

На правах рукописи

ГОКАДЗЕ НАДЕЖДА НЕСТОРОВНА

**ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ МАРКЕРОВ p53, p16, WT1
В АСПИРАЦИОННОМ МАТЕРИАЛЕ ИЗ ПОЛОСТИ МАТКИ
У БОЛЬНЫХ СЕРОЗНЫМ РАКОМ ЯИЧНИКОВ**

14.01.12 – Онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2021 г.

Работа выполнена на кафедре онкологии факультета дополнительного профессионального образования федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Жордания Кирилл Иосифович

Официальные оппоненты:

Берлев Игорь Викторович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий хирургическим онкогинекологическим отделением федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Кедрова Анна Генриховна, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры акушерства и гинекологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Институт повышения квалификации Федерального медико-биологического агентства».

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « 18 » ноября 2021 года в 13-00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01 (Д 001.017.01), созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24 и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан « ___ » _____ 2021 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинский наук

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Рак яичников (РЯ) — группа морфологически гетерогенных заболеваний, наибольшая часть из которых (80–85%) представлена серозными формами. Согласно данным отечественной статистики за 2019 год в РФ всего на учете по РЯ состояло 115 556 женщин, из них с впервые установленным диагнозом — 12 466 пациенток; летальность на 1-м году жизни с момента установления диагноза составила 19,4%, что в свою очередь свидетельствует о том, что в течение 1-го года после установления диагноза погибает каждая 5-я больная [Каприн, Старинский, Петрова, 2019]. Столь неблагоприятные показатели свидетельствуют о том, что своевременная диагностика РЯ остается одной из ключевых проблем своевременного лечения этой категории больных. Недостаточное понимание этиологии и патогенеза РЯ, является одной из главных причин отсутствия скрининговых методов диагностики заболевания. Существующие методы диагностики РЯ характеризуются низкой чувствительностью и специфичностью: рутинное определение сывороточных уровней СА-125 и HE4 в комбинации с ультразвуковым исследованием (УЗИ) органов малого таза продолжают оставаться основными методами диагностики опухолей яичников, однако в реальной клинической практике не дают исчерпывающую информацию о характере опухолевого процесса [Berchuck, Havrilesky, Kauff, 2017; Menon, Gentry-Maharaj, Hallett et al., 2009; Pavlik, 2016; Pinsky, Yu, Kramer et al., 2016]. Все это подчеркивает необходимость более детального изучения патогенеза РЯ.

В свете современной дуалистической модели овариального канцерогенеза, согласно которой СКЯ обоих типов имеют экстраовариальное происхождение, нами было выдвинуто предположение, что исследование клеточного состава содержимого полости матки может иметь определённое значение в диагностике серозных карцином яичников. Несмотря на то, что первые работы по изучению содержимого из полости матки в диагностике РЯ появились более 20 лет назад, к настоящему времени отсутствуют единые алгоритмы, сочетающие в себе как высокую диагностическую информативность, так и возможность их внедрения в клиническую практику на уровне амбулаторно-поликлинического звена здравоохранения. Большинство зарубежных работ по изучению смывов и аспиратов из полости матки основаны на проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования генов — исследованиях,

позволяющих идентифицировать конкретные гены и мутации, а также их комбинации, лежащие в основе овариального канцерогенеза. Однако эти методы доступны далеко не во всех медицинских учреждениях, что существенно затрудняет их широкое внедрение в повседневную практику. Данная работа посвящена изучению возможностей иммуноцитохимического исследования экспрессии маркеров p53, p16, WT1 в клеточном содержимом из полости матки в диагностике серозных карцином яичников, а также дифференциальной диагностике злокачественных и доброкачественных опухолей яичников. Данный неинвазивный метод может служить перспективным направлением диагностики серозного рака яичников в амбулаторных условиях, что, бесспорно, подтверждает актуальность темы настоящего диссертационного исследования.

Цель исследования

Повышение эффективности диагностики серозного рака яичников на основании иммуноцитохимического анализа аспирационного материала из полости матки.

Задачи исследования

1. Оптимизировать методику аспирации содержимого полости матки у больных серозного рака яичников III–IV стадий.
2. Определить экспрессию маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки у пациенток с серозным раком яичников III–IV стадий, с доброкачественными опухолями яичников, метастатическим поражением яичников и практически здоровых женщин (контрольная группа).
3. Оценить диагностическую значимость маркеров p53, p16, WT1, в аспирационном материале из полости матки у больных серозным раком яичников III–IV стадии.
4. Оптимизировать алгоритм определения экспрессии маркеров p53, p16, WT1, в аспирационном материале из полости матки у больных серозным раком яичников III–IV стадий.
5. Оценить возможности применения ИЦХ метода исследования аспирационного материала из полости матки на маркеры p53, p16, WT1 в дифференциальной диагностике между серозным раком III–IV стадии, метастатическим поражением и доброкачественными опухолями яичников, а также между high и low-grade подтипов серозных карцином.

Методология и методы и исследования

Аспирация клеток из полости матки производилась с помощью двухканального силиконового катетера и физиологического раствора, для цитологического исследования полученного материала и проведения ИЦХ реакций заготовлены цитоспиновые многослойные препараты системы Cytospin — серия многослойных цитопрепаратов на центрифуге Cytospin — 3 препарата в режиме 1000 g/мин в течение 5 минут. Два мазка окрашивали по Лейшману, на 3-х проводили ИЦХ исследование с моноклональными антителами (МКАТ) к p53, p16, WT1. ИЦХ исследование проводили на иммуногистостейнере Ventana (BenchMark ULTRA). Для ИЦХ исследования были использованы МКАТ фирмы DAKO: к p53 (клон DO-7, разведение 1:25 – 1:50), p16 (клон Е6Н4, разведение 1:25 – 1:50), WT1 (клон 6F-H2, разведение 1:75 – 1:150). Обработка результатов исследований проведена современными статистическими методами.

