

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
дополнительного профессионального образования
РОССИЙСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ НЕПРЕРЫВНОГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

На правах рукописи

Карпова Асель Ерсаиновна

**ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ИНФОРМАТИВНОСТЬ КОМБИНИРОВАННОГО
ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ГИПЕРПЛАЗИИ,
АТИПИЧЕСКОЙ ГИПЕРПЛАЗИИ ЭНДОМЕТРИЯ И
ЭНДОМЕТРИОИДНОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЕ**

3.3.8. – Клиническая лабораторная диагностика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
д.м.н., профессор, профессор кафедры
клинической лабораторной диагностики
с курсом лабораторной иммунологии
ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России
Шабалова Ирина Петровна

Москва, 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ПАТОЛОГИИ ЭНДОМЕТРИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	16
1.1. Патологические состояния эндометрия, классификация	16
1.2. Сравнительная характеристика различных методов диагностики патологии матки.....	19
1.3. Цитологический метод исследования патологии эндометрия.....	22
1.3.1. Материал для цитологического исследования.....	23
1.3.2. Цитологические особенности клеток эндометрия в течение менструального цикла и в постменопаузе	25
1.3.3. Цитологические особенности патологии эндометрия, классификации.....	26
1.3.4. Метод жидкостной цитологии	30
1.3.5. Сравнительный анализ современных методов исследования патологии эндометрия.....	31
1.4. Применение иммуноцитохимического и иммуногистохимического методов в диагностике рака эндометрия.....	32
РЕЗЮМЕ.....	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	40
2.1. Материалы исследования.....	40
2.2. Методы исследования	45
2.3. Статистический анализ результатов исследования.....	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭНДОМЕТРИЯ.....	59
3.1. Цитологическое исследование эндометрия.....	59
3.2. Иммуноцитохимическое исследование эндометрия.....	90
ГЛАВА 4. РАСЧЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ МЕТОДОВ ТРАДИЦИОННОЙ И ЖИДКОСТНОЙ ЦИТОЛОГИИ.....	96
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100
ВЫВОДЫ.....	103

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	105
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	107

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы диссертационного исследования

По данным ВОЗ в 2020 г. в мире зарегистрировано 417 367 новых случаев рака тела матки (РТМ) (Н. Sung, 2021). В России также отмечается неуклонный рост заболеваемости РТМ. Так в 2011 году выявлено 20821 новых случаев впервые в жизни установленных диагнозов РТМ, в 2021 – 25482 (А.Д. Каприн, 2022). В структуре РТМ более 80% занимает рак эндометрия (РЭ). Среди злокачественных новообразований (ЗНО) органов женской репродуктивной системы РЭ в развитых странах занимает первое место. Основную часть РЭ составляет эндометриодная аденокарцинома.

Обязательным этапом диагностики неопластических процессов эндометрия, определяющим лечебную тактику и прогноз заболевания, является морфологическое исследование соскобов из слизистой оболочки матки.

Золотым стандартом морфологической диагностики в настоящее время считают гистологическое исследование (ГИ), но оно, так же как любой диагностический метод, обладает рядом недостатков. Следует констатировать, что применение данного вида морфологического исследования сопряжено с неизбежными анестезиологическими и хирургическими рисками в ходе проведения раздельного диагностического выскабливания (РДВ), что требует поиска новых подходов к диагностике патологических состояний эндометрия в направлении снижения инвазивности вмешательства, а также возможности более широкого применения метода в амбулаторных условиях.

Поэтому большой интерес представляет совершенствование цитологического метода исследования материала из полости матки, особенно в связи с минимизацией сопутствующих рисков при высоком потенциале диагностической информативности. Важно определить возможности и ограничения цитологической диагностики патологии эндометрия.

Принятие цитологического исследования (ЦИ) в качестве диагностической процедуры в прошлом было затруднено из-за сложностей, возникающих при

интерпретации результатов традиционного цитологического исследования эндометрия; влияние оказывают такие факторы как наличие избыточного количества крови или элементов воспаления, чрезмерное нагромождение клеток, их искажение или наличие плотных плохо просматриваемых структур, скудность клеточного состава и наличие артефактов фиксации) [111]. Это, по-видимому, является причиной того, что цитологическое исследование материала из полости матки только частично принято в Японии и мало практикуется в остальном мире [83]. В России цитологическое исследование аспиратов и смывов из полости матки в прошлом использовалось достаточно широко; в настоящее время в соответствии с Клиническими рекомендациями его нередко вытесняет гистологическое исследование материала РДВ [13, 14].

В настоящее время в гинекологической практике помимо традиционного (классического) метода приготовления и окрашивания препаратов (традиционная цитология (ТЦ) применяют метод жидкостной цитологии (ЖЦ) [8]. Метод основан на технологиях приготовления стандартных тонкослойных цитологических препаратов из клеточного материала (эксфолиативного, биопсийного, операционного, полученного при диагностическом выскабливании, пункции и др.), помещенного в специальную среду. Метод жидкостной цитологии в последние годы всё чаще используется в морфологической диагностике реактивных изменений и опухолей. В сравнении с мазками, приготовленными традиционными методами, тонкослойные препараты, как правило, более информативны, их качество практически не зависит от качества работы лаборанта [16]. Получающиеся тонкослойные препараты можно использовать при необходимости для проведения иммуноцитохимических исследований (ИЦХИ) [11]. Кроме того, из этого материала можно осуществлять приготовление клеточных блоков; при наличии в пунктате или соскобе тканевых фрагментов из патологического очага - получать информацию о его гистологическом строении, а также использовать эти блоки для проведения иммуногистохимического исследования (ИГХИ) [55]. Техника жидкостной цитологии, первоначально разработанная для гинекологических цервикальных мазков, постепенно завоевала признание при применении в

негинекологических локализациях и при исследовании клеточного материала, полученного путем тонкоигольной аспирационной биопсии [54, 62]. Жидкостная цитология имеет важное значение, дополняя традиционный метод исследования и улучшая качество цитологической диагностики.

Трудности при оценке жидкостных препаратов обусловлены тем, что морфологические критерии препаратов жидкостной цитологии при исследовании материала эндометрия изучены недостаточно. По этой причине необходим параллельный анализ традиционного цитологического препарата и определение возможности проведения иммуноцитохимического исследования.

Таким образом, совершенствование цитологического метода диагностики путем применения комбинированного морфологического исследования соскобов из полости матки и операционного материала, разработка объективных критериев дифференциальной цитологической диагностики патологических состояниях эндометрия с использованием традиционной и жидкостной цитологии и иммуноцитохимического исследования является актуальной темой в решении проблемы установления диагноза при гиперплазиях эндометрия без атипии, атипической гиперплазии и рака эндометрия.

Оценка характера патологического процесса в эндометрии с использованием световой микроскопии продолжает оставаться традиционным методом исследования, однако не решает всех поставленных задач, в частности, не позволяет оценить морфологические и молекулярные особенности неопухолевых поражений и опухолей эндометрия; это требует актуализации и разработки объективных дифференциальных критериев при различных патологических состояниях.

Это явилось основанием для разработки цели и задач диссертационного исследования.

Анализ доступной научной литературы показал, что в настоящее время имеется необходимость повышения качества диагностики заболеваний эндометрия.

Степень разработанности темы исследования

По данным научной литературы успешное внедрение метода жидкостной цитологии в общую клиническую и онкологическую практику открыло широкие возможности для улучшения своевременной диагностики рака шейки матки [18], рака мочевого пузыря [19] и злокачественных опухолей других локализаций; возможности метода при раке эндометрия изучены недостаточно.

Установлено, что применение жидкостной цитологии при раке эндометрия позволяет повысить эффективность цитологического исследования за счет стандартизации препаратов и дает возможность использовать их в дальнейшем для иммуноцитохимических, цитогенетических, морфометрических исследований [Wang Q., 2019, Shinagawa A., 2018].

Новые возможности в улучшении качества диагностики при заболеваниях эндометрия связаны с развитием методов обработки материала и применением дополнительных методов исследования, в числе которых — иммуноцитохимическое исследование.

В соответствии с этим актуальность данного исследования обусловлена необходимостью определения возможностей улучшения цитологической диагностики, разработкой цитологических критериев гиперплазии эндометрия без атипии, атипической гиперплазии и эндометриоидной аденокарциномы на препаратах, приготовленных методом жидкостной цитологии, сравнение эффективности традиционной и жидкостной цитологии, проведения иммуноцитохимического исследования и их комбинированного применения; а также в работе будет разработан алгоритм использования различных методик в определении характера поражения эндометрия.

Цель исследования

Совершенствование цитологической диагностики гиперплазии, атипической гиперплазии эндометрия и эндометриоидной аденокарциномы.

Задачи исследования

1. Сравнить результаты цитологической диагностики по традиционным мазкам и препаратам, приготовленным методом жидкостной цитологии автоматизированным и ручным способом, с результатами гистологического исследования при гиперплазии, атипической гиперплазии эндометрия и эндометриоидной аденокарциноме.

2. Оценить диагностическую информативность цитологической диагностики по материалу из полости матки при гиперплазии, атипической гиперплазии эндометрия и эндометриоидной аденокарциноме.

3. Уточнить цитологические критерии, позволяющие дифференцировать гиперплазию эндометрия без атипии, атипическую гиперплазию и эндометриоидную аденокарциному.

4. Оценить экспрессию маркеров PTEN, СЕА, p63, p53 в материале жидкостной цитологии при гиперплазии, атипической гиперплазии и эндометриоидной аденокарциноме.

5. Разработать алгоритм исследования материала из полости матки у пациенток с подозрением на патологию эндометрия, включающий комбинированное использование традиционной, жидкостной цитологии и иммуноцитохимического исследования.

Научная новизна результатов диссертационной работы

Полученные соискателем ученой степени научные данные сопоставимы с данными, опубликованными ранее (Q. Wang, 2019, F. Yanaki, 2019), вместе с тем, представления о применении метода жидкостной цитологии в исследовании материала из полости матки у пациенток с подозрением на патологию эндометрия расширены, дополнена информация о взаимосвязи экспрессии маркеров PTEN, СЕА, p53, p63 в материале эндометрия у пациенток с атипической гиперплазией и эндометриоидной аденокарциномой.

Оценена диагностическая информативность методов традиционной и жидкостной цитологии при исследовании материала эндометрия у пациенток без

морфологической патологии эндометрия, у пациенток с гиперплазией эндометрия, с атипической гиперплазией и эндометриоидной аденокарциномой эндометрия.

Определено, что в отношении выявления гиперплазии эндометрия без атипии наибольшей чувствительностью обладает метод традиционной цитологии, наибольшей специфичностью – метод жидкостной цитологии. В отношении выявления эндометриоидной аденокарциномы наибольшей чувствительностью обладает метод жидкостной цитологии, а показатель специфичности одинаков при традиционной и жидкостной цитологии. При объединении пациенток с атипической гиперплазией и эндометриоидной аденокарциномой эндометрия в одну группу, показатели чувствительности и специфичности традиционной и жидкостной цитологии достигали одинаковых значений.

Впервые обоснованы возможности совместного применения двух методов цитологической диагностики (традиционный и жидкостный) при гиперплазии эндометрия без атипии, атипической гиперплазии и эндометриоидной аденокарциноме с определением диагностической значимости каждого из них. На основании сравнения результатов традиционной и жидкостной цитологии с результатами гистологического исследования, доказано, что комбинированное применение традиционной и жидкостной цитологии способствует повышению эффективности диагностики патологических состояний эндометрия.

Оценена экспрессия иммуноцитохимических маркеров PTEN, СЕА, p63, p53 на материале жидкостной цитологии для диагностики гиперплазии эндометрия без атипии, атипической гиперплазии и эндометриоидной аденокарциномы и установлено, что из использованных в работе маркеров экспрессия СЕА имеет корреляционную связь с наличием атипической гиперплазии эндометрия и эндометриоидной аденокарциномы, и данный маркер может быть использован в качестве дополнительного метода в дифференциальной диагностике.

На основании результатов научно обоснована необходимость цитологического исследования материала эндометрия в многопрофильной медицинской организации. Подробно представлены диагностические критерии гиперплазии эндометрия без атипии, атипической гиперплазии и эндометриоидной

аденокарциномы с описанием цитологических особенностей этих нозологических форм в традиционных и жидкостных препаратах и микрофотографиями с препаратов.

Разработан алгоритм комбинированного цитологического исследования материала из полости матки у пациенток с подозрением на патологию эндометрия, включающий использование традиционной, жидкостной цитологии и иммуноцитохимического исследования.

Теоретическая и практическая значимость работы

Сформулирована концепция оценки значения комбинированного цитологического исследования, используемая для диагностики гиперплазии эндометрия без атипии, атипической гиперплазии и эндометриоидной аденокарциномы. Разработана научная идея совместного использования традиционной, жидкостной цитологии и иммуноцитохимического исследования для повышения эффективности и точности диагностики, что дало возможность расширить имеющиеся знания морфологических особенностей цитологических картин (традиционная и жидкостная цитология) и пополнить знания о значении маркеров PTEN, CEA, p63, p53 в дифференциальной диагностике гиперплазии эндометрия без атипии, атипической гиперплазии и эндометриоидной аденокарциномы.

Совместное применение традиционной и жидкостной цитологии позволяет повысить точность дооперационной диагностики патологических состояний эндометрия. Продемонстрированы преимущества жидкостной цитологии, в частности, возможность проводить дополнительно иммуноцитохимическое исследование.

Определение экспрессии иммуноцитохимических маркеров (из используемых в работе наиболее эффективным явился раково-эмбриональный антиген (CEA)) на материале жидкостной цитологии позволяет повысить эффективность дооперационной диагностики. Разработан диагностический алгоритм при исследовании материала из эндометрия, базирующийся на

совместном применении традиционной и жидкостной цитологии с использованием при необходимости иммуноцитохимического исследования.

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационной работы является комбинированный подход к исследованию материала эндометрия с применением иммуноцитохимического исследования, выполненного с использованием жидкостной цитологии в дополнение к традиционному цитоморфологическому исследованию.

Приготовление препаратов для цитологического исследования осуществляли двумя методами: методом традиционной цитологии с окраской по Паппенгейму и методом жидкостной цитологии с последующей окраской по Папаниколау.

Для приготовления препаратов методом жидкостной цитологии материала эндометрия были использованы две технологии: ручной метод на основе центрифугирования и автоматизированный метод с использованием технологии фильтрации.

Окрашивание по Папаниколау тонкослойных препаратов производили на автоматическом приборе Эмкостейнер АФОМК-25.

Имуноцитохимическое исследование осуществляли непрямым иммуноферментным методом в ручном режиме в несколько этапов по протоколу с применением антител к p53, СЕА, РТЕН, р63 и системы детекции PrimeVision.

Все цитологические препараты анализировали с применением светового микроскопа «Axioskop» (Carl Zeiss, Германия), объективы x10, x40, x100.

Статистическую обработку результатов исследования проводили по общепринятым методикам с использованием пакета StatTech v. 2.6.2. Для расчета показателей чувствительности, специфичности, положительной прогностической ценности, отрицательной прогностической ценности и диагностической точности использовали стандартную четырехпольную таблицу сопряженности. Статистически достоверными считались различия между сравниваемыми величинами при критическом уровне значимости $p < 0,05$.

Степень достоверности результатов

В результате детального теоретического анализа проблемы, а также адекватными поставленным задачам и обоснованными методами исследования, достаточной выборкой обследованных (136 пациенток) были обеспечены высокая степень достоверности и обоснованности полученных результатов, научных положений, выводов и практических рекомендаций научного исследования. Достоверность результатов исследования также подтверждается достаточным объемом проведенных цитологических исследований: 460 цитологических исследований (методом традиционной цитологии - 136, методом жидкостной цитологии - 136, иммуноцитохимическим методом исследования – 188) и применением современных методов обработки и анализа материала с использованием корректного статистического инструментария. Результаты проведенного исследования документированы графиками, таблицами, фотографиями и схемами. Полученные результаты исследования не противоречат существующим положениям и сопоставимы с данными других исследований.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Комбинированное цитологическое исследование материала из эндометрия, включающее в себя совместное применение традиционной, жидкостной цитологии и иммуноцитохимического метода исследования, коррелирует с результатами гистологического исследования и приводит к снижению количества неинформативного материала, по сравнению с использованием традиционной и жидкостной цитологии по отдельности, что повышает эффективность и точность диагностики при гиперплазии эндометрия без атипии, атипической гиперплазии и эндометриоидной аденокарциноме.

2. Использование разработанных критериев дифференциальной диагностики гиперплазии эндометрия без атипии, атипической гиперплазии эндометрия и эндометриоидной аденокарциномы по материалу жидкостной цитологии имеет важное значение для более точной постановки цитологического заключения.

3. Предложенный алгоритм исследования материала эндометрия в диагностике гиперплазии эндометрия без атипии, атипической гиперплазии и эндометриоидной аденокарциномы обосновывает целесообразность комбинированного применения методов традиционной, жидкостной цитологии и иммуноцитохимического исследования, что способствует повышению точности диагностики.

Личный вклад автора

Автором диссертационной работы самостоятельно установлена актуальность исследования, сформулирована его тема, цель и задачи, разработан дизайн, определены методы исследования. Автор проанализировал отечественные и зарубежные публикации по теме диссертационного исследования, определил проблематику по данной теме. Диссертантом проведен сбор и обработка биоматериала, приготовлены цитологические и иммуноцитохимические препараты, сделаны микрофотографии с цитологических препаратов. Автор принимал непосредственное участие в интерпретации результатов цитологического и иммуноцитохимического исследования. Автором проведена математико-статистическая обработка полученных данных и представлены критериальные значения цитологических методов исследований для дифференциальной диагностики гиперплазии эндометрия от атипической гиперплазии и РЭ эндометриоидной аденокарциномы по материалу жидкостной цитологии. Автор проанализировал полученные результаты, сформулировал выводы и практические рекомендации, а также принял непосредственное участие в подготовке презентаций и публикаций по материалам исследования.

Публикации результатов исследования

По теме исследования опубликовано 5 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертационных исследований.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты диссертационной работы внедрены в практическую деятельность клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ ГKB им. С.П. Боткина, что подтверждается актом о внедрении № 1-21/3398 от 20.05.2022. Основные положения и выводы диссертационного исследования, включены в соответствующий раздел основной образовательной программы – программы подготовки специалистов в ординатуре по специальности клиническая лабораторная диагностика, а также включены в учебный план циклов профессиональной переподготовки специалистов и повышения квалификации врачей на кафедре клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Министерства здравоохранения РФ (акт внедрения от 01.09.2022). По материалам диссертационной работы выполнены микрофотографии с цитологических препаратов пациенток с различными клиническими проявлениями и особенностями развития патологических состояний эндометрия; использование данного материала имеет важное значение при подготовке лекций и проведении занятий по патологии эндометрия с курсантами кафедры КЛД РМАНПО.

Апробация результатов исследования

Основные положения и результаты диссертации были изложены на XIV Общероссийском научно-практическом семинаре «Репродуктивный потенциал России: версии и контраверсии» (Сочи, 2020), на XXV Юбилейной всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Наука и практика лабораторных исследований» (Москва, 2020), на VII Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2021), на VIII Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2022), на IX Республиканском Конгрессе специалистов клинической лабораторной диагностики Республики Беларусь (Минск, 2023), на XXVIII Всероссийской научно-практической конференции «Наукоемкие лабораторные технологии для клинической практики» (Москва, 2023), на International Conference «Cancer and Breast Cancer Therapy» (Dubai, UAE, 2023),

на III Научно-практической конференции с международным участием «Здоровье женщины, плода, новорожденного» (Санкт-Петербург, 2023), на XXVIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационное исследование соответствует паспорту специальности 3.3.8. - Клиническая лабораторная диагностика (медицинские науки), п.1. «Основы теории клинической лабораторной диагностики. Определение качественных и количественных характеристик морфологических, химических и других параметров биологических материалов», п.8. «Морфологические (цитологические) исследования биоматериала».

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 120 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы по теме диссертации, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. В работу включены 49 рисунков и 12 таблиц. Библиографический указатель состоит из 115 источников, в том числе 39 отечественных и 76 зарубежных авторов.

ГЛАВА 1.

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ПАТОЛОГИИ ЭНДОМЕТРИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Патологические состояния эндометрия, классификации

Рак тела матки – симптомное заболевание, основным признаком которого считают кровянистые выделения из половых путей: ациклические или на фоне постменопаузы. Более чем у 80% пациенток заболевание диагностируют на ранних (I–II) стадиях опухолевого процесса. С этим связаны благоприятный прогноз и низкие показатели одногодичной летальности больных [98, 26].

В структуре ЗНО тела матки более 80% составляет РЭ, а именно эндометриоидная аденокарцинома. Редкие морфологические формы РЭ представлены в основном муцинозным, серозным и светлоклеточным фенотипами, и число их не превышает 15-20% [25]. РЭ в более 90% всех случаев приходится на женщин старше 50 лет, при этом средний возраст заболевших РЭ как в России, так и в большинстве стран Евроатлантического блока составляет 63 года [49, 26].

По классификации Я.В. Бохмана [Я.В. Бохман, 1989], патологические состояния эндометрия делятся на [1]:

- фоновые заболевания (железистая гиперплазия, полипы эндометрия);
- предраковые заболевания (атипическая гиперплазия I, II, III степени);
- рак эндометрия (РЭ).

В 2020 г. ВОЗ принимает новую (действующую) классификацию опухолей тела матки, выделяющую следующие категории поражений эндометрия [107]:

Эпителиальные опухоли и предопухолевые процессы:

- Предопухолевые процессы
 - Гиперплазия эндометрия без атипии
 - Атипическая гиперплазия эндометрия

- Эндометриальные карциномы
- Эндометриоидная аденокарцинома
 - Серозная карцинома
 - Светлоклеточная карцинома
 - Недифференцированная и дедифференцированная карцинома
 - Смешанная карцинома
 - Мезонефральная аденокарцинома
 - Другие эндометриальные карциномы
 - Карциносаркома

Опухолеподобные поражения

- Эндометриальный полип
- Эндометриальная метаплазия
- Реакция Ариас-Стеллы

Мезенхимальные опухоли

- Гладкомышечные опухоли
- Стромальные и ретикулярные опухоли эндометрия
- Различные мезенхимальные опухоли

Смешанные эпителиальные и мезенхимальные опухоли

- Аденомиома
- Атипическая полипоидная аденомиома
- Аденосаркома

Гиперплазия эндометрия (ГЭ) – гормонально зависимая патология эндометрия, развивающаяся на фоне относительной или абсолютной гиперэстрогемии и проявляющаяся в виде морфологических изменений желез и стромы эндометрия [6].

ГЭ без атипии, предыдущими эквивалентными терминами являлись «железистая» и «железисто-кистозная» ГЭ, при гистологическом исследовании характеризуется повышением числа железистых и стромальных структур; при этом первые преобладают незначительно. Эндометрий увеличивается в объеме, изменяется его структура: строма и железы активны, железы располагаются

неравномерно, наблюдается кистозное расширение некоторых из них, сосуды в строме располагаются равномерно, атипия ядер отсутствует.

Второй вариант гиперпластического состояния эндометрия без атипии, ранее называемый сложной (аденоматозной) ГЭ, характеризуется более значительной перестройкой железистого компонента: пролиферация желез более выраженная; железы приобретают неправильную структуру и форму, нарушается баланс между разрастанием стромы и желез, среди многочисленных желез разной формы и величины преобладают ветвящиеся, со складчатостью в направлении просвета железы, более выражена многоядерность эпителия, атипия ядер отсутствует, сосуды распределены неравномерно.

Атипическую гиперплазию эндометрия (АГЭ) относят к облигатно предраковому процессу; выделяют преимущественно структурную (аденоматозную) и клеточную АГЭ. Атипическая гиперплазия эндометрия (аденоматоз, атипическая железистая гиперплазия) характеризуется более выраженными пролиферативными изменениями эпителиального компонента с атипией строения желез (формы и расположения). Как правило отмечается преобладание объема желез над объемом стромы [37].

Отличительным признаком АГЭ является наличие атипии клеток желез без изменений стромы. АГЭ проявляется в изменении нормального расположения ядер железистых клеток и их необычной, зачастую округлой форме. Эпителий проявляет повышенную митотическую активность, наблюдаются патологические митозы. Встречаются ядра клеток с признаками полиморфизма, довольно часто обнаруживают крупные ядрышки. Железы имеют причудливую форму, напоминают картину «железа в железе». К характерным признакам АГЭ относят: клеточную дисполяриность, анизоцитоз, увеличение размера и гиперхромия ядер, эозинофилию цитоплазмы, расширение вакуолей [12].

Полипсы эндометрия в большинстве наблюдений образуются на фоне неизменной слизистой оболочки, в связи с чем, в современных классификациях не отнесены к гиперпластическим процессам эндометрия [3].

Эндометриоидная аденокарцинома (ЭА) – наиболее часто встречающаяся злокачественная опухоль тела матки (80%), которая в большинстве наблюдений (80-85%) является эстроген-зависимой опухолью и только на 15-20% – эстроген-независимой.

Серозная форма аденокарциномы встречаются крайне редко, светлоклеточная (мезонефрогенная) аденокарцинома – у 4% пациенток с РЭ. В зависимости от уровня дифференцировки выделяют высокодифференцированную, умереннодифференцированную и низкодифференцированную аденокарциному [11].

Около 3% злокачественных новообразований матки составляют неэпителиальные опухоли (саркомы) матки.

1.2. Сравнительная характеристика различных методов диагностики патологии матки

В настоящее время значительное место в диагностике патологии эндометрия исследователи отводят биохимическим методам, среди которых актуальными являются определения маркеров окислительной модификации белков, сопровождающихся необратимыми изменениями тканей [33]. Отработанными и достаточно надежными, хотя и не лишенными недостатков, авторы считают иммунофлюоресцентную и гистохимическую методику исследования ткани эндометрия с обнаружением выделившихся в эндометриальную слизь ферментов и их изоформ [38], определение в смывах из полости матки опухолевых маркеров [38]; содержание карбонильных групп белка [5], ЦИ аспирата из полости матки [35]. Эхографическое исследование органов репродуктивной системы при эндометриозе получило широкое распространение среди аппаратных методов [4].

Среди дополнительных методов диагностики патологии эндометрия описано радионуклидное исследование [35]. Ведущее место в диагностике внутриматочной патологии занимает гистероскопия [28], для которой авторами показана отрицательная прогностическая ценность на уровне более 97%, когда в полностью визуализированной полости матки не обнаруживаются структурных отклонений и

когда эндометрий кажется однородно тонким [50]. Авторы уточняют, что гистероскопия является полезным диагностическим инструментом, но для диагностики патологических состояний эндометрия должна дополняться биопсией эндометрия [34]. Максимально применяемым в настоящее время является метод диагностики патологии эндометрия, основанный на ГИ соскоба из полости матки [43, 36].

Одним из инструментальных методов выявления патологии эндометрия является трансвагинальное ультразвуковое исследование (УЗИ). Трансвагинальное УЗИ является наиболее распространенным диагностическим тестом, который позволяет измерить толщину эндометрия [105]. УЗИ органов малого таза (вне кровотечения) имеет большую информативную ценность. При выполнении УЗИ максимальное значение переднезаднего размера М-эхо (изображение двух слоев эндометрия, относящихся к противоположно расположенным стенкам матки в плоскости сканирования, и линию смыкания между этими слоями) принимают за толщину эндометрия [21]. Увеличение М-эхо рассматривают в качестве основного прогностического маркера патологических состояний эндометрия. На величину М-эхо у менструирующих женщин оказывает влияние фаза менструального цикла. Максимальные значения величины М-эхо достигаются в позднюю стадию секреции - 16 мм. В целях определения возможной патологии эндометрия у женщин репродуктивного и перименопаузального возраста УЗИ выполняют на 5-7-й день менструального цикла [6].

УЗИ считается первым шагом в оценке состояния женщин с постменопаузальным кровотечением [73]. Женщины в постменопаузе могут подвергаться более высокому риску поражения эндометрия. Данный фактор очень важен, поскольку именно состояние постменопаузального эндометрия (линейный тип М-эхо) формирует некоторое понятие нормы при ультразвуковом сканировании, что может быть использовано в качестве скринингового теста [29]. Исследования J.W. Moroney с соавт. (2007 г.) показали, что серьезные патологические изменения в период менопаузы обнаруживают только у женщин с симптомами кровотечения; ни у одной из бессимптомных женщин в период

менопаузы не было выявлено гиперплазии или карциномы эндометрия [78]. Вместе с тем, по данным одной из работ, вероятность развития предракового поражения эндометрия в постменопаузе выше у бессимптомных женщин, у которых в мазках из шейки матки выявлены нормальные клетки эндометрия, чем у женщин, у которых в мазках нормальные клетки эндометрия отсутствуют. Также было установлено, что значительная патология эндометрия была обнаружена у 11,6% пациенток в постменопаузе по сравнению с 2,3% в контрольной группе и ни у одной из пациенток в пременопаузе. Поэтому, оценка эндометрия рекомендуется для всех женщин, у которых обнаружены нормальные клетки эндометрия в постменопаузе независимо от симптомов [114].

