

На правах рукописи

БРЫНОВА

Ольга Васильевна

**ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЖИДКОСТНОЙ И ТРАДИЦИОННОЙ
ЦИТОЛОГИИ**

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт–Петербург – 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России

Научный руководитель:

Касоян Карине Тимуровна - кандидат медицинских наук

Официальные оппоненты:

Шапиро Наум Абрамович – доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный врач России, НУЗ «Научный клинический центр ОАО «РЖД», цитологическая лаборатория патологоанатомического отделения, руководитель

Борисова Олеся Владимировна – кандидат медицинских наук, Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отделение онкоцитологии, старший научный сотрудник

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «14» июня 2019 года в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, г. Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54 и на сайте <https://www.nrserm.ru>.

Автореферат разослан «_____» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук

Санников Максим Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Тенденция к росту тиреоидной патологии, отмечаемая во всем мире, и возрастающая онкологическая настороженность определяют актуальность проблемы морфологической диагностики при узловых образованиях щитовидной железы (ЩЖ) [Sanabria A., 2015].

Злокачественные опухоли ЩЖ встречаются относительно нечасто, вероятность наличия в узловом образовании рака ЩЖ (РЩЖ) составляет 5-8% [Rios A., 2016]. Однако в последнее время во всем мире заболеваемость РЩЖ увеличивается, опережая рост злокачественных опухолей других локализаций [Morris L.G., 2010; McNally R.J., 2012; Siegel R.L., 2016; Lubitz C., 2017; Lee K.L., 2017]. По данным МНИОИ им. П.А. Герцена в России за период с 2007 г. по 2017 г. прирост заболеваемости РЩЖ составил 37,52% [Каприн А.Д., 2018].

В связи с этим особенно остро стоит проблема своевременного и точного выявления РЩЖ, и для выбора правильной тактики лечения и адекватного объема оперативного вмешательства в первую очередь необходимо иметь информацию о морфологической структуре узловых образований ЩЖ [Акатова Е.А., 2009]. Единственно возможным методом предоперационной морфологической верификации РЩЖ является цитологическое исследование, основанное на тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ) патологических образований ЩЖ [Nakala T., 2013]. Однако метод имеет ряд ограничений и является одним из наиболее трудных разделов клинической цитологии [Павлова Т.В., 2011; Rosai J., 2010]. Данные о чувствительности и специфичности цитологического метода весьма разноречивы. Одни исследователи считают, что метод имеет достаточно высокие показатели чувствительности, но при этом отмечают низкую специфичность, другие, напротив, считают, что метод обладает большей специфичностью, но недостаточной чувствительностью [Черников Р.А. 2013; Busseniers A., 2007; Dabelic N., 2010].

Дифференциальная диагностика доброкачественных и злокачественных образований ШЖ в 30%, а по отдельным данным до 42% случаев, представляет сложную задачу для морфолога из-за отсутствия четких критериев и сходных морфологических характеристик клеток [Волченко Н.Н., Савостикова М.В., 2010; Полоз Т.Л., 2011; Guglielmo Ardito, 2010; Yazgan A., 2014]. В такой ситуации цитологические заключения классифицируются как «неопределенные» [Bongiovanni M., 2012]. В связи с риском малигнизации на диагностическую лобэктомия направляется большинство пациентов с цитологически «неопределенными» узловыми образованиями, до 70% из которых при гистологическом исследовании оказываются доброкачественными [Cibas E.S., 2009; Dabelic N., 2010]. Таким образом, число пациентов с доброкачественными узловыми образованиями ШЖ, перенесших операцию, по-прежнему остается высоким. В тоже время, ложноотрицательные (ЛО) результаты цитологического исследования приводят к неверному определению объема операции и необходимости выполнения повторных операций. Рецидивы после неадекватных операций возникают у 17-28% больных [Новожилова Е.Н., 1999; Барчук А.С., 2007].

Степень разработанности темы исследования

Для решения проблем дооперационной цитологической диагностики и уточнения диагноза при «неопределенном» цитологическом заключении при ТАБ ШЖ возникает необходимость применения дополнительных методов: иммуноцитохимических (ИЦХ) и молекулярно-генетических, определение диагностической значимости которых нуждается в дальнейшем изучении. [Duick D.S., 2012; Alexander E.K., 2012; Beaudenon-Huibregtse S., 2014; Nikiforov Y.E., 2015; Labourier E., 2015].

В настоящее время метод жидкостной цитологии (ЖЦ) приобретает все большее распространение и находит применение не только в гинекологической практике, но и в других областях. Новый подход к приготовлению и обработке цитологического материала с использованием ЖЦ расширяет возможности

применения ИЦХ и молекулярно-генетических методов на цитологическом материале [Волченко Н.Н., 2013].

Применительно к ЩЖ метод ЖЦ стал использоваться недавно и вызывает споры среди исследователей. Данные литературы о месте и роли ЖЦ при ТАБ ЩЖ, диагностических возможностях по сравнению с ТЦ весьма противоречивы [Chong Y., 2017; Gupta S., 2018]. Хотя многие исследователи согласны с тем, что применение ЖЦ к ТАБ ЩЖ приемлемо, насколько можно доверять результатам ЖЦ, правильно ли использовать только ЖЦ или применять ЖЦ в сочетании с ТЦ - это аспекты, которые требуют изучения, и в этой области опубликовано относительно мало исследований.

Несмотря на обоснованную необходимость применения дополнительных методов, ИЦХ дифференциально-диагностические критерии на клеточном материале ЩЖ носят противоречивый характер, высокочувствительные ИЦХ маркеры для дифференциальной диагностики злокачественных и доброкачественных новообразований ЩЖ в настоящее время отсутствуют.

Целью исследования является оценка диагностической значимости методов традиционной и жидкостной цитологии с последующим использованием жидкостной технологии для иммуноцитохимического и молекулярно-генетического исследований в диагностике заболеваний щитовидной железы.

Задачи исследования

1. Провести сравнительный анализ результатов традиционного и жидкостного методов цитологического исследования пунктатов щитовидной железы.

2. Выделить цитологические особенности доброкачественных и злокачественных образований щитовидной железы при использовании метода жидкостной цитологии.

