

19 ноября 2021 года

## Цитологическая диагностика опухолей легкого

Григорук Ольга Григорьевна



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

Научно-практическая конференция  
**РАК ЛЕГКОГО**  
г. Москва

Рак лёгкого

Рак лёгкого (РЛ) – это одно из самых распространенных злокачественных новообразований в мире

- В 2020 году в мировой статистике зарегистрировано 2,2 миллиона новых случаев этого заболевания, умерло же от этого заболевания 1,8 миллиона человек (A Cancer Journal for Clinicians, 2021).
- Впервые рак лёгкого уступил первенство раку молочной железы (2,258 тыс.).
- В России рак лёгкого входит в тройку самых распространенных заболеваний, с которыми сталкиваются россияне в своем окружении (24%), наряду с раком молочной железы (33%) и раком желудка (25%).
- Отмечается тенденция к снижению заболеваемости РЛ В России: «грубый» показатель -0,69 ежегодно, и -6,64 в за 10 лет.

 ACS JOURNALS

CA: A Cancer Journal for Clinicians 

ARTICLE | Free Access |  
Cancer statistics, 2020

- Снижение заболеваемости и смертности при раке легкого обусловлено в большей степени ежегодным сокращением потребления табака и улучшением диагностических процедур.

## Диагностика

### Методы диагностики рака лёгкого

- Жалобы больного и анамнез
- Физикальное обследование (наружный осмотр, пальпация, перкуссия, аускультация)
- Лучевая диагностика (рентгенография, КТ, МРТ, ПЭТ)
- Эндоскопическая диагностика (бронхоскопия, медиастиноскопия, торакоскопия)
- Цитологическая диагностика
- Биопсия и морфологическая диагностика



[http://www.oncology.ru/specialist/library/lung\\_cancer/diagnostics](http://www.oncology.ru/specialist/library/lung_cancer/diagnostics)



<https://oncology-spb.ru/uslugi/diagnostika>



Врач-цитолог КГБУЗ АКОЛД Сигитова Е.С.

Своевременная диагностика рака легкого – серьезная и сложная задача для клиницистов. Заболевание, которое является одной из основных причин смертности во всем мире, в подавляющем большинстве случаев диагностируется на поздних стадиях, что сопряжено с неблагоприятным прогнозом и высокой летальностью.



### 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.**

## Цитологическая диагностика

### Возможности использования малого диагностического материала при диагностике заболеваний легкого

- 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.
- Точная диагностика заболеваний легкого на основе цитологического материала возможна при использовании не только световой микроскопии, но и применении цитохимических, иммуноцитохимических и молекулярно-генетических исследований.

## Цитологическая диагностика

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



<https://ru.depositphotos.com/stock-photos>

- Результативность цитологической диагностики высока и составляет 89,4 – 100%. (Шапиро Н.А., 2005; Eloubeidi M.A, 2005; Gia Khanh Nguyen, 2008; Савостикова М.В. 2015; Григорук О.Г., 2017).
- 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; Григорук О.Г., 2017).
- 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).

## Цитологическая диагностика

## 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.**

## V классификация опухолей легкого ВОЗ

## 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. 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

Система Папаниколау для цитологических заключений опухолей  
легких, 2019г.

Категория	Пояснение
I. Недостаточный и / или не репрезентативный клеточный материал для диагностики	<ul style="list-style-type: none"> <li>- бесклеточный материал</li> <li>- артефициально поврежденный материал</li> <li>- клетки не принадлежащие очагу (транзиторные)</li> <li>- при пункции лимфатического узла – материал, содержащий только кровь</li> <li>- доброкачественный респираторный эпителий при наличии подтвержденного методами визуализации очага</li> </ul>
II. Доброкачественный процесс	<ul style="list-style-type: none"> <li>- доброкачественные воспалительные /реактивные процессы</li> <li>- гиперплазия и реактивные изменения в лимфатических узлах</li> </ul>
III. Атипия неопределенного значения	<ul style="list-style-type: none"> <li>- респираторный или метapлазированный эпителий при доброкачественном процессе с наличием некоторой атипии, однако ее недостаточно для подозрения на малигнизацию</li> <li>- скудный клеточный состав при подозрении на доброкачественный процесс или процесс с неопределенным потенциалом</li> </ul>
IV. 1. Доброкачественные опухоли 2. Новообразования с неопределенным злокачественным потенциалом	<p>1. легочная гамартома - зернисто-клеточная опухоль - плоскоклеточная папиллома</p> <p>2. эпителиоидная гемангиоэндотелиома - сахарная опухоль легкого - склерозирующая пневмоцистома - первичная легочная менингиома - гистиоцитоз из клеток Лангерганса - солитарная фиброзная опухоль - воспалительная миофибробластическая опухоль - миоэпителиальные новообразования</p>
V. Подозрение на малигнизацию	атиличные 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