Научная новизна

В рамках настоящей научной работы впервые оптимизирована методика аспирации содержимого полости матки в результате сбора биологического материала у больных исследуемых групп (больные серозным раком яичников III– IV стадий, доброкачественными опухолями яичников, метастатическим поражением яичников) и контрольной группы (здоровые женщины). Впервые материал исследован цитологическим методом, после чего в нем определена экспрессия маркеров p53, p16, WT1 иммуноцитохимическим методом и оценена диагностическая значимость вышеперечисленных маркеров у больных исследуемых групп. В данной работе оптимизирован алгоритм определения экспрессии маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки для диагностики серозных карцином яичников III–IV стадий. Впервые в отечественной практике на большом клиническом материале разработан подход, на основании которого на этапе предоперационного обследования представляется возможным подтвердить диагноз рака, удостовериться в его серозном типе, а также судить о подтипе серозного рака (high- или low-grade) в каждом конкретном клиническом наблюдении.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты иллюстрируют важность изучения клеточных маркеров в диагностике серозного рака яичников, а также наиболее оптимального метода их

оценки, который может быть широко внедрен в клиническую практику для определения гистологического подтипа опухоли и выбора наиболее рациональной тактики лечения этой категории больных. В ходе данного диссертационного исследования разработан и усовершенствован современный подход к диагностике серозного рака яичников, основанный на иммуноцитохимическом исследовании экспрессии маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки, оценена возможность применения данного метода в дифференциальной диагностике опухолей яичников, в том числе и подтипов серозного рака (high- и low-grade) на основании оценки вышеперечисленных клеточных маркеров.

Личный вклад

Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, анализе и обобщении полученных результатов. План диссертации, ее основные идеи и содержание разработаны совместно с научными руководителями, на основе многолетних целенаправленных исследований. Автором самостоятельно обоснованы актуальность темы диссертации, цель, задачи и этапы научного исследования. Автором лично проведена систематизация и статистическая обработка полученных результатов. При участии и лично автором была проведена подготовка основных публикаций по выполненной работе на тему диссертации.

Соответствие паспорту научной специальности

Основные положения и выводы диссертационной работы соответствуют искомой специальности 14.01.12 – Онкология и области исследований п.2. «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.) и п.3. «Разработка и совершенствование программ скрининга и ранней диагностики».

Положения, выносимые на защиту

1. Установлена высокая специфичность иммуноцитохимического метода исследования экспрессии маркеров p53, p16 и WT1 (98%, 94%, 99% и 98%) в аспирационном материале из полости матки больных III–IV стадиями серозного рака яичников обоих гистологических подтипов (high-grade, low-grade) при невысокой

чувствительности и их комбинации (47,8%, 38%, 52,1% и 63,4%), что позволяет использовать метод в качестве дополнительного, но не в качестве скрининга.

2. Показатели диагностической информативности комбинации маркеров p53, p16, WT1 и их комбинации превышают таковые, чем каждого маркера в частности.

3. Оценка экспрессии маркеров p53, p16, WT1 и их комбинации в аспирационном материале из полости матки иммуноцитохимическим методом может быть использована в качестве вспомогательного метода для проведения дифференциальной диагностики между high- и low-grade серозными карциномами яичников на этапе планирования лечения.

Внедрение результатов исследования

Основные положения диссертационной работы используются в практической работе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, а также используются в процессе лекционного и практического обучения кафедры онкологии ФДПО ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на следующих научно-практических мероприятиях:

- на IV Всероссийской Конференции по молекулярной онкологии (Москва, 17–19 декабря 2018 года);
- на XIII Международном конгрессе по репродуктивной медицине ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (Москва, 21–23 января 2019 года);
- на ежегодном съезде Международного Сообщества Гинекологической Онкологии 2020 года (International Gynecologic Cancer Society 2020 Annual Global Meeting, September 10-13).

Апробация

Апробация диссертации состоялась на совместной научной конференции с участием: кафедры онкологии факультета дополнительного профессионального образования ФГБОУ «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, онкологического отделения хирургических методов лечения №8 (онкогинекологии), лаборатории клинической цитологии, онкологического отделения радиохирургии, онкологического отделения хирургических методов лечения №2 (диагностики

опухолей) отдела общей онкологии НИИ клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова, состоявшейся 20 октября 2020 года.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 научных публикаций, в том числе, 6 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Объем и структура работы

Диссертационная работа состоит из введения, 3 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований), заключения, выводов и списка используемой литературы, содержащего 126 источников, из которых 113 зарубежных авторов. Работа изложена на 114 страницах машинописного текста, иллюстрирована 7 таблицами и 27 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В рамках диссертационной работы проведено проспективное исследование, на первом этапе которого обследовано 272 пациентки, обратившихся в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по поводу опухолей яичников в период с 2013г. по 2019г. В сравнительном аспекте анализированы результаты исследований в 4 группах пациенток. В группу I (основная) были включены: 71 пациентка с серозным раком яичников III–IV стадии, прошедшие на первом этапе хирургическое лечение. При анализе морфологического строения опухоли после проведенного хирургического лечения больные разделились следующим образом: подгруппа с серозными high-grade карциномами — 51 пациентка; low-grade карциномами — 20 пациенток. В группу II вошли 50 пациенток с метастатическим поражением яичников из другого первичного очага. Из них: у 15 (30%) больных диагностирован рак молочной железы, у 9 (18%) рак толстой кишки, у 8 (16%) рак поджелудочной железы, у 6 (12%) рак желудка и у 2 (4%) рак почки. Группу III составили 50 пациенток с доброкачественными опухолями яичников, из которых: 15 (30%) больных с серозными папиллярными цистаденомами, 13 (26%) муцинозными цистаденомами, 8 (16%) зрелыми тератомами, 8 (16%) текомаами, 6 (12%) - эндометриоидными цистоаденомами. В группу IV (контрольная) были

включены 50 практически здоровых женщин-добровольцев, которым была выполнена диагностическая аспирация содержимого полости матки.