3. Оценить экспрессию иммуноцитохимических маркеров: галектин-3, Ki-67, нуклеофозмин, E-кадгерин, β -катенин в материале пунктатов щитовидной железы, полученном методом жидкостной цитологии.

4. Оценить возможность определения BRAF V600E мутации в клетках папиллярного рака щитовидной железы в материале, полученном методом жидкостной цитологии.

5. Разработать алгоритм дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных образований щитовидной железы с применением методов традиционной и жидкостной цитологии, иммуноцитохимического и молекулярно-генетического исследований.

Научная новизна

Совместно применены два метода (традиционной и жидкостной цитологии) для диагностики заболеваний щитовидной железы с определением диагностической значимости каждого из них.

Выявлен иммунофенотип доброкачественных и злокачественных образований щитовидной железы в материале жидкостной цитологии на основе экспрессии онкомаркеров Ki-67 и β -катенин.

Продемонстрирована возможность выявления BRAF V600E мутации в клетках тиреоидного эпителия, находящихся в консервирующей среде жидкостной цитологии.

Показано, что комбинированное применение традиционной и жидкостной цитологии с иммуноцитохимическими и молекулярно-генетическими исследованиями способствует повышению эффективности предоперационной диагностики узловых образований щитовидной железы.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенный сравнительный анализ методов традиционной и жидкостной цитологии показал, что совместное применение методов повышает точность цитологической диагностики заболеваний щитовидной железы. Выявлено, что для проведения исследований на основе жидкостной цитологии необходимо выполнять отдельное пунктирование узлового образования щитовидной железы. Продемонстрировано, что метод жидкостной цитологии позволяет проводить дополнительно к цитологическому - иммуноцитохимические и молекулярно-генетические исследования.

Определены чувствительные онкомаркеры и предельные значения уровней экспрессии. Разработан диагностический алгоритм, базирующийся на совместном применении традиционной и жидкостной цитологии с возможностью использования дополнительных иммуоцитохимических и молекулярно-генетических методов.

Внедрение полученных результатов в клиническую практику будет способствовать повышению точности предоперационной цитологической диагностики заболеваний ЩЖ.

Положения, выносимые на защиту

1. Метод жидкостной цитологии в комплексе с традиционным увеличивает точность цитологической диагностики заболеваний щитовидной железы по сравнению с применением только традиционной цитологии.

2. Высокоспецифичными и высокочувствительными иммуоцитохимическими маркерами для дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных образований щитовидной железы являются Ki-67 и β -катенин, применяемые в комбинации.

3. Разработанный алгоритм для дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных образований щитовидной железы включает совместное применение методов традиционной и жидкостной цитологии, иммуоцитохимические исследования, определение BRAF V600E мутации и способствует повышению эффективности цитологического метода.

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационной работы является комплексный подход к исследованию материала ТАБ узловых образований ЩЖ с применением высокотехнологичных методов исследования (ИЦХ, молекулярно-генетических), выполненных с использованием ЖЦ в дополнение к традиционному цитоморфологическому исследованию. Обработка результатов, полученных в ходе диссертационного исследования, осуществлялась с помощью компьютерных программ и статистического анализа по общепринятым методикам.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность и обоснованность научной работы обеспечена детальным теоретическим анализом проблемы, достаточной выборкой обследованных (126 пациентов), обеспечена адекватными поставленным задачам методами исследования и статистическим анализом полученных данных. Основные положения и результаты диссертации были изложены на V Международной научной интернет-конференции «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии» (Казань, 2014), на XX Всероссийской юбилейной научно-практической конференции «Достижения и перспективы развития лабораторной службы России» (Москва, 2015), на XI Всероссийском съезде Ассоциации клинических цитологов России (Звенигород, 2015), на 39th European Congress of Cytology (Милан, 2015) с постерным и устным докладом, на XII Пленуме общероссийской общественной организации «Ассоциация клинических цитологов» (Крым, 2016).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты диссертационной работы внедрены в практическую деятельность ГБУЗ Московская городская онкологическая больница №62. Основные положения и выводы, разработанные в ходе диссертационного исследования, включены в учебный процесс циклов повышения квалификации врачей кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО РМАНПО Министерства здравоохранения РФ.

Личный вклад автора

Автор изучил отечественные и зарубежные публикации по теме диссертации, лично проводил цитологические исследования на основе метода ЖЦ, традиционные препараты были пересмотрены и реклассифицированы автором. Автор принимал непосредственное участие в проведении дополнительных ИЦХ и молекулярно-генетических методов исследования. Автором был выполнен анализ полученных результатов, сформулированы выводы. Он принимал непосредственное участие в презентации и публикациях по материалам исследования.

Публикации результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, включая 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертационных исследований.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 135 страницах машинописного текста и состоит из введения, анализа публикаций литературы по теме диссертации, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 59 рисунками и содержит 19 таблиц. Библиографический указатель включает 208 источников, из них 181 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В работе был использован материал, полученный при ТАБ ЩЖ 126 пациентов (117 женщин и 9 мужчин) в возрасте от 23 до 82 лет, проходивших обследование и лечение в г. Томск за период 2012–2015 гг. Показаниями для проведения ТАБ ЩЖ являлись: наличие узлового образования > 1 см и наличие узлового образования < 1 см в сочетании сстораживающими в отношении злокачественности клиническими и/или ультрасонографическими признаками. У всех лиц, включенных в исследование, было получено информированное согласие.

В соответствии с клиническими, цитологическими, ультразвуковыми и другими показаниями 101 пациенту проведено хирургическое лечение и установлен гистологический диагноз: узловой зоб, $n=33$; аутоиммунный тиреоидит (АИТ), $n=17$; фолликулярная аденома (ФА), $n=19$; гюртлеклеточная аденома (ГА), $n=3$; папиллярный рак (ПР), $n=27$ (классический вариант $n=25$,

фолликулярный вариант n=2); медуллярный рак (МР), n=1; анаплазированный рак (АР), n=1.

