

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ РАННЕГО ВЫЯВЛЕНИЯ РАКА ТЕЛА МАТКИ

Графская М.Ю.

*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России, Ростов-на-Дону,
e-mail: mariagrafskaja@ya.ru*

Цель: сравнить с гистологическим исследованием и выявить наибольшую эффективность совершенствований цитологических методов для раннего выявления рака тела матки. Всего обследованы 259 пациенток с диагнозом «рак тела матки» и 103 женщины контрольной группы без опухолевых заболеваний. Перед выскабливанием стенок полости матки пациенткам проводили забор материала с помощью щеток из цервикального канала и эндометрия либо осуществляли аспирационную биопсию тканей эндометрия. Выделяли дезоксирибонуклеиновую кислоту из образцов тканей шейки матки и эндометрия. Методом полимеразной цепной реакции определяли наличие онкогенных мутаций в генах основных сигнальных путей канцерогенеза. При наличии мутации хотя бы одного из генов тест считали положительным. Обнаружение онкогенных мутаций в соскобах из цервикального канала при раке тела матки имело чувствительность 65,8% и диагностическую специфичность 91,5%. Диагностическая чувствительность аспирационной биопсии составила 76,9%, а специфичность – 90,6%. При щеточной биопсии эндометрия чувствительность методики в отношении выявления рака тела матки составила 82,6%, а специфичность – 100%. Дополнительное молекулярно-генетическое исследование эндометрия на онкогенные мутации статистически значимо повысило ($p=0,047$) чувствительность метода до 89,7% по сравнению с результатами цитологического исследования образцов из эндометрия при стандартной щеточной биопсии. Спектр мутаций генов совпадал при исследовании образцов из цервикального канала и эндометрия. При биопсии эндометрия пробоотбор с помощью щетки повышает эффективность цитологического исследования на предмет выявления рака тела матки по сравнению с аспирационным способом получения биологического материала. Дополнительное генетическое исследование на онкогенные мутации образцов эндометрия и цервикальных соскобов после щеточной биопсии способствует эффективному выявлению пациенток с высоким риском злокачественного изменения эндометрия.

Ключевые слова: рак тела матки, аспирационная биопсия, щеточная биопсия, жидкостная цитология, онкогенные мутации.

IMPROVEMENT OF CYTOLOGICAL RESEARCH METHODS FOR EARLY DETECTION OF UTERINE CANCER

Grafskaya M.Yu.

*Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the
Russian Federation, Rostov-on-Don, e-mail: mariagrafskaja@ya.ru*

Objective: to compare with histological examination and to identify the greatest efficiency of improvements in cytological methods for the early detection of endometrial cancer. A total of 259 patients diagnosed with endometrial cancer and 103 women in the control group without tumor diseases were examined. Before curettage of the uterine cavity walls, patients took material from the endocervical canal and endometrium using brushes or performed an aspiration biopsy of the endometrial tissues. Deoxyribonucleic acid was isolated from endocervical and endometrium tissue samples. The polymerase chain reaction method was used to determine the presence of oncogenic mutations in the genes of the main signaling pathways of carcinogenesis. If at least one gene had a mutation, the test was considered positive. Detection of oncogenic mutations in endocervical canal scrapings for endometrial cancer had a sensitivity of 65,8% and a diagnostic specificity of 91,5%. The diagnostic sensitivity of aspiration biopsy was 76,9%, and the specificity was 90,6%. In the case of endometrial brush biopsy, the sensitivity of the technique in detecting endometrial cancer was 82,6%, and the specificity was 100%. Additional molecular genetic testing of the endometrium for oncogenic mutations statistically significantly increased ($p=0,047$) the sensitivity of the method to 89.7% compared to the results of cytological examination of endometrial samples in standard brush biopsy. The spectrum of gene mutations coincided when studying samples from the endocervical canal and endometrium. In endometrial biopsy, brush sampling increases the efficiency of cytological examination for detection of uterine body cancer compared to aspiration method of obtaining biological material. Additional genetic testing for oncogenic mutations of endometrial samples and endocervical scrapings

after brush biopsy leads to effective identification of patients with high risk of malignant changes in the endometrium.

Keywords: uterine cancer, aspiration biopsy, brush biopsy, liquid cytology, oncogenic mutations.