Критерии включения пациенток в исследование были следующими:

- возраст старше наступления менархе;
- наличие родов в анамнезе;
- наличие объемных (одно- или двусторонних) образований в области придатков матки по данным гинекологического осмотра и/или подтвержденного инструментальными методами обследования (УЗИ органов малого таза, КТ органов брюшной полости с контрастным усилением, МРТ органов малого таза с контрастным усилением);
- давшие согласие на исследование.

У всех пациенток с опухолями яичников диагноз заболевания был в дальнейшем подтвержден морфологически.

Критерии исключения пациентов из исследования были следующими:

- отсутствие возможности проведения хирургического лечения на 1-м этапе и морфологического подтверждения диагноза;
- обнаружение отличной от серозной (муцинозной, эндометриоидной, светлоклеточной) формы РЯ, неэпителиальных ЗНО придатков и/или рака шейки матки, а также рака эндометрия по результатам морфологического исследования операционного материала;
- неоадьювантная терапия по поводу РЯ в анамнезе;
- наличие в анамнезе экстирпации матки и/или без придатков, двусторонней аднексэктомии;
- атрезия цервикального канала.
- отказ пациентки от проведения аспирации содержимого полости матки.

Стадирование заболевания проводилось в соответствии с классификацией TNM 8-ое изд., FIGO от 2014 года.

Для получения наиболее информативного материала из полости матки методика аспирации образцов клеток из последней была усовершенствована нами с помощью применения двухпросветного центрального венозного катетера REF CV-17702-E фирмы Arrow International Inc., США (Рисунок 1).



Рисунок 1 — Двухпросветный центральный венозный катетер REFVCV-17702-E фирмы Arrow International Inc. (США)

В амбулаторных условиях при визуализации шейки матки в зеркалах после обработки влагалища водным раствором хлоргексидина для удобства манипуляций последняя фиксировалась пулевыми щипцами. Затем через цервикальный канал в полость матки вводился двухпросветный силиконовый катетер, к которому подсоединялись два шприца объемом 20 мл, один из которых был наполнен 0,9% раствором хлорида натрия. После введения катетера в полость матки (что достоверно определялось введением его на глубину до советующей заводской маркировке на его поверхности) производилось медленное введение физиологического раствора из подключенного к катетеру шприца с одномоментной аспирацией полученного материала в пустой. Материал помещали в эппендорф-пробирку с питательной средой и доставляли в лабораторию. Таким образом, в отличие от аспирации содержимого полости матки с применением урологического зонда типа Пайпель, данный метод позволил нам изучить клеточный состав содержимого полости матки, минимизируя содержание в нем форменных элементов крови и пластов клеток эндометрия.

В рамках научной работы проведено 221 цитологическое и 663 ИЦХ исследования образцов аспирационного материала из полости матки. На первом этапе полученный материал подвергался рутинному цитологическому исследованию с целью выявления в образце клеток карциномы, после чего выполнялось ИЦХ исследование на маркеры p53, p16, WT1: были заготовлены цитоспиновые многослойные препараты системы Cytospin — серия многослойных цитопрепаратов на центрифуге Cytospin — 3 в режиме 1000 g/мин в течение 5 минут. Два мазка

окрашивали по Лейшману, на 3-х проводили ИЦХ исследование с моноклональными антителами (МКАТ) к p53, p16, WT1 (Таблица 1).

Таблица 1 — Характеристика МКАТ, использованных для проведения иммуноцитохимического анализа аспирационного материала из полости матки

МКАТ	Клон	Разведение
p53	DO-7	1:25-1:50
p16	E6H4	1:25-1:50
WT1	6F-H2	1:75-1:150

Остальные препараты (6–4) фиксировали в химически чистом ацетоне при температуре +4 – +8 °С и архивировали при –20 °С, предварительно завернув в фольгу. Процедура ИЦХ окрашивания производилась с применением автоматизированной системы BenchMark ULTRA (иммуногистостейнер Ventana). Все препараты докрасивали гематоксилином Майера в течение 30 секунд и заключали в бальзам. Оценка экспрессии маркеров в полученном материале проводилась качественно: ядерная реакция проявлялась разной степенью интенсивности и полнотой коричневого окрашивания ядра. Схема оценки степени выраженности экспрессии того или иного маркера была следующей: отрицательная реакция трактовалась как полное отсутствие или экспрессия антигена менее чем в 5% ядер опухолевых клеток, слабоположительная – при наличии реакции в 6–25% ядер, умеренно положительная в 26–75%, выраженная — более чем в 75% ядер. За положительный результат принята экспрессия маркера с умеренной и выраженной интенсивностью окраски ядра (Таблица 2).

Таблица 2 — Схема оценки ИЦХ реакции с МКАТ к p53, p16, WT1

Результат ИЦХ реакции	Экспрессия маркеров	Количество окрашенных ядер в поле зрения
Отрицательный	Отрицательная	Полное отсутствие окрашенных ядер или окрашивание менее 5% ядер опухолевых клеток
	Слабо положительная	Наличие реакции в 6–25% ядер опухолевых клеток
Положительный	Умеренно положительная	Наличие реакции в 26–75% ядер опухолевых клеток
	Выраженная	Более чем в 75% ядер опухолевых клеток

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты цитологического и иммуноцитохимического исследования аспирационного материала больных серозным раком яичников

При рутинном цитологическом исследовании аспирационного материала из полости матки больных серозным high-grade РЯ единичные клетки соответствующей карциномы или их комплексы были выявлены у 33 пациенток, что составило 64,7% (Рисунок 2). В остальных 28 наблюдениях high-grade карцином клеток рака в аспирационном материале, как и положительных реакций с МКАТ к p53, p16, WT1, выявлено не было. При ИЦХ исследовании в 31 наблюдении (61%) прослеживалась выраженная или умеренная ядерная экспрессия белка p53 (рис. 11), ядерная экспрессия WT1 в 24 из 51 (47%) образцах, ядерная экспрессия p16 в 25 из 51 (49%).

