - Завышение балла 6
  - Занижение балла 2
- **2 или 3 балла 10**
  - Завышение балла 1
  - Занижение балла 9
- **Разброс мнений 1,2 и 3 балла 4 (13%)**
- **1 или 3 балла 1**

## Степень злокачественности

- **Совпадение: 10 (33%), преимущественно при G3**
- **I-II 5**
  - В 4 случаях занижение
  - В 1 завышение
- **II-III 12**
  - Во всех случаях занижение градации
- **I-II-III 3 (10%)**

### ■ 1 случай

- ИДР G1 с наличием перстневидных клеток и LCIS. G3 определил самый неопытный врач, 2 врача отнесли к G2 за счет завышения оценки митотической активности

### ■ 2 случай

- ИПР+микропапиллярный G2. G1 определил самый неопытный врач, 2 врача отнесли к G3 за счет завышения полиморфизма и митотической активности

### ■ 3 случай

- Муцинозный рак G2. 2 врача отнесли к G1 за счет недооценки тубулярных структур, 2 врача отнесли к G3 за счет завышения оценки тубулярных структур и митотической активности.

## Наличие карциномы *in situ*

### ■ Гипердиагностика 6

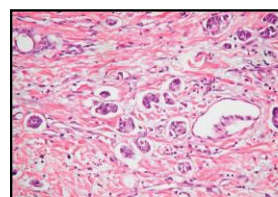
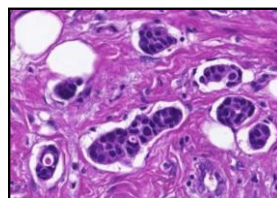
- Принимали инвазивные комплексы, особенно при муцинозном раке

### ■ Гиподиагностика 4

- Увидели большинство врачей (но не все!) в 3 случаях из 8

## Наличие ангиолимфатической инвазии

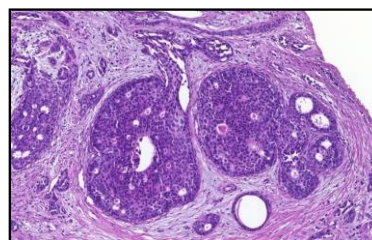
- Гиподиагностика – 2
- Гипердиагностика – 6
  - Принимали за эмболы ретракционный артефакт

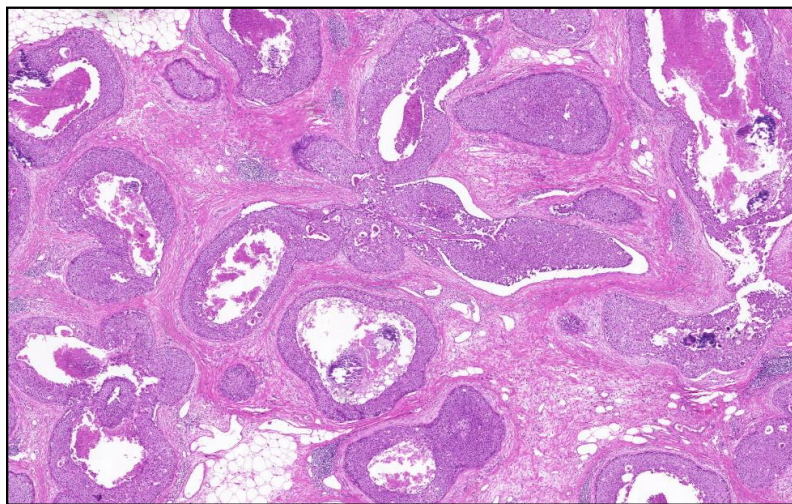


- Во всех случаях выполнили ИГХ-подтверждение ангиолимфатической инвазии

## Микроинвазивный рак – фокус инвазии менее 1 мм

- 1 случай DCIS с микрофокусом инвазии
- Правильно оценил 1 врач.
- Остальные все оценили как ИПР, G2, гормональный статус, c-erbB-2 и Ki-67