Введение

При ранней диагностике рака тела матки наиболее результативные показатели чувствительности и специфичности установлены для гистологического исследования образцов эндометрия, полученных при выскабливании стенок полости матки [1]. Ввиду инвазивности такого вмешательства, присутствия в определенной степени анестезиологических и хирургических рисков складывается потребность усовершенствования подходов к методам выявления доброкачественных и злокачественных изменений эндометрия [2]. Как результат, формируется необходимость в повышении диагностической информативности цитологического исследования образцов эндометрия, получаемых с минимальной инвазивностью в амбулаторных условиях [3]. Для выполнения такой задачи происходит совершенствование методических подходов в разных направлениях: разработка новых устройств для отбора биологических образцов, использование наряду с классической схемой приготовления и окрашивания препаратов жидкостной цитологии иммуноцитологического, а также молекулярно-генетического исследования тонкослойных препаратов, определение онкомаркеров в различных биологических средах, контактирующих с опухолью [4–6].

В России при амбулаторном осмотре женщин для раннего выявления гинекологического рака регулярно используется тест Папаниколау с получением соскобов с эпителия шейки матки и из цервикального канала [7], а также проводится аспирационная биопсия тканей эндометрия по Пайпелю [4]. В последнее время появились научные разработки – использование соскоба из цервикального канала как биологического материала для молекулярно-генетического исследования на предмет выявления рака тела матки [8]. В работе I. Kinde с соавторами было доказано, что циркулирующие опухолевые клетки при раке тела матки концентрируются в цервикальном канале в большей мере по сравнению с системным кровотоком [9]. Кроме того, перспектива развития цитологических методов исследования при диагностике рака тела матки может быть связана с совершенствованием отбора проб из эндометрия с помощью устройств для щеточной биопсии [10].

В связи с вышеизложенным **целью работы** явилось сравнить с гистологическим исследованием и выявить наибольшую эффективность совершенствований цитологических методов для раннего выявления рака тела матки.

Материал и методы исследования

Всего обследованы 259 пациенток с диагнозом «рак тела матки» и 103 женщины

контрольной группы без опухолевых заболеваний.

Критерии включения в исследование были следующими: пациентки, которым требовалось выскабливание стенок полости матки с последующим гистологическим исследованием образцов эндометрия, добровольное информированное согласие пациенток для участия в исследовании. Критерии исключения из исследования были следующими: пациенты с лихорадкой или острым воспалением, беременные, больные с верифицированным раком шейки матки, инфицирование вирусом папилломы человека по итогам жидкостной цитологии соскобов с шейки матки, онкологические заболевания иной локализации, чем рак тела матки, проведение специфического противоопухолевого лечения, недостаточное количество биологического материала для исследования.

Перед выскабливанием стенок полости матки методом случайного распределения пациенткам проводили забор материала с помощью щеток из цервикального канала и эндометрия либо осуществляли аспирационную биопсию тканей эндометрия. После верификации диагноза были отобраны 155 больных раком тела матки и 71 пациентка без опухолевой патологии, которым проведен забор образцов тканей из цервикального канала и эндометрия с помощью щеток. Кроме того, в работу были включены 104 пациентки с диагнозом «рак тела матки» и 32 женщины без опухолевых заболеваний, которым до выскабливания проводили аспирационную биопсию эндометрия по Пайпелю.

Забор биологического материала из цервикального канала проводили с использованием щетки браш из набора «Cytoscreen» (Hospitex, Италия). Полученный материал стабилизировали специальным раствором «Cyto-screen solution», клетки смывали в шейкере. С помощью световой микроскопии осуществляли цитологическое исследование окрашенного мазка на стекле. Инфицирование вирусом папилломы человека определяли иммуноцитохимическим методом. У этих же больных эндометрий отбирали с помощью щетки Tao-Brush IUMC (Cook Medical Inc., США). При введении щетка находилась в ограничительном чехле, чтобы на нее не попадал эпителий влагалища и шейки матки. После введения в полость матки и достижения дна матки чехол с помощью ручки оттягивали назад, а щетку поворачивали пятикратно на 360° по и против часовой стрелки. Далее наружный чехол вновь возвращали назад на щетку и извлекали устройство отбора из полости матки. Образцы тканей шейки матки и эндометрия помещали каждый в раствор, из которого выделяли дезоксирибонуклеиновую кислоту посредством набора для очистки QIAamp DNA micro (Qiagen N.V., Голландия). Далее методом полимеразной цепной реакции определяли наличие онкогенных мутаций в генах *PTEN*, *TP53*, *PIK3CA*, *PIK3R1*, *CTNNB1*, *KRAS*, *FBXW7*, *FGFR2*, *APC*, *POLE*. При наличии мутации хотя бы одного из генов тест считали положительным.