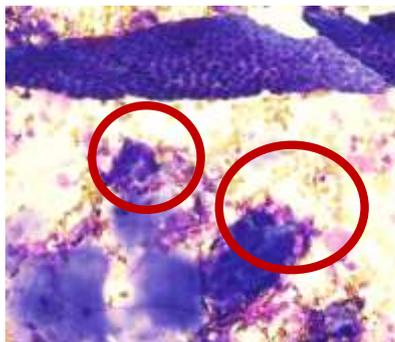


Рисунок 2 — Цитопрепарат аспирационного материала из полости матки пациентки из группы high-grade серозного рака яичников: 1— клетки серозной карциномы яичников, 2 — пласт клеток эндометрия ($\times 200$)

Стоит отметить, что положительная экспрессия p53, p16, WT1 прослеживается у 17 пациенток, в материале которых при световой микроскопии были выявлены железисто-папиллярные комплексы, что составило 33% от их общего количества исследуемых в группе high-grade карцином ($n=51$). Отрицательная реакция всей комбинации маркеров отмечена у 16 пациенток этой группы, что обусловлено в первую очередь отсутствием злокачественных клеток в полученном материале (Рисунок 3).

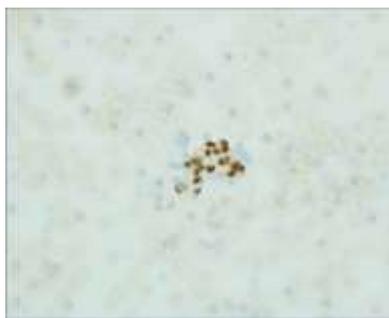


Рисунок 3 — Характерные папиллярные структуры серозного рака high-grade. Ядерная экспрессия p53. Препарат Cytospin. Окраска по Лейшману (×200)

В единичных клетках пролиферирующего эндометрия в образцах аспирационного материала 4-х больных группы high-grade карцином яичников отмечена ядерная экспрессия белка p53 и p16 на фоне отрицательной реакции WT1 и отсутствии морфологических признаков атипии (Рисунок 4). При тщательном морфологическом исследовании операционного материала этих пациенток в эндометрии выявлена сложная гиперплазия без атипии. Таким образом возможно выдвинуть предположение, что положительная экспрессия p53 и p16 в этих наблюдениях может свидетельствовать о проявлении самых ранних молекулярных механизмов малигнизации эпителия эндометрия.

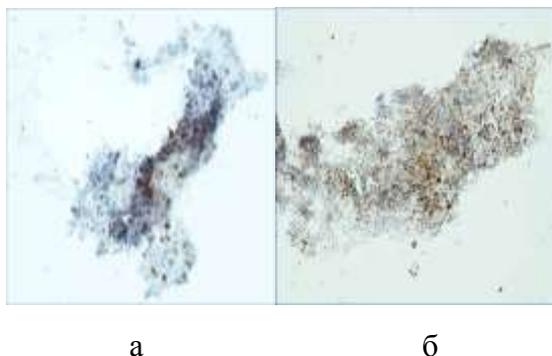


Рисунок 4 — Ядерная экспрессия белка p16 (а) p53 (б) в клетках неизмененного эпителия эндометрия пациентки IV группы (контрольной). Окраска по Лейшману (×200)

Из 20 больных low-grade карциномами у 12 пациенток (60%) при цитологическом исследовании аспирационного материала из полости матки были выявлены единичные клетки карциномы или их комплексы, что подтвердилось и при ИЦХ исследовании полученного материала –выраженная ядерная экспрессия WT1 прослеживалась в этих же 12 образцах, в то время как реакция с МКАТ к белку p53 была слабой или умеренной и наблюдалась лишь в образцах 2-х пациенток. Ядерная экспрессия p16 прослеживается

в образцах 3х больных. В аспирационном материале 8 (40%) больных low-grade карциномами клеток рака выявлено не было (Таблица 3).

Таблица 3 — Сравнительная характеристика экспрессии маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки больных различными гистологическими подтипами серозным раком яичников III–IV стадии

Гистологический подтип серозного рака яичников	Цитологическое исследование образцов		ИЦХ исследование образцов		
	Клетки рака выявлены	Клетки рака не выявлены	p53	p16	WT1
High grade (n=51)	33 (64,7%)	28 (36,3%)	31 (61%)	25 (49%)	24 (47%)
Low grade (n =20)	12 (60%)	8 (40%)	2 (10%)	3 (15%)	12 (60%)
Итого (n=71)	45 (63,4%)	36 (50,7%)	33 (46,5%)	28 (39,4%)	36(25,6%)

Слабая ядерная экспрессия белка p53 в отдельных клетках эндометрия без признаков атипии при отсутствии в исследуемом материале клеток серозной карциномы зафиксировано у 2-х (10%) пациенток группы low-grade карцином. При морфологическом исследовании эндометрия в последнем патологии не выявлено. В 7 (35%) наблюдениях в полученном материале присутствуют комплексы клеток карциномы сосочкового строения с выраженной экспрессией WT1 на фоне отрицательной реакции с МКАТ к p16 (Рисунок 5).

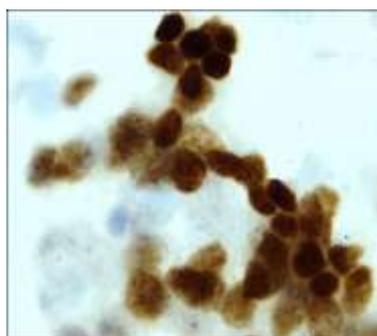


Рисунок 5 — Ядерная экспрессия WT1 в комплексах клеток карциномы, выявленных в аспирационном материале из полости матки больной low-grade серозным раком яичников (x1000)

Экспрессия p53 в этих комплексах не выявлена. Положительная реакция WT1 указывает на принадлежность комплексов клеток рака к серозному типу аденокарцином. У 3-х (15%) больных в аспирационном материале из полости матки выявлены

комплексы клеток рака с выраженной ядерной экспрессией WT1 в сочетании с ядерной экспрессией p16 (WT1+/p16+), что позволяет предположить принадлежность к low-grade подтипу серозных карцином.