Критерием отбора материала для сравнительного анализа ТЦ и ЖЦ являлось наличие установленного гистологического диагноза. Для ТЦ материал ТАБ наносили сразу на стекло, для ЖЦ - материал помещали в пробирку типа «Eppendorf» с консервирующим раствором в объеме 1 мл (Preservative Solution Novaprep, Франция), температурный режим хранения 10-30⁰С. Тонкослойные препараты на основе метода ЖЦ получали путем центрифугирования 100 мкл клеточной суспензии (5 минут, 1000 оборотов в минуту) в цитоцентрифуге Cellspin II фирмы Tharmas, Германия. Сначала окрашивали один препарат по Папаниколау для цитологического исследования и оценки клеточности (126 препаратов), затем готовили еще по 5 препаратов для ИЦХ исследования, критерий отбора - не менее 100 клеток в тонкослойном препарате, (200 препаратов). Оставшийся клеточный материал использовали для определения BRAF V600E мутации методом ПЦР (9 образцов).

Первым 47 пациентам материал для ЖЦ получали путем промывания иглы и шприца в консервирующем растворе Novaprep, остальным 54 - выполняли дополнительное пунктирование из места первичного взятия.

Цитоморфологический анализ и иммуноцитохимические исследования выполнены на кафедре клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ, г. Москва (зав. д.м.н., профессор В.В. Долгов), молекулярно-генетические исследования – на базе молекулярно-биологической лаборатории ГБУЗ «МГОб № 62 ДЗМ» (зав. к.м.н. Демидова И.А.).

Проведение диссертационного исследования было одобрено независимым этическим комитетом ФГБУ «ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова» МЧС России (№ 2/18 от 16.03.18 г.).

Иммуноцитохимическое исследование

Для оценки экспрессии белков нуклеофозмин, галектин-3, Ki-67, β-катенин и E-кадгерин были отобраны: 20 доброкачественных и 20 злокачественных образований. ИЦХ исследование осуществляли непрямым

иммуноферментным методом в ручном режиме согласно протоколу. Оценку ИЦХ реакции проводили качественно (по наличию коричневого окрашивания зоны локализации изучаемого антигена), а также количественно, производя подсчет клеток с наличием окрашивания разной интенсивности. Учитывали степень окрашивания и процент окрашенных клеток по формуле гистосчета (Histochemical score).

Histochemical score (HS) = $\sum P(i) \times i$, где i – интенсивность окрашивания, выраженная в баллах от 0 до 3; $P(i)$ – процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью.

Молекулярно-генетическое исследование на выявление мутации BRAF V600E

Метод основан на проведении полимеразной цепной реакции. Выделение ДНК производили из 9 образцов жидкостной цитологии (7 ПР и 2 АИТ) с использованием набора cobas® DNA Sample Preparation Kit (Roche, США) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию выделенной ДНК определяли на спектрофотометре Qubit (ThermoFisher Scientific, США).

Статистический анализ результатов исследования

Анализ полученных результатов выполняли с помощью пакета «Microsoft Excel 2007». Статистическую обработку результатов исследования проводили по общепринятым методикам с использованием пакета SPSS «Stata 14,0». Различия между сравниваемыми величинами считались статистически достоверными при критическом уровне значимости $p < 0,05$. Для определения достоверности различий между исследуемыми группами использовали критерий U-Манна-Уитни, для анализа качественных признаков - критерий Хи-квадрат. Для определения диагностической эффективности цитологического исследования использовали метод бинарной логистической регрессии с применением ROC-анализа и построением ROC-кривых.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты цитологического исследования были сопоставлены с гистологическими диагнозами. Заключение ТЦ и ЖЦ формулировали в соответствии с классификационной системой The Bethesda System (таблица 1).

Таблица 1.

Сопоставление результатов цитологического исследования методом традиционной и жидкостной цитологии с гистологическим

Цитологический диагноз	Гистологический диагноз					
	Зоб/АИТ (n=50)		Аденома (n=22)		Рак (n=29)	
	ЖЦ	ТЦ	ЖЦ	ТЦ	ЖЦ	ТЦ
Bethesda I	20	14	13	4	8	0
Bethesda II	26	17	7	3	5	2
Bethesda III	1	4	0	4	0	3
Bethesda IV	1	4	2	11	2	3
Bethesda V	2	10	0	0	6	7
Bethesda VI	0	1	0	0	8	14
Всего	50	50	22	22	29	29

Bethesda I - недиагностический материал

Bethesda II - доброкачественные изменения

Bethesda III - атипия неопределенного значения

Bethesda IV - фолликулярная опухоль/предположительно, фолликулярная опухоль

Bethesda V - предположительно, злокачественная опухоль

Bethesda VI - злокачественная опухоль

Анализ неинформативного материала

Необходимым условием для проведения цитологического исследования является получение достаточного количества клеток. Материал оценивали как неинформативный для ТЦ и для ЖЦ, если обнаруживали в препарате менее 6 скоплений из 10 клеток тиреоидного эпителия, и не было идентифицируемого коллоида либо лимфоидных элементов, что согласуется с рекомендациями The Bethesda System.

Большее число наблюдений с недиагностическим материалом отмечено в препаратах, приготовленных методом ЖЦ - 41%, по сравнению с ТЦ - 18%. Такое количество недиагностического материала в ЖЦ в нашей работе можно объяснить тем, что у первых 47 пациентов материал для ЖЦ получали по остаточному принципу с помощью промывания иглы и шприца консервирующим раствором после первоначальной подготовки препаратов ТЦ, 54 пациентам выполняли дополнительное пунктирование для ЖЦ, количество

неинформативных образцов в этой группе снизилось в 2,7 раза и было сопоставимо с ТЦ (9 случаев в ТЦ и 11 в ЖЦ). По результатам нашего исследования, лучше отказаться от получения материала путем промывания иглы и шприца, а использовать дополнительные пункции.

Анализ цитологического материала неопухолевых образований щитовидной железы

Исследован пункционный материал 50 пациентов с установленным диагнозом узловой коллоидный зоб (n=33) и АИТ (n=17). В ТЦ в этой категории было больше ложноположительных заключений, чем в ЖЦ: 15 из 36 (42%) против 3 из 30 (10%). В ТЦ клеточные элементы выглядели крупнее, чем в ЖЦ, что вызвано «распластыванием» клеток по стеклу при приготовлении препарата, выражен краш-феномен, отмечено очаговое нагромождение клеток. В ЖЦ лучше сохранялась структура ядра, были менее выражены дегенеративные изменения, в связи с этим ошибок в ЖЦ было меньше. Частичная потеря коллоида и лимфоидных элементов в препаратах ЖЦ не помешала трактовке изменений как доброкачественных.

