



**Григорук Ольга Григорьевна**

## **Значение цитологического метода в диагностике рака легкого**

КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер»,  
ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Барнаул

**V Ежегодный Конгресс Российского общества онкопатологов**  
**23-24 апреля 2021 года, г. Москва**

### **Еще 120 лет назад рак легкого считался уникально редким заболеванием**



- В 1898 году в медицинской литературе было описано всего **140** случаев.
- В одной из самых больших клиник Европы – Шарите – каждый новый пациент подробно демонстрировался на общегоспитальной врачебной конференции.

*(Имянитов Е.Н., Хансон К.П., 2007)*

## Заболеваемость населения раком легкого за последние **50 лет** возросла во многих странах мира

Рак легкого — это одно из самых распространенных злокачественных новообразований в мире, и ежегодно регистрируется **1,8** миллиона новых случаев этого заболевания, умирает же от этого заболевания более **1,6** миллиона человек (Stewart W, Bernard, Wild P, Christopher. World Cancer Report 2014. Lyon.2014; 19)



## Заболеваемость раком легкого в Алтайском крае

- В **2020** г. в Алтайском крае с впервые установленным диагнозом рака легкого зарегистрировано около **1253** человека (**1043** мужчин и **210** женщин)
- Заболеваемость составляет **53,7** на 100 тыс. населения (РФ 2019г.40,96), среди мужчин **96,8** и **16,8** на 100 тысяч среди женщин
- Отмечается тенденция к снижению заболеваемости РЛ в России: «грубый» показатель **-0,69** ежегодно, и **-6,64** в за 10 лет.
- Морфологическая (гистологическая и цитологическая) верификация составила **84,4 %** (РФ 2019г. 82,7 %)





## Онкопатология легкого

- Рак легкого объединяет разные по морфологической форме заболевания, объединенные в одну группу по органной принадлежности.
- В классификации 2015 года при диагностике заболеваний легкого определены возможности и ограничения использования малого диагностического материала, который является определяющим началом лечения пациентов при раке легкого является морфологический диагноз (гистологический и/или цитологический).
- Большая часть пациентов (**до 70 %**) поступает в клинику на лечение, имея поздние стадии заболеваний, что значительно снижает вероятность оперативного лечения.
- Основным методом морфологического подтверждения опухолевого процесса для большинства пациентов с подозрением на рак легкого является использование малого диагностического материала – биопсии и цитологических образцов.

### Вышла бета-версия V классификации опухолей легкого ВОЗ 2021 года.

классификация эпителиальных опухолей в новой версии остается практически неизменной с 2015 г.,

Ряд моментов:

1. Появилась новая единица: недифференцированная опухоль с дефицитом SMARCA4 как высоко агрессивный низкодифференцированный подтип рака легкого, в большинстве случаев, тесно связанный с курением.
2. Бронхиолярная (bronchiolar) аденома / реснитчатая муконодулярная папиллярная опухоль теперь признана новым подтипом аденомы. Часто мутации в генах *BRAF*, *EGFR*, *KRAS*, *HRAS*, *AKT1* и *ALK*.
3. Кроме того, из-за отсутствия полной корреляции между лимфоэпителиомоподобной гистологией и позитивностью гибридизации на EBV, номенклатура лимфоэпителиомоподобной карциномы была изменена на «лимфоэпителиальную карциному», которая включает EBV-положительный и отрицательный подтипы.
4. Термин «кишечная аденокарцинома» был изменен на «аденокарцинома кишечного типа» на протяжении всей классификации. Этот новый термин признает, что первичные аденокарциномы легких и тимуса могут иметь морфологию и дифференцировку кишечного типа.
5. Авторы ставят вопрос о будущих исследованиях с адьювантной терапией с учетом подтипов роста аденокарциномы в качестве фактора стратификации.
6. С 2015 года появились новые данные результатов секвенирования для карциноидов, а также нейроэндокринных карцином высокой степени злокачественности (НЭК). На основании профилей мутаций и экспрессии генов карциноидные опухоли разделены на несколько молекулярных подгрупп.
7. Анализ данных полногеномного секвенирования SCLC показал, что потеря генов-супрессоров опухолей TP53 и RB1 является обязательной в этих опухолях.
8. В январе 2017 года восьмое издание TNM заменило седьмое издание. Новая система стадирования была разработана на основе результатов выживаемости 94 708 пациентов, собранных на международном уровне, с внешней проверкой с использованием базы данных программы SEER NCI. Основные изменения касаются стадий T и M, при этом стадия N практически не изменилась. В этом контексте IASLC прилагает усилия для разработки более четких гистологических критериев для определения инвазивного компонента опухоли, поскольку предыдущие исследования продемонстрировали отсутствие воспроизводимости при диагностике инвазивного компонента.