Результаты цитологического и иммуноцитохимического исследования аспирационного материала больных с метастатическим поражением яичников, доброкачественными опухолями яичников и больных контрольной группы

В 48 (96%) наблюдениях метастазов в яичниках (карцином кишки, почки, молочной железы, желудка и поджелудочной железы) при цитологическом исследовании аспириатов у больных клеток рака выявлено не было. Только в одном наблюдении у пациентки с метастазом колоректального рака в яичник в аспирате из полости матки выявили клетки аденокарциномы эндометриоидного типа, что также подтвердилось при ИЦХ исследовании выраженной положительной экспрессией белка p53 (Таблица 4).

Таблица 4 — Результаты цитологического и иммуноцитохимического исследования аспирационного материала пациенток с метастатическим поражением яичников

Локализация первичного очага рака	Количество образцов	Цитологическое исследование образцов		ИЦХ исследование образцов		
		Клетки рака выявлены	Клетки рака не выявлены	p53	p16	WT1
Молочная железа	15	-	15 (100%)	-	-	-
Желудок	6	-	6 (100%)	-	-	-
Толстая кишка	9	1 (11%)	8 (89%)	1	-	-
Почка	2	-	2 (100%)	-	-	-
Поджелудочная железа	8	-	8 (100%)	-	-	-
Итого	48			2	-	-

У одной из пациенток с метастазом РМЖ в яичнике, в аспирате из полости матки определялись псевдопапиллярные скопления эпителиальных клеток без выраженных признаков злокачественности, подозрительные в отношении пограничной опухоли яичников. При ИЦХ исследовании отмечалась умеренная положительная реакция белка

p53 в 10% опухолевых клетках и высокий индекс пролиферативной активности Ki67 = 65%.

При классическом цитологическом исследовании аспириатов из полости матки 50 пациенток с доброкачественной патологией яичников атипических клеток в материале не найдено. В двух наблюдениях серозной цистаденомы яичников при ИЦХ анализе выявлена умеренная экспрессия p53 в части клеток эпителия эндометрия, причем в одном из них отмечалась умеренная экспрессия p16 и высокий индекс Ki67=50%, при отсутствии экспрессии WT1.

В группу IV (контрольную) вошли 50 практически здоровых женщин-добровольцев, проходивших профосмотр. При цитологическом исследовании клеточного состава аспириатов из полости матки у всех женщин, не имеющих в анамнезе патологии со стороны гинекологической сферы, клеток рака не было выявлено. Проведено ИЦХ исследование с антителами к антигенам WT1, p53, p16: экспрессия WT1 — отрицательная во всех 50 наблюдениях, положительная ИЦХ реакция с p16 отмечалась в 3 исследованиях, но имела слабо выраженную экспрессию в единичных клетках подтвержденного в дальнейшем гистологически пролиферирующего эндометрия. Экспрессия p53 была отрицательная 49 женщин, и только в одном наблюдении отмечена слабая очаговая экспрессия белка p53 в клетках эпителия эндометрия. В дальнейшем, при динамическом наблюдении в течении нескольких лет, методом аспирационной биопсии гистологически были диагностированы: в 3 наблюдениях — простая железистая гиперплазия эндометрия, в 2 — атипическая гиперплазия, 1 вариант аденомиоза. У остальных 45 обследуемых отмечены варианты физиологического состояния эндометрия.

Анализ показателей диагностической информативности цитологического метода исследования

При оценке эффективности цитологического метода с применением жидкостной цитологии и системы Cytospin для исследования аспирационного материала из полости матки в диагностике серозных карцином яичников, установлено что, чувствительность диагностического подхода не столь высока и составляет 63,3% при высокой специфичности, достигающей 99% (Рисунок 6).

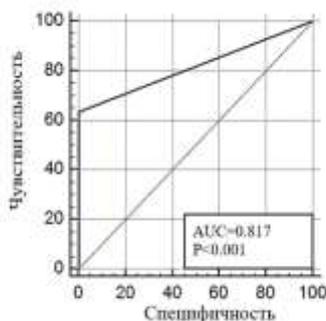


Рисунок 6 — ROC-кривая для цитологического метода, основанного на применении жидкостной цитологии и системы Cytospin для исследования аспирационного материала из полости матки в диагностике серозных карцином яичников

Прогностическая ценность положительного результата при этом так же высока и составляет 99%, в то время как прогностическая ценность отрицательного результата составила 65,8%. Диагностическая точность метода составляет 78,5%. При сравнении группы больных СКЯ (n=71) с группой больных доброкачественными опухолями (n=50), группой больных с метастатическим поражением яичников (n=50) и группой контроля (n=50) установлено, что в обоих случаях цитологический метод исследования аспирационного материала из полости матки может применяться в качестве дополнительного метода для проведения дифференциальной диагностики новообразований яичников: данные ROC-анализа практически идентичны и AUC (area under curve, площадь под кривой ошибок) составляет 0,817.

Анализ результатов ИЦХ метода исследования аспирационного материала из полости матки в диагностике серозных карцином яичников

Оценка экспрессии маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки выполнялась у всех пациенток исследуемых групп, различия в экспрессии являются статистически значимыми ($p < 0,0001$). Сводные данные о показателях диагностической информативности маркеров и их комбинации представлены в таблице 5. Ниже рассмотрим подробнее каждый из них.

Данные об уровне чувствительности ИЦХ исследования экспрессии маркеров и их комбинации в аспирационном материале из полости матки при серозном раке яичников обоих гистологических подтипов представлены на рисунке 7.

Таблица 5 — Показатели диагностической информативности ИЦХ метода исследования маркеров p53, p16, WT1 и их комбинации в диагностике серозных карцином яичников

Показатель	p53	p16	WT1	Комбинация
Чувствительность, %	47,89	38,03	52,11	63,38
Специфичность, %	98,00	94,00	100,00	98,00
Прогностическая ценность положительного результата, %	97,14	90,00	100,0	97,80
Прогностическая ценность отрицательного результата, %	57,0	51,6	59,5	65,3
Диагностическая точность, %	68,60	61,16	71,90	77,69

При сравнении показателей диагностической информативности маркеров и их комбинации для групп больных СКЯ (n=71) и больных с метастатическим поражением яичников (n=50) установлено, что наибольшей чувствительностью обладает комбинация всех 3х маркеров, составляя 63,38%, а также маркер WT1, составляя 52,11%.