В 6 случаях (40%) из 15 ложноположительных диагнозов в ТЦ использование ЖЦ позволило поставить правильный диагноз доброкачественного неопухолевого образования. Несовпадение диагнозов между ТЦ и ЖЦ в оценке характера процесса вызывает необходимость применения дополнительных высокотехнологичных методов исследования.

Анализ цитологического материала доброкачественных опухолей щитовидной железы

Исследован пункционный материал 19 пациентов с установленным диагнозом ФА и 3 пациентов с диагнозом ГА. В данной категории при использовании ЖЦ было больше ЛО диагнозов: 7 из 9 (78%) против 7 из 18 (39%) в ТЦ. В ЖЦ меньшие по размеру клетки располагались равномерно, преимущественно в мелких группах, ядра выглядели мельче по сравнению с ТЦ, структура хроматина был «сглажена». Причиной гиподиагностики ГА в

ЖЦ, была ошибка в идентификации клеток Гюртле, которые в связи с особенностью окрашивания по Папаниколау имели более нежную цитоплазму с размытыми границами. В нашей работе при выявлении доброкачественных опухолевых образований метод ТЦ показал себя более точным.

Однако, выделение категории Bethesda IV при цитологическом исследовании направлено на определение образований, которые могут являться злокачественными, достоверно определить природу которых можно только на основании результатов гистологического исследования (наличие капсулярной и сосудистой инвазии) [Renuka I.V., 2012; Yazgan A., 2014]. В этой связи в нашем исследовании методом ЖЦ с большей долей вероятности был установлен доброкачественный характер этих образований, что предполагает наблюдение за пациентом, в отличие от заключений ТЦ категории Bethesda IV, нуждающихся в хирургическом контроле. Тем не менее, большое количество ошибок и в ТЦ, и в ЖЦ при использовании заключений данной категории, которую не случайно называют «серой зоной цитологии», диктует необходимость применения дополнительных уточняющих методов диагностики независимо от способа приготовления материала.

Анализ цитологического материала злокачественных опухолей щитовидной железы

Исследован пункционный материал ЩЖ 27 пациентов с установленным диагнозом ПР, 1 пациента с диагнозом МР и 1 пациента с диагнозом АР. Количество ЛО наблюдений в ЖЦ и в ТЦ составило 5 из 21 (24%) случаев и 5 из 29 (17%) соответственно и было обусловлено сложностями в цитологической диагностике фолликулярного варианта ПР (2 случая) и невыраженностью основных цитологических критериев злокачественности (3 случая). Хотя эксцентрически расположенные ядрышки и борозды ядер при ПР более четко были видны в жидкостных образцах, в 12 из 19 случаев (63%), внутриядерные инвагинации цитоплазмы при использовании метода ЖЦ обнаруживались реже в нашей работе, в 6 из 19 случаев (32%) против 13 из 27 (48%) в ТЦ, что согласуется с данными литературы [Fadda G., 2011]. Была

отмечена частичная фрагментация пластов опухолевых клеток в препаратах ЖЦ, вероятно, связанная с процессом приготовления. При окрашивании по Папаниколау изменяется морфология ядер клеток ПР: в ЖЦ – хроматин мелкозернистый, бледный с конденсацией по периферии, в ТЦ – гиперхромный, распределен неравномерно. В нашем исследовании метод ЖЦ уступал методу ТЦ в верификации ПР.

При МР в ТЦ и ЖЦ определялись округлые и веретеновидные клетки, расположенные разрозненно с хроматином ядер в виде «соли и перца»; в традиционных препаратах (в отличие от препаратов ЖЦ) в цитоплазме клеток визуализировались азурофильные гранулы, межклеточно - фрагменты розового амилоида (дополнительные критерии диагностики МР), в ЖЦ - фон препарата был «чистым».

При АР некробиотические изменения в клетках были более выражены в традиционном препарате, что затрудняло оценку клеточной атипии, и цитологическая картина была оценена как атипия неопределенного значения (Bethesda III). В препарате ЖЦ полиморфные клетки с гиперхромными ядрами не вызывали сомнений в злокачественности процесса.

Сравнение результатов применения традиционной и жидкостной цитологии в диагностике заболеваний щитовидной железы

Анализ полученных результатов показал, что сложности и ошибки наблюдались как в ТЦ, так и в ЖЦ, кроме того, опыт применения метода ЖЦ при поражениях ЩЖ еще небольшой, и необходима осторожность в интерпретации найденных изменений, особенно, если используется только ЖЦ. Влажная фиксация и последующая окраска по Папаниколау вызывали изменения морфологии клеток, в связи с этим необходима адаптация к цитоморфологическим особенностям метода ЖЦ.

В ходе исследования был выполнен сравнительный анализ цитологических картин различных заболеваний ЩЖ методом ТЦ и ЖЦ, который показал, что одни параметры лучше оценивать методом ЖЦ, другие – традиционным методом. Преимуществом метода ЖЦ являлась возможность

равномерного распределения клеточного материала на стекле, лучшая сохранность клеток, уменьшение количества элементов крови и артефактов, что способствовало более детальному анализу морфологии клеток.

При расчете диагностических показателей с использованием ROC-анализа чувствительность метода ТЦ в выявлении опухолей ЩЖ составила 75%, специфичность 58%, точность 68%; метода ЖЦ – 60%, 90% и 75% соответственно.

Таким образом, в нашей работе метод ТЦ превосходил метод ЖЦ в чувствительности, но уступал в специфичности, следовательно, наиболее достоверный цитологический диагноз при ТАБ узловых образований ЩЖ может быть установлен при совместном применении методов ТЦ и ЖЦ (рисунок 1).