Статистический анализ данных при обследовании пациенток с аномальными маточными кровотечениями в постменопаузе показал, что максимальная чувствительность УЗИ в отношении РЭ достигается при толщине эндометрия 3-4 мм, и находится в обратной зависимости от толщины эндометрия. Чувствительность УЗИ в выявлении РЭ при М-эхо 4 мм составляет 90,6% и увеличивается до 96,9% при М-эхо до 3 мм. При этом точность теста, специфичность и положительная прогностическая ценность при такой толщине эндометрия являются очень низкими [34].

S. Granberg с соавт. полагают, что толщина эндометрия у женщин в постменопаузе, равная 5 мм и менее, позволяет с высокой (96%) вероятностью исключить заболевание слизистой оболочки тела матки [58].

В отношении диагностики и прогнозирования РЭ УЗИ имеет низкую специфичность из-за высокого уровня ложноположительных результатов [16]. Потенциал УЗИ как скринингового теста подрывается его неспособностью надежно различать доброкачественные и злокачественные поражения, что подвергает женщин без патологии ненужным инвазивным процедурам и связанным с ними осложнениями. О его высоком ложноположительном уровне свидетельствует тот факт, что лишь у одной из 50 женщин, у которых выявлены отклонения по данным УЗИ, после прохождения дополнительных диагностических процедур было доказано наличие РЭ [105]. С. Yasa с соавт. (2016 г.) выполнили ретроспективное

когортное исследование. Обследовано 276 бессимптомных женщин в постменопаузе, которые проходили дилатацию, выскабливание и гистероскопию, на предмет случайного обнаружения с помощью УЗИ утолщенного эндометрия (≥ 4 мм). В итоге было отмечено, что регулярное использование измерения толщины эндометрия с помощью УЗИ не является эффективным диагностическим инструментом для диагностики РЭ, поскольку имеет низкие диагностические показатели у бессимптомных женщин в постменопаузе [112].

Гипердиагностика РЭ приводит к необоснованному риску и предсказуемым осложнениям. Выявленные при УЗИ, патологические изменения в эндометрии, подразумевают дальнейший диагностический поиск, включающий биопсию эндометрия или кюретаж полости матки для проведения гистологического исследования. «Золотым стандартом» в комплексной оценке состояния эндометрия в репродуктивном возрасте считают ГИ эндометрия в середине фазы пролиферации на 7–10-й день менструального цикла с последующей оценкой его рецепторного статуса при помощи ИГХИ [9].

Однако выполнение таких инвазивных процедур, как биопсия и кюретаж, может привести к таким осложнениям, как аномальные маточные кровотечения, развитие инфекции и внутриматочных синехий, в редких случаях возможна даже перфорации матки; также есть риск, связанный с анестезиологическим пособием. Отдельно необходимо отметить, что при проведении данных манипуляций возможно возникновение психологического дискомфорта и периоперационного стресса. Поэтому проведение данных процедур у всех пациенток с подозрением на патологию эндометрия считают проблематичным [95, 26].

1.3. Цитологический метод исследования патологии эндометрия

Метод ЦИ эндометрия по сравнению с гистологическим является менее инвазивным, более легко выполняемым, менее дорогостоящим, имеющим возможность многократного повторения исследования. Разные авторы отмечают как достоинства, так и недостатки этого метода. Основными трудностями при его использовании являются различные факторы, такие как морфологические

изменения в разные периоды менструального цикла, степень дифференцировки опухолевых клеток, сложности, связанные с частотой забора материала, квалификацией врача и другие [20, 30, 41].

В.И. Новик отмечает выявление РЭ при цитологическом исследовании в 84-100 % наблюдений. А регенераторные изменения, возникающие после РДВ, могут быть причиной гипердиагностики атипической гиперплазии или РЭ [22, 23]. Зарубежные коллеги признали, что ЦИ эндометрия является полезным методом диагностики с высокой чувствительностью и специфичностью при выявлении эндометриальных нарушений [109]. В Японии ЦИ материала из полости матки является первым шагом для оценки состояния эндометрия у женщин с подозрением на карциному [95].

Во многих учреждениях материал, полученный из эндометрия, наносится непосредственно на стекло (ТЦ), но всё большую популярность приобретает метод ЖЦ, основанный на технологии приготовления стандартных тонкослойных цитологических препаратов из жидкой клеточной взвеси. При ТЦ высок уровень неадекватных образцов в связи с наличием белка, слизи и компонентов крови [95]. Число неадекватных образцов, приготовленных методом ЖЦ, ниже, чем у образцов, приготовленных традиционным методом [95]. Однако в литературе мы не нашли данных о том, как влияет на результаты цитологической диагностики совместное использование двух методов.

1.3.1. Материал для цитологического исследования

Материал для цитологического исследования оптимально получать в пролиферативной (на 6-9-е сутки менструального цикла) или в секреторной фазе, но не позднее, чем за 5 суток до предполагаемого дня начала менструации. во время менструации и перед ней материал брать не рекомендуется, так как дегенеративные изменения в клетках могут быть причиной ошибочного цитологического диагноза [11]. Клеточный состав мазков из полости матки меняется в разные фазы менструального цикла и менопаузального статуса (перименопауза, постменопауза). Сохранное состояние клеток зависит от методов,

используемых для получения материала, приготовления и окрашивания препаратов.

Способы получения материала из полости матки для ЦИ [11, 37]:

1. Соскобы слизистой оболочки полости матки (brush-биопсия)
2. Аспирация содержимого полости матки
3. Смывы физиологическим раствором
4. Отпечатки с Пайпель биоптата.

В цитологическом материале выделяют следующие типы клеток эндометрия:

- Эндометриальные эпителиальные клетки:
 - секреторирующие клетки (цилиндрические или кубические);
 - реснитчатые (мерцательные);
 - вставочные (добавочные);
- Поверхностные и глубокие стромальные клетки:
 - типа фибробластов;
 - гистиоциты;
 - лейкоциты.

В цитологических препаратах могут также обнаруживаться капилляры, часто окруженные стромальными клетками [37]. В материале из полости матки, могут встретиться эндоцервикальные клетки, реже – клетки плоского и метаплазированного эпителия. В связи с чем, важно учитывать дифференциальные признаки эндометриальных (эпителиальных и стромальных) и эндоцервикальных клеток. Эпителиальные эндометриальные клетки располагаются в структурах сотоподобного вида, а также в виде обширных пластов и трубочек. Тип клеток: низкопризматический, кубический. Клетки имеют округлую или овальную форму, размер немного крупнее эритроцита. Ядро округлое, овальное или неправильной формы. Цитоплазма плотная, относительно скудная. Стромальные эндометриальные клетки располагаются в рыхлых структурах или разрозненно. Структуры представляют собой пласты неправильной формы или располагаются вокруг капилляров. Тип клеток: фиброциты, гистиоциты, лейкоциты. Размер клеток значительно варьирует, форма вытянутая, неправильная. Ядро овальной,

веретенообразной или почкообразной формы. Цитоплазма плохо определяется. В отличие от эпителиальных эндометриальных и стромальных эндометриальных клеток эндоцервикальные клетки представляют собой высокопризматический и призматический тип клеток размером примерно в 2 раза крупнее эритроцита. Ядро округло-овальное, цитоплазма сохранная с четкими границами. Располагаются эндоцервикальные клетки в пластах, в виде однорядных структур или разрозненно. Структуры сотоподобные и палисадообразные [37].

Клетки эндометрия удаляются из полости матки во время менструации и в течение нескольких дней до 12-го дня цикла. Присутствие клеток эндометрия в материале из шейки матки после 12-го дня цикла считается не нормальным. Клетки эндометрия в цервикальном мазке в постменопаузе могут указывать на риск возникновения патологии эндометрия. [97].

1.3.2. Цитологические особенности клеток эндометрия в течение менструального цикла и в постменопаузе

В течение первой половины менструального цикла (пролиферативная фаза, 1-14 дни), особенно в начале кровотечения, пласты из мелких клеток эндометрия окружены клетками крови и клеточным детритом или округлыми структурами, состоящими из небольших вытянутых, плотно упакованных стромальных клеток; окружающая периферия состоит из более крупных, вакуолизированных железистых клеток. Это так называемый «exodus», свидетельствующий об окончании менструации. Нормальные клетки эндометрия обычно располагаются в шаровидных или трехмерных структурах без четких границ. Ядра нормальных клеток эндометрия обычно округлые или бобовидные и небольшие, сходные по размерам с ядрами клеток плоского эпителия промежуточного слоя. Ядрышки не видны, а рисунок хроматина трудно различим. Цитоплазма скудная, базофильная и иногда вакуолизированная. Фон в традиционных мазках обычно кровянистый, в материале жидкостной цитологии более чистый. Иногда присутствуют гистиоциты и эндометриальные стромальные клетки.

Если материал взят из полости матки в середине менструального цикла нормальные клетки эндометрия располагаются в виде менее плотных скоплений с единичными разрозненно лежащими клетками эндометрия. Эти железистые клетки округлые или слегка удлиненные, размер от 10 до 20 мкм. Цитоплазма базофильная, с редкими вакуолями, ядра округлые, размер их не превышает размер ядер промежуточных или парабазальных клеток плоского эпителия, ядрышки не видны [72, 31].

В секреторной фазе (15-28 дни) по сравнению с пролиферативной клетки становятся крупнее, границы клеток более четкие, ядра округлые, овальные, незначительно увеличены, ядрышки мелкие, более выражены, хроматин более зернистый, распределен равномерно. Цитоплазма может конденсироваться по периферии клеток; появляются вакуоли вокруг ядра; затем они диффузно заполняют всю цитоплазму [36].

Наряду с пластами из эпителиальных клеток эндометрия пролиферативного и секреторного типа в постменопаузе визуализируются структуры из клеток индифферентно-маточного типа: мелкие, одинакового размера и формы клетки, расположенные компактно. Ядра округлые, мелкие, изредка сморщенные, интенсивно окрашенные с однородной структурой хроматина, цитоплазма скудная и нередко плохо различима. При значительном снижении гормональной активности женщин, особенно находящихся в глубокой постменопаузе, развивается атрофия эндометрия [11]. Образцы атрофического эндометрия у женщин в постменопаузе обычно содержат меньшее количество клеток или фрагментов ткани. Клетки выглядят однородными и не проявляют циклических изменений. Размер эпителиальных клеток меньше, они имеют низко-цилиндрическую или кубическую форму. Стромальные клетки сморщенные, со скудной цитоплазмой, располагаются разрозненно. Характерны дегенеративные изменения в клетках [37].

1.3.3. Цитологические особенности патологии эндометрия, классификации

В ходе серьезного и плодотворного обсуждения на симпозиуме, посвященном ЦИ материала из полости матки, проходившем в рамках конгресса

Международной Академии цитологии (International Academy of Cytology (ICC) в 2016 в Йокогаме (Япония), международные эксперты по эндометриальной цитологии договорились о разработке приемлемой для всего мира системы отчетности в области эндометриальной цитологии под названием Йокогамская система (The Yokohama System (TYS) для отчетности по эндометриальной цитологии [55, 79].

Йокогамская система для интерпретации эндометриальной цитологии представляет собой следующие категории и обозначения:

TYS0 - Материал неудовлетворительного качества (Unsatisfactory);

TYS1- Цитограмма, негативная по злокачественному новообразованию и предшествующим поражениям (Negative for Malignancy);

TYS2 - Атипия в клетках эндометрия неясного значения/Atypical endometrial cells, of undetermined significance (ATEC-US);

TYS3 - Гиперплазия эндометрия без атипии (Endometrial hyperplasia without atypia);

TYS4 - Атипия в клетках эндометрия, нельзя исключить атипическую гиперплазию эндометрия/ Atypical endometrial cells, cannot exclude АЕН (ATEC-AE);

TYS5 - Атипическая гиперплазия эндометрия/ Atypical endometrial hyperplasia (АЕН);

TYS6 - Злокачественные опухоли (Malignant neoplasms) [55].

Заключение о каждой категории выставляют при наличии ряда признаков.

– Неинформативный материал (TYS0)

Полученный образец нельзя оценить по разному ряду причин (например, избыток примеси крови или элементов воспаления, контаминация содержимым влагалища, отсутствие клеток эндометрия и т.д.)

– Отсутствие злокачественных новообразований и предшествующих поражений (TYS1)

Непатологический/физиологический эндометрий. Если все структуры (кластеры) клеток в препарате представлены физиологическими трубчатыми или плоскими формами, сопровождаемыми стромальными клетками и негромождение ядер составляет менее трех слоев, цитологическая картина оценивается как отрицательная по наличию злокачественной опухоли и предшественников. Если имеются скопления ядер и/или увеличенные кровеносные сосуды, формулируется заключение о пролиферативном эндометрии. Заключение о секреторном эндометрии, как правило, устанавливают, если на малом увеличении видны пласты из клеток эндометрия с сотоподобным рисунком и околядерными цитоплазматическими вакуолями, а на среднем увеличении видны структуры в виде «зубцов пилы» и/или длинные кровеносные сосуды. Заключение об атрофическом эндометрии обычно формулируют при наличии однородных округлых ядер и скудной цитоплазмы и/или более коротких и тонких кровеносных сосудов.

Изменения в эндометрии могут носить доброкачественный реактивный характер (причинами могут быть изменения, вызванные ношением внутриматочной спирали, приемом тамоксифена и др.), могут иметь место при полипе эндометрия.

– Атипичные клетки эндометрия неопределенного значения (АТЕС-US - TYS2)

Заключение АТЕС-US дают в случае, когда атипичные клетки эндометрия присутствуют, но их значимость не определена из-за имеющихся воспалительных, метапластических или ятрогенных изменений. Если цитологических данных недостаточно для классификации по любой другой из вышеуказанных диагностических категорий, следует выбрать АТЕС-US (TYS2). В таких случаях последующая биопсия эндометрия не требуется, если только изменения не повторяются.

– Гиперплазия эндометрия без атипии (TYS3)

На малом увеличении микроскопа обнаруживают более пяти скоплений клеток в виде расширенных ветвящихся железистых структур, с наложением ядер не более чем в три слоя. Для того, чтобы дать заключение о гиперплазии

эндометрия без атипии, необходимо убедиться в отсутствии ядерной атипии на среднем увеличении микроскопа. Могут отмечаться нарушения в соотношении желез и стромы эндометрия (EGBD – Endometrial Glandular and Stromal Break Down).

Поскольку расширенные или ветвящиеся железистые структуры также встречаются при нарушениях в пролиферативной фазе или при полипах, категория TYS3 не исключает их. В добавление может быть написан комментарий, такой как «нельзя исключить нарушение созревания эндометрия».

– Атипичные клетки эндометрия, нельзя исключить АЕН (АТЕС-АЕ - TYS4)

Термин АТЕС используют, когда обнаруживают атипичные клетки эндометрия. АТЕС-АЕ используют, когда есть предположение об атипичной гиперплазии эндометрия или злокачественной опухоли, но изменений недостаточно для того, чтобы интерпретировать их как злокачественное новообразование: количество атипичных клеток ограничено или атипия вызвана воспалением, метапластическими изменениями или ятрогенным воздействием. В таком случае рекомендуется последующая биопсия эндометрия.

– Атипичная гиперплазия эндометрия (АЕН - TYS5)

В препаратах отмечается атипия строения желез: «разлетающиеся» структуры, нагромождение клеток, рыхлое расположение клеток в структуре, расположение в виде перьев по периферии, разрозненное расположение эпителиальных клеток. Имеется атипия клеток желез: укрупненные, вытянутой формы гиперхромные ядра, грубозернистый хроматин, различие размеров ядер, неровные контуры ядерной мембраны, умеренно обильная светлая цитоплазма, нечеткие контуры клеток [37]. АЕН (TYS5) можно отличить от аденокарциномы (TYS6), если при наличии четко определенных ядерных аномалий отсутствуют дополнительные данные, свидетельствующие об инвазии: нет явного некротического фона, изолированных злокачественных клеток, структур «спина к спине», или крибриформных структур [55].

— Злокачественные опухоли (TYS6)

На малом увеличении микроскопа наблюдаются комплексы из клеток с неравномерными выпячиваниями, нагромождением ядер в три или более слоев. Морфологический диагноз аденокарциномы (TYS6) или атипичной гиперплазии эндометрия/эндометриоидной внутриэпителиальной неоплазии (TYS5) устанавливаются, если отмечают ядерную атипичию или некротический фон, нарушение цитоархитектоники в структурах (комплексах): крибриформные структуры и/или структуры «спина к спине» [55].

Клетки высокодифференцированной аденокарциномы однородные, ядра округлой или продолговатой формы, сравнительно небольших размеров, хроматин мелкозернистый или мелкоглыбчатый. В мазках аспиратов из полости матки клетки опухоли расположены в виде крупных и мелких сосочков или железисто-альвеолярных комплексов, гроздевидных структур; признаки злокачественности в них выражены нерезко. Иногда это создает серьезные трудности отличия их от клеток гиперплазированного или даже неизмененного эндометриального эпителия и может быть причиной ложноотрицательных результатов в отношении рака. В случаях низкодифференцированной и умереннодифференцированной аденокарциномы цитологические признаки злокачественности выражены в полной мере; при этом как правило трудностей в оценке цитологических картин не возникает [11, 82].

1.3.4. Метод жидкостной цитологии

Внедрение ЖЦ в рутинную практику позволило исследовать клетки эндометрия на предмет установления цитологического диагноза, а также сделало возможным применение вспомогательных методов изучения молекулярных изменений при РЭ [55].

В образцах, приготовленных методом ЖЦ, клетки эндометрия могут казаться более гиперхромными и полиморфными, с более видимыми, чем в традиционных мазках, ядрышками. Лучший диагностический результат по материалу, приготовленному методом ЖЦ, объясняется лучшей сохранностью клеток и отсутствием загрязнения элементами крови или воспаления, с которыми часто

сталкиваются в традиционных мазках. ЖЦ позволяет обнаружить диагностические клетки даже при их небольшом количестве [37].

В настоящее время в мире наиболее распространены две технологии жидкостной цитологии: ThinPrep (TP; Hologic Inc., Marlborough, MA, USA) [89, 44] и SurePath (SP; BD Diagnostics, Burlington, NC, USA) [85, 86, 81], получившие широкое распространение в связи с проведением цитологического скрининга рака шейки матки и используемые для приготовления препаратов из других локализаций [51].

Эти два способа отличаются устройствами для отбора проб и технологическими особенностями, но оба метода позволяют приготовить качественные препараты и рассчитаны на большое число исследований. Существуют и другие аппараты, цитоцентрифуги, а также и методики приготовления жидкостных препаратов без использования цитоцентрифуг и автоматизированных систем.

Развитие жидкостных цитологических методов позволяет преодолеть препятствия, связанные с человеческим фактором при подготовке препаратов, и повысить точность диагностики [16, 88], чему способствует расширение и углубление знаний гистологических особенностей эндометрия [39].

1.3.5. Сравнительный анализ современных методов исследования патологии эндометрия

В последнее время авторы, проводя сравнение методов биопсии указывают, что дилатация и кюретаж, РДВ или Пайпель биопсия имеют недостаточную точность, высокий уровень ошибочных диагнозов [36, 93]. В связи с этим с целью диагностики РЭ клиницисты используют ГИ и ЖЦ. При этом более точные результаты получены при сочетании метода ЖЦ и клеточного блока [113], при котором отобранный с помощью амбулаторной биопсии образец помещается в консервирующую жидкость [92].

В метаанализе, проведенном Q. Wang с соавт. для оценки метода ЦИ эндометрия в диагностике рака эндометрия примерно у 4179 пациенток с

различными патологическими состояниями эндометрия с цитогистопатологическими результатами, было установлено, что ЦИ эндометрия является эффективным диагностическим методом и поэтому применимо для диагностики нарушений эндометрия [104].

В результате исследования F. Yanaki с соавт. 1116 образцов эндометрия, приготовленных методом ЖЦ и 1044 образцов аспирационной биопсии эндометрия, авторы сообщили, что ЖЦ эндометрия может быть более подходящей в различных клинических ситуациях в качестве начального инструмента обнаружения злокачественных опухолей эндометрия. Также они отметили, что ЖЦ можно использовать для скрининга опухолей эндометрия в более широком масштабе [108].

В исследовании X. Yang с соавт. по анализу применения этих методов показано, что при атипичной гиперплазии диагностическая точность ЖЦ эндометрия составила 86,1%, чувствительность была оценена в 70,3%, специфичность в 88,5%, положительное прогностическое значение в 48,0% и отрицательное прогностическое значение в 95,2%. В отношении карциномы эндометрия диагностическая точность ЖЦ составила 94,4%; чувствительность оценивалась в 53,2%, специфичность – в 98,6%, положительное прогностическое значение – в 79,8% и отрицательное прогностическое значение – в 95,3%. Из этого авторы сделали обоснованный вывод о полезности применения ЖЦ в качестве метода первой линии [110].

1.4. Применение иммуноцитохимического и иммуногистохимического методов в диагностике рака эндометрия

ИГХИ и ИЦХИ – являются методами обработки биологического материала, основанными на реакции “антиген-антитело” с целью идентификации и установления локализации в клетках разнообразных молекулярных структур и соединений: иммуноглобулинов, ферментов, гормонов и их рецепторов, рецепторов поверхностных мембран, белков промежуточных филаментов. ИГХИ отличается от ИЦХИ объектом исследования: для ИГХИ это гистологический срез

или клеточный блок, для ИЦХИ – цитологический препарат (традиционный или жидкостный) [11].

Подготовка клеточного блока – это хорошо зарекомендовавший себя метод подготовки материала для ЦИ, а если в материале присутствуют кусочки ткани и ГИ. Было описано несколько методов приготовления препаратов: фиксированного осадка, встраивания агара, упрощенный метод приготовления клеточного блока, сгустка плазмы-тромбина, компактного клеточного блока, СВЧ-техника для быстрой обработки клеточных блоков, клеточный блок из Миллипор. Система ThinPrep™ также предлагает возможность применения автоматизированной системы блокировки ячеек [55]. Однако, как указывают авторы, в большинство фиксированных формалином образцов первичной ткани имеются потери антигена, что может привести к ошибкам. Дополнительный метод уменьшения вероятности ошибок может заключаться в использовании подтверждающих тестов, таких как флуоресцентная гибридизация *in situ*, анализ на HER-2 New, метод измерения мРНК для определения статуса рецептора гормонов [91]. Также установлено, что препараты клеточных блоков из выпотов и промывных жидкостей из полостей тела более надежны и воспроизводимы, чем мазки, цитоспин-препараты и ThinPrep-препараты. Однако показано, что обычная подготовка клеточных блоков требует большого количества клеток в образце, чтобы получить парафиновые блоки оптимального качества [48]. Таким образом, данные литературы по ИЦХИ и клеточным блокам весьма противоречивы.

Материал Пайпель-биоптата также можно исследовать на рецепторный статус с помощью ИЦХИ. Данный метод получения биоматериала имеет ряд преимуществ: доступность, небольшая инвазивность, высокая скорость, малый объем достаточного для исследования материала, высокая информативность метода [10].

Панель антител, применяемая для ИЦХИ эндометриальных поражений, включает:

- рецепторы эстрогена (РЭ);
- рецепторы прогестерона (РП);

- p53 (белок p53 – транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл, выполняет функцию супрессора образования злокачественных опухолей);
- Ki-67 белок-антиген, показывающий активность опухолевых клеток);
- PTEN (сокр. от англ. Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome 10 – фосфатаза с двойной субстратной специфичностью);
- p16 (белок – ингибитор циклин-зависимых киназ, регулирует клеточный цикл).

Данные маркеры были отобраны исследователями с целью облегчения дифференциации эндометриальной и эндоцервикальной аденокарциномы и эндометриоидной карциномы от серозной и светлоклеточной карциномы, а также для реализации использования маркеров, связанных с опухолеобразованием и прогнозом [27, 80]. Однако, прогностическая ценность каждого из этих критериев для диагностики определенного типа риска не в полной мере изучена, и имеется необходимость дальнейшего исследования.

РЭ на основе биомаркеров традиционно разделяют на два подтипа [17]. Наиболее часто встречающийся РЭ типа I, обычно характеризуется наличием высококодифференцированных клеток, по гистологическим характеристикам является эндометриоидным, а сами клетки опухоли обнаруживают нормальный диплоидный кариотип, нестабильность микросателлитов (MSI) и экспрессируют рецепторы эстрогенов (ER) и прогестерона (PR). При РЭ типа I мутации в гене опухолевого супрессора TP53 происходят редко, и больные имеют хорошие шансы на выздоровление [15]. РЭ типа I проявляется мутациями в K-ras, PTEN, фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3-киназной каталитической субъединице альфа (PIK3CA), и генах катенина бета-1 (CTNNB1) [103, 47].

В отличие от этого, РЭ типа II не относится к эндометриоидным опухолям, содержит низкодифференцированные клетки, для многих из которых характерна анеуплоидия, отсутствуют генетические изменения в белке p53, а ER и PR не экспрессируются. При этом течение болезни имеет неблагоприятный прогноз [15]. Некоторые авторы указывают, что тип II проявляет хромосомную нестабильность [90].

Внедрение в практику ИЦХИ и недавнее открытие новых генов и их функций при раке привели к открытию клеточных белков или нуклеиновых кислот, которые экспрессируются исключительно в опухолях. Эти биомаркеры обладают потенциалом повышения диагностической согласованности и воспроизводимости злокачественных новообразований эпителиального генеза [87]. К биомаркерам помимо описанных относят L1-молекулу клеточной адгезии (L1CAM), MutL гомолог 1 (MLH1), белок-продукт PMS2-гена, участвующий в восстановлении несоответствия ДНК, β -катенин и E-кадгерин [57].

Согласно данным литературы, совпадение результатов ИГХИ и ИЦХИ при опухолевых поражениях составляет для ER 98%, для PR – 97% [45].

Мутации генов PTEN, β -катенин и p53 – наиболее частые молекулярные дефекты при раке эндометрия I и II типа [106, 71, 59, 65, 66, 76]. Потеря PTEN и положительное ядерное окрашивание на β -катенин часто наблюдались при атипической гиперплазии эндометрия, но не в нормальном пролиферативном эндометрии. Комбинация PTEN– и β -катенин+ в результате могут стать надежными маркерами в диагностике атипической гиперплазии эндометрия [84]. В работе Abd El-Maqsood и соавт. показано, что экспрессия PTEN менялась на протяжении менструального цикла. Авторы предполагают, что PTEN участвует в ранних стадиях канцерогенеза эндометрия [40].

К. Kosmas с соавт. сообщили, что в их исследовании положительная экспрессия p53 на отпечатках цитологических мазков коррелировала с хирургической патологической стадией, гистологической оценкой, метастазами в лимфатических узлах [67]. Экспрессия Cyclin A сочетается с прогрессированием злокачественной опухоли эндометрия и коррелирует с пролиферативной активностью [69].

В одном из недавних исследований, проведенном группой ученых Washington University (St. Louis, 2013) в рамках проекта “The Cancer Genome Atlas (TCGA)”, и заключающемся в интегративном геномном анализе 373 опухолей эндометрия, продемонстрировано, что около 1/4 опухолей, классифицированных как низкодифференцированные эндометриоидные, имеет молекулярный фенотип,

аналогичный серозным карциномам тела матки, включая мутации TP53 и аномалии числа копий соматических генов [2]. Исследование иммуноцитохимических маркеров соскобов с эндометрия Ki-67, Vcl-2, p53 на этапе диагностики/дифференциальной диагностики является высокоинформативным методом [24].

Исследование иранских ученых с применением ИЦХИ, направленное на оценку диагностической и прогностической ценности биомаркеров p53 и PTEN в 40 образцах от пациенток с РЭ, перенесших гистерэктомию, показало, неравномерность экспрессии биомаркеров p53 и PTEN. При этом результаты ИЦХИ для p53 интерпретировали как положительные при сильном ядерном окрашивании в 75% клеток. Реакцию на PTEN интерпретировали как положительную, когда наблюдали диффузное окрашивание цитоплазмы клеток. Результаты окрашивания на p53 показали экспрессию этого биомаркера в 9 (22,5%) из 40 образцов, в то время как 31 (77,5%) был p53 отрицательным. Кроме того, отмечена положительная реакция на PTEN в 10 (25,0%) образцах, в то время как другие 30 (75,0%) образцов были отрицательными. Все 6 образцов серозной аденокарциномы и единственная светлоклеточная аденокарцинома были положительными на p53. Однако реакция на p53 была положительной только в двух (6,06%) из 33 образцов эндометриоидного рака. Результат PTEN показал положительное и отрицательное окрашивание в 9 (27,27%) и 24 (72,73%) образцах эндометриоидной аденокарциномы соответственно. Самая высокая частота экспрессии p53 и PTEN наблюдалась при раке эндометрия II и III степени [52]. Таким образом, авторами было отмечено, что для диагностики серозной аденокарциномы имеет высокую значимость ИЦХИ на p53, поскольку все 6 образцов с данной патологией были обнаружены с помощью ИЦХИ. Этот вывод подтверждают результаты ранее проведенных исследований [56, 74, 115].

Прогностическая ценность p53 и PTEN была оценена и в исследовании T.L. Мао; экспрессию p53 наблюдали в 42,1% случаев высокодифференцированного РЭ, в то время как ни один из случаев I степени не показал положительного результата на p53. С другой стороны, потерю PTEN наблюдали с наибольшей частотой при

раке III степени. Кроме того, результат ИЦХИ на PTEN показал положительное в 27,27% случаев и отрицательное окрашивание в 72,73% образцах эндометриоидной аденокарциномы, а также был положительным в отношении биомаркера p53 только в 6,06% образцов РЭ [75].