**Система Папаниколау для цитологических заключений опухолей  
легких, 2019г.**

Категория	Пояснение
I. Недостаточный и / или не репрезентативный клеточный материал для диагностики	- бесклеточный материал - артефициально поврежденный материал - клетки не принадлежащие очагу (транзиторные) - при пункции лимфатического узла – материал, содержащий только кровь - доброкачественный респираторный эпителий при наличии подтвержденного методами визуализация очага
II. Доброкачественный процесс	- доброкачественные воспалительные /реактивные процессы - гиперплазия и реактивные изменения в лимфатических узлах
III. Атипия неопределенного значения	- респираторный или метастазированный эпителий при доброкачественном процессе с наличием некоторой атипии, однако ее недостаточно для подозрения на малигнизацию - скудный клеточный состав при подозрении на доброкачественный процесс или процесс с неопределенным потенциалом
IV. 1. Доброкачественные опухоли 2. Новообразования с неопределенным злокачественным потенциалом	1. легочная гамартома - зернисто-клеточная опухоль - плоскоклеточная папиллома 2. эпителиоидная гемангиоэндотелиома - сахарная опухоль легкого - склерозирующая пневмоцистома - первичная легочная менингиома – гистиоцитоз из клеток Лангерганса - солитарная фиброзная опухоль - воспалительная миофибробластическая опухоль - мезоэпителиальные новообразования
V. Подозрение на малигнизацию	атипичные эпителиальные клетки, атипичная лимфоидная популяция, атипичные мезенхимальные клетки, демонстрирующие выраженные цитоморфологические изменения с подозрением на малигнизацию, но их особенности не соответствуют критериям для диагноза злокачественного процесса



**Среди комплексных методов предоперационной  
диагностики опухолей легких цитологический метод  
занимает одно из ведущих мест**



- **Результативность** цитологической диагностики высока и составляет **89,4 – 97,3%**. (Шапиро Н.А., 2005; Eloubeidi M.A, 2005; Gia Khanh Nguyen, 2008; Савостикова М.В. 2015).
- **Точность** цитологических исследований опухолей легкого по данным разных авторов относительно вариабельна и составляет **79-98%**. (Albert Ute-Susann et al 2000; Nayar Ritu et al. 2001; Герасименко И.И. 2001; Волченко Н.Н. и др., 2004; Chang F., et al, 2006; Савостикова М.В..2015).
- По данным литературы **чувствительность** цитологического исследования опухолей легких колеблется в пределах **92,7% – 97,3%** (Nguyen GK, 2000; Stolnicu S, 2006; Савостикова М.В. 2015),
- **Специфичность – 79,0 % – 100 %** (Kakinuma H, 2003; Stolnicu S, 2006; Koss LG, 2006; Jaishree Jagirdar, 2008; Савостикова М.В. 2015; Gerard A. Silvestri , Clinical Aspects of Lung Cancer. 2016).

## Возможности использования малого диагностического материала при диагностике заболеваний легкого

Точная диагностика заболеваний легкого на основе цитологического материала возможна при использовании

Не только световой микроскопии, но и применении цитохимических, иммуноцитохимических и молекулярно-генетических исследований.