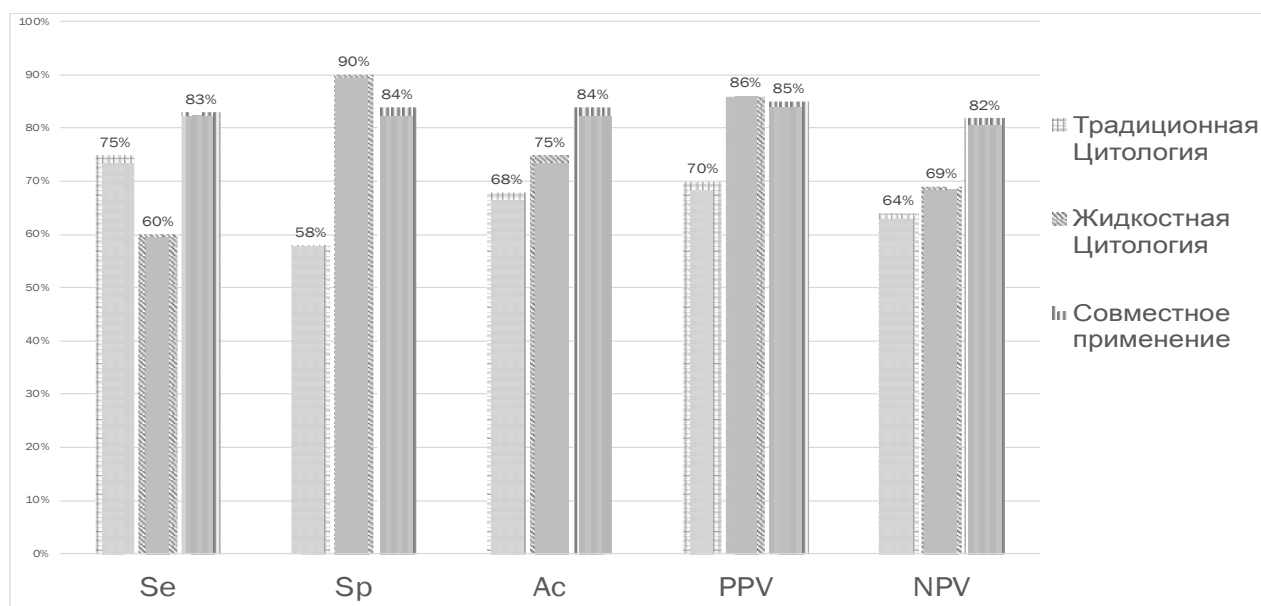


Рис. 1. Диаграмма диагностических показателей метода жидкостной и традиционной цитологии в выявлении опухолей щитовидной железы.

Se - чувствительность

Sp - специфичность

Ac - точность

PPV - прогностическая ценность положительного результата

NPV - прогностическая ценность отрицательного результата

При совместном использовании ТЦ и ЖЦ диагностические показатели значительно улучшились, о чем свидетельствует показатель площади под ROC-

кривой, значение которого в диапазоне 0,8-0,9 позволяет охарактеризовать качество метода как очень хорошее (таблица 2).

Таблица 2.

Сравнительная характеристика методов традиционной и жидкостной цитологии

Показатель	Совместное применение	Традиционная цитология	Жидкостная цитология
Число наблюдений	92	83	60
Критерий χ^2	46,05	9,25	22,18
AUC (площадь под ROC-кривой)	0,8374	0,6740	0,7533
Чувствительность (Se)	83%	75%	60%
Специфичность (Sp)	84%	58%	90%
Точность (Ac)	84%	68%	75%
Прогностическая ценность положительного результата (PPV)	85%	70%	86%
Прогностическая ценность отрицательного результата (NPV)	82%	64%	69%

Иммуноцитохимические исследования

При определении экспрессии β -катенина оценивали мембранное, цитоплазматическое и ядерное окрашивание; E-кадгерина - мембранное; галектина-3 – цитоплазматическое; Ki-67 и нуклеофозмина – ядерное.

При доброкачественных образованиях отмечали мембранную экспрессию β -катенина, при злокачественных - мембранная экспрессия снижалась, но значительно возрастала цитоплазматическая и в некоторых случаях появлялась ядерная, что в общих цифрах гистосчета показало значительное повышение по сравнению с доброкачественными; экспрессия Ki-67 продемонстрировала выраженную корреляцию с наличием РЦЖ (таблица 3).

Таблица 3.

Показатели экспрессии маркеров β -катенин и Ki-67 (средние значения, min-max)

Гистологический диагноз	β -катенин (HS)	Ki-67 (%)
Аутоиммунный тиреоидит n=7	27,3 (10,0-54,0)	4,3(0,0-15,0)
Узловой зоб, n=10	12,0 (0,0-54,0)	4,1(0,0-16,0)
Фолликулярная аденома, n=3	48,0 (20,0-82,0)	6,7(0,0-20,0)
Папиллярный рак, n=18	122,3 (50,0-240,0)	47,2(7,0-67,0)
Медулярный рак, n=1	61,0	100,0
Анаплазированный рак, n=1	135,0	70,0

Получено статистически значимое различие значений экспрессии β -катенина ($U=5,0$; $p<0,001$) и Ki-67 ($U=7,0$; $p<0,001$) между доброкачественными и злокачественными образованиями ЩЖ (рисунок 2).

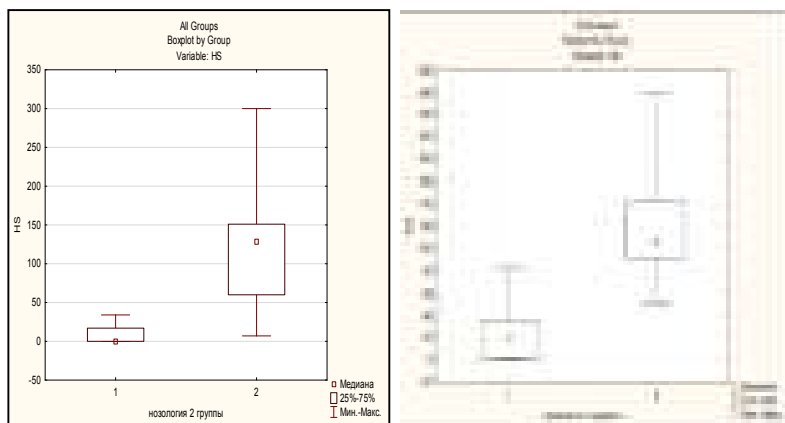


Рис. 2. Уровень экспрессии Ki-67 (слева) и β -катенин (справа); медиана и межквартильный размах.