Известно, что прием тамоксифена связан с повышенной частотой развития аденокарциномы эндометрия. D.Holtz с соавт. была изучена экспрессия PTEN при тамоксифен-ассоциированном РЭ методом ИЦХИ. Авторы исследовали образцы карциномы эндометрия у пациенток при раке молочной железы в анамнезе с (15 образцов) и без (13 образцов) введения тамоксифена. Их результаты показали, что 4 (27%) из 15 женщин, получавших тамоксифен, были иммунореактивны к PTEN по сравнению с двумя (15%) из 13, не получавших лечения. Они также пришли к выводу, что тамоксифен-ассоциированный РЭ не отличается от спорадического РЭ в отношении экспрессии PTEN [60].

C.Tsionou с соавт. проводили определение экспрессии СЕА у четырех групп пациенток: пациентки с нормальным эндометрием, с ГЭ без атипии, с атипической гиперплазией и эндометриальной аденокарциномой. Положительная экспрессия СЕА была отмечена в 33%, 46%, 75% и 83% случаях соответственно ($p < 0,01$) [102].

Опухолевой белок 63 (p63) представляет собой фактор транскрипции семейства генов p53, участвующий в дифференцировке некоторых тканей, включая плоский эпителий. Иммуногистохимическое исследование на p63 широко используется для классификации опухолей, но опубликованные данные о его экспрессии при раке противоречивы [99, 42]. В нормальной эндометрии присутствует популяция p63-позитивных клеток, которые могут действовать как популяция стволовых клеток и число их увеличивается при различных формах метаплазии. Узелки плацентарного узла и эпителиоидная трофобластическая опухоль (поражения, происходящего из промежуточного трофобласта хорионического типа) обычно положительны по p63, тогда как реакция плацентарного узла и трофобластическая опухоль плацентарного узла (поражения, происходящего из промежуточного трофобласта места имплантации) обычно отрицательны; авторы считают, что p63 может быть полезен в диагностическом

алгоритме трофобластических поражений [61]. S. Steurer с соавт. в своей работе отметили положительную экспрессию p63 в материале, полученном из p63-негативных тканей в 160 наблюдениях рака эндометрия [99].

Ki-67 как маркер клеточной пролиферации, все чаще используется в предоперационных исследованиях РЭ как первичный показатель прогноза (исхода заболевания). Однако, в отличие от рака молочной железы, в отношении данного показателя не выработаны рекомендации по его измерению и клинической значимости в качестве биомаркера ответа. Несмотря на неоднозначность в литературе о ценности Ki-67 как биомаркера при РЭ, начались предоперационные исследования с использованием изменения Ki-67 в качестве прогностического критерия [77, 70, 94, 96, 101].

Показано, что экспрессия Ki-67 положительно коррелирует со степенью дифференцировки опухоли [96]. Однако сведения о прогностическом значении Ki-67 применительно к РЭ, пока не уточнены, что, возможно, связано, с малочисленностью выборок [64].

В работе F. Castello с соавт. описано наблюдение положительной экспрессии TTF-1 у пациентки с эндометриальной аденокарциномой. Авторы утверждают, что часть эндометриоидных новообразований экспрессирует TTF-1, и эта ситуация может сбивать с толку [46]. Еще два недавних исследования опухолей женских половых органов показали иммунореактивность TTF-1 в 19% случаев эндометриоидных аденокарцином матки. Помимо злокачественных опухолей, TTF-1 также был обнаружен в доброкачественных опухолях и доброкачественном эпителии маточных труб и эндометрия. Однако роль TTF-1 в эпителии женских половых органов и их опухолях неизвестна [74, 114].

В настоящее время, несмотря на большое количество работ отечественных и зарубежных авторов, посвященных изучению молекулярно-биологических аспектов РЭ, ни один из опухолевых маркеров не рекомендован к широкому клиническому использованию при раке тела матки, поскольку недостаточно информации для их внедрения в клиническую практику. Детальное изучение данной проблемы позволит оптимизировать как диагностику, так и лечение рака

эндометрия, а исследование генетических особенностей двух вариантов РЭ будет способствовать персонализации подходов в его терапии [32].

Таким образом, в настоящее время исследовательские усилия сосредоточены на открытии новых неинвазивных методов диагностики и понимания молекулярной архитектуры опухоли в режиме реального времени [92].

Резюме

Таким образом, об эффективности цитологической и иммуноцитохимической диагностики неопухолевых поражений и опухолей эндометрия опубликовано относительно мало исследований, и данная проблема остается спорной. Анализ данных литературы свидетельствует о существовании объективных трудностей в диагностике патологических состояний эндометрия. Имеющиеся данные о показателях чувствительности и специфичности цитологического метода весьма разноречивы [109, 104, 108, 110]. В настоящее время во многих лабораториях успешно применяется ЖЦ как новый метод приготовления и обработки цитологических препаратов; он расширяет возможности ИЦХИ и молекулярно-генетических методов, что имеет большое значение при уточнении цитологических диагнозов [7, 63, 80]. Необходимость применения ИЦХИ, в качестве дополнительного метода, с целью улучшения точности цитологической диагностики неопухолевых поражений и опухолей эндометрия не вызывает сомнений. Однако данные о возможности использования ИЦХИ при поражениях эндометрия носят весьма противоречивый характер [24, 52, 75, 60, 68].

Отсутствие однозначных трактовок цитологических картин при исследовании методом жидкостной цитологии материала из эндометрия, высокий процент ошибок и противоречивость ИЦХИ при гиперплазии, атипичской гиперплазии эндометрия и эндометриоидной аденокарциноме, определили актуальность предпринятого нами исследования.

ГЛАВА 2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

В исследование включено 136 пациенток, проходивших обследование и лечение в медицинских учреждениях г. Москва в период с 2019 по 2023 гг. Материалом для исследования служили образцы эндометрия, полученные интраоперационно.

Обследованные пациентки находились на стационарном лечении в гинекологическом отделении №22 ГБУЗ ГКБ им. С.П. Боткина ДЗМ, гинекологическом отделении ГБУЗ ГКБ №13 ДЗМ, отделении острых гинекологических заболеваний ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ». От всех пациенток, принимавших участие в исследовании, было получено информированное добровольное согласие на предоставление материала для исследования, а также на использование и обработку персональных данных.

Работа одобрена независимым этическим комитетом ФГБОУ ДПО РМАНПО Министерства здравоохранения РФ (№ 11 от 16.10.19 г.) и выполнена в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (1964 г. с изменениями от 2013 г.).

Все пациентки при поступлении были обследованы по схеме, включающей в себя: сбор анамнеза, жалоб, общий осмотр, пальпация матки и региональных групп лимфатических узлов, УЗИ матки.

Критерии включения пациенток в исследование: клинические признаки заболевания эндометрия, получение добровольного информированного согласия на участие в исследовании в письменной форме.

Критерии исключения из исследования: отказ от участия, отсутствие гистологического заключения.

В соответствии с клиническими, ультразвуковыми и другими показаниями пациенткам было проведено хирургическое лечение (гистероскопия (ГС) с

раздельным диагностическим выскабливанием (РДВ) или экстирпация матки) с последующим морфологическим исследованием материала эндометрия.

Результаты гистологического исследования были выданы гистологами из патологоанатомических отделений учреждений здравоохранения г. Москва.

В нашей работе материалом для ЦИ эндометрия были соскобы эндометрия, полученные после операции гистерэктомии и при РДВ с ГС.

При помощи щетки Cytobrush получали с поверхности эндометрия соскоб, который для традиционного цитологического исследования сразу наносили на предметное стекло, а после этого щетку с оставшимся материалом помещали в контейнер с консервирующей средой для жидкостной цитологии (ЖЦ).

Было проведено 460 цитологических исследований: методом традиционной цитологии - 136 исследований, методом жидкостной цитологии - 136 исследований и 188 иммуноцитохимических исследований.

Возраст пациенток составил от 22 до 84 лет (средний возраст $50,5 \pm 12,8$ л). Возрастная характеристика пациенток представлена на рисунке 1.

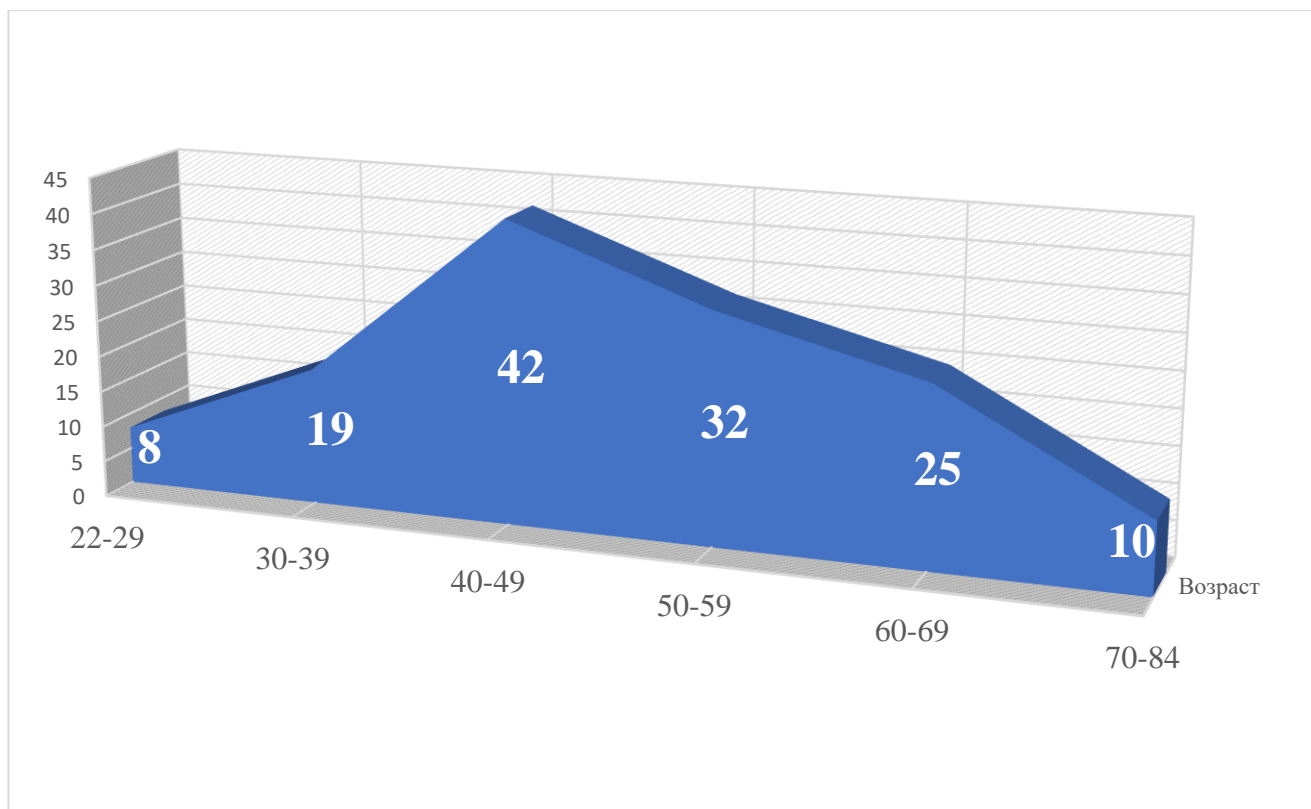


Рисунок 1 - Распределение пациенток по возрасту

Пациентки поступали с жалобами: на аномальные маточные кровотечения (55,5%), постменопаузальные кровотечения (34,9%), боли в нижней части живота (6,4%), нарушение менструального цикла (3,2%). Всем пациенткам были установлены клинические диагнозы согласно МКБ-10 (рисунок 2).

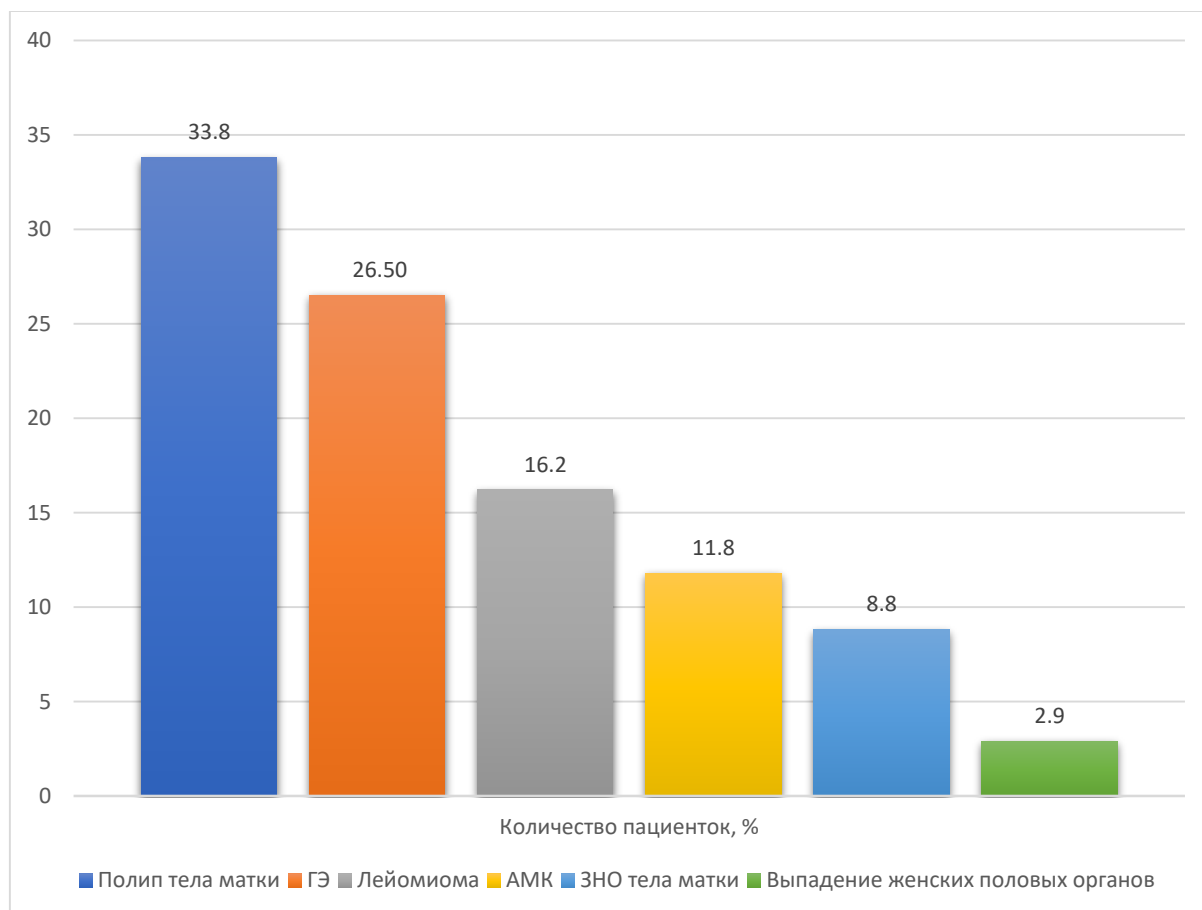


Рисунок 2 – Распределение пациентов в соответствии с клиническими диагнозами, %.

Полип тела матки (N84); ГЭ - железистая гиперплазия эндометрия (N85); лейомиома матки (D25); АМК - аномальное маточное и влагалищное кровотечение неуточненное (N93); ЗНО тела матки (C54); выпадение женских половых органов (N81).

При распределении клинических диагнозов в соответствии с возрастными группами в самой многочисленной группе пациенток 40-49 лет преобладали клинические диагнозы ГЭ (35,0%) и полип тела матки (35,0%) (рисунок 3).

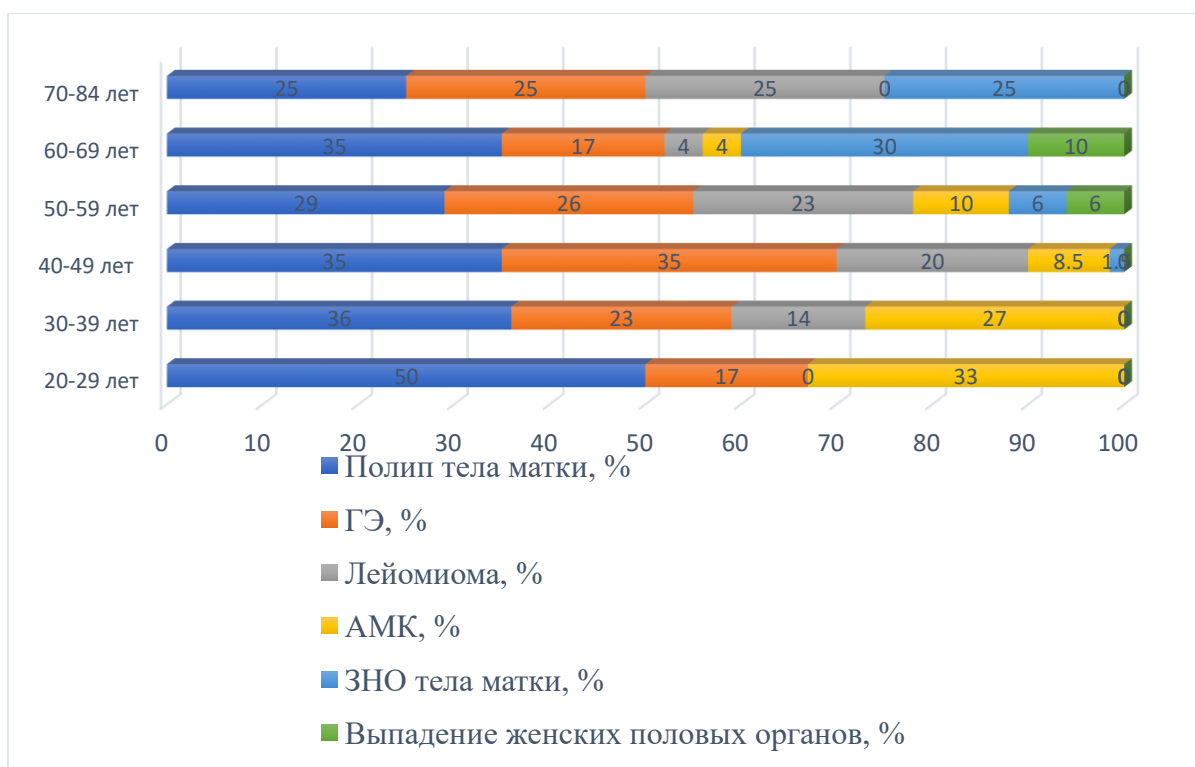


Рисунок 3 - Распределение клинических диагнозов в соответствии с возрастными группами пациенток, %.

Клинический диагноз ЗНО тела матки наиболее часто ставили в группе пациенток 60-69 лет (30,0%).

У 53 пациенток были получены результаты УЗИ (Таблица 1): толщина М-эхо >5 мм – у 25 пациенток; толщина М-эхо < 5 мм – у 4; миома – у 7 пациенток; полип – 7; ГЭ – 8; патология эндометрия – 2.

Таблица 1

Сопоставление данных УЗИ с жалобами пациенток

Жалобы \ Результаты УЗИ	Результаты УЗИ					
	М-эхо > 5 мм	М-эхо < 5 мм	Полип	Миома	ГЭ	Патология эндометрия
Постменопаузальные кровотечения	7	1	2	5	4	1
Межменструальные кровотечения	16	2	5	2	4	1

Нарушение менструального цикла	2	нет	нет	нет	нет	нет
Боли в нижней части живота	нет	1	нет	нет	нет	нет

После сбора анамнеза, клинических данных и данных УЗИ-исследования всем пациенткам были определены показания к ГС с РДВ (64%) или оперативного лечения в объеме экстирпации матки (36%).

Всем пациенткам в соответствии с показаниями было проведено оперативное лечение и установка гистологического диагноза. Гистологические заключения исследованного материала эндометрия распределяли по группам:

- неинформативный материал;
- эндометрий без морфологической патологии;
- гиперплазия эндометрия и полипы;
- эндометриоидная аденокарцинома и атипичная гиперплазия эндометрия (рисунок 4).

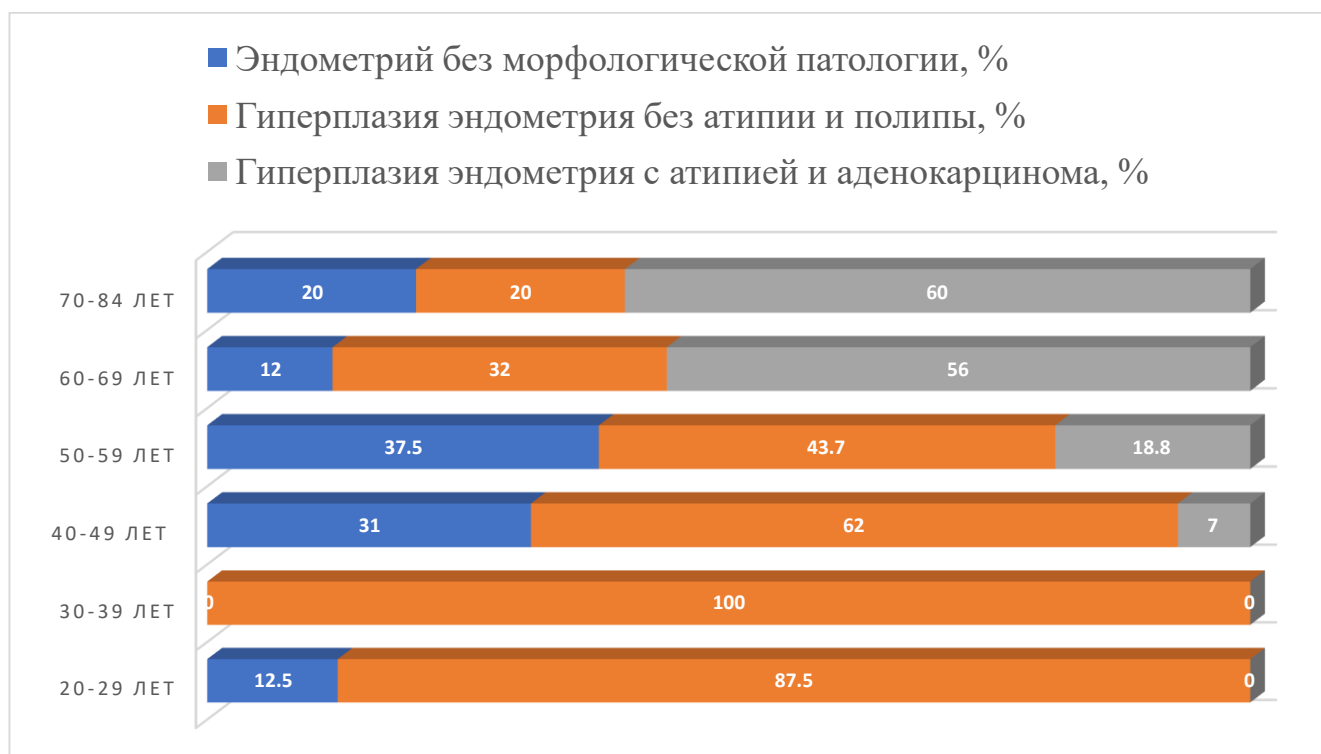


Рисунок 4 - Распределение гистологических заключений исследования эндометрия в соответствие с возрастными группами, %.

Наибольшее число наблюдений РЭ было выявлено в группе пациенток 60-69 и 70-84 лет. В группе пациенток 60-69 лет 13-ти пациенткам из 25-ти было дано заключение эндометриоидная аденокарцинома, и у одной пациентки в этой группе диагностирована АГЭ. В группе пациенток в возрасте 70-84 лет – у 6 пациенток из 10 выявлен РЭ. В группах пациенток 20-29, 30-39 и 40-49 лет преобладали заключения: гиперплазия эндометрия без атипии и полипы.

2.2. Методы исследования

Приготовление препаратов для цитологического исследования осуществляли традиционным цитологическим методом с окраской по методу Паппенгейма и методом ЖЦ с последующей окраской по Папаниколау.

Для традиционного цитологического исследования полученный материал наносили на предметное стекло прокатывающими движениями щетки и после высыхания окрашивали по методу Паппенгейма с помощью раствора красителя азур-эозин (Таблица 2).

Таблица 2

Метод окрашивания по Паппенгейму

Фиксирующая жидкость (на основе метанола)	2 минуты
Промывание фосфатным буфером pH 6,8-7,0	1-3 секунды
Раствор красителя азур-эозин	13 минут
Промывание фосфатным буфером pH 6,8-7,0	1-3 секунды
Высушивание на воздухе	До полного высыхания

После приготовления традиционного препарата щетку с оставшимся материалом помещали в виалу (контейнер) с консервирующей средой для ЖЦ.

Консервирующий раствор разработан с целью фиксации, хранения, транспортировки материала и приготовления монослойных препаратов. Помимо этого материал, помещенный в консервирующую среду, еще в течение 6 месяцев может сохранять свои биологические свойства.

Для приготовления препаратов методом ЖЦ материала эндометрия в нашей работе были использованы 2 технологии:

- Метод центрифугирования (ручной метод);
- Автоматизированный метод с использованием технологии фильтрации. Материал пациенток был распределен случайным образом между двумя технологиями ЖЦ: материал 100 пациенток обрабатывали методом центрифугирования, материал 36 пациенток - методом фильтрации (рисунок 5, 6). Технология автоматизированного цитологического процессора основана на бесконтактном переносе материала на стекло после фильтрации, которая препятствует наложению клеток друг на друга и образованию пустых участков в препарате.

Характеристики цитологического процессора:

1. Автоматическая система открытия и закрытия крышки контейнера с фиксирующим раствором.
2. Автоматическая система переноса клеток. Для каждого протокола установлена оптимальная величина давления, позволяющая переносить на стекло необходимое количество клеток в соответствии с количеством материала в контейнере с фиксирующим раствором.
3. Автоматическая система подачи фильтров.
4. Система подготовки препарата за один шаг. Подготовка стекла с препаратом происходит автоматически при нажатии клавиши START (ЗАПУСК) после загрузки виалы и стекла в прибор.
5. Высокая скорость подготовки препарата. Время приготовления одного стекла – 26 сек.

Второй метод ЖЦ, используемый в нашей работе, является преимущественно ручным методом с обязательным использованием лабораторной центрифуги (рисунок 7).

Подготовка препарата:

1. Взболтать флакон с образцом вручную в течение 5 сек.
2. Перелить половину образца в центрифужную пробирку (до 10 мл). Если образец мутный или с кровью, то достаточно 5-8 мл.
3. Центрифугировать пробирки в лабораторной центрифуге 5 минут (1500 rpm).
4. Слить надосадочную жидкость, оставить немного образца на дне пробирки.
5. Добавить в пробирку равное остатку образца количество цитологического раствора ClearPrep (соотношение 1:1).
6. Перемешать полученную клеточную суспензию взбалтыванием в течение 3-5 секунд и оставить на 60 секунд для того, чтобы цитологический раствор хорошо проник в клеточные мембраны.
7. Перемешать клеточную суспензию взбалтыванием в течение 4-6 секунд до полного размешивания.
8. Используя одноразовую пипетку, перенести 2-4 капли клеточной суспензии на ограниченную поверхность цитологического стекла и равномерно распределить для предотвращения получения слишком толстого слоя необходимо удалить большие фрагменты пипеткой.
9. Высушить образец на воздухе при комнатной температуре 25 в течение 40 минут (рисунок 8).

В соответствии с методикой из одного образца, полученного и помещенного в виалу с консервирующей средой материала, готовили несколько препаратов. Один стеклопрепарат готовили для морфологического исследования и окрашивали по методу Папаниколау, а еще 5 стеклопрепаратов оставляли для ИЦХИ.



Рисунок 5 - цитологический процессор (метод фильтрации)



Рисунок 6 – Вials с фиксирующим раствором



Рисунок 7 – Набор реагентов для ЦИ методом центрифугирования



Рисунок 8 - Процесс приготовления образцов.

Окрашивание по методу Папаниколау монослойных препаратов, приготовленных жидкостными технологиями, производили на автоматическом приборе Эмкостейнер АФОМК-25 (ГК ЭМКО, Россия), программа «PAP-NON-GYM» (рисунок 9). Окрашивание происходит в несколько этапов и основано на

последовательном погружении штатива со стеклопрепаратами в емкости с красителями: ОГ6 (оранжевый G) и краска ЕА (эозин, светло-зеленый SF и фосфорно-вольфрамовая кислота) для окраски цитоплазмы, гематоксилин для окраски ядер. Благодаря предварительной влажной фиксации мазка фиксатором-спреем или проводимой в этиловом спирте, хорошо сохраняются ядра, клеточная мембрана и структура хроматина.

Методика окрашивания по Папаниколау:

1. Промыть фиксированный препарат в ёмкости с водопроводной водой в течение 30 сек. Избыток водопроводной воды необходимо удалить, поставив стекло вертикально на фильтровальную бумагу.

2. Препарат погрузить в сосуд с дистиллированной водой на 5 сек.

3. Препарат погрузить в сосуд с рабочим раствором гематоксилина по Гиллу-2 (Папаниколау-1) на 3 мин.