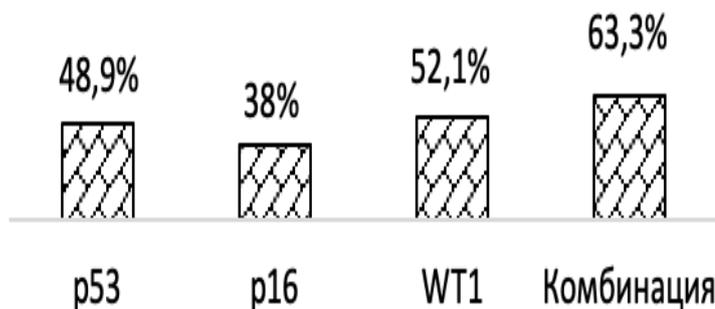


Рисунок 7 — Чувствительность маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки у пациенток с серозным раком яичников III–IV стадии

Рассматривая различия в уровне показателя специфичности исследуемых маркеров и их комбинации нельзя не отметить, что согласно полученным нами данным специфичность маркера WT1 в группе больных серозными карциномами яичников достигает 100% — в образцах аспирационного материала из полости матки всех больных серозным раком яичников, включенных в настоящее исследование не выявлено ни одного ложно-отрицательного результата, то есть наличие экспрессии WT1 клетками

карциномы в аспирате прослеживалось только у пациенток группы серозных карцином обоих гистологических подтипов.

Принимая во внимание, что исследуемый диагностический подход продемонстрировал достаточно высокую специфичность (Рисунок 8), на фоне не столь значительной чувствительности, чтобы рассматриваться в качестве скринингового метода диагностики серозных карцином яичников, наиболее целесообразно его внедрение в клиническую практику в качестве дополнительного, а не основного метода обследования при подозрении на СКЯ, а также учитывая данные логистической регрессии с последующим ROC-анализом для проведения дифференциальной диагностики между и high-grade и low-grade серозными карциномами яичников, первичным серозным раком яичников и метастатическим поражением придатков из другого первичного очага и доброкачественными опухолями яичников.

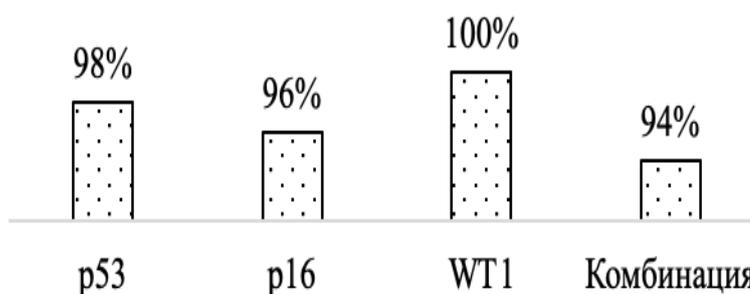


Рисунок 8 — Специфичность маркеров p53, p16, WT1 и их комбинации в аспирационном материале из полости матки пациенток с серозным раком яичников III–IV стадии

На рисунках 9 и 10 представлены обобщенные данные о предсказательной ценности положительного и отрицательного результатов ИЦХ исследования маркеров p53, p16, WT1 и их комбинации в диагностике СКЯ. Согласно полученным нами данным наибольшей предсказательной ценностью положительного результата в группе СКЯ обладает маркер WT1, экспрессия которого во всех образцах, содержащих клетки аденокарциномы, свидетельствует о СКЯ.

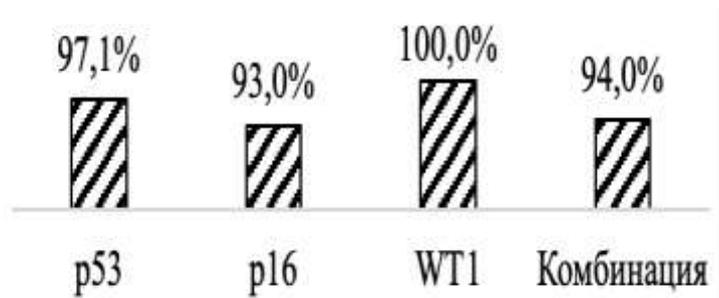


Рисунок 9 — Предсказательная ценность положительного результата экспрессии маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки пациенток с серозным раком яичников III–IV стадии

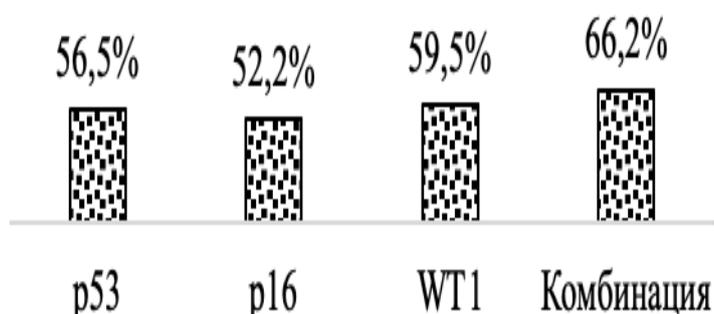


Рисунок 10 — Предсказательная ценность отрицательного результата экспрессии маркеров p53, p16, WT1 и их комбинации в аспирационном материале из полости матки больных серозным раком яичников III–IV стадий

Анализируя сравнительные данные о диагностической точности маркеров p53, p16, WT1 и их комбинации в диагностике СКЯ, представленных на рисунке 11, очевидным становится увеличение показателя при использовании всех трех маркеров по сравнению с каждым из них в отдельности. Наибольшей диагностической точностью обладает маркер WT1: при сравнении результатов ИЦХ исследования группы больных СКЯ (n=71) и с таковыми в контрольной группе установлено, что диагностическая точность последнего составляет 71,9%, в то время как значение этого показателя для маркера p53 составило 68,6%, p16 — 61,16%.