Забор ткани эндометрия при аспирационной биопсии проводили при помощи аспирационного двухканального катетера Pipelle (Laboratoire C.C.D., Франция). Полученную жидкость после аспирации центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость сливали, осадок оставляли для исследования. Из клеточного осадка готовили тонкослойные препараты для цитологического исследования. Фрагменты ткани эндометрия помещали в пробирки с формалином для гистологического исследования.

Статистический анализ проводили с использованием параметров доказательной медицины и компьютерной программы MedCalc 23.0.9 (Software Ltd.).

Результаты исследования и их обсуждение

У пациенток, включенных в работу, выскабливание стенок полости матки с последующим гистологическим исследованием образцов эндометрия проводили по причинам аномального маточного кровотечения в период пре- или постменопаузы, превышения толщины эндометрия при трансвагинальном ультразвуковом исследовании в постменопаузе более 5 мм, при гиперменорее, длительных менструальных кровотечениях и пролапсе матки. Возраст больных раком тела матки колебался от 43 до 76 лет, в среднем составив $62,3 \pm 2,6$ года. В контрольной группе возраст обследуемых был сходным, варьировал в диапазоне от 41 до 74 лет, среднее значение соответствовало $59,8 \pm 2,1$ года.

Среди больных с диагнозом «рак тела матки» I стадия заболевания была установлена у 166 (64,1%), II – у 38 (14,7%), III – у 37 (14,3%) и IV – у 18 (6,9%) пациенток. По гистологическому типу у всех пациенток была выявлена эндометриальная карцинома.

Результаты молекулярно-генетического исследования на онкогенные мутации образцов из цервикального канала, аспирационной биопсии по Пайпелю, цитологического исследования эндометрия, полученного при внутриматочной щеточной биопсии, а также молекулярно-генетического исследования на онкогенные мутации эндометрия представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты выявления рака тела матки в зависимости от метода и места забора биологического материала

Методика	Место забора биоматериала	Рак тела матки		Контрольная группа	
		«+»	«-»	«+»	«-»
Щеточная биопсия и молекулярно-генетическое исследование ¹	Цервикальный канал	102	53	6	65
Аспирационная биопсия ²	Эндометрий	80	24	3	29

Щеточная биопсия ³	Эндо метрий	128	27	0	71
Щеточная биопсия и молекулярно-генетическое исследование ⁴	Эндо метрий	140	15	0	71
p	$p_{mn} < 0,001$ $p_{1-2} = 0,05$, $p_{1-3} = 0,0008$, $p_{1-4} < 0,001$ $p_{2-3} = 0,26$, $p_{2-4} = 0,003$, $p_{3-4} = 0,047$				

Примечание: «+» – положительный результат теста, «-» – отрицательный результат теста, p – уровень значимости различия между группами больных, условно обозначенными цифрами, p_{mn} – уровень значимости различия при множественном сравнении между четырьмя группами

На основании распределения пациенток в зависимости от результатов обследования были рассчитаны параметры диагностической информативности различных методов и способов пробоотбора биологического материала для раннего выявления рака тела матки (табл. 2).

Таблица 2

Диагностическая информативность различных методов и способов пробоотбора биологического материала для раннего выявления рака тела матки

Методика	Место забора биоматериала	ДЧ, %	ДС, %	ДТ, %	AUC
Щеточная биопсия и молекулярно-генетическое исследование	Цервикальный канал	65,8	91,5	73,9	0,787
Аспирационная биопсия	Эндо метрий	76,9	90,6	80,1	0,838
Щеточная биопсия	Эндо метрий	82,6	100,0	83,3	0,913
Щеточная биопсия и молекулярно-генетическое исследование	Эндо метрий	89,7	100,0	92,9	0,948

Примечание: ДЧ – диагностическая чувствительность, ДС – диагностическая специфичность, ДТ – диагностическая точность, AUC – площадь под ROC кривой