4. Препарат погрузить в ёмкость с водопроводной водой на 2 мин. После чего для устранения избытка водопроводной воды нижнее ребро стекла необходимо промокнуть о фильтровальную бумагу.

5. Препарат погрузить в сосуд с рабочим раствором краски ОГ (Папаниколау-2) на 15 сек. Затем для устранения избытка краски нижнее ребро стекла промокнуть о фильтровальную бумагу.

6. Препарат промыть в первом растворе для дегидратации (изопропиловом спирте) 10 сек.

7. Препарат погрузить в ёмкость с рабочим раствором краски ЕА (Папаниколау-3) на 3 мин.

8. Препарат промыть в сосуде с чистой водопроводной водой 2 сек. После чего для устранения избытка водопроводной воды нижнее ребро стекла промокнуть о фильтровальную бумагу.

9. Препарат промыть в первом сосуде с раствором для дегидратации (изопропиловым спиртом), погрузив на 10 сек. Вынув, устранить избыток раствора, промокнув нижнее ребро стекла о фильтровальную бумагу.

10. Препарат промыть во втором сосуде с раствором для дегидратации (изопропиловым спиртом), погрузив на 10 сек.
11. Препарат промыть в третьем сосуде с раствором для дегидратации (изопропиловым спиртом), погрузив на 10 сек.
12. Препарат поместить в ёмкость с просветляющим раствором (ксилолом) на 10 сек.
13. Не допуская высыхания препарата, нанести на препарат 100 мкл монтирующей (закрывающей) среды (бальзама), накрыть покровным стеклом.



Рисунок 9 – Прибор для покраски препаратов



Рисунок 10 - Готовые окрашенные препараты ЖЦ и ТЦ (слева направо)

Цитологическое исследование интраоперационного материала эндометрия проводили методами традиционной и жидкостной цитологии (рисунок 10). Для анализа цитологических препаратов применяли световой микроскоп «Axioskop» (Carl Zeiss, Германия), объективы x10, x40, x100. По результатам цитологического исследования материала эндометрия заключения формулировали в соответствии с

клиническими рекомендациями МЗ [13, 14, 53] и международной Йокогамской системы (The Yokohama System (TYS) (рис. 11) [55].

Согласно Клиническим рекомендациям МЗ формулировали цитологические заключения и распределяли их по нескольким группам:

- неинформативный материал,
- эндометрий без морфологической патологии (секреторный, пролиферативный, атрофичный),
- гиперплазия эндометрия без атипии,
- атипическая гиперплазия эндометрия и аденокарцинома.

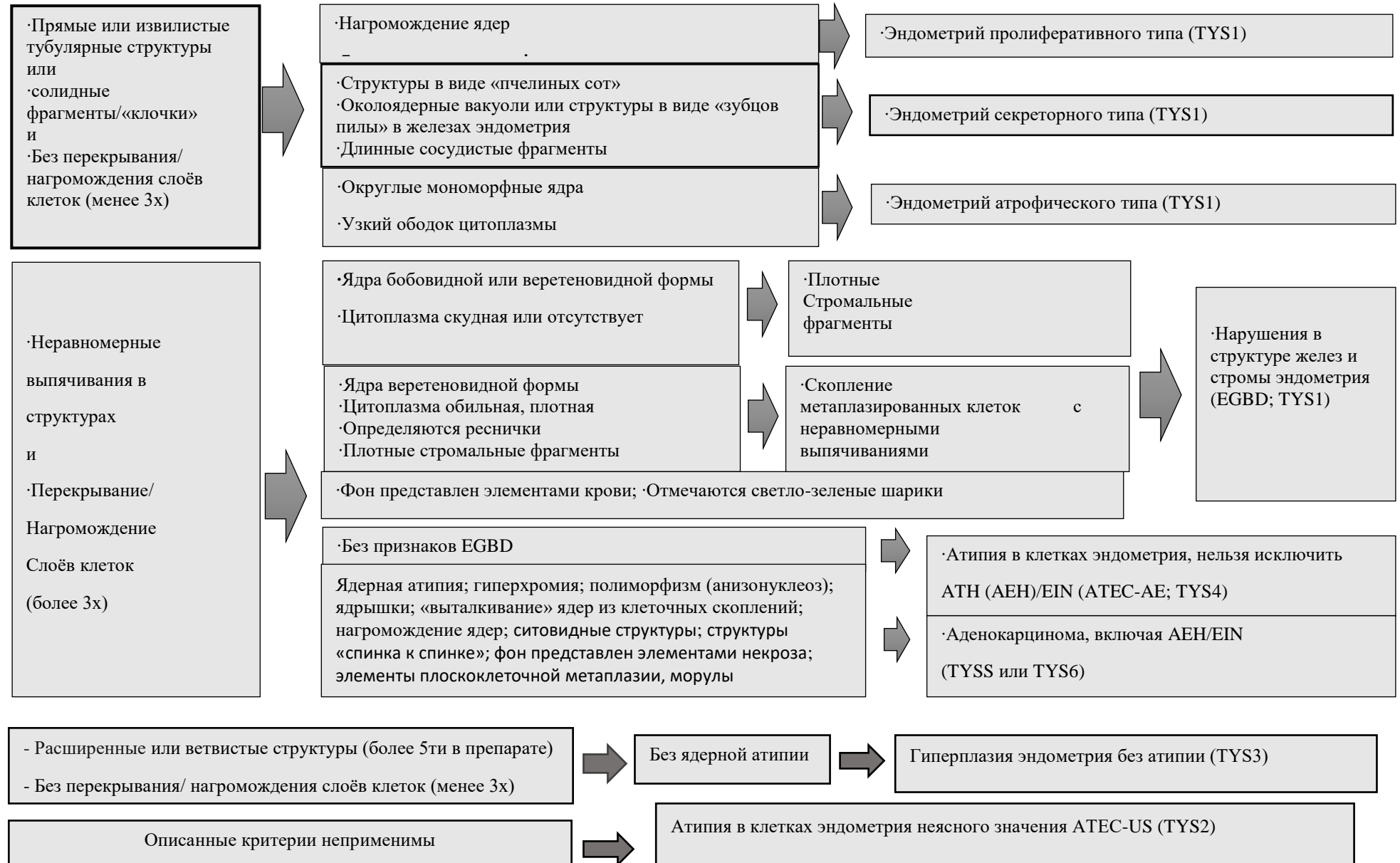
Сопоставление цитологических заключений гистологическим представлены в таблице 3.

Таблица 3

Соответствие цитологических заключений гистологическим

Гистологическое заключение	Цитологическое заключение
Неинформативный материал	Неинформативный материал (TYS0)
Эндометрий без морфологической патологии	Эндометрий без морфологических признаков патологии (TYS1)
Гиперплазия эндометрия без атипии и полипы	Гиперплазия эндометрия без атипии (TYS3)
Атипическая гиперплазия и эндометриоидная аденокарцинома	Атипическая гиперплазия и аденокарцинома (TYS2, TYS4, TYS5, TYS6)

Рисунок 11. Алгоритм интерпретации эндометриальной патологии по системе TYS



Гистологическое исследование было выполнено на материале эндометрия всех 136 пациенток. Морфологическое заключение формулировали в соответствии с классификацией ВОЗ 2020 г.

По результатам гистологического исследования основную массу больных составили пациентки с гиперплазией без атипии и полипами - 76 (55,9%), у 31 (22,8%) отсутствовала морфологическая патология эндометрия, в 24 наблюдениях (17,6%) установлена эндометриоидная аденокарцинома и у 5 (3,7%) атипичная гиперплазия (рисунок 12).

По результатам гистологических заключений обнаружена сопутствующая патология миометрия: лейомиома у 21 пациентки, аденомиоз - у 7.

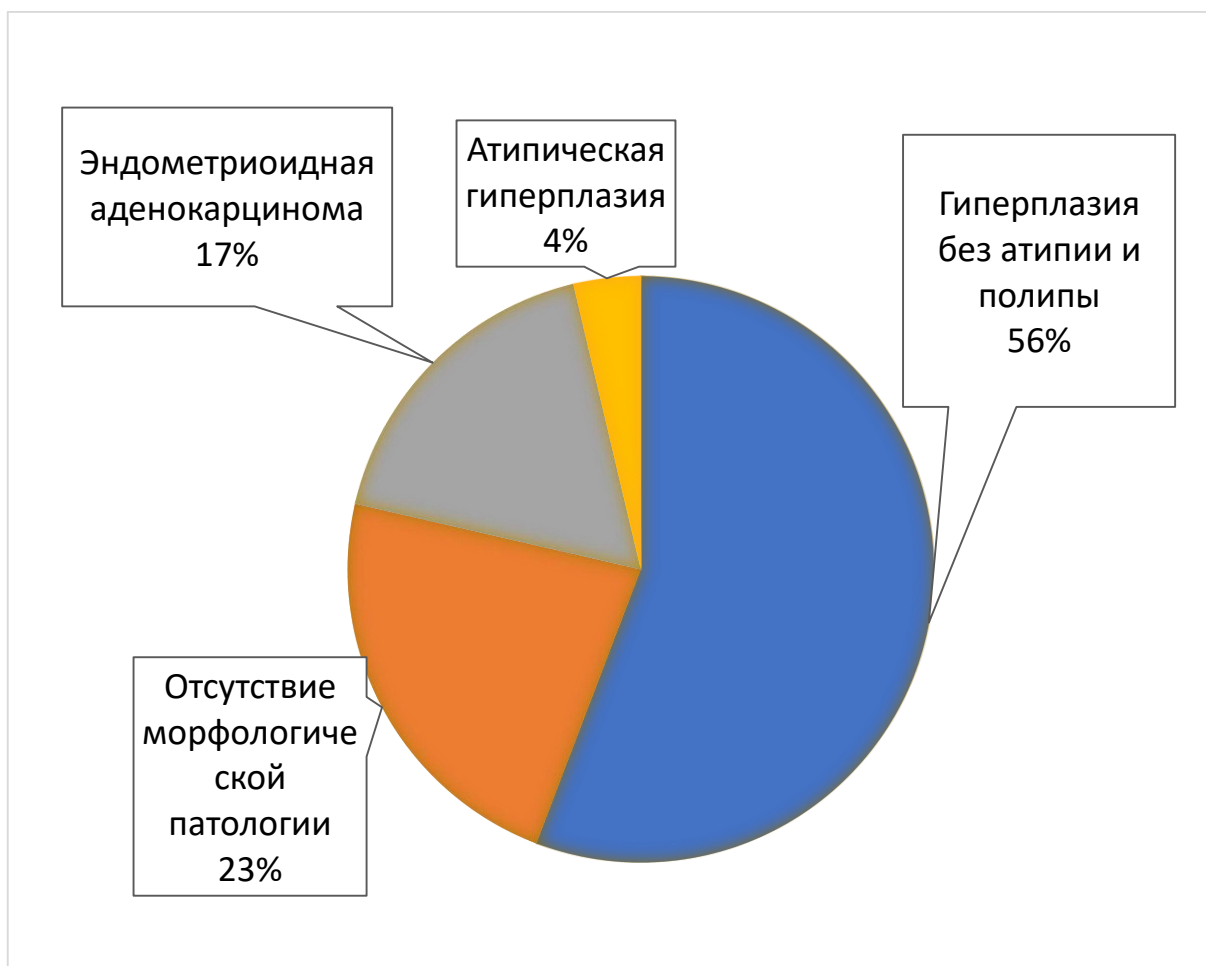


Рисунок 12 – Структура диагнозов по результатам гистологического исследования, %.

Иммуноцитохимическое исследование для выявления экспрессии p53, p63, PTEN, СЕА.

Для ИЦХИ отбирали тонкослойные препараты только с досточной клеточностью, которую определяли в окрашенном по Папаниколау препарате ЖЦ (минимум 100 клеток).

Образцы с достаточной клеточностью (20 с доброкачественной морфологической патологией и 27 со злокачественной морфологической патологией эндометрия) были отобраны для оценки экспрессии p53, p63, PTEN, СЕА в клетках эндометрия методом ИЦХИ.

ИЦХИ осуществляли непрямым иммуноферментным методом в ручном режиме в несколько этапов согласно протоколу (Таблица 4).

Вначале была проведена демаскировка антигенов и блокирование эндогенной пероксидазной активности, затем - инкубация с антителами, после чего препарат промывали водой для прекращения реакции, докрашивали гематоксилином и заключали в монтирующую среду.

Таблица 4

Протокол проведения иммуноцитохимического исследования ручным методом

№	Этапы исследования	Время
1	Маркировка стекла	-
2	Фиксация в холодном ацетоне	2 минуты
3	Демаскирование антигена (heat-induced epitope retrieval) ¹	20 минут
4	Промывание в PBS-буфере	5 минут
5	Маркировка площади нанесения антитела гидрофобным карандашом	
6	Блокирование эндогенной пероксидазы с помощью 3% H ₂ O ₂ ²	5 минут
7	Промывание в PBS- буфере	10 минут
8	Удаление остаточной жидкости на стекле вокруг препаратов	-
9	Нанесение 50 мкл выбранных первичных антител ³	30 минут
10	Промывание в PBS- буфере	10 минут

11	Удаление остаточной жидкости на стекле вокруг препаратов	
12	Нанесение системы детекции шаг 1 (энхансер)	15 минут
13	Промывание в PBS-буфере	10 минут
14	Удаление остаточной жидкости на стекле вокруг препаратов	
13	Нанесение системы детекции шаг 2 (Поли HRP-конъюгант)	30 минут
14	Промывание в PBS-буфере	10 минут
15	Удаление остаточной жидкости на стекле вокруг препаратов	
16	Нанесение 50 мкл хромогенного субстрата DAB ⁴	8 минут
17	Промывание в дистиллированной воде	10 минут
18	Окрашивание гематоксилином Майера	10 секунд
19	Промывание в проточной воде	1-2 секунды
20	Промывание в аммиачной воде для придания ядрам голубого оттенка	2-3 секунды
21	Высушивание препарата	До полного высыхания
22	Оценка окрашивания	-
23	Заключение под покровное стекло с монтирующим раствором	-

¹⁾ Процедуру тепловой демаскировки антигена проводили путем нагревания препаратов до температуры - 99⁰С в контейнере Хелледахеля с цитратным буфером (рН 6,0). Для этого использовали СВЧ -печь мощностью 600 Вт. Общее время нагревания составило 6 минут. Остывший при комнатной температуре в течение 15-20 минут цитратный буфер сливали и заливали в контейнер Хелледахеля 0,05М Tris-HCl буфер (рН 7,6) комнатной температуры на 5 минут.

²⁾ Блокирование эндогенной пероксидазы клеток проводили путем обработки выделенной области препарата 3% раствором перекиси водорода в течение 5 минут (по 1 капле раствора на выделенную область).

³⁾ Антитела предварительно разводили PBS-буфером (фосфатно-солевой буфер, рН 7,4) при комнатной температуре. Антитела к р53 (клон 318-6-11) фирмы Dako (Дания) использовали в рабочем разведении 1:200. Антитела к СЕА (клон 11-

7) фирмы Dako (Дания) применяли в рабочем разведении 1:25. Антитела к PTEN (клон 6H2.1) фирмы Dako (Дания) применяли в рабочем разведении 1:100. Антитела к TTF-1 (клон NCL-L-TTF-1) фирмы Leica Novocastra (США) использовали в рабочем разведении 1:200. Антитела к p63 (клон PBM-3A10) фирмы ПраймБиоМед (Россия) применяли в рабочем разведении 1:50.

4) Хромогенный субстрат ДАБ - 3,3-диаминобензидин (PrimeVision, ПраймБиоМед, Россия). Придает коричневое окрашивание на месте появления пероксидазной активности искомого антигена. Приготовление происходит непосредственно перед применением согласно инструкции производителя: на 1 мл раствора А (ДАБ субстрат) добавляли 40 мкл (1 каплю) раствора Б (концентрат ДАБ хромогена), тщательно перемешивая.

Вся процедура инкубации при ИЦХИ происходит во влажной камере, так как недопустимо исследуемые препараты подвергать высыханию.

Оценку результатов ИЦХИ проводили качественным методом (по наличию коричневого окрашивания зоны локализации изучаемого антигена).

При определении экспрессии СЕА оценивали мембранную и цитоплазмную реакции. При проведении реакции с PTEN оценивали окрашивание ядер и цитоплазмы. Для определения индекса пролиферативной активности p53, p63 оценивали ядерную экспрессию.

Сбор информации из историй болезни, анализ полученных данных, приготовление тонкослойных препаратов для ЦИ материала методом ЖЦ, их последующее окрашивание по Папаниколау и заключение под покровное стекло, а также окрашивание традиционных препаратов были выполнены автором лично. Просмотр цитологических препаратов и классифицирование результатов было проведено на базе кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Министерства здравоохранения РФ г. Москва (зав. кафедрой д.м.н. Годков М.А.) при непосредственном участии автора.

2.3 Статистический анализ результатов исследования

Расчеты для математического анализа полученных данных выполняли с помощью программы “Microsoft Excel 2016”. Статистическую обработку результатов исследования проводили по общепринятым методикам с использованием пакета StatTech v. 2.6.2 (разработчик - ООО "Статтех", Россия). Статистически достоверными считались различия между сравниваемыми величинами при критическом уровне значимости $p < 0,05$. Сопоставление двух групп по числовым показателям осуществляли с помощью непараметрического метода Манна-Уитни. Сравнение трех и более групп по количественным показателям проводили на основе непараметрического критерия Краскела-Уоллеса. Статистическую значимость различий групп для дихотомических и номинальных шкал определяли с использованием критерия Хи-квадрат Пирсона в случае независимых выборок, и с использованием метода МакНеймера в случае зависимых групп.

Для описания количественных показателей применяли среднее значение и стандартное отклонение в виде « $M \pm S$ ».

Категориальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей.

Для расчета показателей чувствительности, специфичности, положительной прогностической ценности, отрицательной прогностической ценности и диагностической точности использовали стандартную четырехпольную таблицу сопряженности.

Чувствительность – это способность теста достоверно определять наличие данного заболевания у лица, имеющего его в действительности.

$$\text{Чувствительность} = \text{ИПР} / (\text{ИПР} + \text{ЛОР}) \times 100\%$$

Специфичность – это способность теста достоверно определять отсутствие данного заболевания у лица, не имеющего его в действительности.

$$\text{Специфичность} = \text{ИОР} / (\text{ЛПР} + \text{ИОР}) \times 100\%$$

Положительная прогностическая ценность (PPV-Positive Predictive Value) – вероятность наличия заболевания при положительном результате теста.

$$PPV = \frac{ИПР}{ИПР + ЛПР} \times 100\%$$

Отрицательная прогностическая ценность (NPV-Negative Predictive Value) – вероятность отсутствия заболевания при отрицательном результате теста.

$$NPV = \frac{ИОР}{ЛОР + ИОР} \times 100\%$$

Точность – доля верно определенных результатов теста в общем количестве результатов.

$$\text{Точность} = \frac{ИПР + ИОР}{ИПР + ИОР + ЛПР + ЛОР} \times 100\%.$$

ГЛАВА 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭНДОМЕТРИЯ

В ходе диссертационного исследования был проведен сравнительный анализ цитологических картин в препаратах традиционной и жидкостной цитологии при гиперплазии без атипии, атипической гиперплазии эндометрия и эндометриоидной аденокарциноме, что позволило уточнить особенности, отличия и возможности жидкостной и традиционной цитологии в диагностике по этой локализации.

3.1. Цитологическое исследование эндометрия

Материал, полученный при ГС с РДВ и операционный материал пациенток исследовали методами традиционной, жидкостной цитологии и ИЦХИ.

Непатологический/физиологический эндометрий

Клеточный состав материала из полости матки меняется в течение фаз менструального цикла и в постменопаузе. В случае, если в препаратах ТЦ и ЖЦ все структуры клеток были представлены полосками (эпителий желез) или плоскими формами (покровный эпителий), цитологическую картину оценивали как отрицательную по наличию злокачественной опухоли и ее предшественников. Заключение о пролиферативном эндометрии формулировали при наличии нагромождения ядер и/или увеличенного числа капилляров. Если на малом увеличении были видны пласты из клеток эндометрия с сотоподобным рисунком и околядерными цитоплазматическими вакуолями, формулировали заключение о секреторном эндометрии.

В препаратах, приготовленных методом ТЦ, клеточные элементы выглядели несколько крупнее, чем в препаратах ЖЦ, что связано с уплощением клеток при высушивании мазка. Менее выраженные дегенеративные изменения были отмечены в препаратах ЖЦ, помимо этого количество элементов крови и артефактов было в них меньше по сравнению с препаратами ТЦ; это являлось преимуществом при детальном анализе морфологии клеток (рисунок 13, 14).

Цитологические критерии непатологического/физиологического эндометрия в препаратах традиционной и жидкостной цитологии представлены в таблице 5.

Отмечено, что независимо от нозологической формы патологии во всех препаратах ТЦ имелось очаговое нагромождение клеток и присутствовали фоновые элементы (эритроциты, лимфоциты, макрофаги, детрит), во всех препаратах ЖЦ – равномерное распределение клеток и «чистый» фон.

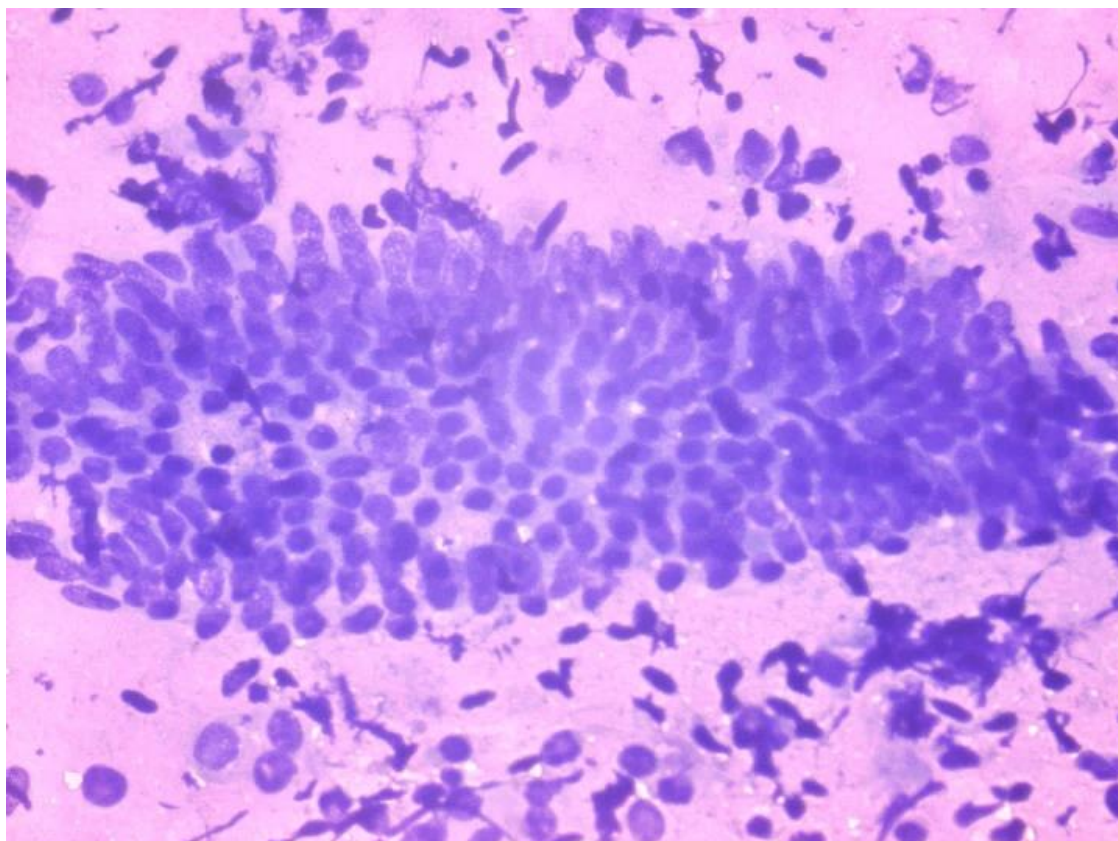


Рисунок 13. Метод традиционной цитологии. Эндометрий без морфологической патологии. Структура в виде полосы из клеток эндометрия кубической формы. Окрашивание по методу Романовского-Гимзе (x400).

На микрофотографии (рисунок 13) клетки эндометрия расположены равномерно, однослойно. Полярность расположения клеток сохранена. Клетки с овальным или круглым ядром, пространства между клетками правильные, хроматин однородно-зернистый. Маленькие ядрышки практически не визуализируются. Фон препарата представлен элементами крови и клеточным детритом.

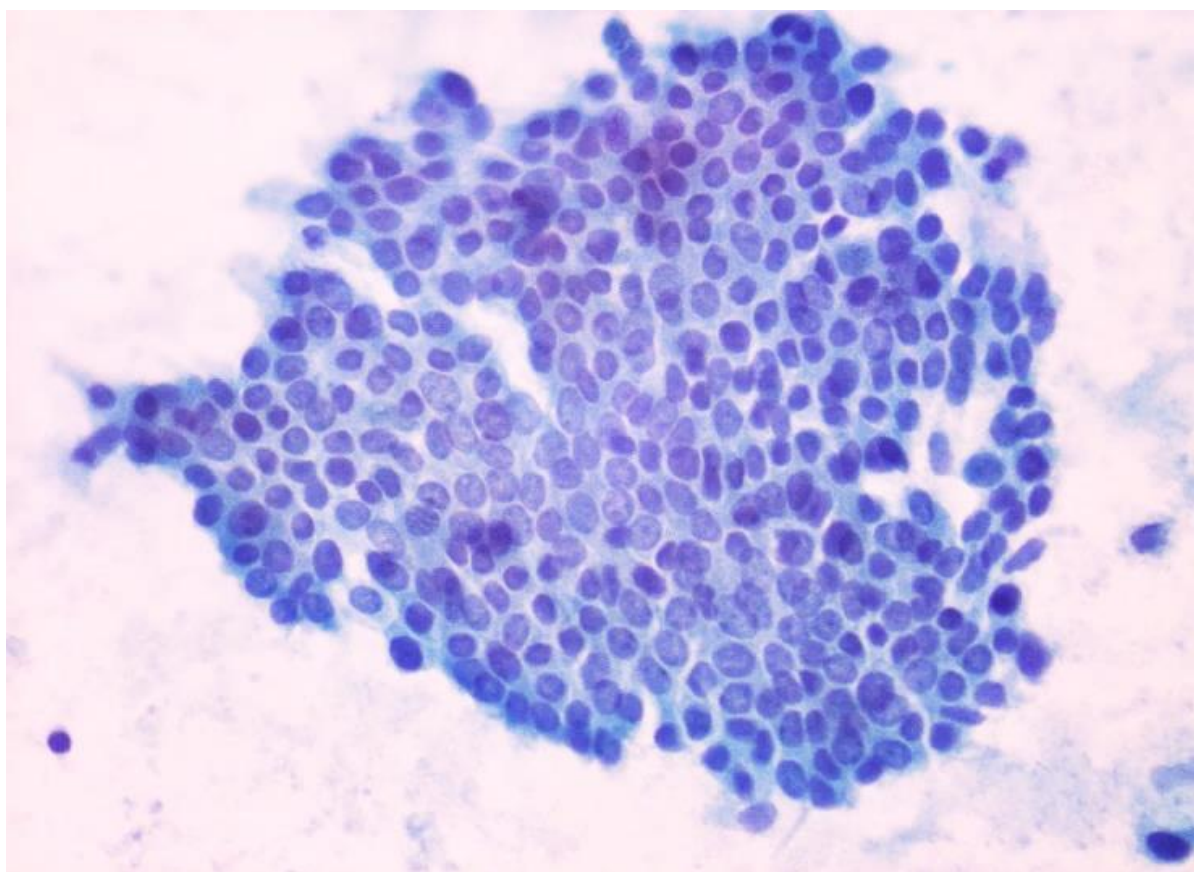


Рисунок 14. Метод жидкостной цитологии (ClearPrep). Сотоподобная структура из клеток эндометрия кубической формы. Окрашивание по Папаниколау (x400).

На микрофотографии препарата ЖЦ встречаются клетки эндометрия более гиперхромные и полиморфные, с более видимыми ядрышками, чем в препаратах ТЦ.

Таблица 5

Цитологические критерии непатологического/физиологического эндометрия в традиционных и жидкостных препаратах (n=31)

Цитологические критерии	Традиционный цитологический препарат	Препарат, приготовленный методом жидкостной цитологии
Расположение клеток/структуры	«Сотоподобные» пласты, Структуры в виде	«Сотоподобные» скопления, структуры в

	«трубочек»	виде «трубочек» и шаровидные структуры
Форма, размер клеток	Мономорфные, кубические клетки без признаков атипии. Размер клеток незначительно изменяется в зависимости от фазы менструального цикла, клетки несколько увеличиваются в фазу секреции. Выглядят крупнее, чем в ЖЦ	Клетки меньше размером, чем в ТЦ. Мономорфные, кубические клетки, меняющиеся в течение менструального цикла
Ядра	Приближен к размеру эритроцита	Приближен к размеру эритроцита или меньше
Хроматин	Гиперхромный, не просматривается	Мелкозернистый, просматривается хорошо
Ядрышки	Как правило не визуализируются	Единичные мелкие
Фон	Эритроциты	По сравнению с традиционными более чистый

Гиперплазия эндометрия без атипии

При гиперплазии эндометрия без атипии в препаратах был отмечен обильный клеточный состав со структурной перестройкой железистого и стромального компонентов. В традиционных цитологических препаратах отмечено увеличение числа желез, изменение их формы. Обнаружены скопления клеток в виде железисто-альвеолярных и папиллярных структур, расширенных к периферии трубочек, иногда с «окошками». Отмечено небольшое нагромождение клеток с

наложением ядер не более чем в три слоя. В строме, богатой фибробластоподобными клетками, наблюдали рассеянную инфильтрацию лимфоцитами. В препаратах ЖЦ фоновые элементы практически не сохранялись, но были обнаружены увеличенные призматические клетки, лежащие в виде пластов и тяжей.