Группа 1 - доброкачественные образования (АИТ, зоб, фолликулярная аденома)

Группа 2 - злокачественные образования (папиллярный рак, анаплазированный рак, медуллярный рак).

Достоверных отличий между злокачественными и доброкачественными образованиями при определении экспрессии маркеров галектин-3, нуклеофозмин и E-кадгерин не выявлено ($U=58,3$; $U=63,0$; $U=131,5$ соответственно; $p>0,05$) (таблица 4; рисунок 3).

Таблица 4.

Показатели экспрессии маркеров галектин-3, нуклеофозмин и E-кадгерин (средние значения гистосчета, min-max)

Гистологический диагноз	Галектин -3	Нуклеофозмин	E-кадгерин
Аутоиммунный тиреоидит, n=7	97,6 (49,0-184,0)	70,3(0,0-100,0)	79,4 (0,0-163,0)
Узловой зоб, n=10	39,8(11,0-85,0)	105,4(0,0-200,0)	117,1 (72,0-200,0)
Фолликулярная аденома, n=3	143,0(90,0-184,0)	81,5(21,0-142,0)	118,0 (101,0-133,0)
Папиллярный рак, n=18	127,4(8,0-300,0)	127,7(46,0-200,0)	80,8 (24,0-153,0)
Медуллярный рак, n=1	10,0	210,0	270,0
Анаплазированный рак, n=1	83,0	135,0	92,0

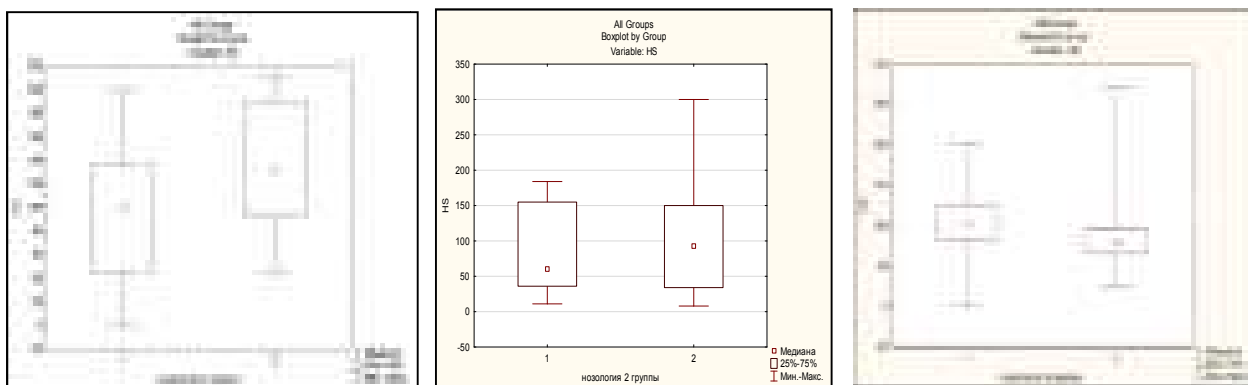


Рис. 3. Уровень экспрессии белков нуклеофозмин (слева), галектин-3 (в центре), E-кадгерин (справа); медиана и межквартильный размах.

Группа 1 – доброкачественные образования (АИТ, зоб, фолликулярная аденома)

Группа 2 – злокачественные образования (папиллярный рак, медуллярный рак, анаплазированный рак).

Методом ROC-анализа был определен порог максимально эффективной вероятности выявления РЦЖ при ИЦХ исследовании: для Ki-67 >20% окрашенных клеток ($X^2=37,7$; $p<0,001$), при котором чувствительность метода составила 85%, специфичность 95%, точность 90%; для β -катенин >82 в значении гистосчета ($X^2=42,98$; $p<0,001$), при котором чувствительность составила 90%, специфичность 95%, точность метода 93%.

Экспрессия Ki-67 $\leq 20\%$ расценена как отрицательное значение индекса пролиферативной активности (-), >20% как положительное значение (+); экспрессия β -катенина (мембранная, цитоплазмная, ядерная) в значении гистосчета ≤ 82 – слабо выраженная (+), >82 – выраженная (++).

В ходе исследования было выявлено 3 случая РЦЖ, которые имели отрицательный индекс пролиферативной активности Ki-67 (-), но при этом выраженную экспрессию β -катенина (++) . В тоже время другие 3 случая РЦЖ имели слабо выраженную экспрессию β -катенина (+), но при этом высокий индекс пролиферативной активности Ki-67 (+) (таблица 5).

Таблица 5.

Анализ экспрессии β -катенина и Ki-67 при различных образованиях щитовидной железы

Гистологический диагноз	β -катенин (+), слабо выраженная экспрессия		β -катенин (++) , выраженная экспрессия	
	Ki-67 (+)	Ki-67 (-)	Ki-67 (+)	Ki-67 (-)
Узловой зоб, n=10		n=10(100%)		
Аутоиммунный тиреоидин, n=7		n=7(100%)		
Фолликулярная аденома, n=3		n=3(100%)		
Рак щитовидной железы (ПР, МР, АР), n=20	n=3(15%)		n=14 (70%)	n=3 (15%)

Сопоставление полученных данных позволило выделить и описать иммунофенотип доброкачественных образований ЩЖ: β -катенин(+), Ki-67(-), а также 2 иммунофенотипа злокачественных образований ЩЖ: β -катенин(+), Ki-67(+) и β -катенин(++), независимо от значений экспрессии Ki-67(\pm).

Исходя из полученных результатов можно рекомендовать диагностическую панель для дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных образований ЩЖ с использованием комбинации двух маркеров: β -катенин и Ki-67 ($p<0,001$). Использование только одного из них может привести к диагностической ошибке.