- В классификации 2015 года при диагностике заболеваний легкого определены возможности и ограничения использования малого диагностического материала.
- Небольшое количество клеточного материала опухоли затрудняет распознавание злокачественности процесса в целом, что приводит к ложноотрицательным и ложноположительным интерпретациям.
- Цитологический материал исключает возможность определять наличие инвазии.

## Возможности использования малого диагностического материала при диагностике заболеваний легкого

- Ложноотрицательные заключения цитологической диагностики нередко обусловлены некачественным забором материала: наличием единичных опухолевых клеток в препарате, присутствием примеси крови, слизи, бесструктурных масс детрита, воспалительных элементов.
- Из-за проблемы гетерогенности злокачественных опухолей легкого при цитологическом исследовании нередко затруднительно высказываться о гистотипе опухоли, в связи с тем, что оценивается материал, полученный из небольшого участка опухоли при пункции или бронхоскопии.
- Особое значение в практической работе имеет опыт врача-цитолога. Уверенные цитологические заключения о наличии опухоли возможны при условии просмотра исследователем не менее **3000** образцов злокачественных опухолей легкого, в приоритете заключения о наличии злокачественности процесса от врачей лабораторий онкологических диспансеров.



## **Цель исследования:**

**оценить информативность цитологической диагностики карциномы легкого, проводимой в онкологическом диспансере**

## **Материалы и методы**



- В основе работы данные пролеченных больных с диагнозом «рак легкого» (**n=756**), установленным цитологическим методом в КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер» за год.
- При диагностике использовали цитологический материал, полученный различными способами.
- При исследовании жидкостного материала изготавливали препараты традиционным центрифугированием и с использованием центрифуги Cytospin-4.
- Окрашивали препараты по методу Паппенгейма.
- При необходимости применяли иммуноцитохимический метод с применением стандартного протокола исследования. Для визуализации реакции антиген/антитело применяли тест-систему REAL™ EnVision™ («ДАКО»). В качестве хромогена – DAB (3,3-diaminobenzidine), докрасивали гематоксилином.



### Еженедельно проводилось сопоставление цитологических и гистологических результатов исследования биологического материала пациентов при диагностике заболеваний легкого

- В части наблюдений проводили молекулярно-генетические исследования, используя клеточный материал опухоли с цитологических препаратов.
- Оценивали количество опухолевых клеток на стеклопрепаратах, процентное соотношение с остальным клеточным материалом, отобранные комплексы клеток опухоли отмечали маркером.
- Клеточный материал растворяли лизирующим раствором и отбирали пипеткой в пробирку типа Эппендорф.
- ДНК из цитологических препаратов, выделяли с помощью набора «DNA Sample Preparation Kit» (Roche, США).
- Проводили оценку пригодности полученных образцов флюориметрическим методом, набором Qubit™ ds DNA HS Assay Kits на приборе Qubit® 2.0 Fluorometer (Live technologies, США).
- Определение статуса гена *EGFR* в образцах осуществляли методом амель-специфической ПЦР в режиме реального времени с помощью набора «Cobas EGFR Mutation Test v2», (Roche, США) Использовали прибор Cobas Z480 (Roche, США). Исследовали 42 мутации: 18 эк.(G719X); 29 del19 эк.; 20 эк. (T790M, S768I, 5 ins); 21 эк.(L861Q и L858R (2573TG>G, 2573\_2574TG>GT)).

## Результаты исследования

Пациенты направлялись в КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер» в большинстве своем с предварительным клиническим диагнозом: «Рак легкого» (n=756)



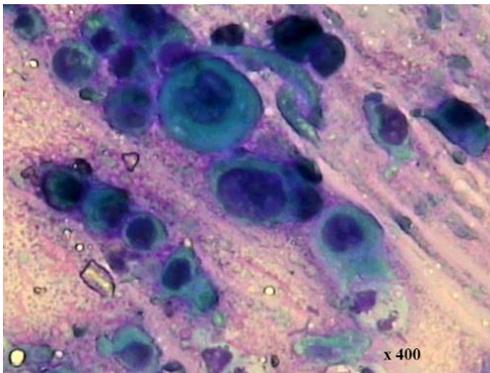
# I. Световая микроскопия



Метод световой микроскопии позволил в **674 (89 %)** наблюдениях определить гистологический тип опухоли.