## Цель исследования

Цитологическая оценка биологического материала при заболеваниях легкого имеет важную роль как в первоначальной диагностике пациентов с симптомами карциномы, так и при контроле лечения и в последующем наблюдении пациентов.

**Цель  
работы:**

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.
- **Еженедельно проводилось сопоставление цитологических и гистологических результатов исследования биологического материала пациентов при диагностике заболеваний легкого.**

### I. Первым этапом работы была световая микроскопия



I. Препараты окрашивали по методу Паппенгейма и Паппаниколау.

## Материалы и методы

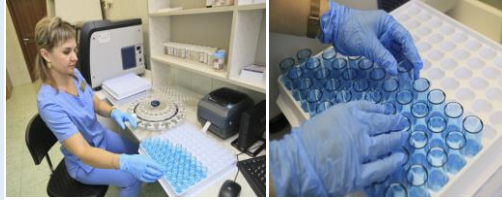
### II. Использование иммуноцитохимических методик

- Окрашенные препараты служили контролем наличия необходимого количества опухолевых клеток для проведения иммуноцитохимических исследований.
- Применяли стандартный протокол проведения иммуноцитохимических реакций.
- Панель антигенов для иммуноцитохимического исследования включала 28 антител: мезотелиальные, эпителиальные, органоспецифические маркеры, а также маркеры, характерные для иммунокомпетентных клеток.



## Материалы и методы

- Кроме цитоцентрифуги Cytospin-4 в рамках ФП «Борьба с онкологическими заболеваниями» приобретено оборудование для приготовления жидкостных препаратов ThinPrep (США).
- Оборудование используется также для приготовления образцов для проведения иммуноцитохимических исследований выпотных жидкостей.