**Типичный «диагноз» при такой картине –  
инвазивный протоковый рак**

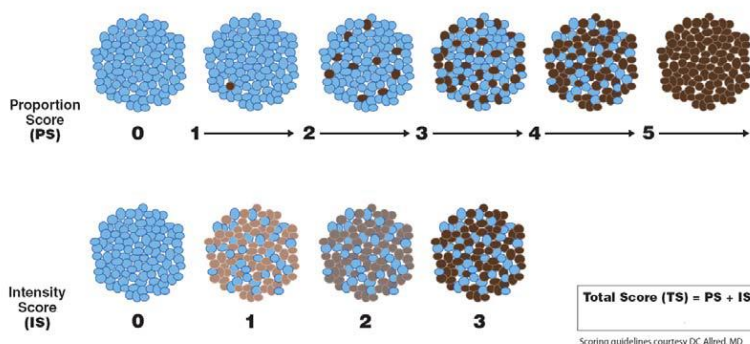
## **Проблемы адекватности материала**

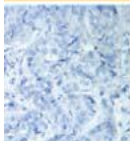
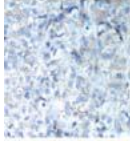
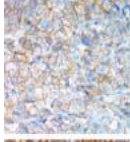
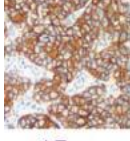
- В 1 случае биопсии МЖ было недостаточно материала, но **всеми врачами!** была дана оценка степени злокачественности, рецепторному и Her2-статусам, пролиферативной активности.
- В 2 случаях (консультативный материал после мастэктомии) признаки неадекватной фиксации, неадекватный уровень Ki-67 – отметили все врачи (случаи в анализ не вошли).

## Выводы. Выявленные проблемы.

- Нет нацеленности на определение вариантов РМЖ
- Непонимание процесса DCIS, LCIS, микроинвазии, градирование DCIS как инвазивного рака
- Не обращают внимание на наличие карциномы in situ при инвазивном раке и наоборот .
- Четкое занижение степени злокачественности (в 16 случаях из 17).
- Врачи «боятся» оценивать структурообразования в 1 балл.
- Наибольшие проблемы вызывает оценка полиморфизма, при решении между 2 или 3 баллами.
- Попытка «усреднения» уровня митотической активности, тенденция оценивать в 2 балла.
- Нет настороженности по отношению к раковым эмболам у одних врачей, гипердиагностика – у других
- У каждого врача есть свои «излюбленные» ошибки

## Шкала оценки экспрессии ER и PR по Allred



ИГХ-реакция (баллы)	Картина реакции	Оценка экспрессии HER2
	0 Отсутствие мембранного окрашивания или наличие слабого окрашивания менее 10% опухолевых клеток	Негативная
	1+ Слабое и неполное мембранное окрашивание более 10% опухолевых клеток, или слабое равномерное мембранное окрашивание менее 10% опухолевых клеток	Негативная
	2+ Слабое равномерное или яркое неполное мембранное окрашивание более 10% опухолевых клеток, или яркое равномерное мембранное окрашивание менее 10% опухолевых клеток	Неопределенная*
	3+ Яркое равномерное мембранное окрашивание более 10% опухолевых клеток	Позитивная

\* Повторное тестирование с помощью гибридизации in situ

## ИГХ маркеры

- ER
  - Совпадение оценки 27 случаев
  - Занижение оценки 1
- PR
  - Совпадение оценки 21
  - Занижение оценки 5
  - Завышение оценки 1
- C-erbB-2
  - Совпадение оценки 16
  - Занижение оценки
    - +1 вместо +2
  - Завышение оценки
    - +2 вместо +1 – 5 случаев
    - +3 вместо +2 – 4 случая

**Ki-67 – самый невоспроизводимый показатель!!!!**



## Результаты проведенной работы (тренинга)

- Резко повысился уровень профессионализма всех врачей, независимо от стажа работы.
- После 30-35 случаев расхождений стало значительно меньше, и они стали менее принципиальные
- Выработался алгоритм и привычка оценивать все параметры при РМЖ,
- Опираясь на полученный опыт, у каждого врача появились «внутренние» ориентиры.

- Необходимо проводить оценку работы отделения.
- Практика проведения тренингов внутри лаборатории позволяет быстро и эффективно повысить уровень диагностической работы лаборатории в целом.