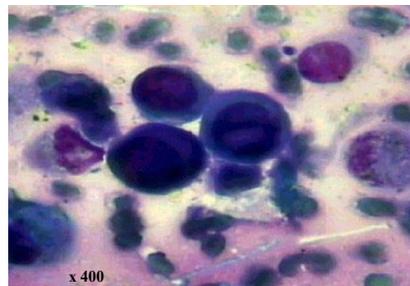
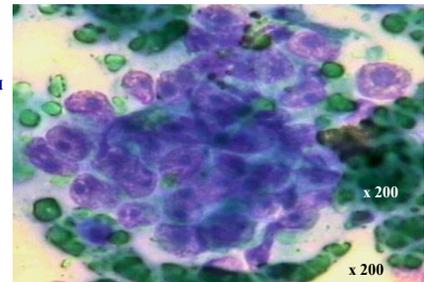
Без уточнения гистологического варианта опухоли диагностирован «рак БДУ» у **82 (11 %)** пациентов в связи с недостаточным количеством клеточного состава, дистрофическими изменениями клеток, а также с отсутствием достоверных клеточных критериев для интерпретации формы рака.

## Плоскоклеточный рак легкого диагностирован у **357 (53 %)** больных



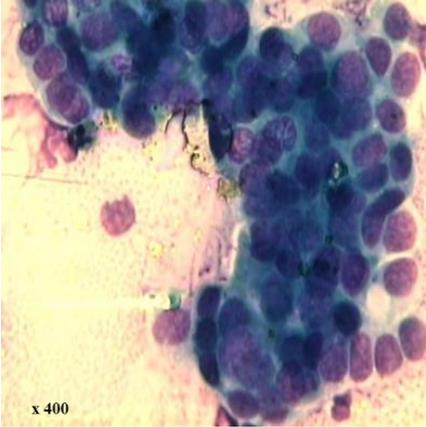
мокрота

при бронхоскопическом исследовании

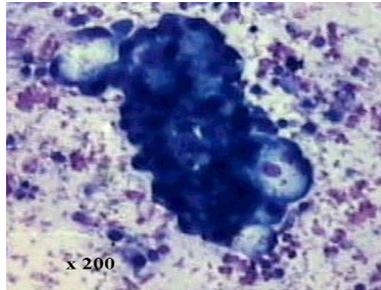


ТПП

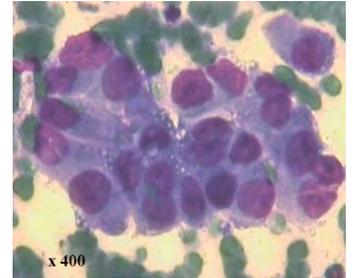
## Аденогенный рак легкого диагностирован в **148 (24 %)** наблюдениях