Обнаружение онкогенных мутаций в клетках цервикального канала, где могут концентрироваться нуклеиновые кислоты циркулирующих опухолевых клеток, а также раковых клеток, подвергшихся апоптозу, некрозу при раке тела матки, имело чувствительность 65,8% и диагностическую специфичность 91,5%. Таким образом, биологический материал из цервикального канала после диагностики патологии шейки матки имеет потенциал для дальнейшего исследования уже с новой целью. При отсутствии рака

шейки матки и инфицирования вирусом папилломы человека выделенная дезоксирибонуклеиновая кислота при факторах риска рака тела матки может быть использована для генетического исследования на онкогенные мутации. Такая дополнительная информация с диагностической точностью 73,9% позволяет судить об опухолевой патологии эндометрия. Учитывая, что тест Папаниколау проводится при гинекологических осмотрах женщин в условиях диспансеризации, то одни и те же биологические образцы могут в зависимости от ситуации исследоваться с разной целью как в текущем режиме, так и ретроспективно. Использование нуклеиновых кислот из проб, отобранных при выполнении теста Папаниколау, для молекулярно-генетического исследования с целью выявления рака тела матки расширяет потенциал данной методики.

Аспирационная биопсия эндометрия по Пайпелю является распространенным методом исследования. Метод безопасен и прост в исполнении. Однако слепая случайная точечная биопсия приводит к высокому проценту ложноотрицательных результатов. Диагностическая чувствительность аспирационной биопсии по Пайпелю в проведенном исследовании составила 76,9%, а специфичность – 90,6%.

Качественный забор материала является одним из ключевых факторов успеха в цитологической диагностике рака тела матки. С этой целью разработано несколько инструментов для взятия образцов эндометрия при щеточной биопсии. К таким инструментам относится щетка Тао. Оболочка успешно защищает щетку от клеток шейки матки или влагалища, качество и площадь отбора материала во много раз возрастают по сравнению с аспирационной биопсией. Однако в России использование щеток для пробоотбора эндометрия в клинической практике происходит крайне редко.

В зарубежных исследованиях при полном секвенировании генов одни и те же мутации в ДНК у больных раком тела матки были установлены в биологических образцах мазка Папаниколау и операционном материале опухоли эндометрия в 100% случаев [9], а при секвенировании отдельных генов основных сигнальных путей диагностическая чувствительность составила 95%, а специфичность – 92% [10].

В работе при щеточной биопсии эндометрия чувствительность методики в отношении выявления рака тела матки составила 82,6%, а специфичность – 100%, что было близко к результатам других исследований [9, 10]. Дополнительное молекулярно-генетическое тестирование образцов эндометрия на онкогенные мутации статистически значимо повысило ($p=0,047$) чувствительность метода до 89,7% по сравнению с результатами цитологического исследования образцов из эндометрия, полученных при традиционной щеточной биопсии. Дополненная генетическим исследованием цитология образцов, отобранных при щеточной биопсии, также статистически значимо ($p=0,003$) была более эффективной по сравнению с

аспирационной биопсией по Пайпелю. При сравнительном анализе чувствительность молекулярно-генетического исследования на онкогенные мутации образцов из цервикального канала статистически значимо уступала методам обследования, когда биологическим материалом выступал эндометрий ($p < 0,05$).

Недостаточное количество материала для проведения цитологического исследования у больных раком тела матки при щеточной биопсии шейки матки встречалось у 3 из 158 (1,9%), при аспирационной биопсии эндометрия – у 8 из 112 (7,1%), при щеточной биопсии эндометрия – у 4 из 159 пациенток (2,5%). Данные образцы не исследовались. При аспирационной биопсии по Пайпелю трудности с получением материала были более выраженными и в основном были связаны с рубцовыми изменениями шейки матки и получением вместо образцов эндометрия большого количества пришеечной слизи. Установлено статистически значимое различие неудачных результатов отбора биологических образцов при щеточной и аспирационной биопсии ($p = 0,048$). Следовательно, щеточная биопсия, в отличие от аспирационной, легче выполняется, и отбор образцов происходит на более высоком качественном уровне. В контрольной группе неудачные результаты отбора проб зарегистрированы при щеточной биопсии шейки матки у 2 из 73 (2,7%), при аспирационной биопсии эндометрия – у 4 из 36 (11,1%) и при щеточной биопсии эндометрия – у 1 из 72 пациенток (1,4%). Однофакторный регрессионный анализ показал, что длительность менопаузы ($p = 0,018$) и жидкость в полости матки ($p = 0,004$) были факторами риска получения недостаточного количества образцов при аспирационной биопсии, в то время как толщина эндометрия ($p = 0,371$) таковым не являлась.