Молекулярно-генетические исследования (определение мутации BRAF V600E)

Наличие мутации BRAF V600E было обнаружено в 2 образцах ПР из 7 исследуемых, в 2 образцах с АИТ – не выявлено. Все анализируемые образцы РЩЖ (n=7) были представлены классическим вариантом ПР.

Необходимо отметить, что клетки ПР с наличием BRAF V600E мутации и без таковой не имели морфологически значимых различий при световой микроскопии. Таким образом, генотип клеток с мутацией не зависел от их морфологического строения и являлся самостоятельным диагностическим дополнительным критерием прогноза опухоли.

Проведенное исследование свидетельствует о том, что в консервирующей среде для ЖЦ клетки тиреоидного эпителия сохраняют свои молекулярно-генетические свойства и могут быть использованы для обнаружения мутаций в случаях выявленного ПР.

Полученные данные легли в основу алгоритма дифференциальной диагностики заболеваний ЩЖ, который представлен на рисунке 4.

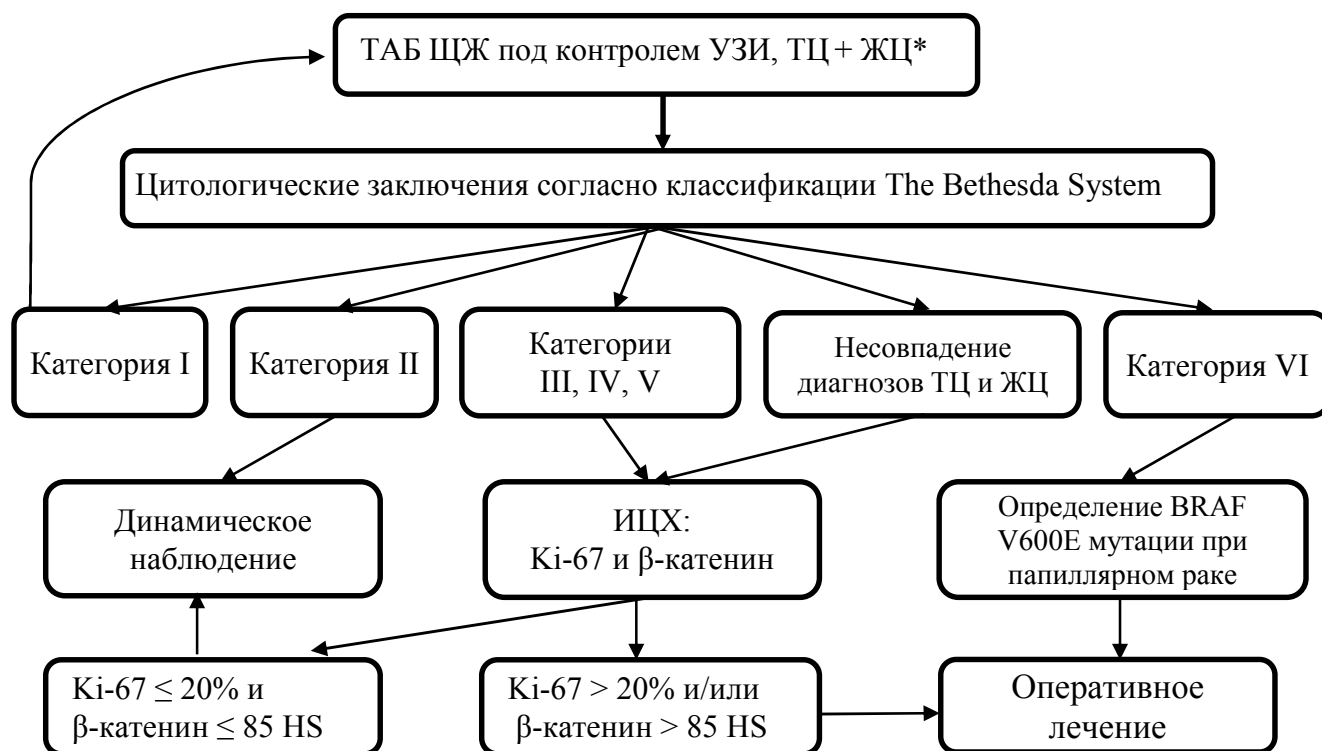


Рисунок 4 - Алгоритм дифференциальной диагностики образований щитовидной железы (*для ЖЦ необходимо выполнить дополнительное пунктирование)

ВЫВОДЫ

1. Метод жидкостной цитологии имеет более высокие показатели специфичности при выявлении опухолевых процессов по сравнению с традиционным методом (90% против 58%), метод традиционной цитологии имеет более высокие показатели чувствительности (75% против 60%). Точность диагностики традиционного цитологического исследования составила 68%, жидкостного 75%, совместного применения традиционной и жидкостной цитологии - 84%.
2. Выполнение дополнительной пункции для метода жидкостной цитологии позволяет снизить количество неинформативного материала в 2,7 раза, по сравнению с использованием остаточного материала при промывании иглы.
3. Выделены цитологические особенности метода жидкостной цитологии по сравнению с традиционным, которые необходимо учитывать для предотвращения ошибок: для неопухолевых образований - меньше коллоида, снижение количества диагностических фоновых элементов; для доброкачественных опухолей - меньшие размеры клеток, микрофолликулярная структурность нерезко выражена; для злокачественных опухолей - отмечена частичная фрагментация крупных пластов фолликулярных клеток, изменение характеристик хроматина ядер, более четко видны ядрышки, ядерные борозды, реже встречаются инвагинаты.
4. Получено достоверно значимое различие экспрессии Ki-67 и β -катенина между доброкачественными и злокачественными образованиями ($p < 0,001$). Экспрессия β -катенина > 82 в значениях гистосчета и/или Ki-67 $> 20\%$ при комбинированном использовании подтверждает диагноз злокачественного образования щитовидной железы. Для галектина-3, нуклеофозмина и E-кадгерина статистически значимых различий между доброкачественными и злокачественными образованиями не выявлено ($p > 0,05$).
5. Использование жидкостной цитологии при исследовании пунктатов узловых образований щитовидной железы позволяет провести полимеразную цепную реакцию на выявление BRAF V600E мутации. В клетках папиллярного рака

(в 2 случаях из 7) выявлена BRAF V600E мутация; при аутоиммунном тиреоидите такая не выявлена.