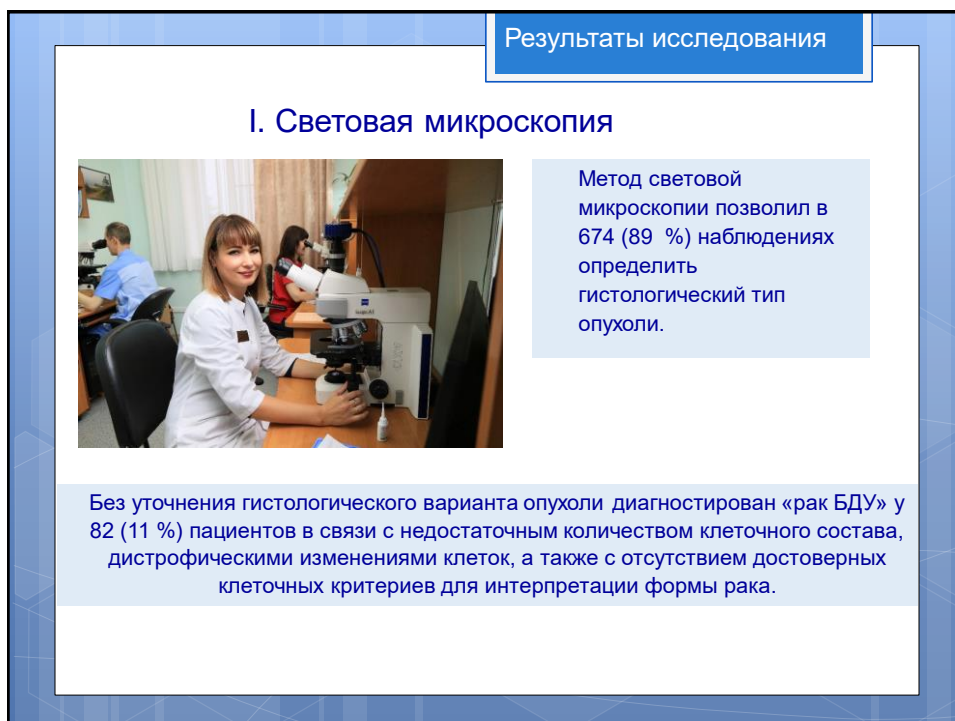


## Материалы и методы

## III. Использование молекулярно-генетических методик

- 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 флуориметрическим 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 аллель-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 ex.(G719X); 29 del19 ex.; 20ex. (T790M, S768I, 5 ins); 21 ex.(L861Q и L858R (2573TG>G, 2573\_2574TG>GT)).

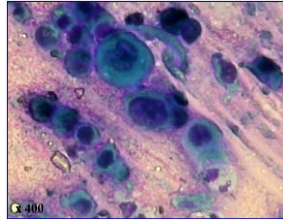




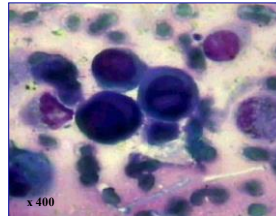


## Плоскоклеточный рак

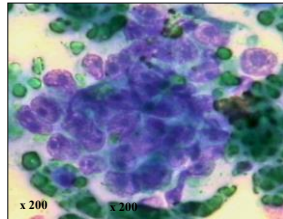
Плоскоклеточный рак легкого диагностирован у **357 (53 %)** больных



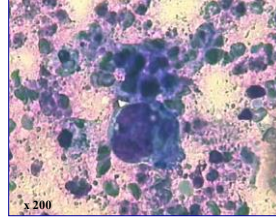
мокрота



ТТП



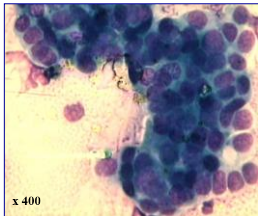
при бронхоскопическом исследовании



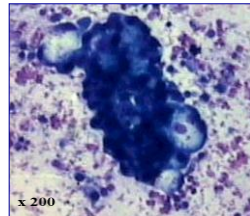
Метастаз в лимфатический узел

## Аденогенный рак

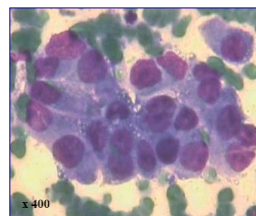
Аденогенный рак легкого диагностирован в **148 (24 %)** наблюдениях



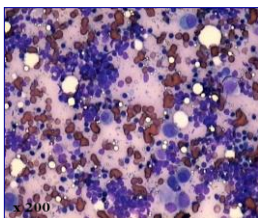
при бронхоскопическом исследовании



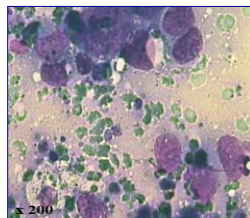
мокрота



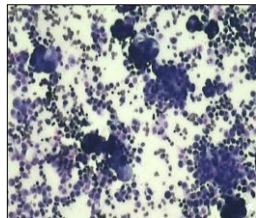
ТТП



Метастаз в лимфатический узел



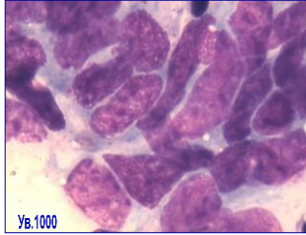
Метастаз в печень



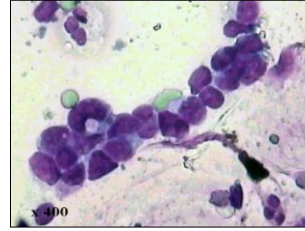
плевральная жидкость

## Мелкоклеточный рак

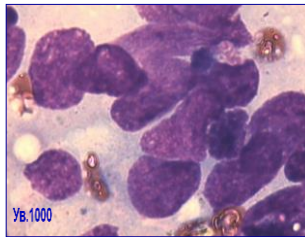
Мелкоклеточный рак легкого диагностирован у 157 (23 %) пациентов