Спектр мутаций генов при мультиплексных полимеразных цепных реакциях совпадал при исследовании образцов из цервикального канала и эндометрия. Безусловно, концентрация раковых клеток в цервикальном канале при эндометриальной карциноме была меньше, чем в образцах эндометрия, что и объясняло меньшую чувствительность и специфичность генетического исследования в первом случае.

Заключение

При биопсии эндометрия пробоотбор с помощью щетки повышает эффективность цитологического исследования на предмет выявления рака тела матки по сравнению с аспирационным способом получения биологического материала. Информативность щеточной биопсии эндометрия возрастает при совместном использовании с генетическим тестом на онкогенные мутации. Мутационный скрининг биологического материала из цервикального канала расширяет диагностический потенциал жидкостного цитологического исследования по Папаниколау для выявления пациенток с высоким риском злокачественного изменения эндометрия.

Список литературы

1. Makker V., MacKay H., Ray-Coquard I., Levine D.A., Westin S.N., Aoki D., Oaknin A. Endometrial cancer // *Nature Reviews Disease Primers*. 2021. Vol. 7. P. 88.
DOI:10.1038/s41572-021-00324-8.
2. Tran A.Q., Gehrig P. Recent Advances in Endometrial Cancer // *F1000Research*. 2017. Vol. 6. P. 1. DOI:10.12688/f1000research.10020.1
3. Williams P.M., Gaddey H.L. Endometrial Biopsy: Tips and Pitfalls // *Am. Fam. Physician*. 2020. Vol. 101. P. 551-556.
4. Карпова А.Е., Шабалова И.П., Созаева Л.Г., Тумгоева Л.Б. Значение комплексного цитологического исследования в диагностике патологии эндометрия (обзор литературы) // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021. Т. 66. № 2. С. 87-94.
DOI:10.51620/0869-2084-2021-66-2-87-94.
5. Коваленко Н.В., Кит О.И., Максимов А.Ю., Демидова А.А. Возможности скрининга рака тела матки по содержанию молекулярных маркеров в моче и вагинально-цервикальном секрете // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023. Т. 68. № 3. С. 141-145.
DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-3-141-145.
6. Taraboanta C., Britton H., Plotkin A., Azordegan N., Clement P.B., Gilks C.B. Performance Characteristics of Endometrial Sampling in Diagnosis of Endometrial Carcinoma // *International Journal of Gynecological Pathology*. 2020. Vol. 39. Is. 1. DOI:10.1097/PGP.0000000000000569.
7. Каюкова Е.В. Роль жидкостной биопсии в выявлении и мониторинге рака шейки матки // *Сибирский онкологический журнал*. 2019. Т. 18. № 2. С. 92-101.
DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-2-92-101.
8. Wang Y., Li L., Douville C., Cohen J.D., Yen T.T., Kinde I., Sundfelt K., Kjaer S.K., Hruban R.H., Shih I.M., Wang T.L., Kurman R.J Evaluation of liquid from the Papanicolaou test and other liquid biopsies for the detection of endometrial and ovarian cancers // *Sci. Transl. Med*. 2018 Mar 21. Vol. 433. Is. 10. P. eaap8793. DOI:10.1126/scitranslmed.aap8793.
9. Kinde I., Bettegowda C., Wang Y., Wu J., Agrawal N., Shih I.M., Dao F., Levine D.A., Giuntoli R., Roden R., Eshleman J.R., Carvalho J.P., Marie S.K., Papadopoulos N. Evaluation of DNA from the Papanicolaou test to detect ovarian and endometrial cancers // *Sci. Transl. Med*. 2013. Vol. 5. P. 167ra4. DOI:10.1126/scitranslmed.3004952.
10. Raffone A., Raimondo D., Raspollini A., Oliviero A., Travaglino A., Santoro A., Renzulli F., Lopez G., Maio C., Casadio P., Zannoni G.F., Seracchioli R., Mollo A. Accuracy of cytological examination of Tao brush endometrial sampling in diagnosing endometrial premalignancy and

malignancy // Int. J. Gynaecol. Obstet. 2022 Dec. Vol. 159. Is. 3. P. 615-621.
DOI:10.1002/ijgo.14204.