Цитологические критерии гиперплазии эндометрия без атипии в препаратах традиционной и жидкостной цитологии представлены в таблице 6.

Гиперплазия эндометрия без атипии. Пациентка С., 46 лет. Рисунок 15, 16.

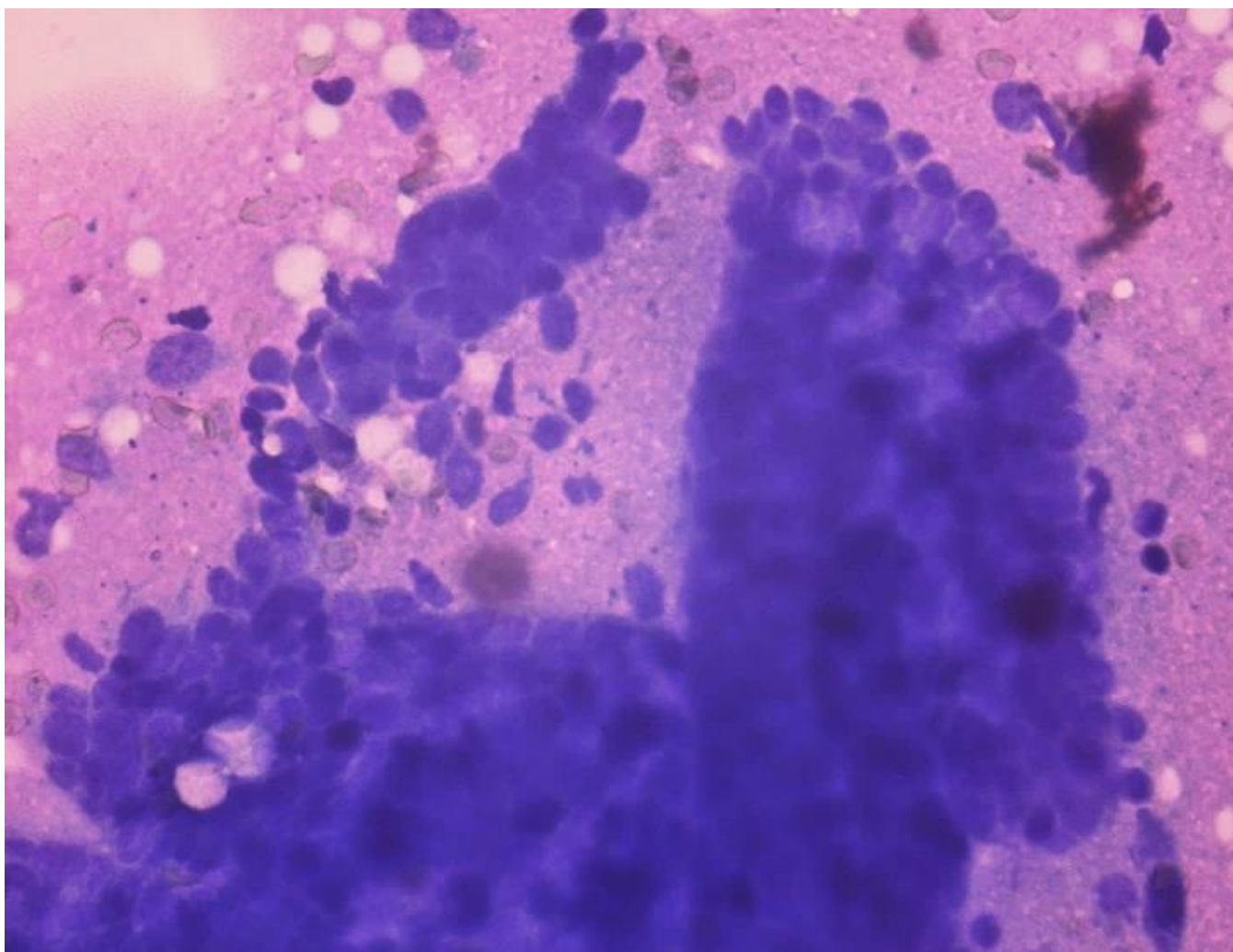


Рисунок 15. Метод традиционной цитологии. Структуры в виде трубочек из эпителиальных клеток эндометрия. Окрашивание по методу Романовского-Гимзе (x400).

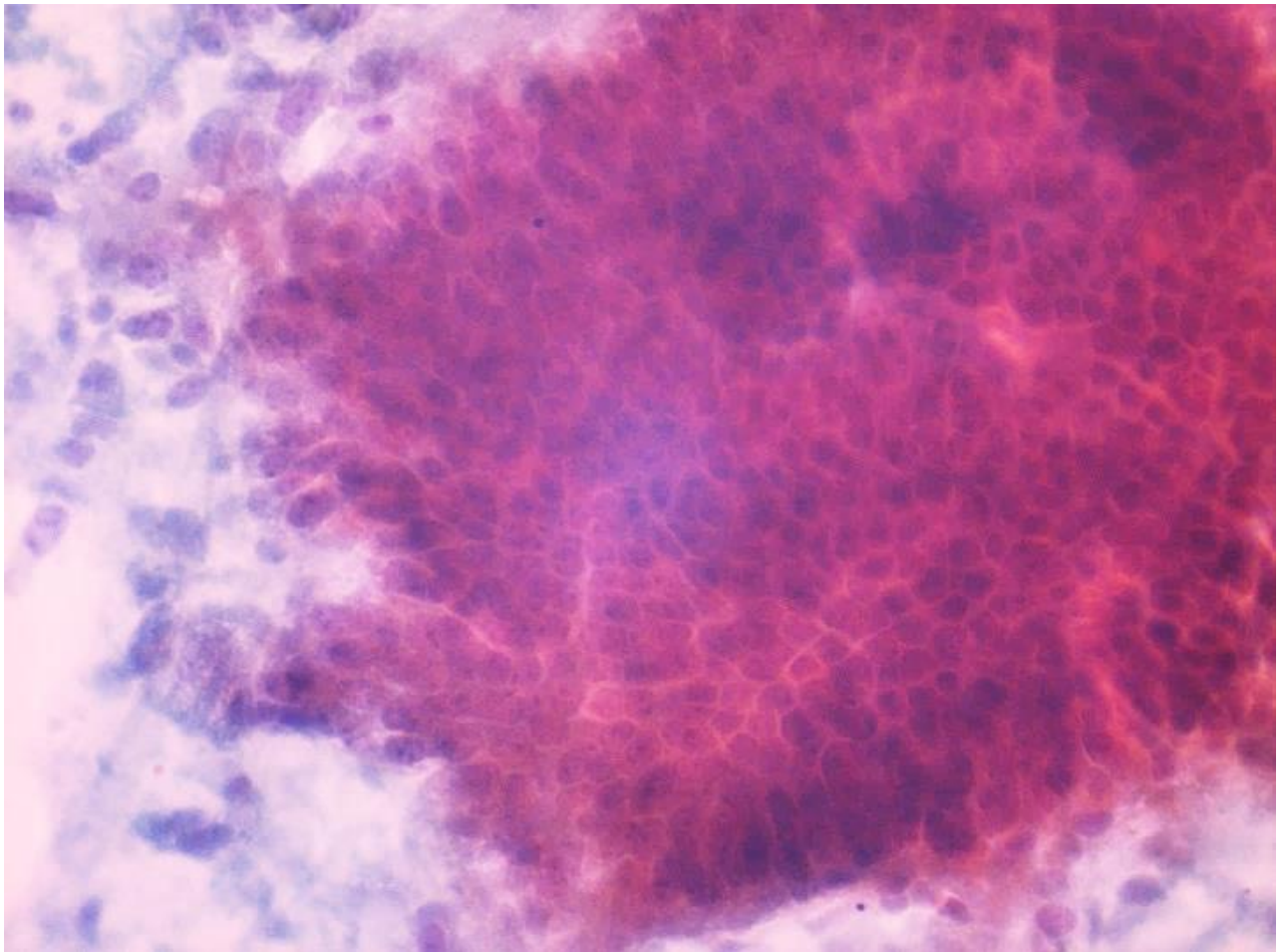


Рисунок 16. Метод жидкостной цитологии (ClearPrep). Клетки эндометрия в плотных скоплениях с нагромождением клеток. Окрашивание по Папаниколау (x400).

Гиперплазия эндометрия без атипии. Первая фаза цикла. Пациентка Л., 44 г. В препарате ТЦ обнаружены обширные структуры из эпителиальных клеток эндометрия. Размер клеток увеличен больше, чем в препаратах ЖЦ. Ядра гиперхромные, мономорфной, округло-овальной, в части структур «вытянутой» формы, цитоплазма базофильная (рисунок 17).

В препаратах ЖЦ встречаются разнообразной формы структуры из клеток эндометрия, располагающихся в плотных скоплениях и нагромождениях (рисунок 18). Цитоархитектура лучше сохранена в препаратах жидкостной цитологии. С увеличением степени нарушения строения железы становятся более разветвленными.

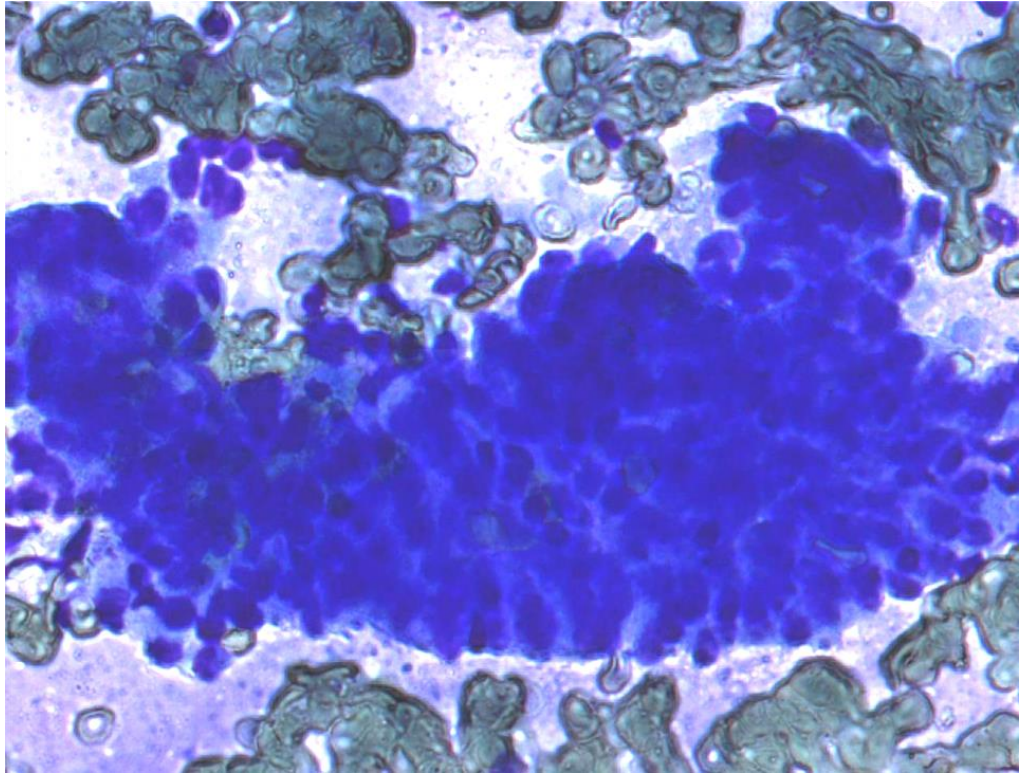


Рисунок 17. Метод традиционной цитологии. Окрашивание по методу Романовского-Гимзе (x400).

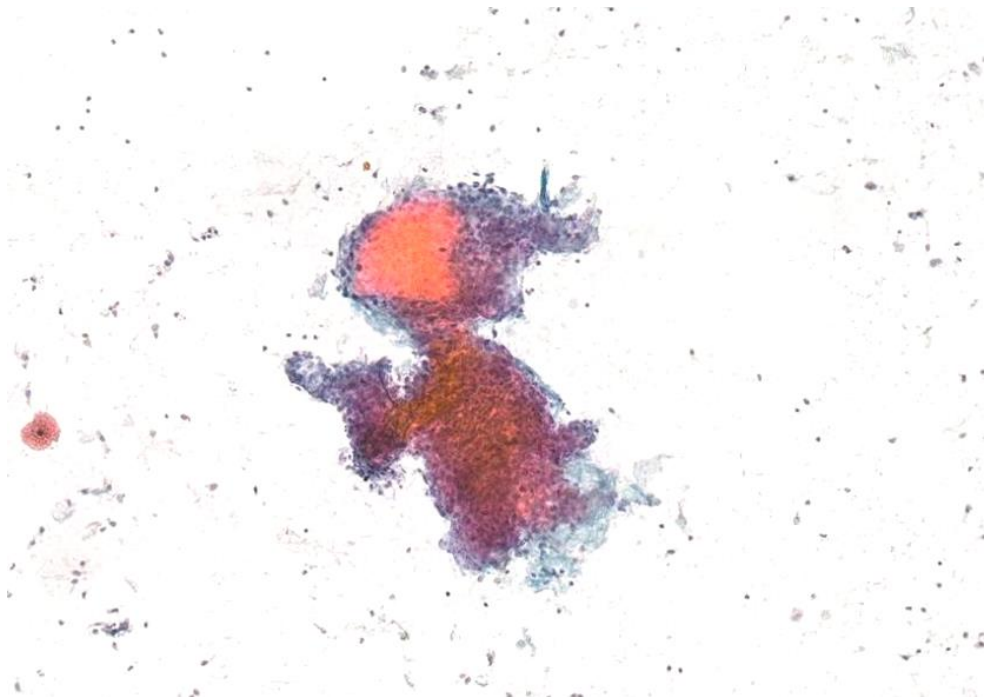


Рисунок 18. Метод ЖЦ (ClearPrep). Окрашивание по Папаниколау (x100).

Гиперплазия эндометрия без атипии. Пациентка А., 47 лет. Рисунок 19, 20.

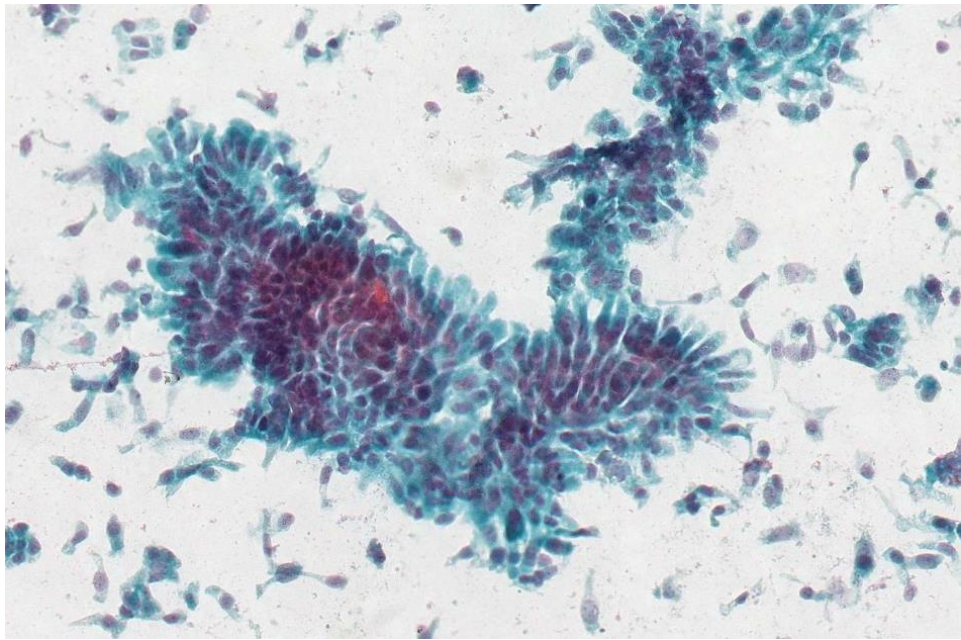


Рисунок 19. Метод жидкостной цитологии (ClearPrep). Обширные структуры из эпителиальных клеток эндометрия. Окрашивание по Папаниколау (x200).

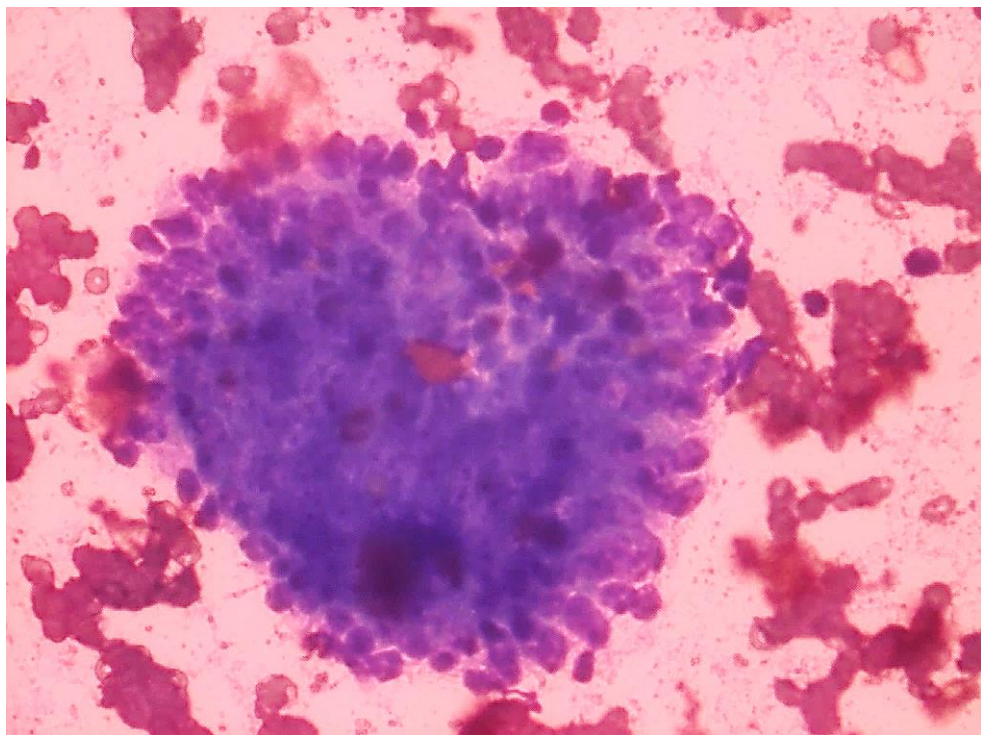


Рисунок 20. Метод традиционной цитологии. Обширные структуры из эпителиальных клеток эндометрия. Окрашивание по Романовскому-Гимзе (x400).

Гиперплазия эндометрия без атипии. Пациентка Л., 51 лет. Рис. 21, 22, 23, 24.

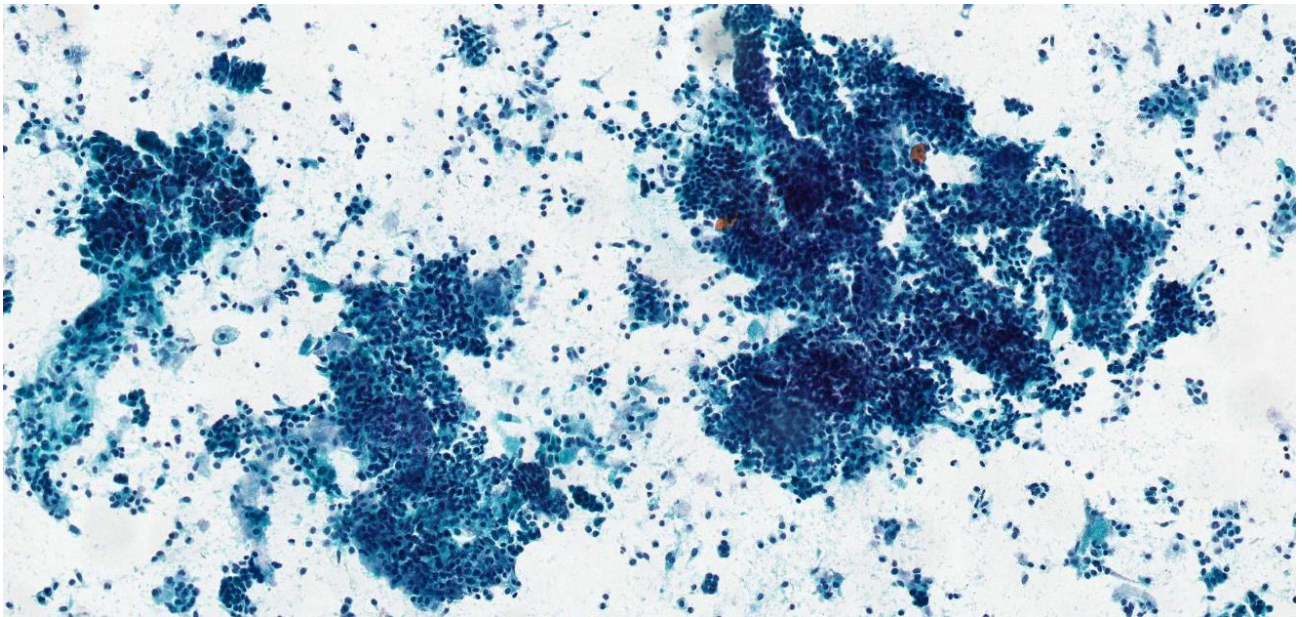


Рисунок 21. Метод жидкостной цитологии (ClearPrep). Расширенные, ветвящиеся структуры клеток эндометрия. Часть клеток лежит разрозненно. Окрашивание по Папаниколау (x100).

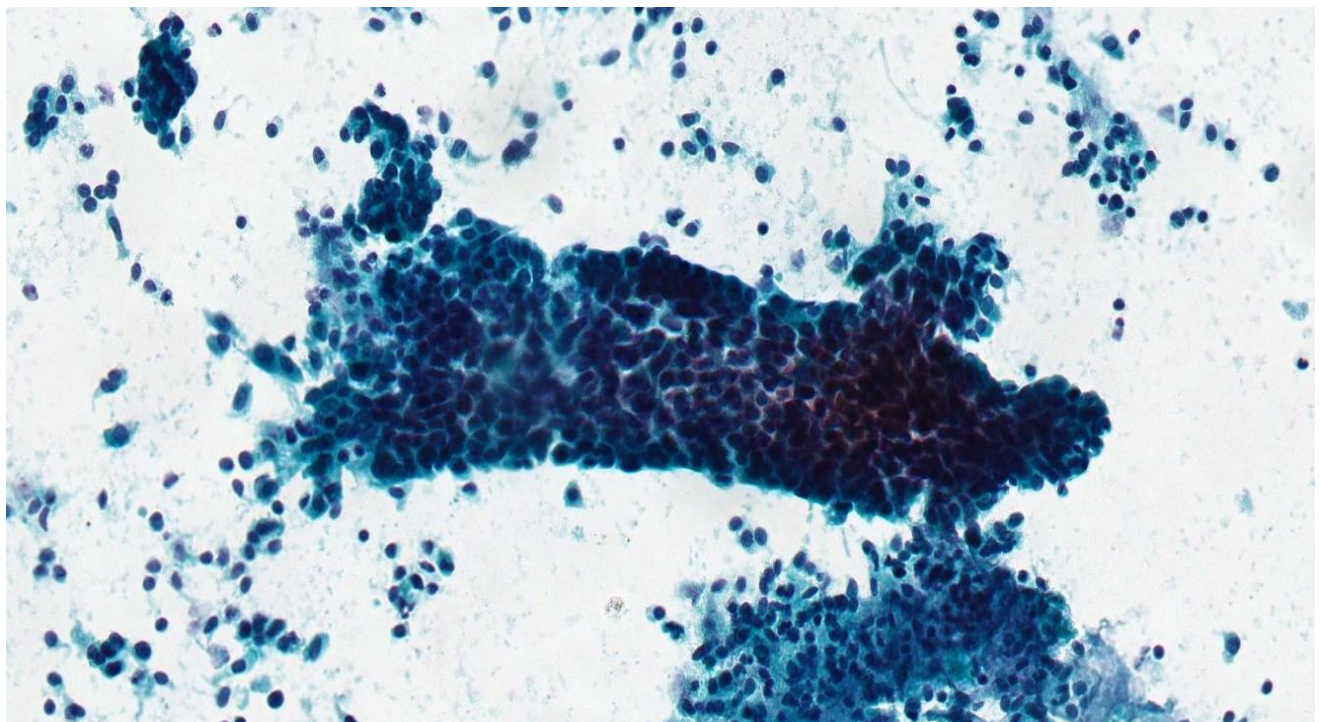


Рисунок 22. Метод жидкостной цитологии (ClearPrep). Клетки эндометрия в виде трубочки с расширением на периферии. Часть клеток лежит разрозненно. Имеется нагромождение клеток. Окрашивание по Папаниколау (x200).

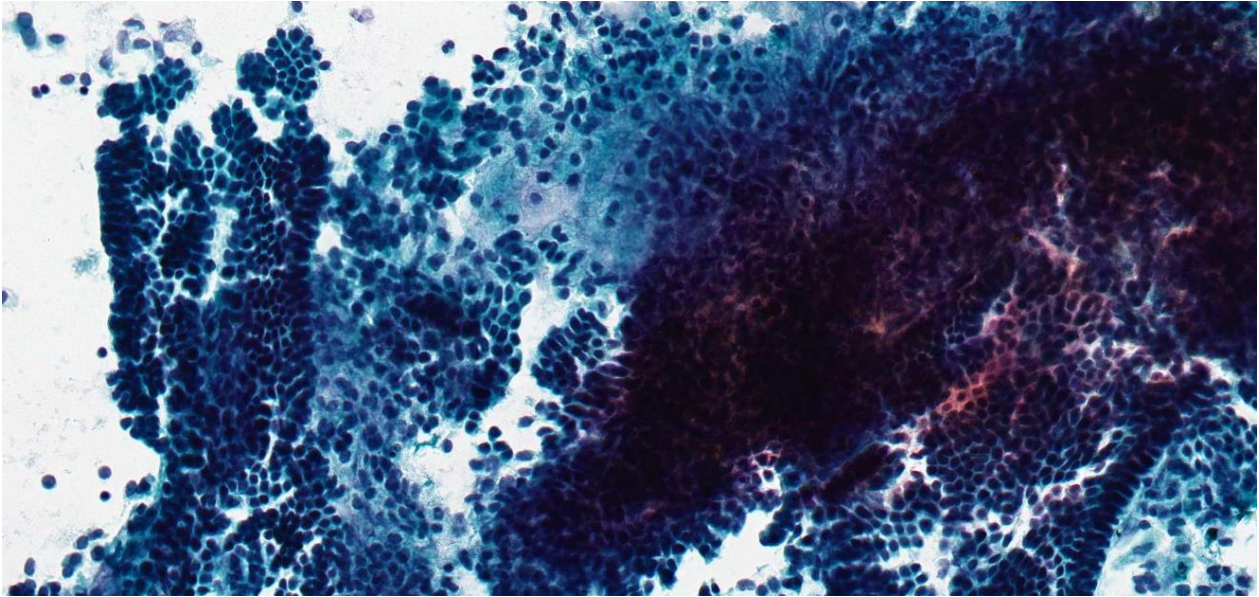


Рисунок 23. Метод жидкостной цитологии (ClearPrep). Клетки эндометрия в расширенных, ветвящихся структурах. Клетки эндометрия без признаков структурной и ядерной атипии. Окрашивание по Папаниколау (x200).