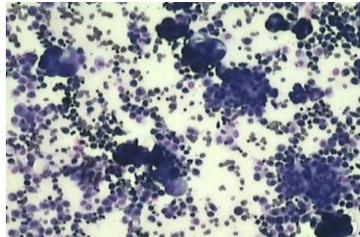
при бронхоскопическом исследовании



мокрота

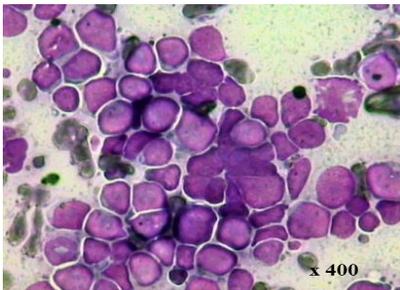


ТТЛ

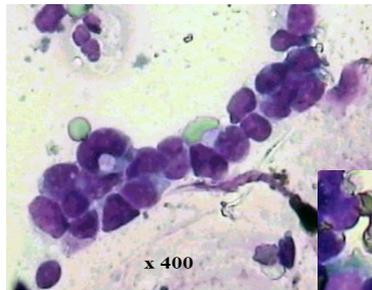


плевральная жидкость

## Мелкоклеточный рак легкого диагностирован у **157 (23 %)** пациентов

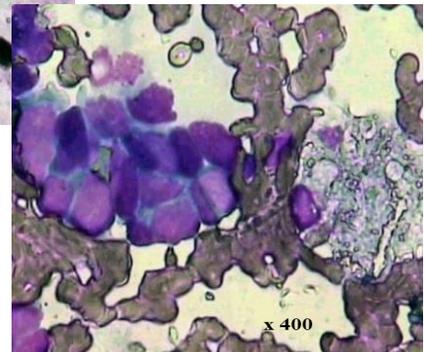


при бронхоскопическом исследовании

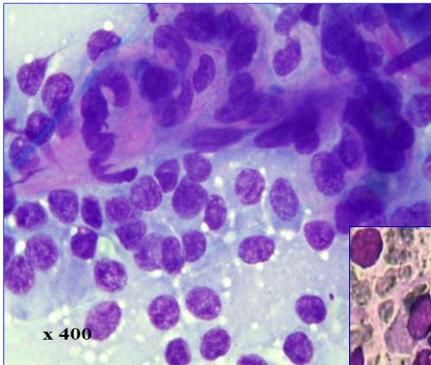


мокрота

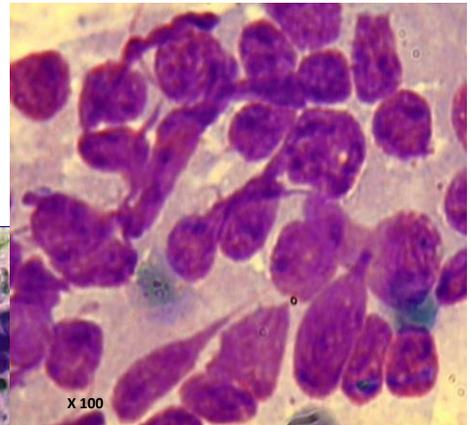
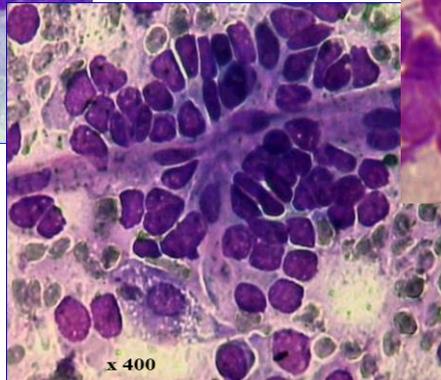
ТТЛ



## Типичный карциноид G1(n=6), атипичный карциноид G2 (n=1) (1 %)



при бронхоскопическом исследовании



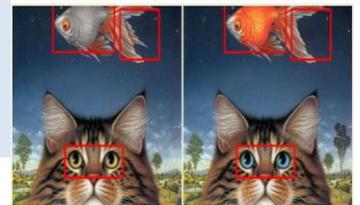
при бронхоскопическом исследовании

## Сопоставление цитологических и гистологических исследований

- При бронхоскопическом исследовании забор материала на гистологическое исследование в части случаев происходит совместно с забором материала на цитологическое исследование. В этих случаях возможно сопоставление данных двух методов исследований, которые дополняют друг друга.
- При рецидивах опухоли и метастатических поражениях при раке легких нередко доступен только цитологический материал.
- Во всех возможных наблюдениях проводилось сопоставление результатов цитологического и гистологического заключений о наличии клеток опухоли в препаратах, совпадение результатов отмечалось в 100 % случаев.