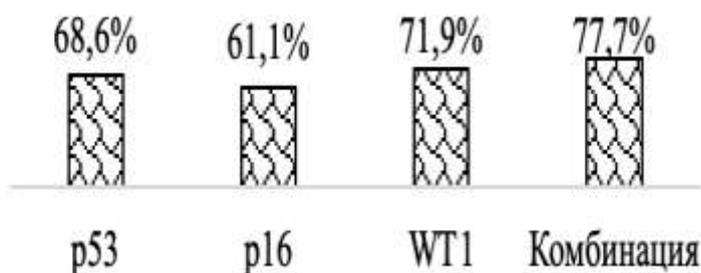


Рисунок 11 — Диагностическая точность экспрессии маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки больных серозным раком яичников III–IV стадии

Обобщая вышеизложенное, становится очевидной необходимость оценки экспрессии маркеров p53, p16, WT1 именно в комбинации, причем на первом этапе ИЦХ исследования аспирата из полости матки при подозрении на СКЯ целесообразно оценить экспрессию WT1, что позволит установить принадлежность атипических клеток к серозному типу карцином, а анализ экспрессии маркеров p53 и p16 в образцах аспириатов больных позволяет предположить принадлежность конкретного наблюдения к подгруппе high-grade или же low-grade подтипов. При построении логистической регрессионной модели с двумя маркерами p53 и p16 было установлено, что диагностическая значимость маркера p16 при отсутствии данных об экспрессии WT1 полностью утрачивается, а значение AUC составляет 0,763 (Рисунок 12а). Формирование выборки больных серозными карциномами яичников с положительным WT1 статусом и последующая оценка экспрессии маркеров p53 и p16 в ней приводит к увеличению AUC до 0,873 (Рисунок 12б).

Оценивая экспрессию маркеров p53 и p16 в аспирационном материале которых выявлены клетки карциномы с положительной ядерной экспрессией WT1, установлено, что использование этих двух маркеров одновременно только в группе испытуемых с положительным WT1-статусом повышает диагностическую чувствительность модели ($p=0,05$).

При этом предсказательная ценность положительного результата составляет 89,3%, а отрицательного — 99%. Из этого следует, что при анализе аспирационного материала из полости матки после установления факта наличия в нем клеток карциномы наиболее целесообразно оценивать экспрессию маркера WT1.

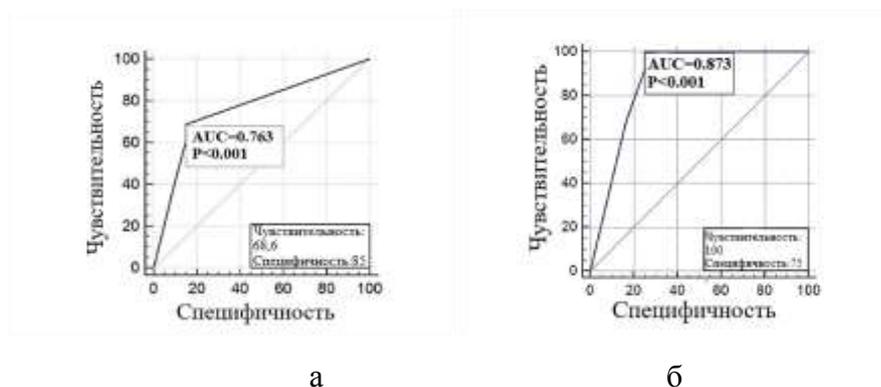


Рисунок 12 — ROC-анализ (выборка больных СКЯ обоих гистологических подтипов): а — при оценке экспрессии p53 и p16 у пациенток СКЯ; б — при оценке экспрессии p53 и p16 у пациенток с СКЯ с положительной экспрессией WT1

Анализ диагностической информативности ИЦХ исследования аспирационного материала из полости матки на маркеры p53, p16, WT1

и их комбинации в дифференциальной диагностике опухолей яичников

При расчете показателей диагностической информативности исследуемых маркеров в подгруппе больных СКЯ high-grade подтипа (n=51) при сравнении с группой low-grade (n=20), установлено, что диагностическая чувствительность всей комбинации маркеров в качестве метода дифференциальной диагностики составляет 64,7% при специфичности равной 85%. Анализ показателей этой подгруппы пациентов в сравнении с таковыми в подгруппе больных low-grade карциномами (n=20), продемонстрировал статистическую значимость различий между ними ($p < 0,0001$). Сравнительные данные чувствительности и специфичности маркеров и их комбинации в диагностике high-grade карцином яичников представлены на рисунке 13.

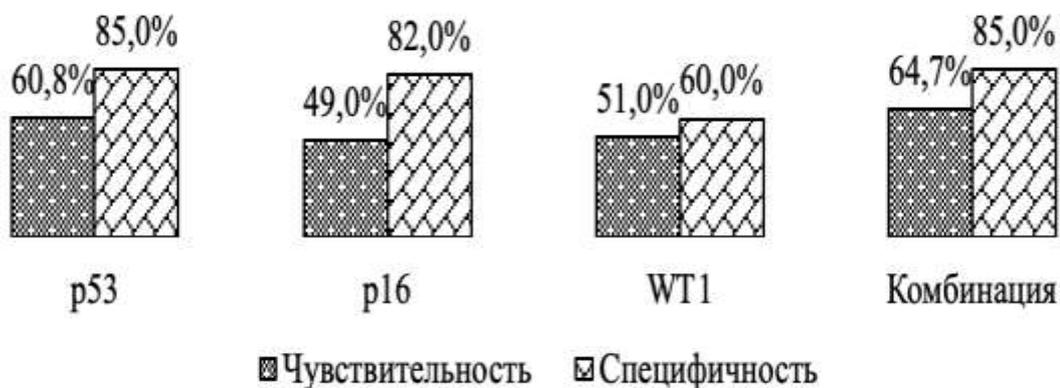


Рисунок 13 — Показатели информативности маркеров p53, p16, WT1 и их комбинации в диагностике high-grade подтипа СКЯ

При проведении ROC-анализа установлено, что метод применим в качестве дополнительного для проведения дифференциальной диагностики СКЯ high-grade и low-grade подтипов: значение AUC составляет 0,833 при $p < 0,0001$ (Рисунок 14).