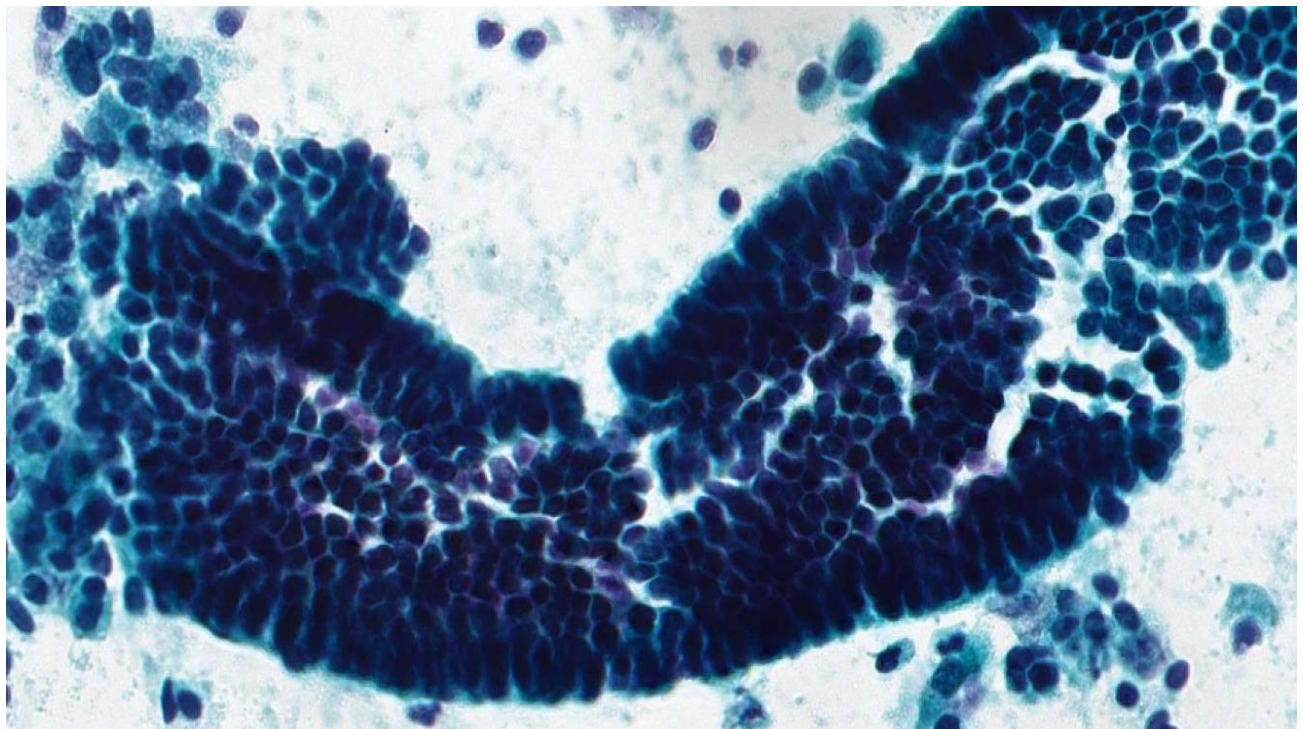


Рисунок 24. Метод жидкостной цитологии (ClearPrep). Клетки эндометрия в структуре в виде трубочки. Клетки эндометрия без признаков структурной и ядерной атипии. Окрашивание по Папаниколау (x400).

Цитологические критерии гиперплазии эндометрия без атипии в традиционных и жидкостных препаратах (n=76)

Цитологические критерии	Традиционный цитологический препарат	Препарат, приготовленный методом жидкостной цитологии
Расположение клеток/ Структуры	Железисто-альвеолярные и папиллярные структуры, расширенные трубочки, иногда с «окошками», тесное расположение, небольшое нагромождение клеток	Железисто-альвеолярные и папиллярные, палисадообразные структуры. В трубочках просматривается двухслойное и многослойное расположение клеток. Структурное расположение клеток сохраняется лучше, в отличие от традиционного метода.
Форма, размер клеток	Увеличенный размер. Визуально крупнее, чем в ЖЦ. Гиперхромия ядер, базофильная цитоплазма Полиморфизм не отмечается.	Увеличенный размер, но меньше, чем в ТЦ. Полиморфизм не отмечается.
Ядра	Увеличен: в полтора-	Увеличен

	два раза больше размера эритроцита. Форма мономорфная, округло-овальная, в части структур «вытянутая»	незначительно: не более чем в полтора раза больше размера эритроцита. Форма мономорфная, округло-овальная
Хроматин	Зернистый, просматривается лучше, чем в жидкостных препаратах	Зернистый
Ядрышки	Единичные, мелкие	Мелкие, в небольшом количестве
Фон	Эритроциты	По сравнению с традиционными более чистый

Атипическая гиперплазия эндометрия

При атипической гиперплазии отмечены выраженные пролиферативные изменения эпителиального компонента с атипией строения желез. Железы значительно различаются по размеру и форме, расположены вплотную друг к другу, промежуточная строма скудная. В препаратах ТЦ отмечали нагромождения клеток, разрозненное, рыхлое расположение эндометриальных клеток в структурах. В препаратах ЖЦ клетки располагались отдельно и/или в виде небольших трехмерных комплексов с клеточной скученностью. Клетки формировали крибриформные, «разлетающиеся» структуры, расположение клеток в виде перьев по периферии, розеткоподобные структуры. Отмечено разрозненное расположение эпителиальных клеток. Структурное расположение клеток сохранялось лучше в препаратах ЖЦ, чем в ТЦ.

Атипия клеток от слабой до умеренно выраженной. Ядра клеток укрупнены в сравнении с нормальными, имеют вытянутую форму, гиперхромные. Атипия ядер от умеренной до выраженной, ядрышки просматриваются. Отмечен неровный контур ядерной мембраны. Встречаются крупные «голые» ядра с атипией. Цитоплазма светлая, умеренно обильная.

Хроматин грубозернистый, лучше просматривается в препаратах ТЦ.

Атипическая гиперплазия. Пациентка П., 56 лет. Рисунок 25, 26.

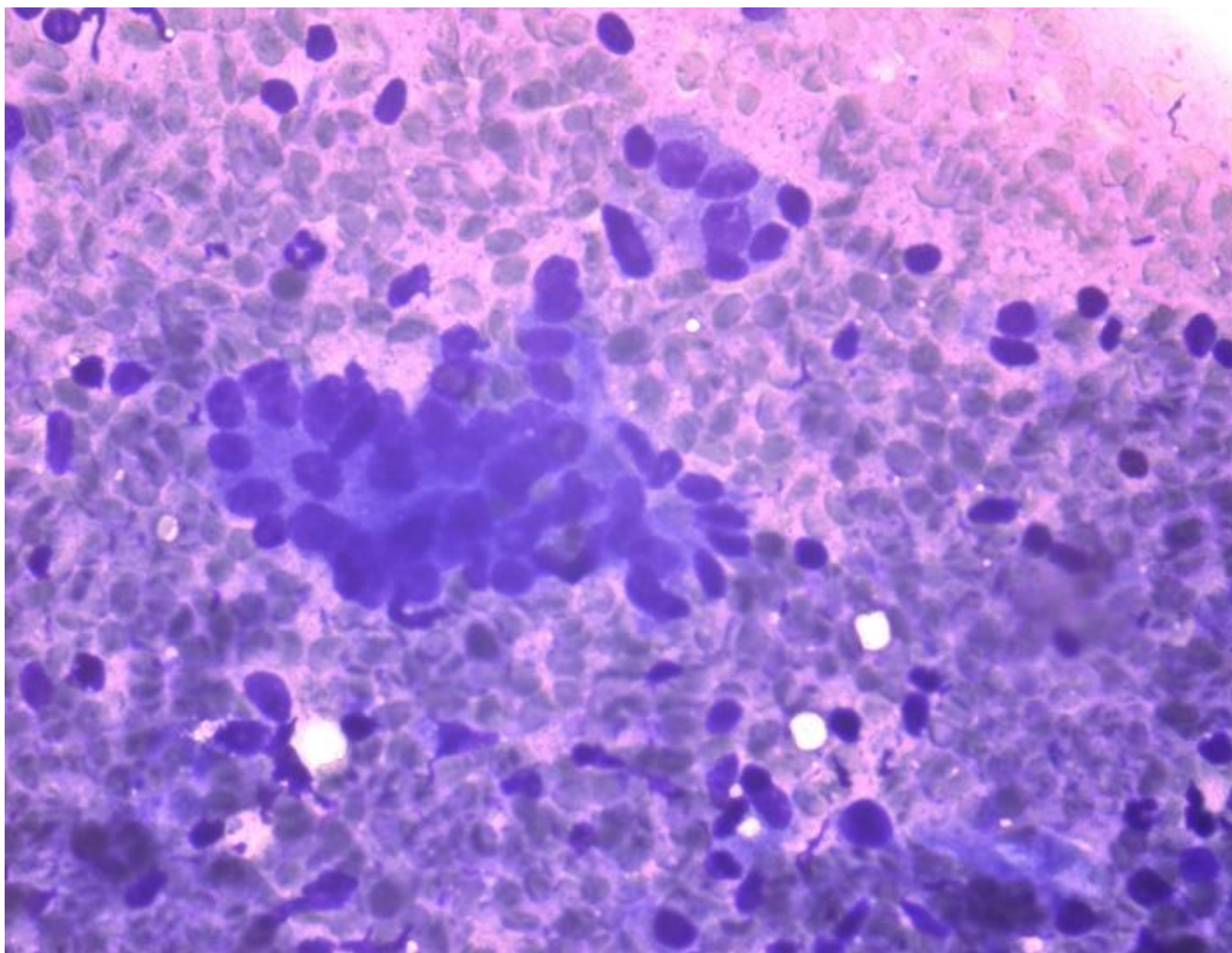


Рисунок 25. Метод традиционной цитологии. Небольшие скопления эндометрия железисто-подобной конфигурации на фоне воспалительно-некротического процесса. Ядра овальные, укрупненные. Окрашивание по методу Романовского-Гимзе (x400).

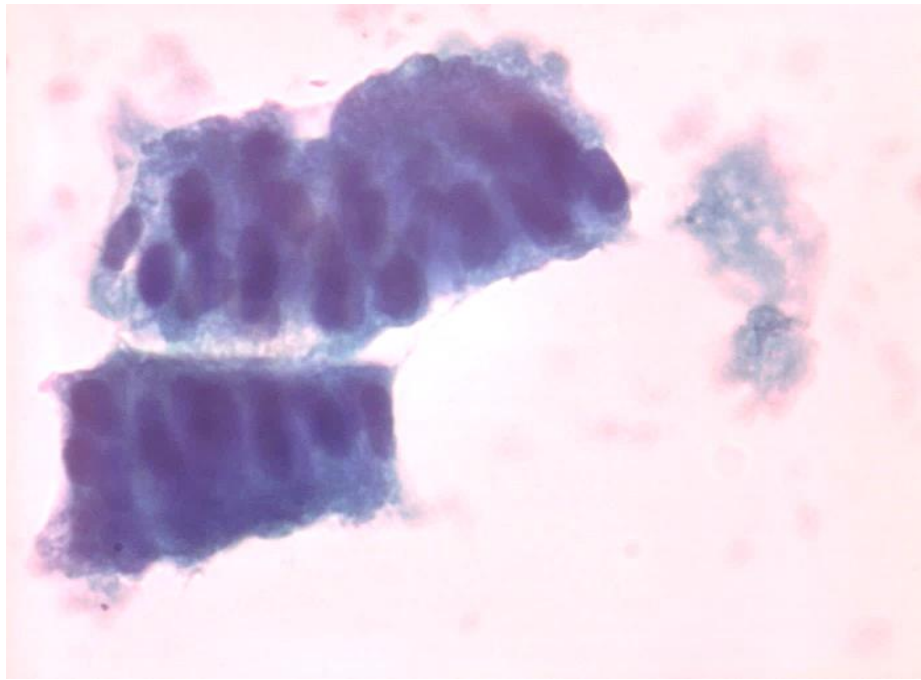


Рисунок 26. Метод жидкостной цитологии (ClearPrep). Присутствуют характерные палисадообразные структуры (псевдостратификация). Окрашивание по Папаниколау (x1000).

Атипичическая гиперплазия. Пациентка Л., 61 г. Рисунок 27, 28, 29, 30.

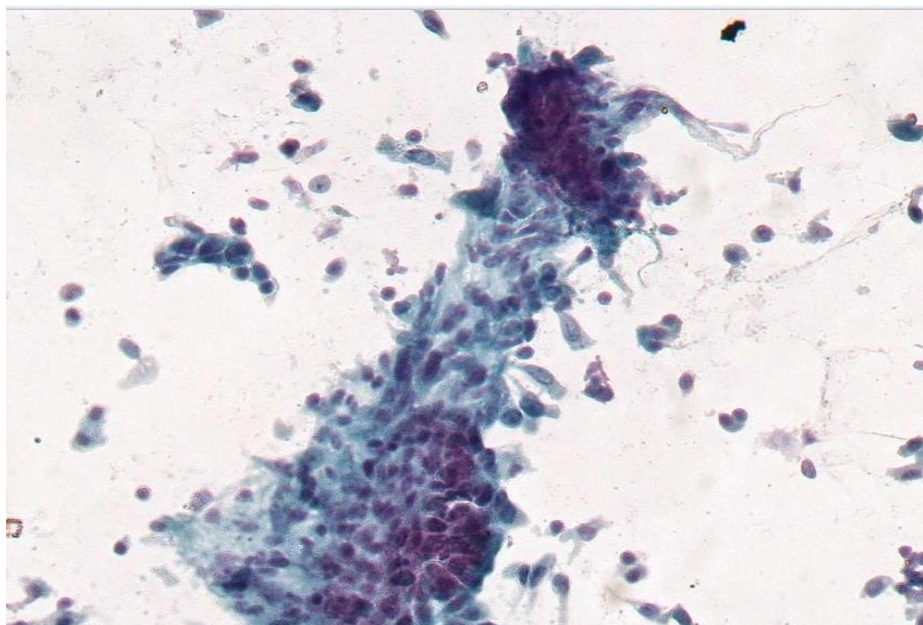


Рисунок 27. Метод жидкостной цитологии (ClearPrep). Рыхлое расположение клеток, клетки «разлетающиеся» по периферии структур. Окрашивание по Папаниколау (x200).

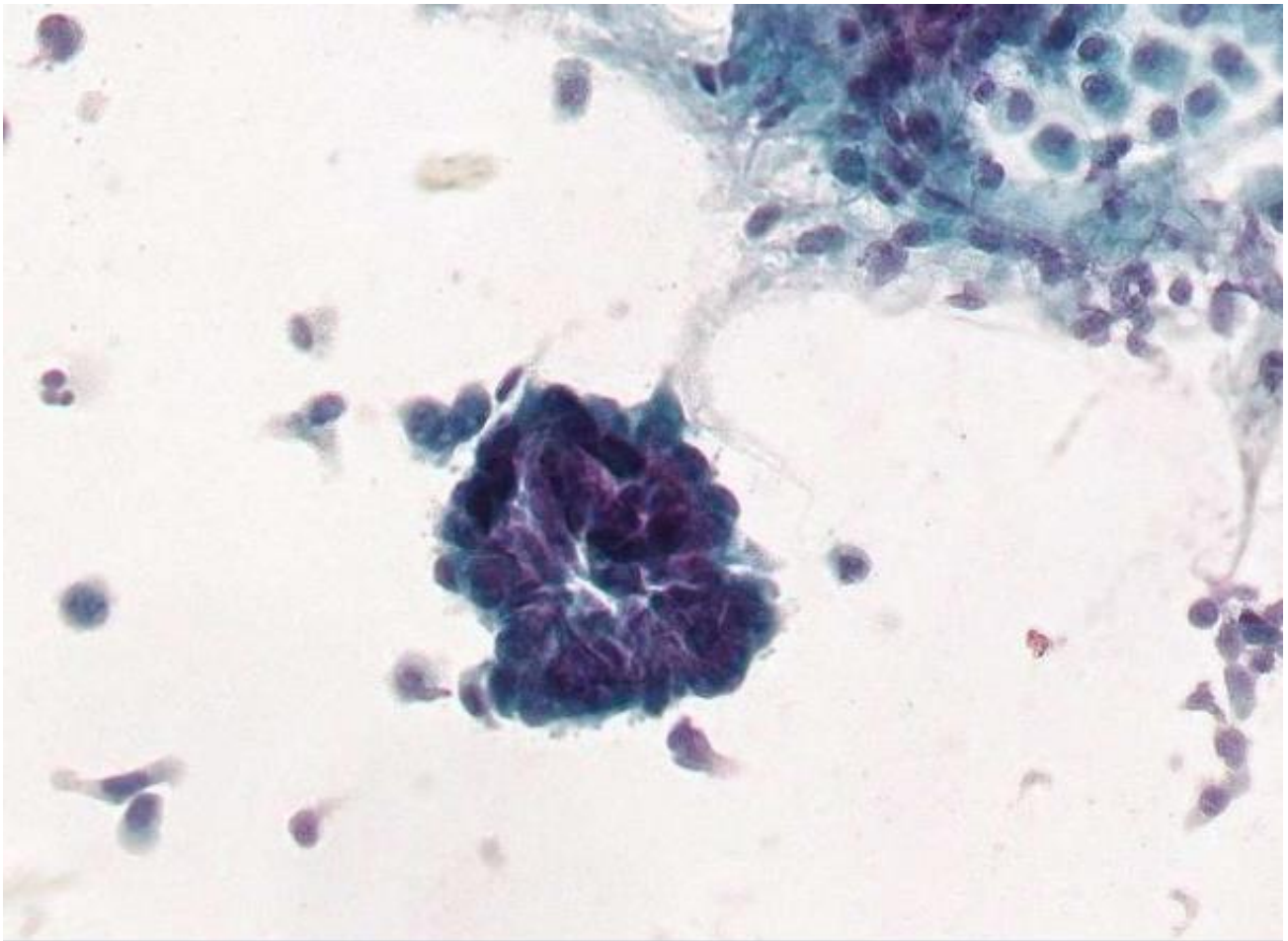


Рисунок 28. Метод жидкостной цитологии. (ClearPrep). Структура в виде розетки. Ядра крупные, гиперхромные. Окрашивание по методу Папаниколау (x200).

При атипичической гиперплазии эндометрия отмечены как железы с расширенным и разветвленным рисунком и рыхлым расположением клеток в структурах (рисунок 27), так и небольшие папиллярные структуры эндометриальных клеток и структуры в виде розеток (рисунок 28) с характерной клеточной скученностью. На фоне крупных гипохромных ядер встречаются клетки с гиперхромными ядрами.

В препаратах ЖЦ также отмечали атипичию строения и клеток желез, но отсутствовал некротический фон. Цитологические критерии атипичической гиперплазии эндометрия в препаратах традиционной и жидкостной цитологии представлены в таблице 7.

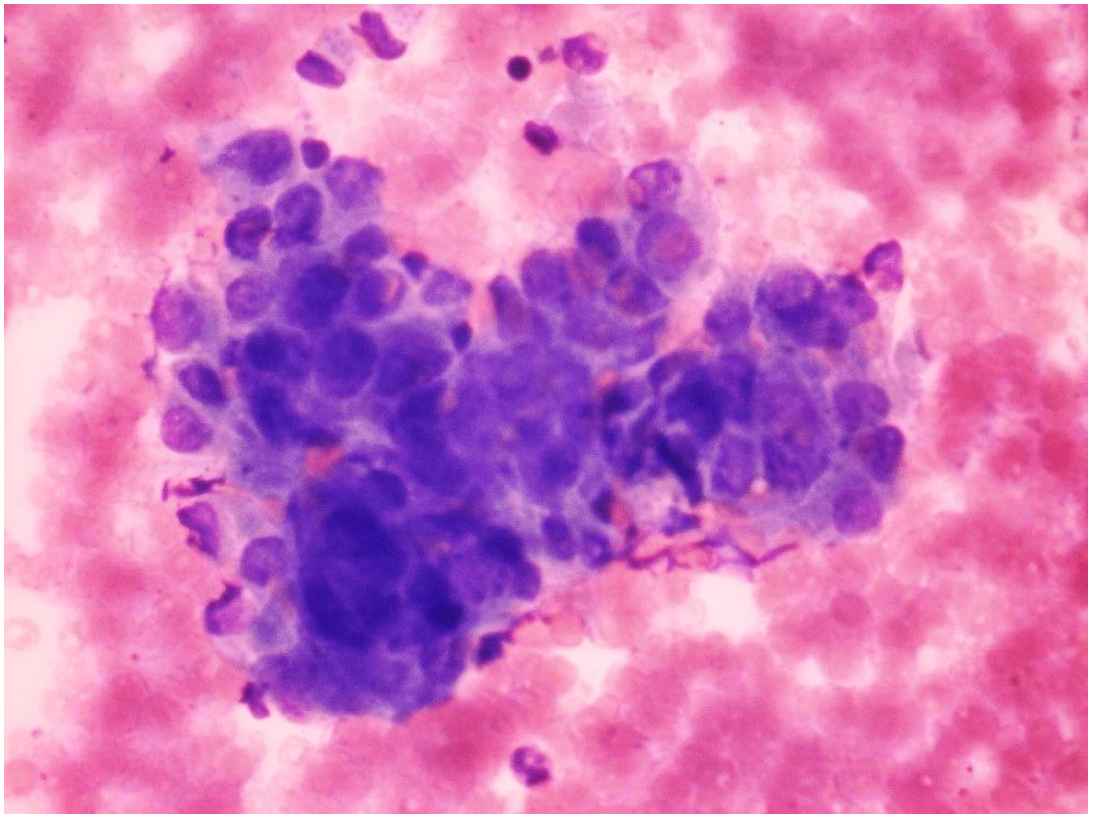


Рисунок 29. Метод традиционной цитологии. Железистоподобные структуры. Ядра укрупненные. Окрашивание по методу Романовского-Гимзе (x400).

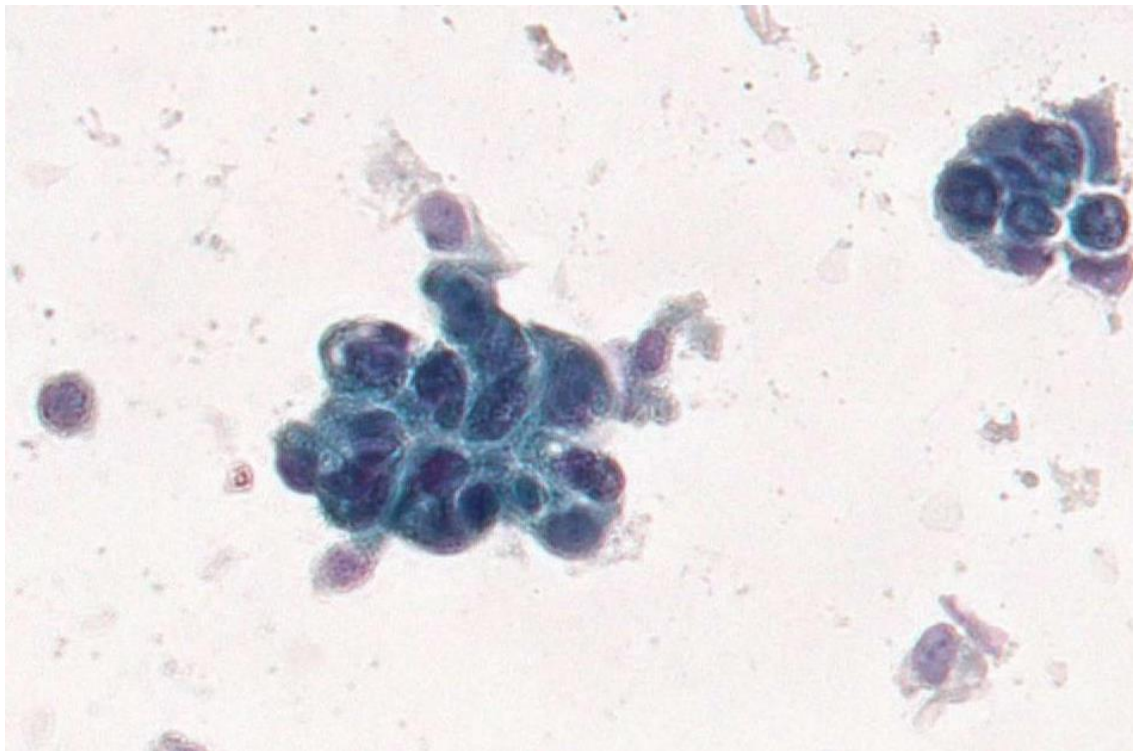


Рисунок 30. Метод жидкостной цитологии. (ClearPrep). Окрашивание по Папаниколау (x400). Сосочкоподобная структура. Ядра крупные, гиперхромные.

Цитологические критерии атипической гиперплазии эндометрия в традиционных и жидкостных препаратах (n=5)

Цитологические критерии	Традиционный цитологический препарат	Препарат, приготовленный методом жидкостной цитологии
Расположение клеток / структуры	«Разлетающиеся» структуры, расположение клеток в виде перьев по периферии структур, нагромождение клеток, рыхлое расположение клеток в структуре, разрозненное расположение эпителиальных клеток с атипией ядер	Отдельные клетки и\или небольшие трехмерные комплексы с клеточной скученностью. Крибриформные структуры. «Разлетающиеся» структуры, расположение клеток в виде перьев по периферии, нагромождение и рыхлое расположение клеток в структуре, разрозненное расположение эпителиальных клеток. Розеткоподобные структуры. Структурное расположение клеток сохраняется лучше, в отличие от традиционного метода.
Форма, размер клеток	Атипия от слабой до умеренной и выраженной. Изменения	Атипия от слабой до умеренной. Изменения сравнительно

	сравнительно мономорфные.	мономорфные.
Ядра	Укрупнены в сравнении с нормальными, вытянутой формы. Атипия от умеренной до выраженной. Гиперхромия. Встречаются крупные «голые» ядра с атипией	Укрупнены визуально менее, чем при ТЦ. Вытянутой формы. Сигароподобное расположение ядер клеток. Атипия от умеренной до выраженной. Легкая гиперхромия.
Хроматин	Грубозернистый хроматин, просматривается лучше, чем в жидкостных препаратах	Грубозернистый, гетерогенный хроматин
Ядрышки	Могут быть видны	Как правило просматриваются, редкие, мелкие. Видны лучше, чем в традиционных препаратах
Фон	Эритроциты, много разрушенных (измененных). Разрушенные лейкоциты, крошковидные массы (опухолевый диатез)	По сравнению с традиционными более чистый, но на отдельных участках препарата могут встречаться элементы опухолевого диатеза

Эндометриоидная аденокарцинома

В препаратах ТЦ отмечены некротический фон, опухолевый диатез, ядерная атипия. Обнаружены комплексы из клеток с неравномерными выпячиваниями, нагромождением ядер более чем в три слоя, а также наличие опухолевых структур с хаотичным расположением клеток.

В препаратах ЖЦ встречали клетки опухоли, расположенные в виде мелких и крупных железисто-альвеолярных комплексов или сосочков, а также определяли нарушение цитоархитектоники в структурах: структуры «спина к спине». Отмечены разрозненно лежащие клетки, пласты, полоски, и/или трехмерные кластеры со скученностью клеток. Пласты, как правило, имеют неправильную форму с нагромождением клеток, перистостью по краю пласта. Встречаются папиллярные структуры с наложением, нагромождением ядер.

При высокодифференцированной аденокарциноме признаки злокачественности не ярко выражены: клетки однородные, ядра округлой или продолговатой формы, относительно небольшого размера, хроматин мелкоглыбчатый или мелкозернистый. В этой связи были отмечены трудности отличия злокачественных клеток от клеток гиперплазированного эпителия. Цитологические признаки злокачественности при умереннодифференцированной и низкодифференцированной аденокарциноме были более выражены, и оценка цитологических картин обычно не вызывала трудностей.

Цитологические критерии аденокарциномы эндометрия в препаратах традиционной и жидкостной цитологии представлены в таблице 8.

При высокодифференцированной эндометриоидной аденокарциноме были обнаружены трехмерные папиллярные структуры клеток, группы клеток в виде розеток и железистых трубочек, а также разрозненно лежащие клетки с атипией. В традиционных препаратах фон представлен фибробластоподобными стромальными клетками и скудным опухолевым диатезом. Клетки располагаются многослойно с нагромождением. Просматриваются мелкие ядрышки.

Эндометриоидная аденокарцинома. Пациентка Д., 65 лет. Рисунок 31.