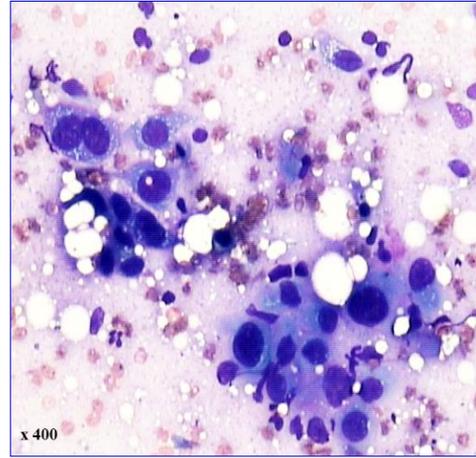
Расхождение по форме при немелкоклеточном раке легкого отмечено в 5 (0,9 %) случаях, при которых установлена принадлежность клеток опухоли в двух случаях к аденогенному раку вместо плоскоклеточного и в трех – наоборот.



## Плоскоклеточный неороговевающий рак легкого



при бронхоскопическом исследовании



при бронхоскопическом исследовании

- Трудности возникают при дифференцировании плоскоклеточного неороговевающего и аденогенного рака. Основным критерием дифференциальной диагностики является центральное расположение ядер в клетках опухоли при плоскоклеточном раке и эксцентричное – при аденогенном раке.

Чувствительность (Se) – это способность диагностического метода давать правильный результат

$$Se = \frac{TP}{D} \times 100\%$$

TP – истинно положительные результаты  
D – общее количество исследуемых

Специфичность (Sp) – это способность диагностического метода не давать при отсутствии признака ложноположительных результатов.

$$Sp = \frac{TN}{D} \times 100\%$$

TN – истинно отрицательные результаты  
D – пациенты с отсутствием признака

Точность (Ac) – это доля правильных результатов теста среди всех обследованных пациентов.

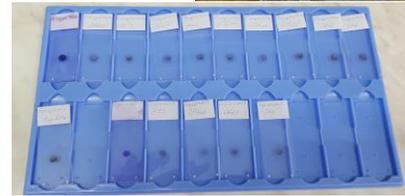
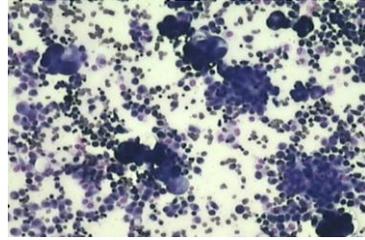
$$Ac = \frac{TP + TN}{D + D'} \times 100\%$$

TP – истинно положительные результаты  
TN – истинно отрицательные результаты  
D – пациенты с наличием признака  
D' – пациенты с отсутствием признака

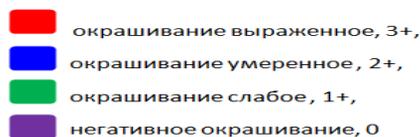
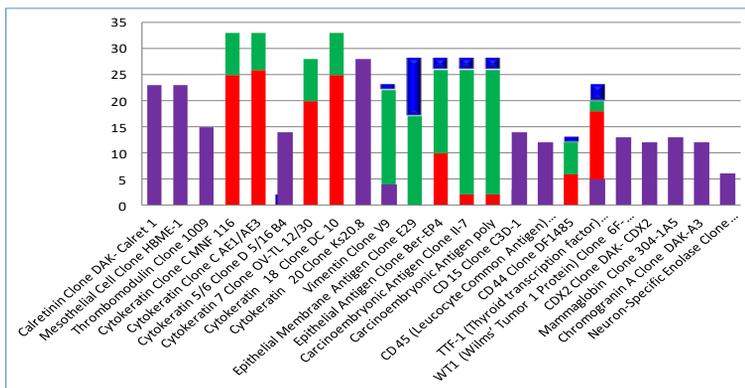
- Особое значение в практической работе имеет опыт врача-цитолога, а также теоретическая подготовка исследователя.
- Важным условием для уверенных цитологических заключений о наличии злокачественных опухолей легкого является использование «второго», а иногда «третьего» и «четвертого» мнения о гистогенетической принадлежности злокачественного процесса.
- Ежедневное сопоставление цитологических и гистологических результатов исследования биологического материала пациентов при диагностике заболеваний легкого с пересмотром данных препаратов.
- При расчёте точности цитологического метода с использованием материала, полученного при бронхоскопии, при условии качественного забора материала на исследование, эффективность диагностики по нашим данным составила **99,3 %**