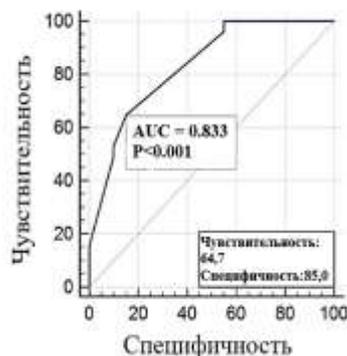
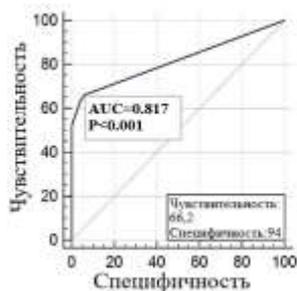
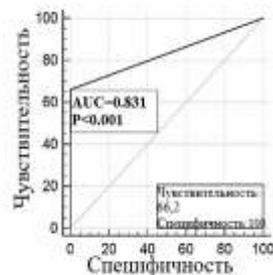


Рисунок 14 — Кривая ROC-анализа информативности оценки экспрессии комбинации маркеров для дифференциальной диагностики high-grade и low-grade карцином

Кроме того, при проведении ROC-анализа экспрессии маркеров и их комбинации пациенток с СКЯ, доброкачественными опухолями яичников и с метастатическим поражением яичников из другого первичного очага было установлено, что в обоих случаях максимальное значение AUC достигается при оценке комбинации и составляет 0,817 для группы доброкачественных опухолей и 0,831 для группы метастазов (Рисунок 15).



а



б

Рисунок 15 — Кривая ROC-анализа информативности оценки экспрессии комбинации маркеров для дифференциальной диагностики: а – СКЯ и доброкачественных опухолей яичников; б – СКЯ и при метастатическом поражении яичников

Таким образом, можно сделать вывод, что ИЦХ исследование экспрессии комбинации маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки

может служить дополнительным методом для проведения дифференциальной диагностики опухолей яичников.

ВЫВОДЫ

1. Аспирационный материал из полости матки, полученный с помощью двухпросветного силиконового катетера, является диагностически информативным методом и позволяет подтвердить диагноз серозного рака у пациенток с III–IV стадиями болезни в 63,3% наблюдений (45 из 71).

2. При ИЦХ исследовании аспирационного материала из полости матки у больных исследуемых групп установлено, что различия в экспрессии маркеров p53, p16, WT1 являются статистически значимыми, при относительно невысокой чувствительности анализа их комбинации (63,7%) и выраженной специфичности (98%) подход может быть использован в качестве дополнительного метода диагностики, но не для первичного скрининга болезни.

3. Значение оценки качества (AUC) ИЦХ анализа экспрессии комбинации маркеров p53, p16 и WT1 в диагностике серозных карцином яичников превышает таковую при анализе каждого маркера в отдельности.

4. При ИЦХ исследовании аспирационного материала из полости матки целесообразно на первом этапе оценивать экспрессию маркера WT1, при положительной экспрессии которого дальнейший анализ наличия совместной экспрессии маркеров p53 и p16 позволяет увеличить предсказательную ценность положительного результата до 89,3%, а отрицательного — до 99%.

5. Иммуноцитохимическое исследование экспрессии маркеров WT1, p53, p16 в аспирационном материале из полости матки может быть использовано в качестве вспомогательного метода для дифференциальной диагностики между high-grade и low-grade серозными карциномами яичников, а также между первичным серозным раком яичников и опухолями яичников иного морфологического строения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Жордания, К.И. Некоторые нюансы патогенеза рака яичников / К.И. Жордания, Ю.Г. Паяниди, М.В. Савостикова, И.В. Паниченко, Е.В. Калиничева, **Н.Н. Гокадзе** // Онкогинекология. – 2016. – № 1. – С.36-45.

2. Савостикова, М.В. Новый взгляд на цитоморфологическую диагностику рака яичников / М.В. Савостикова, К.И. Жордания, Ю.Г. Паяниди, **Н.Н. Гокадзе** // Злокачественные опухоли. – 2017. – Т.7. – № 3. – С.115-116.

3. Жордания, К.И. Рак эндометрия или рак яичников? / К.И. Жордания, Ю.Г. Паяниди, М.В. Савостикова, **Н.Н. Гокадзе**, Е.В. Калиничева, В.Н. Дмитриев // Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение. – 2017. – Т.15. – №1. – С. 63-68.
4. Жордания, К.И. Диагностическая значимость маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки у больных серозным раком яичников/ К.И. Жордания, **Н.Н. Гокадзе**, М.В. Савостикова, Г.И. Краснощекова, Ю.Г. Паяниди, В.Ю. Сельчук // Онкогинекология. – 2019. – №1. – С.28-35.
5. Жордания, К.И. Клеточная экспрессия маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки у больных tuboовариальным серозным раком / К.И. Жордания, **Н.Н. Гокадзе**, М.В. Савостикова, Г.И. Краснощекова, Ю.Г. Паяниди, В.Ю. Сельчук// Онкогинекология. – 2019. – Т30. – №2.– С.35-42.
6. **Гокадзе, Н.Н.** Иммуноцитохимический анализ аспирационного материала из полости матки в диагностике серозных карцином яичников / Н.Н. Гокадзе, В.Ю. Сельчук, Г.И. Краснощекова, Ю.Г. Паяниди, С.В. Винокурова, К.И. Жордания // Вопросы онкологии. – 2020. – Т.66. – № 2. – С.160-166.