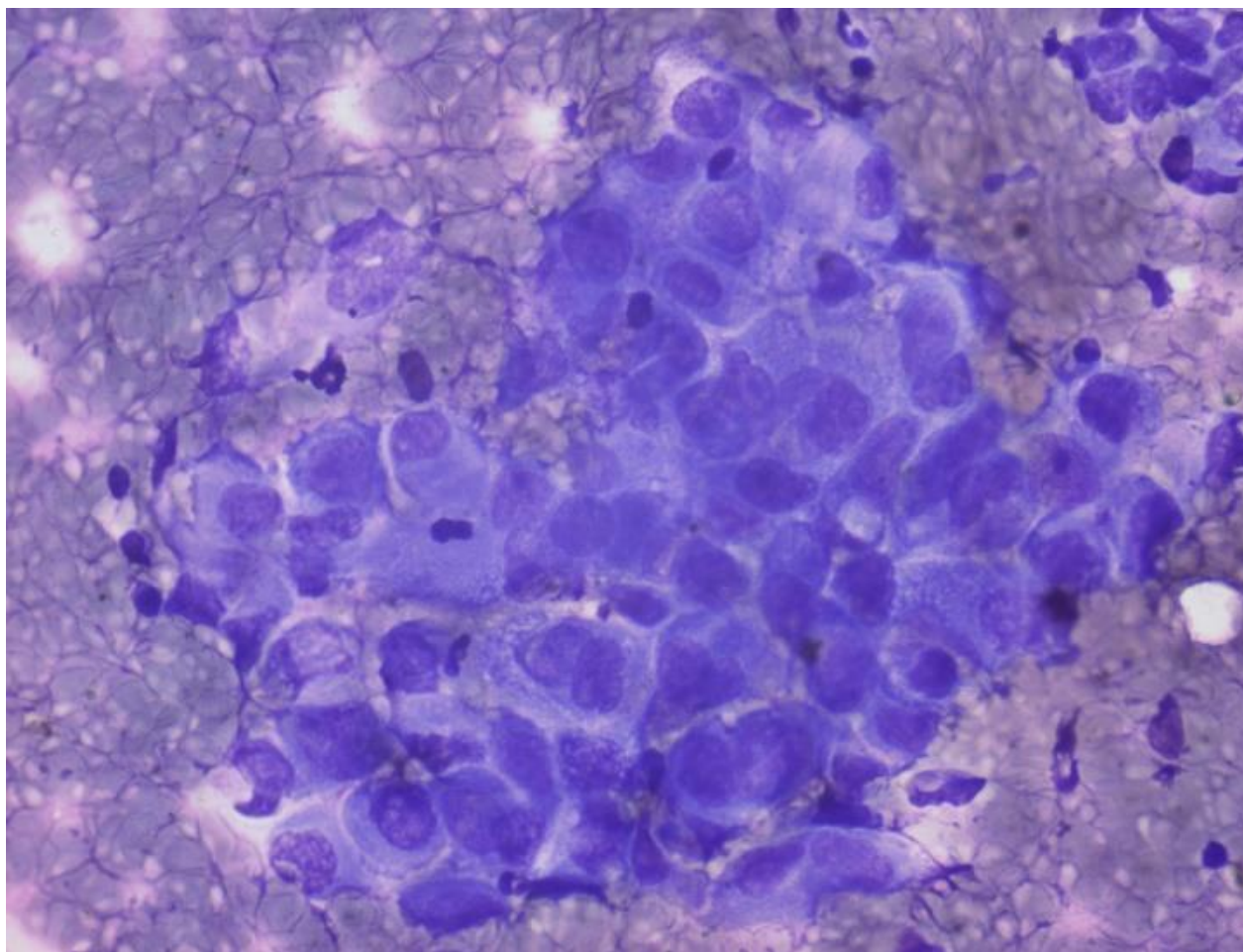


Рисунок 31. Метод традиционной цитологии. Клетки расположены в пластах неправильной формы, накладываются друг на друга. Ядра разных размеров и формы. Опухолевый диатез. Окрашивание по методу Романовского – Гимзе (x400).

При низкодифференцированной аденокарциноме было отмечено большое количество разрозненно лежащих клеток, солидных пластов и рыхлых групп клеток, а также единичные папиллярные структуры. Нарушена полярность расположения клеток и ядер в структурах. Фон представлен опухолевым диатезом, встречается небольшое количество гистиоцитов. Клетки эндометрия небольшого размера, полиморфные, цитоплазма скудная, хроматин неравномерный, ядрышки крупные, высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение.

Эндометриоидная аденокарцинома. Пациентка Д., 65 лет. Рисунок 32.

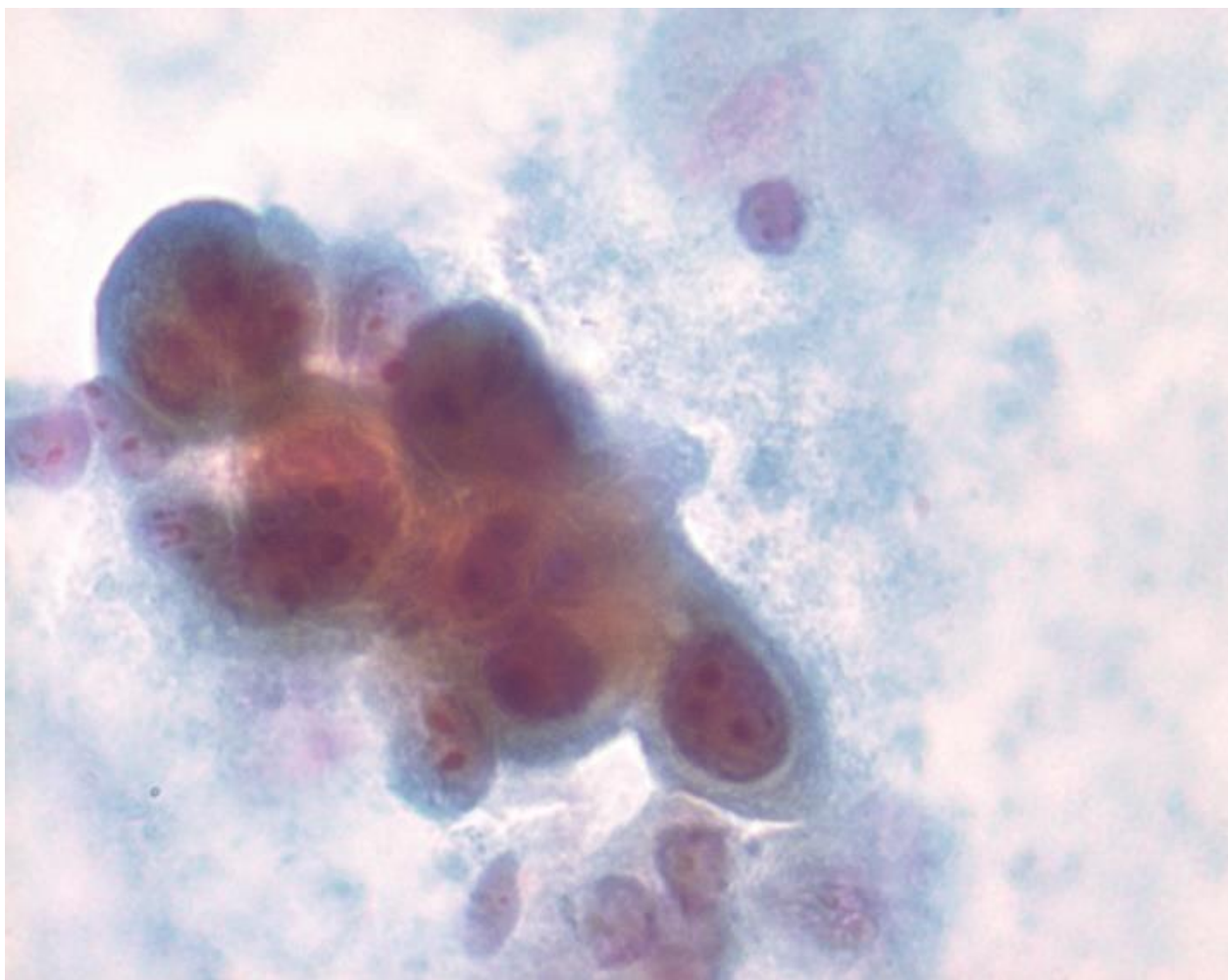


Рисунок 32. Метод жидкостной цитологии (ClearPrep). Плотная сосочкоподобная структура. Выраженный полиморфизм клеток и ядер. Окрашивание по Папаниколау (x1000).

Папиллярная структура, клетки разных размеров и формы, ядра укрупнены и существенно различаются по размерам, ядерная мембрана неровная, ядрышки просматриваются, полиморфные, структура хроматина крупнозернистая (рисунок 32).

Эндометриоидная аденокарцинома. Пациентка Н. 69 лет. Рисунок 33, 34.

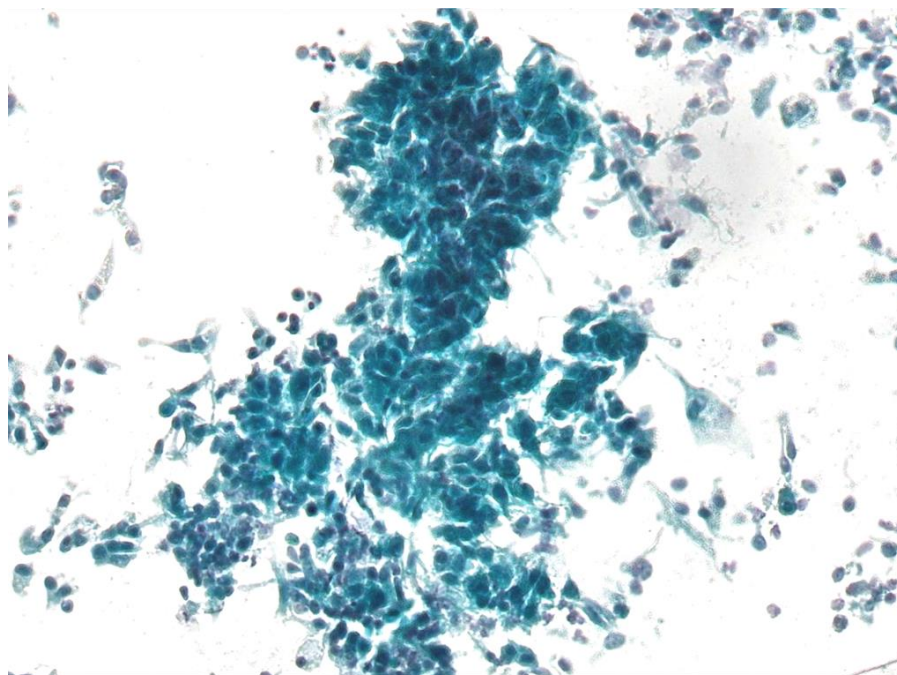


Рисунок 33. Метод жидкостной цитологии (ClearPrep). Рыхлое расположение клеток в структурах, в виде «перьев» по периферии; нагромождение ядер. Ядра разных размеров и формы. Окрашивание по Папаниколау (x200).

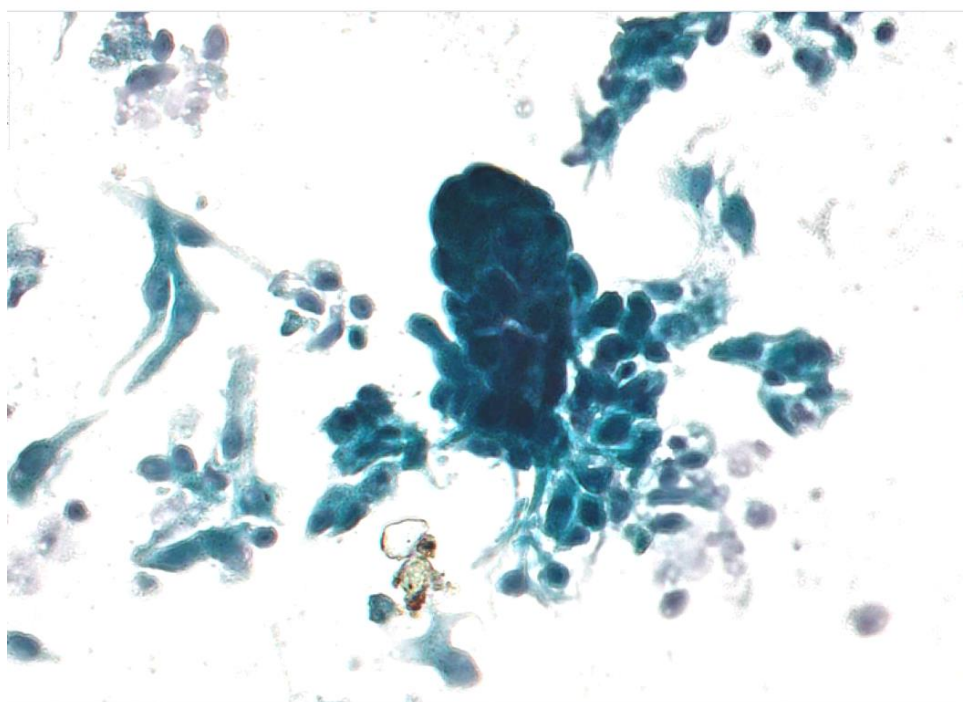


Рисунок 34. Метод жидкостной цитологии (ClearPrep). Сосочкоподобная структура. Выраженный полиморфизм клеток, гиперхромия ядер. Окрашивание по Папаниколау (x400).

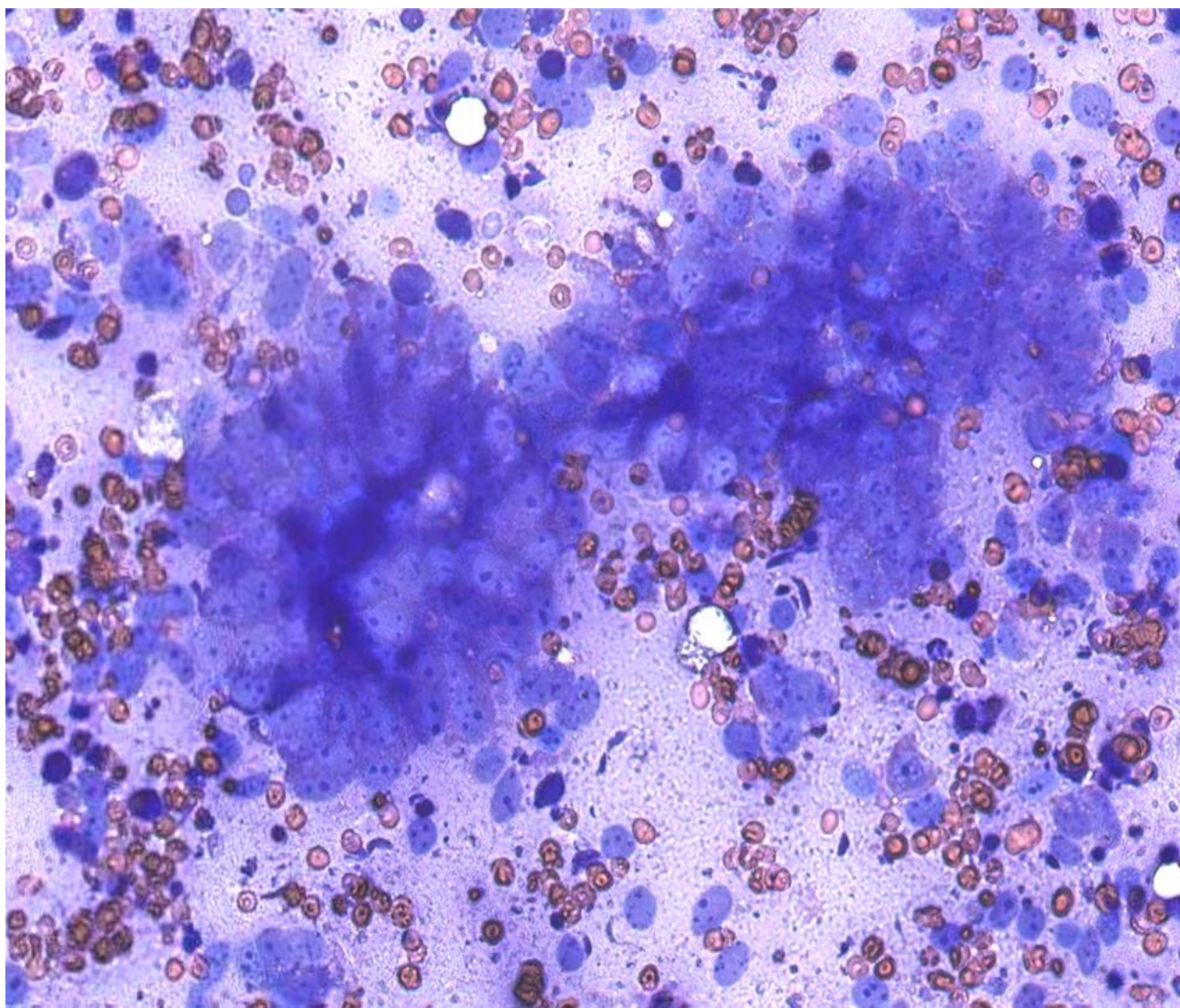


Рисунок 35. Метод традиционной цитологии. Окрашивание по методу Романовского-Гимзе (x200).

Клетки расположены в рыхлых структурах в виде розеток, накладываются друг на друга, «разлетаются» по периферии. Нарушена полярность расположения клеток. Отмечен клеточный и ядерный полиморфизм. Хроматин нежносетчатый, полиморфные ядрышки просматриваются. Фон представлен опухолевым диатезом, элементами воспаления и эритроцитами (рисунок 35).

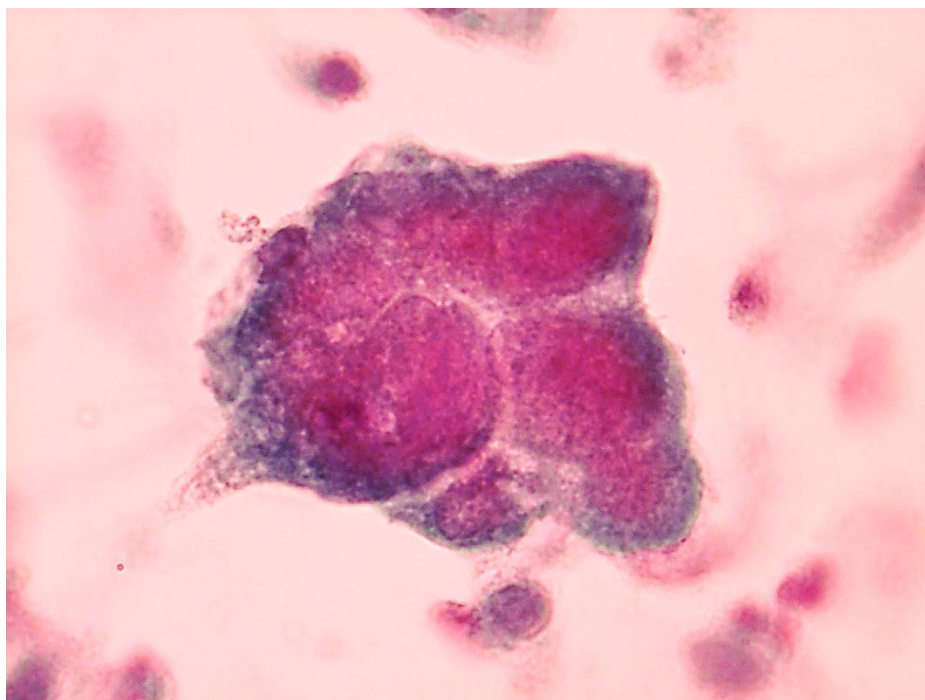


Рисунок 36. Метод жидкостной цитологии (ClearPrep). Сосочкоподобная структура. Выраженный полиморфизм клеток и ядер. Окрашивание по Папаниколау (x100).

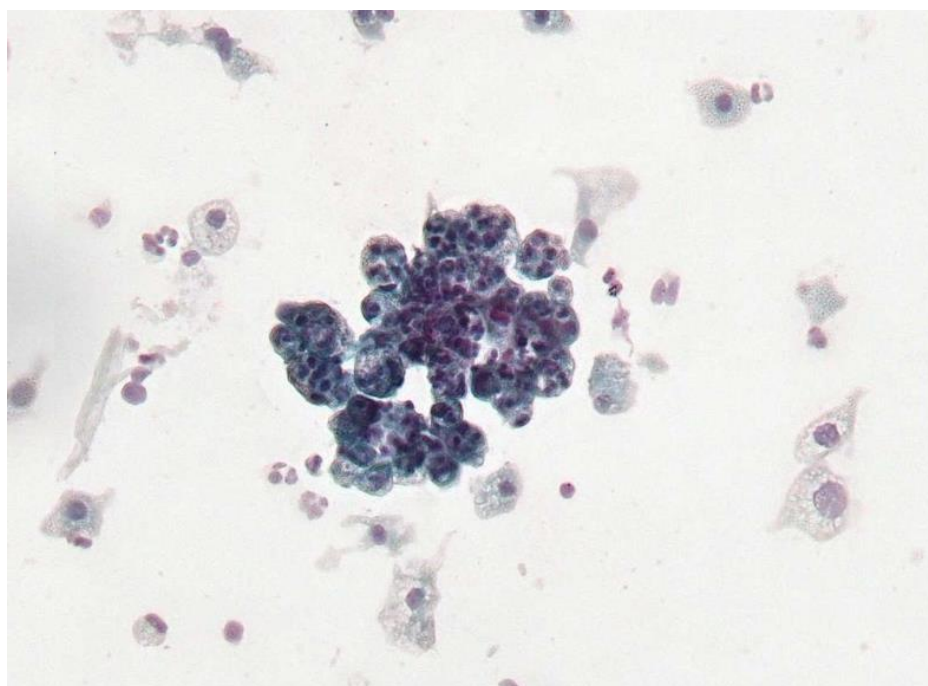


Рисунок 37. Метод жидкостной цитологии (ClearPrep). Комплекс из округлых розеткоподобных структур. Выраженный полиморфизм клеток и ядер, гиперхромия ядер. Окрашивание по Папаниколау (x200).

Эндометриоидная аденокарцинома. Пациентка Г., 71 год. Рисунок 38, 39, 40, 41.

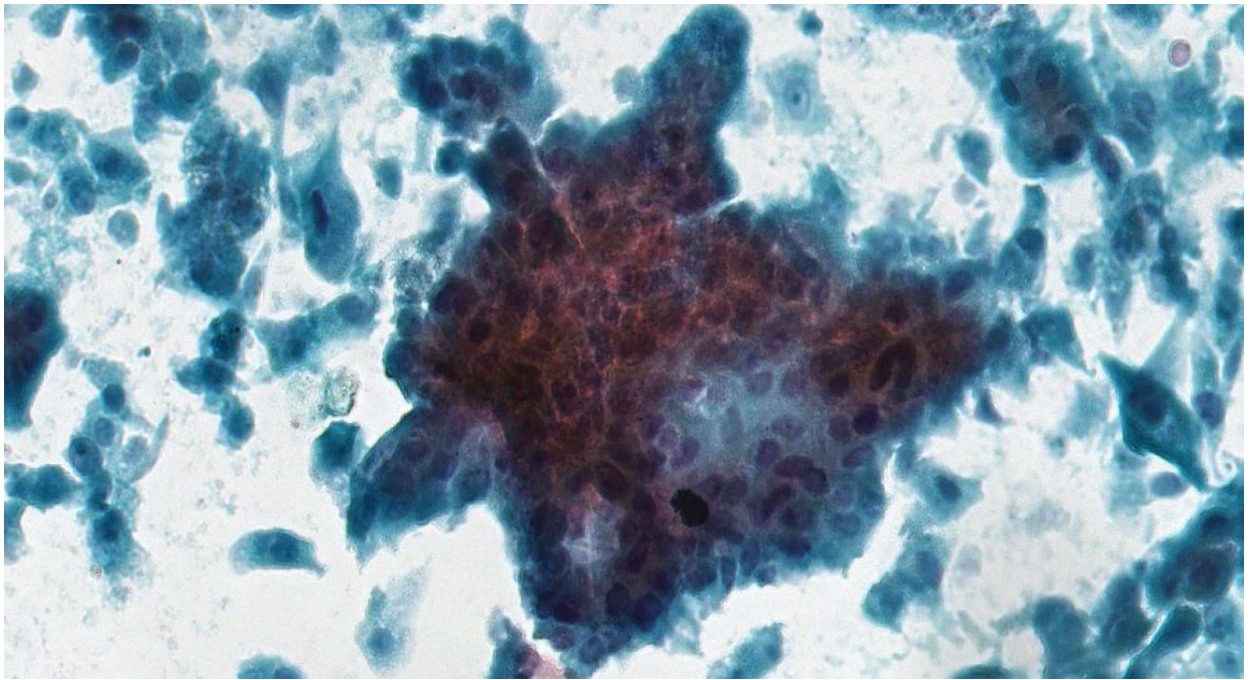


Рисунок 38. Метод жидкостной цитологии (ClearPrep). Клетки расположены в структуре в виде розетки, накладываются друг на друга, «разлетаются» по периферии. Клеточный и ядерный полиморфизм. Окрашивание по Папаниколау (x400).

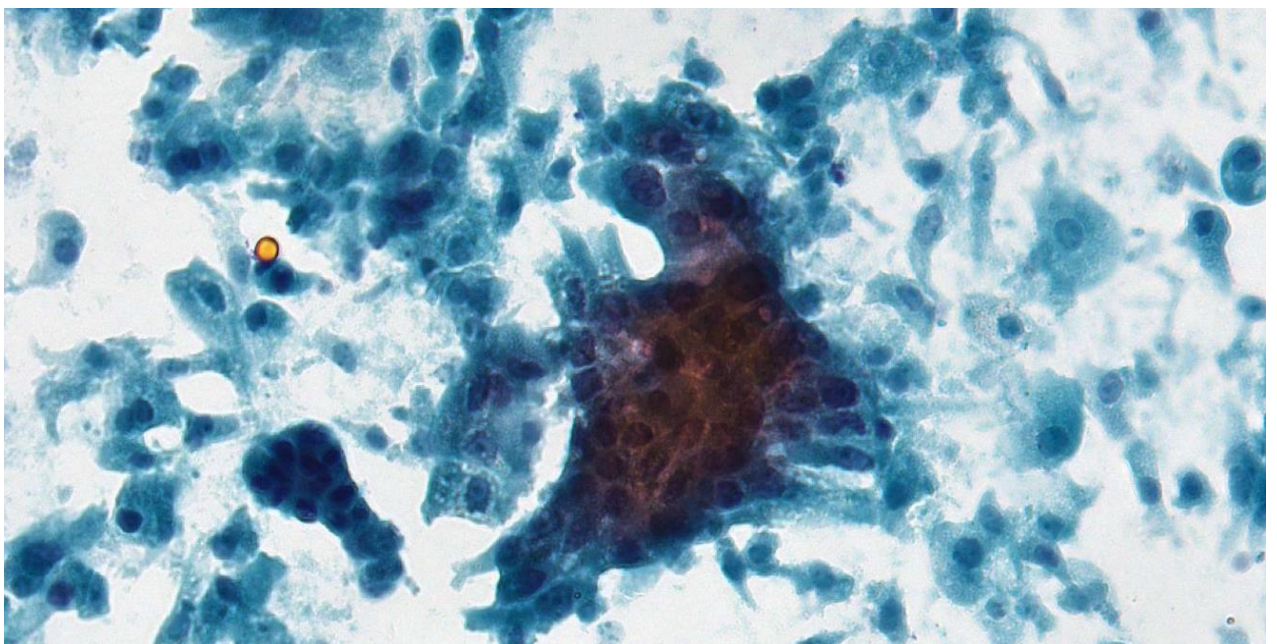


Рисунок 39. Метод жидкостной цитологии (ClearPrep). Неравномерные выпячивания клеток из структуры. Полиморфизм и гиперхромия ядер. Клетки накладываются друг на друга, «разлетаются» по периферии. Клеточный и ядерный полиморфизм. Окрашивание по Папаниколау (x400).

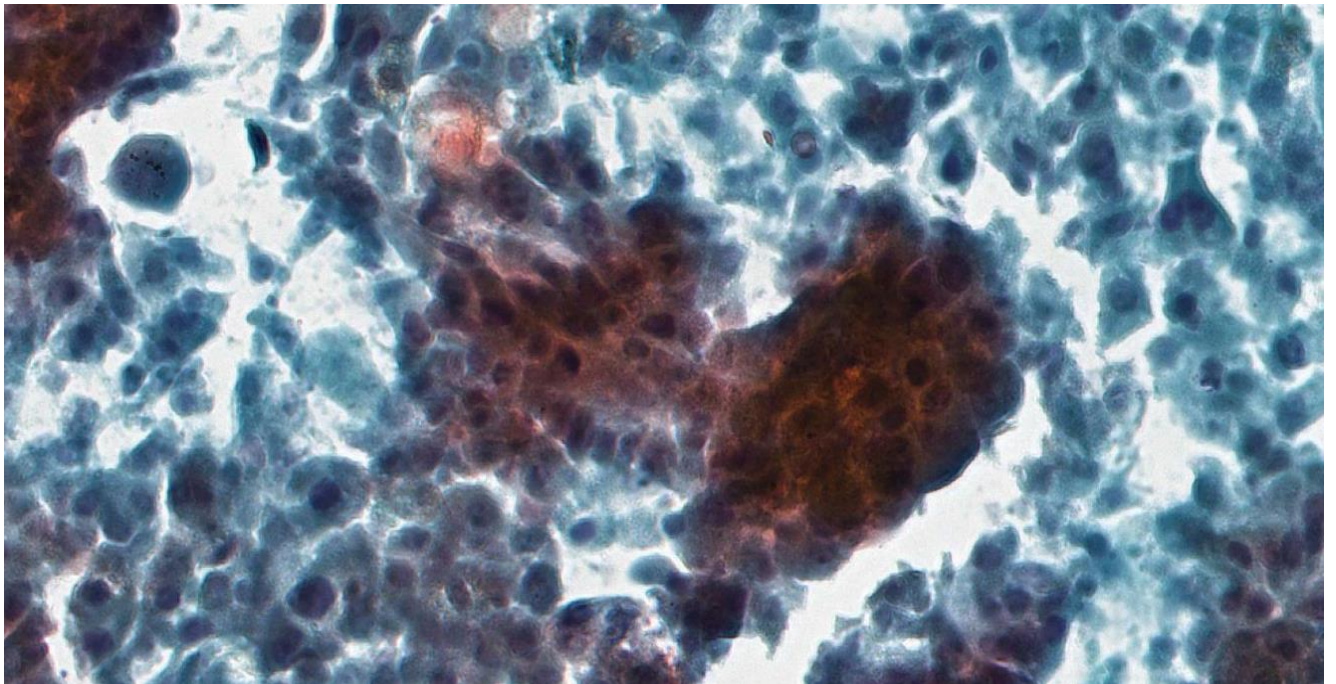


Рисунок 40. Метод жидкостной цитологии (ClearPrep). Перекрывание, нагромождение слоев клеток. Клеточный и ядерный полиморфизм. Гиперхромия ядер. Окрашивание по Папаниколау (x400).