## II. Иммуноцитохимические исследования при раке легкого

- Наиболее сложно установить гистотип клеток опухоли при метастазе рака легкого в плевральную полость.
- Доли правильной диагностики больных при метастазе аденогенного рака легкого в плевральной жидкости составляют 38,0 %, клеточные признаки статистически не значимы, убедительных специфических критериев принадлежности к раку легкого по данным только световой микроскопии (по данным дискриминантного анализа), не обнаружено.
- Для уточнения органной принадлежности опухоли у пациентов без установленного первичного очага использовали иммуноцитохимический метод.

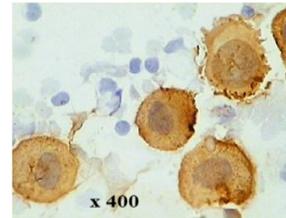
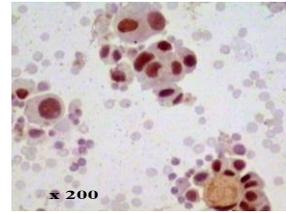


### Оценка иммуноцитохимических реакций в клетках аденогенного рака легкого в плевральной жидкости

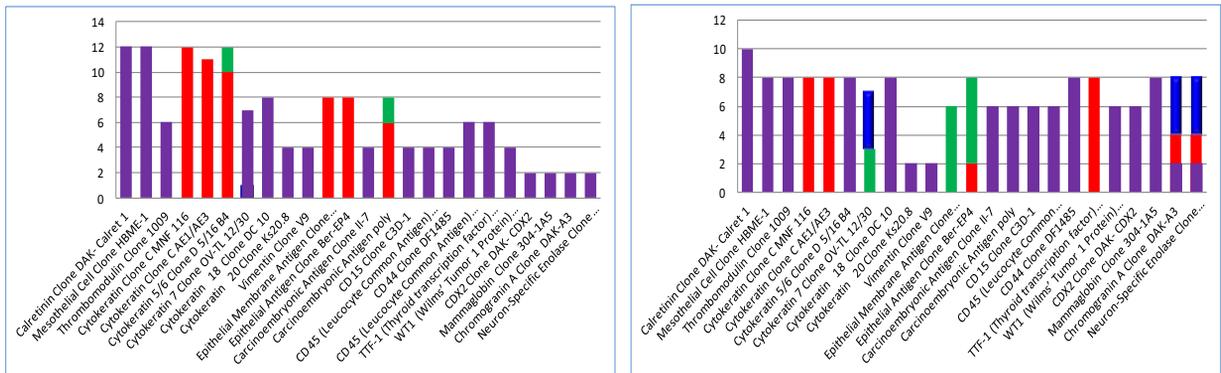


## Иммуноцитохимические исследования при раке легкого

- При иммуноцитохимическом исследовании использование TTF-1 и Napsin A позволило установить принадлежность клеток опухоли к аденогенному раку легкого у 36 больных.
- Иммуноцитохимические исследования повысили точность диагностики метастаза аденогенного рака легкого в плевральной жидкости (по данным дискриминантного анализа) до **86,5 %**.
- 20-25 % первичных аденогенных раков легких негативны для TTF-1. Совместное использование антител TTF-1 и Napsin A является высокоспецифичным для этой формы рака легкого.