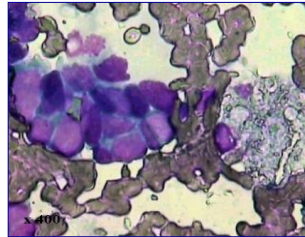
при бронхоскопическом исследовании



мокрота



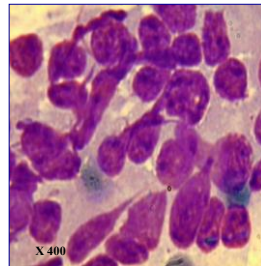
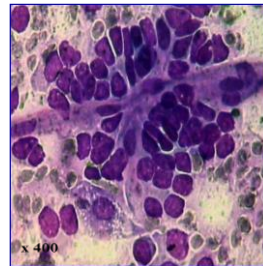
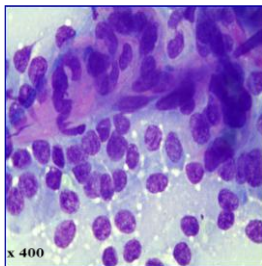
Метастаз в лимфатический узел



ТТ1

## Другие опухоли

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



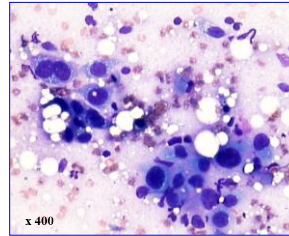
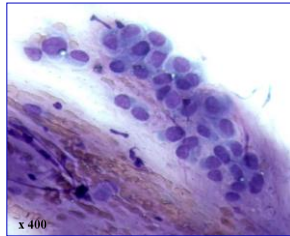
при бронхоскопическом исследовании

## Сопоставление с окончательным диагнозом

### 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.



## Точность метода

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.

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

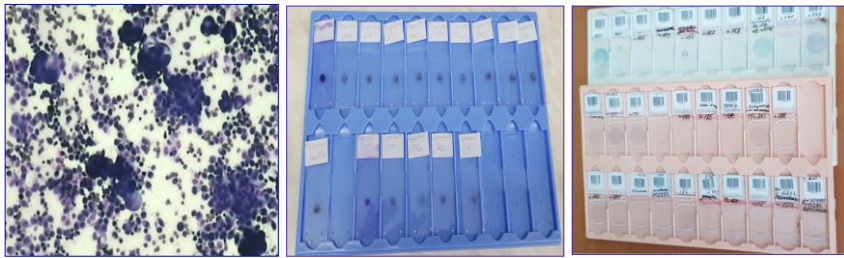
TP – истинно положительные результаты  
TN – истинно отрицательные результаты  
D' – пациенты с наличием признака  
D – пациенты с отсутствием признака

- 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 часть исследования

## II. Иммуноцитохимические исследования при раке лёгкого

- Иммуноцитохимические исследования проведены при диагностике плеврального выпота 49 пациента с подозрением на рак лёгкого, в трёх (6,1 %) случаях из них исследование было неудачным. Причиной неудач было нарушение проведения протокола реакции и недостаточное количество клеток опухоли в жидкости.
- Аденогенный рак лёгкого является наиболее частым метастатическим поражением плевры.
- Отсутствия специфических признаков при световой микроскопии, утвердительно говорить о принадлежности клеток аденогенного рака к принадлежности к раку легкого без проведения иммуноцитохимических исследований невозможно.