6. Разработан алгоритм дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных образований щитовидной железы, который включает комбинированное использование традиционной и жидкостной цитологии, иммуноцитохимических маркеров Ki-67 и β -катенина, выполнение полимеразной цепной реакции на BRAF V600E мутацию.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты проведенного исследования позволяют сформулировать практические рекомендации для врачей клинической лабораторной диагностики, врачей ультразвуковой диагностики, эндокринологов, хирургов и онкологов.

1. При дооперационной тонкоигольной аспирационной пункции щитовидной железы рекомендуется выполнять отдельное пунктирование для метода жидкостной цитологии в дополнение к традиционной цитологии.
2. При получении «неопределенных» результатов (категорий Bethesda III, IV, V), а также при несовпадении результатов традиционной и жидкостной цитологии рекомендуется дополнительно использовать иммуноцитохимическое определение маркеров Ki-67 и β -катенина, уровень экспрессии которых в значениях $>20\%$ и/или $>82\text{HS}$ соответственно позволяет уверенно устанавливать достоверный диагноз злокачественной опухоли.
3. Пациентам с установленным цитологическим диагнозом папиллярный рак рекомендуется проводить исследование для выявления BRAF V600E мутации, наличие которой является фактором неблагоприятного прогноза и основанием для использования более радикальной хирургической тактики.

Перспективы дальнейшей разработки темы исследования

В качестве перспектив разработки темы можно рассматривать дальнейшую апробацию предложенного алгоритма на базе ГБУЗ «МГОб №62 ДЗМ», изучение выявления других мутаций в клетках опухолей щитовидной железы с использованием жидкостной цитологии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для опубликования основных результатов диссертационных исследований по научной специальности диссертации

1. Зима, А.П. Сравнительная оценка экспрессии β -катенина и E-кадгерина в жидкостных образцах пунктатов узловых образований щитовидной железы/ А.П. Зима, А.В. Исаева, Т.В. Саприна, К.Т. Касоян, О.С. Попов, О.В. Брынова, И.С. Березкина, О.А. Васильева, Н.В. Рязанцева, И.П. Шабалова, Л.С. Литвинова, Ю.Д. Пак, В.В. Новицкий // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. - Т.161. - №2. - С.251-256.

2. Брынова, О.В. Метод жидкостной цитологии в диагностике заболеваний щитовидной железы / О.В. Брынова, К.Т. Касоян, И.П. Шабалова, А.П. Зима, А.В. Исаева, Т.В. Саприна // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Т.61. - №4. - С. 225-228.

3. Брынова, О.В. Оценка возможности выявления BRAF мутации в жидкостных образцах пунктатов щитовидной железы / О.В. Брынова // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2018. - Т. 7. – № 6. - С. 37-39.

Другие статьи в рецензируемых научных изданиях

4. Березкина, И.С. Возможности традиционной и жидкостной цитологии в сочетании с иммуноцитохимической детекцией некоторых молекулярных маркеров в дооперационной диагностике высококодифференцированного рака щитовидной железы / И.С. Березкина, Т.В. Саприна, А.П. Зима, А.В. Исаева, В.Н. Латыпова, М.Р. Мухамедов, Л.Р. Базилевич, О.С. Попов, К.Т. Касоян, О.В. Брынова, Н.Г. Бразовская // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2016. - Т. 12. - № 1. – С. 38-45.

Статьи, тезисы докладов в материалах конференций

5. Исаева, А.В. Анализ экспрессии МРНК бета-катенина (CTNNB) и циклина D1 (CCND1) в жидкостных образцах дифференцированного рака щитовидной железы/ А.В. Исаева, А.П. Зима, Т.В. Саприна, В.Н. Латыпова, И.С. Березкина,

К.Т. Касоян, О.В. Брынова // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии: сборник трудов V Международной научной Интернет-конференции. – Казань. - 2014. - С. 77-79.

6. Касоян, К.Т. Возможности метода жидкостной цитологии в комплексной диагностике заболеваний щитовидной железы (тезисы) / К.Т. Касоян, О.В. Брынова, И.П. Шабалова, А.П. Зима, А.В. Исаева, И.С. Березкина // Лаборатория. - 2015. - №2. - стр. 28.

7. Brynova, O. The modern approach to differential diagnosis of thyroid diseases (тезисы) / O. Brynova, K. Kasoyan, I. Shabalova, A. Zima, A. Isaeva, I. Berezkina // 39th European Congress of Cytology, Milan, September 2015. Cytopathology, 2015. - 26 (Suppl. 1). – P. 90.

8. Shabalova, I. Liquid-based cytology in comprehensive diagnostics of thyroid diseases (тезисы) / I. Shabalova, O. Brynova, K. Kasoyan, A. Zima, A. Isaeva, I. Berezkina // 39th European Congress of Cytology, Milan, September 2015. Cytopathology, 2015. – Vol. 26 (Suppl. 1). – P. 13.

9. Брынова, О.В. Традиционная и жидкостная цитология в диагностике поражений щитовидной железы (тезисы) / О.В. Брынова, К.Т. Касоян, И.П. Шабалова, А.П. Зима, А.В. Исаева, И.С. Березкина // Новости клинической цитологии. – 2015. – Т. 19. - №1-2. - С. 34-35.

10. Брынова, О.В. Опыт применения жидкостной цитологии в диагностике патологии щитовидной железы (тезисы) / О.В. Брынова, К.Т. Касоян, И.П. Шабалова // Новости клинической цитологии. – 2016. – Т. 20. - №1-2. - С. 39-40.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АИТ - аутоиммунный тиреоидит

АР - анаплазированный рак

ГА - гюртлеклеточная аденома

ЖЦ - жидкостная цитология

ИЦХ - иммуноцитохимия

ЛО - ложноотрицательный

МР - медуллярный рак

ПР - папиллярный рак

РЩЖ - рак щитовидной железы

ТАБ - тонкоигольная аспирационная биопсия

ТЦ - традиционная цитология

ФА - фолликулярная аденома

ЩЖ - щитовидная железа

HS - Histochemical score (гистосчет)