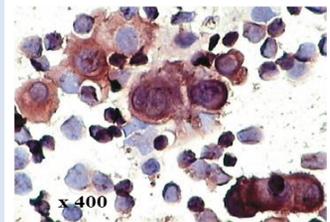
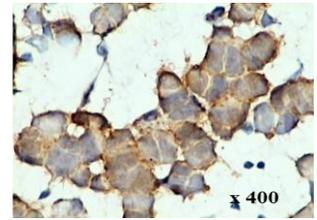
## Оценка иммуноцитохимических реакций в клетках плоскоклеточного и мелкоклеточного рака легкого в плевральной жидкости



- окрашивание выраженное, 3+,
- окрашивание умеренное, 2+,
- окрашивание слабое, 1+,
- негативное окрашивание, 0

## Иммуноцитохимические исследования при раке легкого

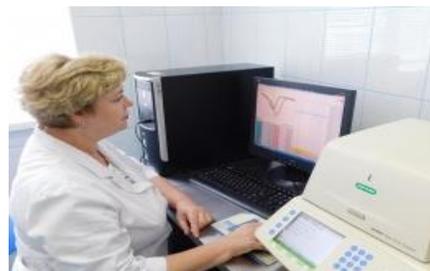
- Уточняющие иммуноцитохимические реакции использовали при дифференциальной диагностике мелкоклеточного рака в плевральной жидкости в трех наблюдениях и плоскоклеточного – в одном.
- Для мелкоклеточного рака легкого наиболее значимы иммуноцитохимические реакции с ТТФ-1, СК 7, хромогранин А, нейрон-специфической энолазой.
- Иммуноцитохимические исследования позволили повысить точность диагностики мелкоклеточного рака легкого (по данным дискриминантного анализа) до **87,6 %**, которая при световой микроскопии составляла 80 %.
- Для плоскоклеточного рака лёгкого значимы иммуноцитохимические реакции на СК5/6 и р63. Точность диагностики плоскоклеточного рака легкого в плевральной жидкости при иммуноцитохимических исследованиях (по данным дискриминантного анализа) составила **96 %** (световая микроскопия – 86,1 %)



## III. Молекулярно-генетические исследования при аденогенном раке легкого

Для молекулярно-генетических исследований использовали цитологические образцы, полученные при:

- бронхоскопии (n=52),
- из мокроты (n=1),
- плевральной жидкости (n=7) и
- лимфатических узлов (n=2).



## Молекулярно-генетические исследования при аденогенном раке легкого



- При проведении молекулярно-генетических исследований изучали статус гена *EGFR* у пациентов с цитологическим заключением «аденогенный рак лёгкого».
- Цитологический материал с наличием достаточного количества клеток опухоли (не менее 200) являлся полноценным материалом для молекулярно-генетических исследований.

Мутации гена *EGFR* обнаружены в 7 (11,3 %) из шестидесяти двух наблюдений, в числе которых выявлена точечная мутация L858R (3 наблюдения) и делеции 19 экзона (4 наблюдения).

## Выводы:

- Цитологическое исследование при диагностике карциномы легкого в специализированном онкологическом учреждении занимает **важное** место в работе ЛПУ.
- Цитологическая верификация карциномы легкого позволяет установить точный диагноз (**до 100 %**), с определением гистотипа в **89,2 %**.
- Расхождения в определении гистотипа опухоли в цитологическом и гистологическом заключениях отмечаются менее чем в **1 %** случаев.
- Необходимость применения иммуноцитохимических исследований возникает, прежде всего, при метастазах рака легкого в плевру.
- Иммуноцитохимические исследования повышают точность диагностики метастазов рака легкого в плевру с указанием гистотипа опухоли до **87-96 %**.

## **Выводы:**

- Цитологический материал **является полноценным материалом** для проведения молекулярной диагностики, позволяет установить точный диагноз для выбора персонализированного лечения.
- Использование цитологического материала для поиска соматических мутаций оправдано для пациентов с местно-распространенным или диссеминированным процессом, у которых цитологический материал является единственно доступным морфологическим материалом для исследования.
- Мутации гена *EGFR* обнаружены в **11,3 %** наблюдений, в числе которых выявлена точечная мутация L858R (3 наблюдения) и делеции в 19 экзоне (4 наблюдения).

**Благодарю за  
внимание!**