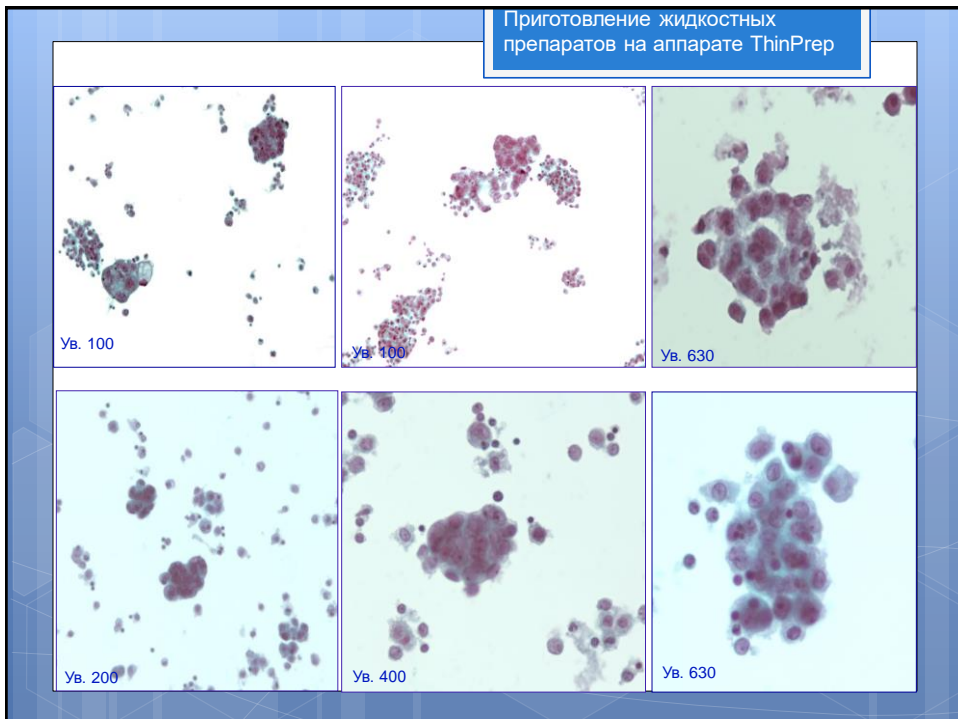
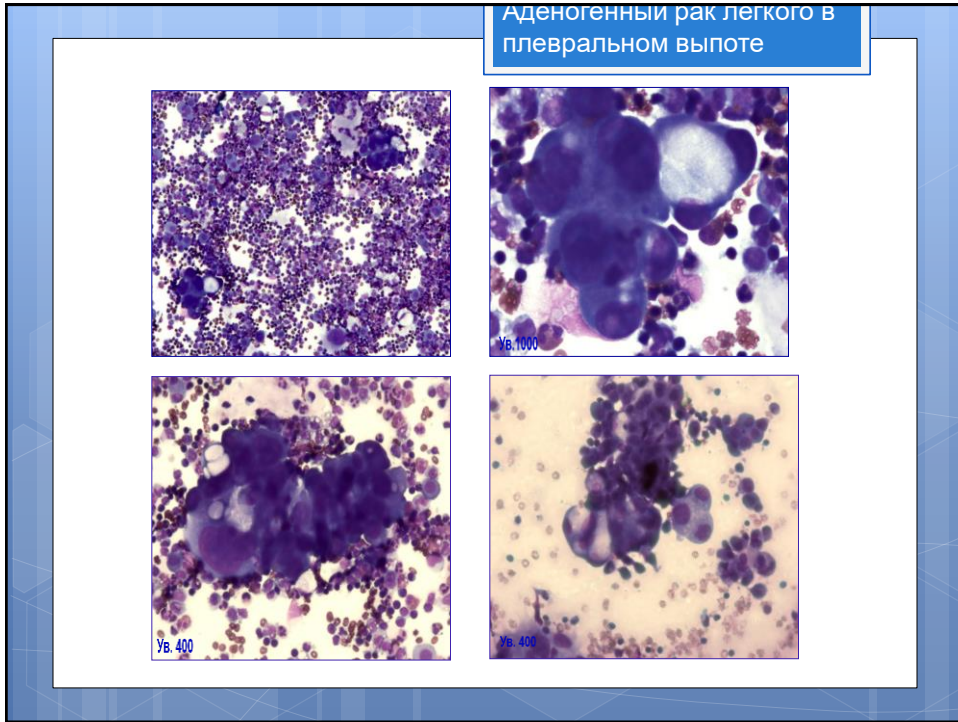
### Иммуноцитохимические исследования

#### Цитологический поиск истины

- Для поиска метастатического поражения плевры необходимо, прежде всего, исключить первичную опухоль – мезотелиому, используя все существующие в настоящее время диагностические возможности.
- Только при исключении мезотелиомы начинается диагностический поиск характеристики предполагаемого первичного образования в карциноматозном плевральном выпоте.
- При дифференциальной диагностике метастаза аденогенного рака лёгкого и эпителиоидной мезотелиомы в плевральной жидкости, согласно проведённым исследованиям, рекомендуем следующую панель:
  - 1) для аденогенного рака лёгкого – калретинин (-), мезотелин (-), тромбомодулин (-), CK5/6 (-), эпителиальный антиген (2+), CEA (2+, 1+), TTF-1 (3+, 2+, 1+), WT1 (-);
  - 2) для эпителиоидной мезотелиомы – калретинин (3+), мезотелин (3+), тромбомодулин (3+), CK5/6(3+), эпителиальный антиген (-), CEAmono (-), TTF-1 (-), WT1 (3+).

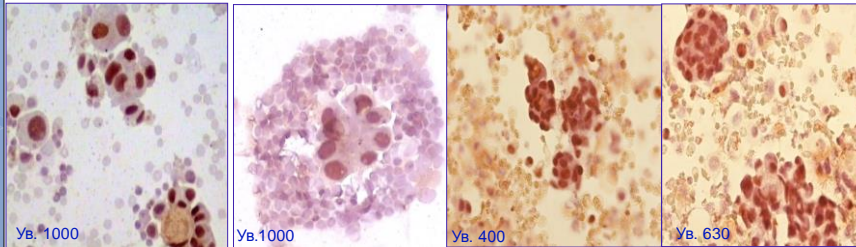


<https://www.chitalnaya.ru/work/1251029/>



### Иммуноцитохимические исследования при раке лёгкого

- Основоплагающими антителами для установления принадлежности метастаза в плевру аденогенного рака легкого являлась позитивная реакция на маркер TTF-1 и Napsin A.
- Использование существующего алгоритма диагностики позволило обнаружить гиперэкспрессию маркеров TTF-1 и Napsin A у 42 из 48 (87,5 %) пациентов, что позволило установить принадлежность клеток к аденогенному раку лёгкого.
- По литературным данным известно, что около 20 % первичных аденогенных раков легких негативны для TTF-1 (Stenhouse G.,2004; Ye J., 2011).



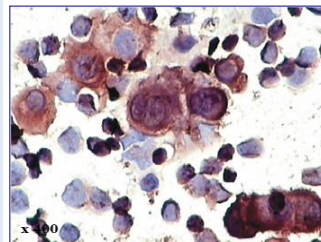
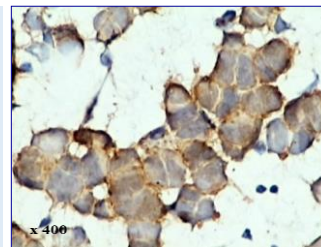
Препараты изготовлены на центрифуге Cytospin-4

Препараты изготовлены на аппарате ThinPrep

Позитивная ядерная реакция на маркер Thyroid transcription factor-1 Clone 8G7G3/1. Использование полимерной системы иммунодетекции.

### Иммуноцитохимические исследования при раке лёгкого

- 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 TTF-1, СК 7, хромогранином А, нейрон-специфической энolahой.
- 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 **96,2 %** (световая микроскопия – 86,1 %)



x 400

## III часть исследования

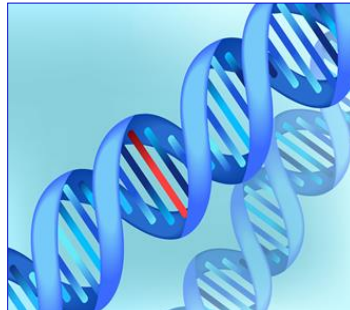
## III. Молекулярно-генетические исследования при аденогенном раке лёгкого

- 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 лёгкого

- 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 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.
- Использование жидкостных методик играет ведущую роль для проведения иммуноцитохимического метода при диагностике пациентов с плевральным выпотом.
- Иммуноцитохимические исследования повышают точность диагностики метастазов рака легкого в плевру с указанием гистотипа опухоли до 87-96,2 %.
- 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!



Озеро Светлое (Лебединое) в Алтайском крае