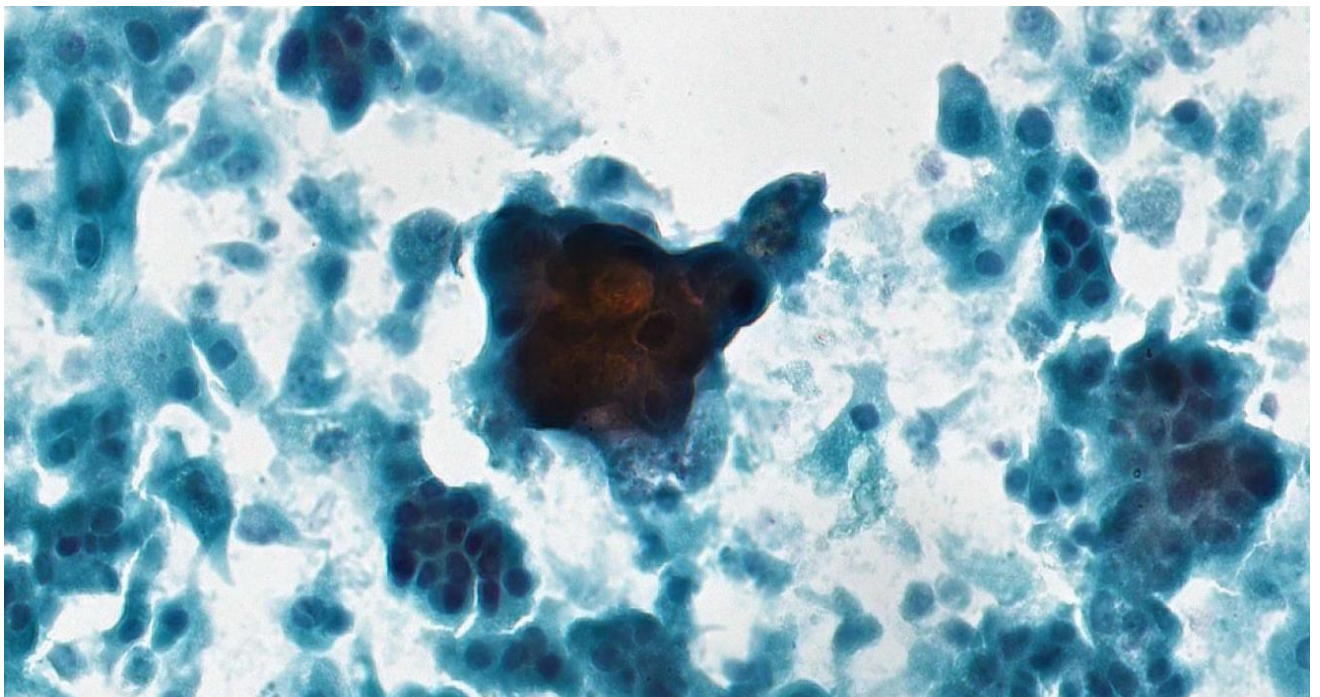


Рисунок 41. Метод жидкостной цитологии (ClearPrep). Сосочкоподобная структура. Выраженный полиморфизм клеток и ядер. Окрашивание по Папаниколау (x400).

Цитологические критерии эндометриоидной аденокарциномы в традиционных и жидкостных препаратах (n=24)

Цитологические критерии	Традиционный цитологический препарат	Препарат, приготовленный методом жидкостной цитологии
Расположение клеток/ структуры	Пласты неправильной формы с нагромождением клеток; папиллярные; в виде розеток; рыхлое расположение клеток в структурах; наложение, нагромождение ядер, «разлетающиеся» структуры	Разрозненные клетки, пласты, полоски, и/или трехмерные кластеры со скученностью клеток. Псевдостратификация, палисадообразование, структуры в виде розеток. Пласты неправильной формы с нагромождением клеток; «разлетающиеся» структуры, перистость по краю пласта, папиллярные структуры, рыхлое расположение клеток в структурах; наложение, нагромождение ядер. Структурное расположение клеток сохраняется лучше, в отличие от традиционного метода.
Форма, размер клеток	Неправильной формы, значительно отличаются по размеру и форме.	Неправильной формы, отличаются по размеру и форме.

	Различная сохранность клеток.	
Ядра	Ядра укрупнены до трех и более раз по сравнению с размером эритроцитов. Различаются по размерам и форме, Полиморфизм умеренного выраженного.	Ядра укрупнены (в два-три раза больше размера эритроцитов). Различаются по размерам и форме. Полиморфизм от умеренного до выраженного. Встречается ядерная скученность в сочетании с гиперхромией. Хорошо сохранены особенности ядер.
Хроматин	Крупнозернистый	Мелко- крупнозернистый неравномерно распределенный хроматин
Ядрышки	Видны, полиморфные	Четко визуализируются, крупные, полиморфные, до нескольких в одном ядре

Таким образом, наше исследование показало, что одни параметры (структурное расположение клеток, ядрышки) лучше оценивать при использовании метода ЖЦ, другие (фоновые элементы, структуры хроматина) - метода традиционной цитологии, что важно учитывать для избежания ошибок.

При традиционном цитологическом исследовании соскобов из эндометрия были получены следующие группы результатов:

1. Неинформативный материал – 8,1% (n=11)
2. Отсутствие морфологической патологии – 22,1% (n=30);
3. Гиперплазия эндометрия без атипии– 46,3% (n=63);

4. Неоплазия (атипическая гиперплазия и аденокарцинома) – 23,5% (n=32).

В результате исследования соскобов методом жидкостной цитологии эндометрия были получены следующие группы результатов:

1. Неинформативный материал – 11,8% (n=16);
2. Отсутствие морфологической патологии – 25,0% (n=34);
3. Гиперплазия эндометрия без атипии и полипы – 39,7% (n=54);
4. Неоплазия (атипической гиперплазией и аденокарциномой) – 23,5% (n=32).

Результаты ТЦ и ЖЦ были сопоставлены с результатами гистологического исследования операционного материала (таблица 9, 10).

Таблица 9

Сравнение результатов ТЦ с результатами гистологического исследования

Заключение по традиционной цитологии	Гистологическое заключение			Все-го	Уро-вень P (df=2)
	Аденокарци-нома или гиперплазия с атипией (N=29)	Отсутствие морфологичес-кой патологии эндометрия (N=31)	ГЭ без атипии (N=76)		
Неинформативн-ый материал	0 (0,0%)	2 (6,5%)	9 (11,8%)	11	0,1285
Отсутствие морфологическо-й патологии эндометрия	0 (0,0%)	18 (58,1%)	12 (15,8%)	30	<0,0001
ГЭ без атипии	0 (0,0%)	11 (35,5%)	52 (68,4%)	63	<0,0001
Аденокарцином-а или гиперплазия с атипией	29 (100,0%)	0 (0,0%)	3 (3,9%)	32	<0,0001

Сравнение результатов ЖЦ с результатами гистологического исследования

Заключение по жидкостной цитологии	Гистологическое заключение			Всего	Уровень P (df=2)
	Аденокарцинома или гиперплазия с атипией (N=29)	Отсутствие морфологической патологии эндометрия (N=31)	ГЭ без атипии (N=76)		
Неинформативный материал	0 (0,0%)	4 (12,9%)	12 (15,8%)	16	0,0784
Отсутствие морфологической патологии эндометрия	0 (0,0%)	20 (64,5%)	14 (18,4%)	34	<0,000 1
ГЭ без атипии	0 (0,0%)	7 (22,6%)	47 (61,8%)	54	<0,000 1
Аденокарцинома или гиперплазия с атипией	29 (100,0%)	0 (0,0%)	3 (3,9%)	32	<0,000 1

На основании результатов, представленных в таблице 9, 10 можно сделать вывод о том, что имеется корреляционная связь между заключениями, данными по результатам гистологического исследования и результатам ТЦ и ЖЦ ($p < 0,0001$).

Нами был проведен анализ заключений с неинформативным материалом. В некоторых случаях оценить клеточный состав препаратов было невозможно. Это происходило по ряду причин, обусловленных дефектами забора биоматериала, такими как отсутствие клеток эндометрия, избыточное содержание примесей крови или элементов воспаления. Цитологическое заключение «неинформативный материал» для ТЦ и ЖЦ мы ставили, если обнаруживали менее пяти структур из клеток эндометрия. Если первый цитологический препарат для ЖЦ был неадекватным, то готовили второй препарат с большей концентрацией клеточного

материала. В случае, если и второй препарат также был неудовлетворительным, принимали решение о неадекватности получения материала.

Большее число наблюдений с неинформативным материалом в нашей работе было отмечено при исследовании препаратов, приготовленных методом ЖЦ – 16 (11,8%), по сравнению с ТЦ – 11 (8,1%). При сравнении двух методов ЖЦ наибольшее число наблюдений с недиагностическим материалом было при приготовлении препаратов методом фильтрации (10 из 36 (27,8%), в то время как при приготовлении препаратов методом центрифугирования неинформативный материал был получен лишь в 6 из 100 наблюдений (6%). Возможно, что в нашей работе такая доля неинформативного материала в ЖЦ связана с малым количеством клеток, помещенных в консервирующий раствор, а также с тем, что крупные структуры оседали на фильтре и не попадали в препарат.

Сложности оценки неинформативных препаратов, приготовленных методом ТЦ, чаще всего были связаны с обилием элементов крови.

При совместном использовании двух цитологических методов исследования только в 8 (5,9%) наблюдениях материал оценен как неадекватный.

В дальнейшем у данных пациенток были получены результаты гистологического исследования. В 64% наблюдений неинформативного материала по ТЦ, и 62,5% по ЖЦ, гистологическое исследование дало заключение «Эндометрий атрофического типа». Вероятнее всего этим можно объяснить малое количество клеток эндометрия в цитологических препаратах у женщин в постменопаузе.

Нами был проведен анализ цитологических заключений эндометрия без морфологической патологии (эндометрий пролиферативного, секреторного, атрофического типов). Как уже было отмечено, у 31 пациенток при гистологическом исследовании морфологическая патология эндометрия отсутствовала. По результатам ТЦ у двух пациенток из этой группы был неинформативный материал, в 18 из 29 наблюдений цитологический диагноз совпал с гистологическим, что в процентном соотношении составило 62%. По

результатам ЖЦ у четырех пациенток из этой группы был неинформативный материал, и в 20 из 26 наблюдений цитологический диагноз совпал с гистологическим (76,9%).

В ЖЦ в этой категории было немного больше ложноположительных заключений, чем в ТЦ: 15 и 13 соответственно. Всем попавшим в эту группу пациенткам гистологи установили диагноз «Полип эндометрия». Такую долю ложноположительных результатов можно объяснить непопаданием материала полипа в цитологический препарат.

Цитологическое заключение: гиперплазии эндометрия без атипии

У 76 пациенток было дано гистологическое заключение - гиперплазия эндометрия без атипии и полипы. При цитологическом исследовании операционного материала цитологический диагноз совпал с гистологическим в 52 наблюдениях из 65 с информативным материалом ТЦ, что в процентном соотношении составляет 83,9%, и в 47 из 62 ЖЦ, соответственно в 75,8%.

Цитологическое заключение: атипичная гиперплазия эндометрия и аденокарцинома

У всех пациенток получен информативный материал для ТЦ и ЖЦ. При исследовании операционного материала (29 пациенток) дано цитологическое заключение «атипичная гиперплазия эндометрия» (n=5), аденокарцинома (n=24). При исследовании операционного материала гистологическим методом совпадение результатов цитологического исследования с гистологическим произошло во всех 29 наблюдениях. Помимо этих пациенток еще в трех наблюдениях по результатам ТЦ и ЖЦ было дано заключение «атипичная гиперплазия эндометрия» при гистологическом – гиперплазия без атипии.

3.2. Иммуноцитохимическое исследование эндометрия

С целью определения возможности использования жидкостных препаратов эндометрия и оценки экспрессии маркеров PTEN, СЕА, p53, p63 для ИЦХИ было

отобрано 47 образцов (20 – с гиперплазией без атипии, 22 – с аденокарциномой и 5 – с АГЭ и 27 злокачественных образований) с достаточной клеточностью (минимум 100 клеток в препарате).

При определении экспрессии СЕА оценивали мембранную и цитоплазмную реакции. При проведении реакции с РТЕН оценивали окрашивание ядер и цитоплазмы. Для определения экспрессии р53, р63 оценивали ядерную реакцию. При доброкачественных образованиях отмечали цитоплазмную экспрессию РТЕН, при злокачественных - возрастала цитоплазмная реакция и появлялась ядерная. Сопоставление экспрессии иммуноцитохимических маркеров с гистологическими диагнозами представлено в таблице 11.

Таблица 11

Экспрессия маркеров в соответствии с гистологическими заключениями

ИЦХ-маркер	Гистологическое заключение		Всего	Уровень Р (df=2)
	Аденокарцинома и гиперплазия с атипией (N=27)	Гиперплазия без атипии (N=20)		
РТЕН	11 (40,74%)	5 (25,00%)	16	0,5305
СЕА	24 (88,89%)	11 (55,00%)	35	0,0311
Р53	3 (11,11%)	0 (0,00%)	3	0,3052
Р63	2 (7,41%)	0 (0,00%)	2	0,4613

Получено статистически значимое различие значений экспрессии СЕА ($p=0,0311$) между патологическими (эндометриоидная аденокарцинома и атипичная гиперплазия) и доброкачественными (гиперплазия без атипии) изменениями эндометрия.

Графическое изображение количественных показателей экспрессии маркеров представлено на рисунке 42.

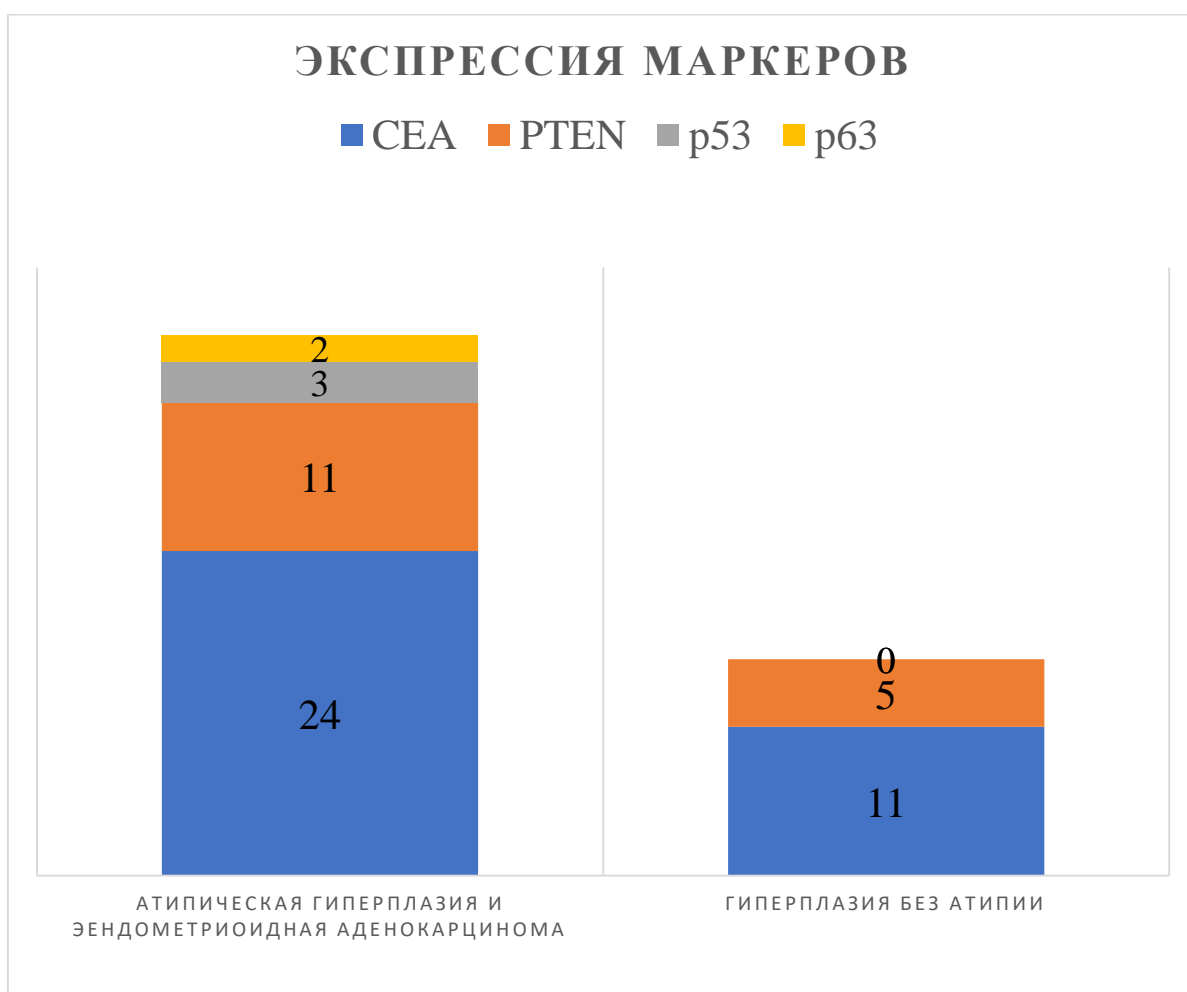


Рисунок 42. Соотношение экспрессии маркеров СЕА, РТЕН, р53, р63 у пациенток с гиперплазией без атипии и атипичной гиперплазией и аденокарциномой, абс.

Достоверных отличий в группе пациенток с аденокарциномой и атипичной гиперплазией эндометрия и пациенток с ГЭ без атипии при определении экспрессии маркеров р53, р63 и РТЕН не выявлено ($p>0,05$), однако

отмеченные изменения этих показателей в исследуемых группах могут подтверждать участие генетических факторов в патогенезе гиперпластических процессов эндометрия и открывать новые перспективы поиска диагностических маркеров изучаемой патологии.

Эндометриоидная аденокарцинома. Пациентка Д., 69 лет. Рисунок 43, 44, 45, 46.

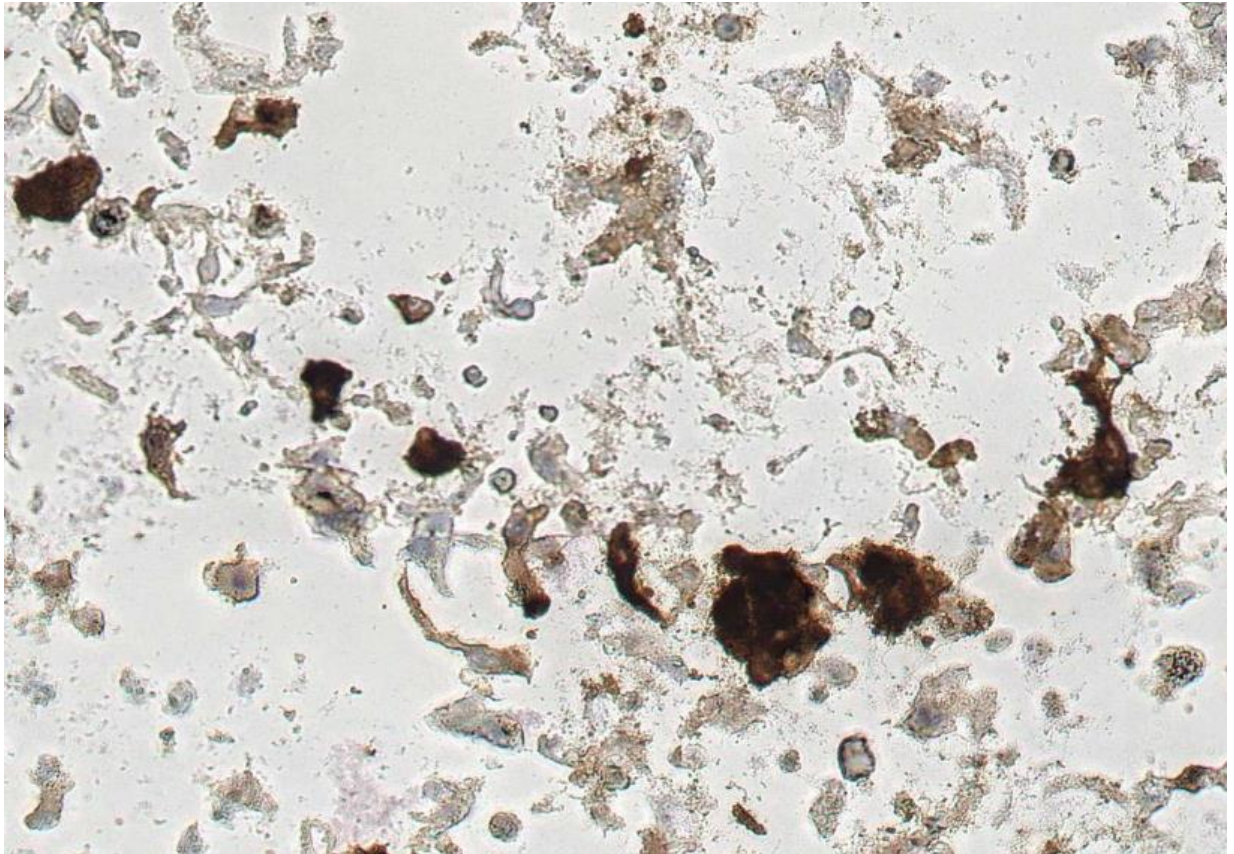


Рисунок 43. ИЦХИ. Увеличение 200. Положительная экспрессия СЕА

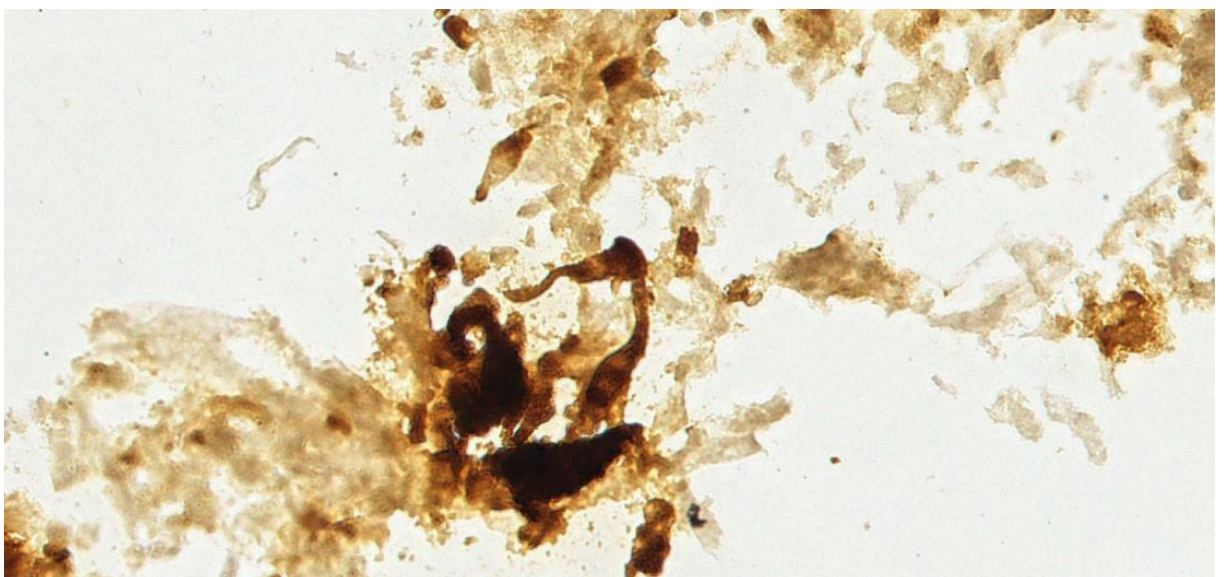


Рисунок 44. ИЦХИ. Увеличение 400. Положительная экспрессия маркера СЕА

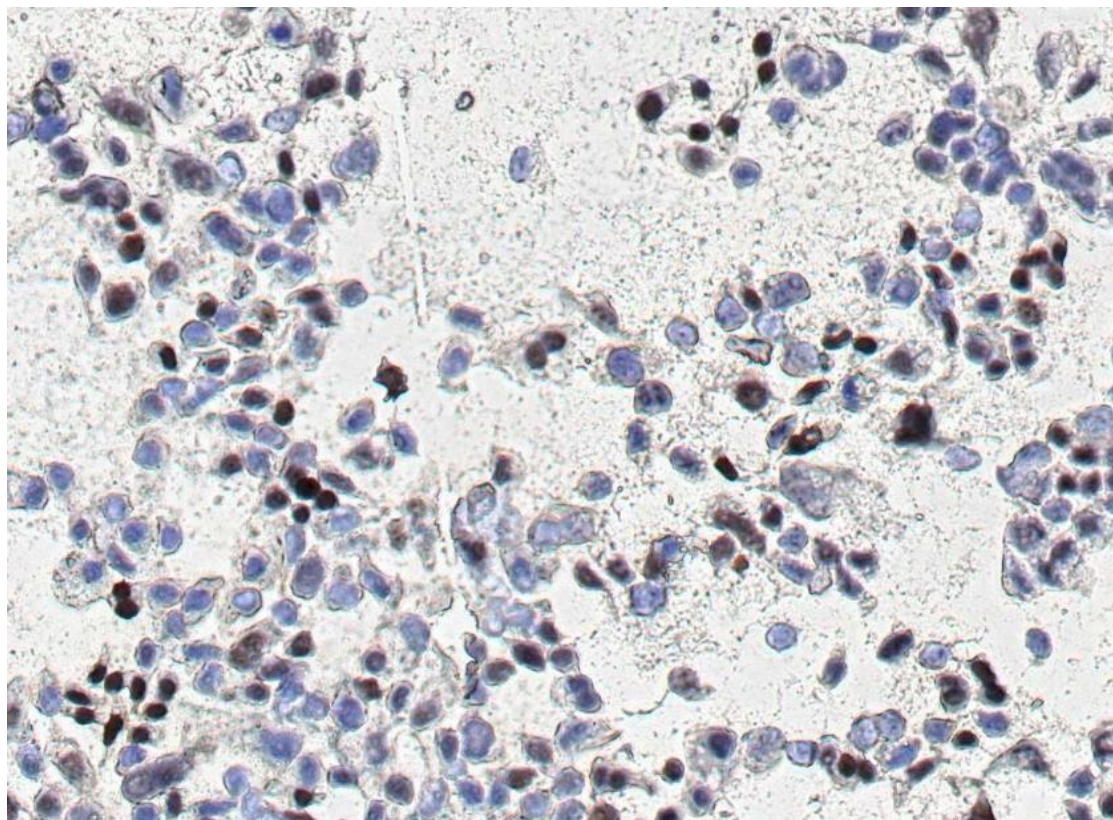


Рисунок 45. ИЦХИ. Увеличение 200. Положительная ядерная экспрессия маркера р53 в клетках эндометрия

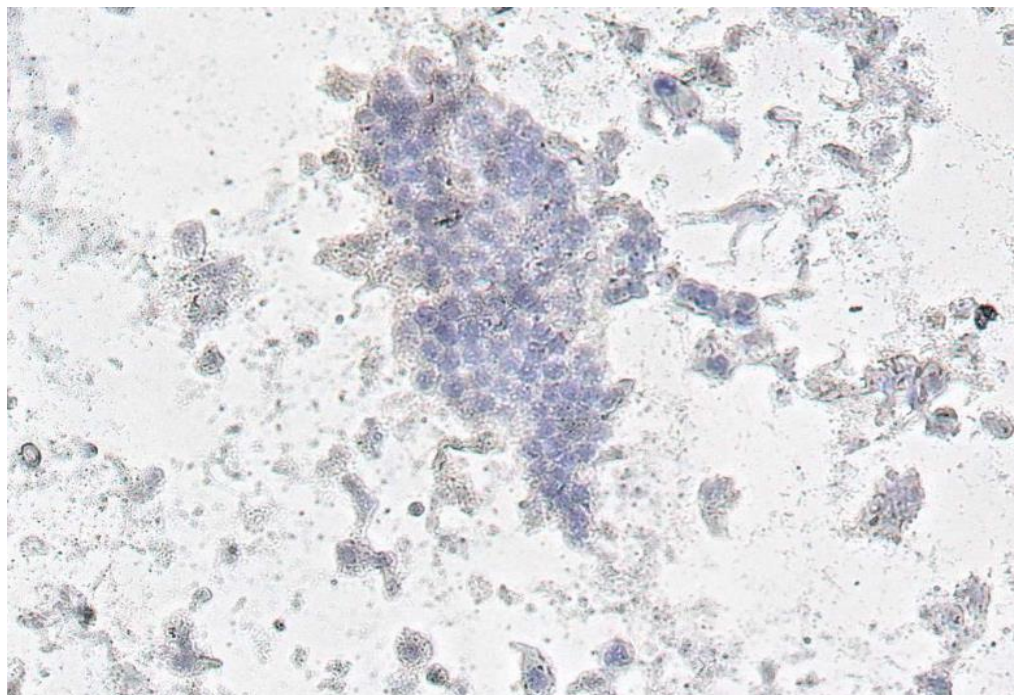


Рисунок 46. ИЦХИ. Увеличение 200. Отрицательная экспрессия маркера р63

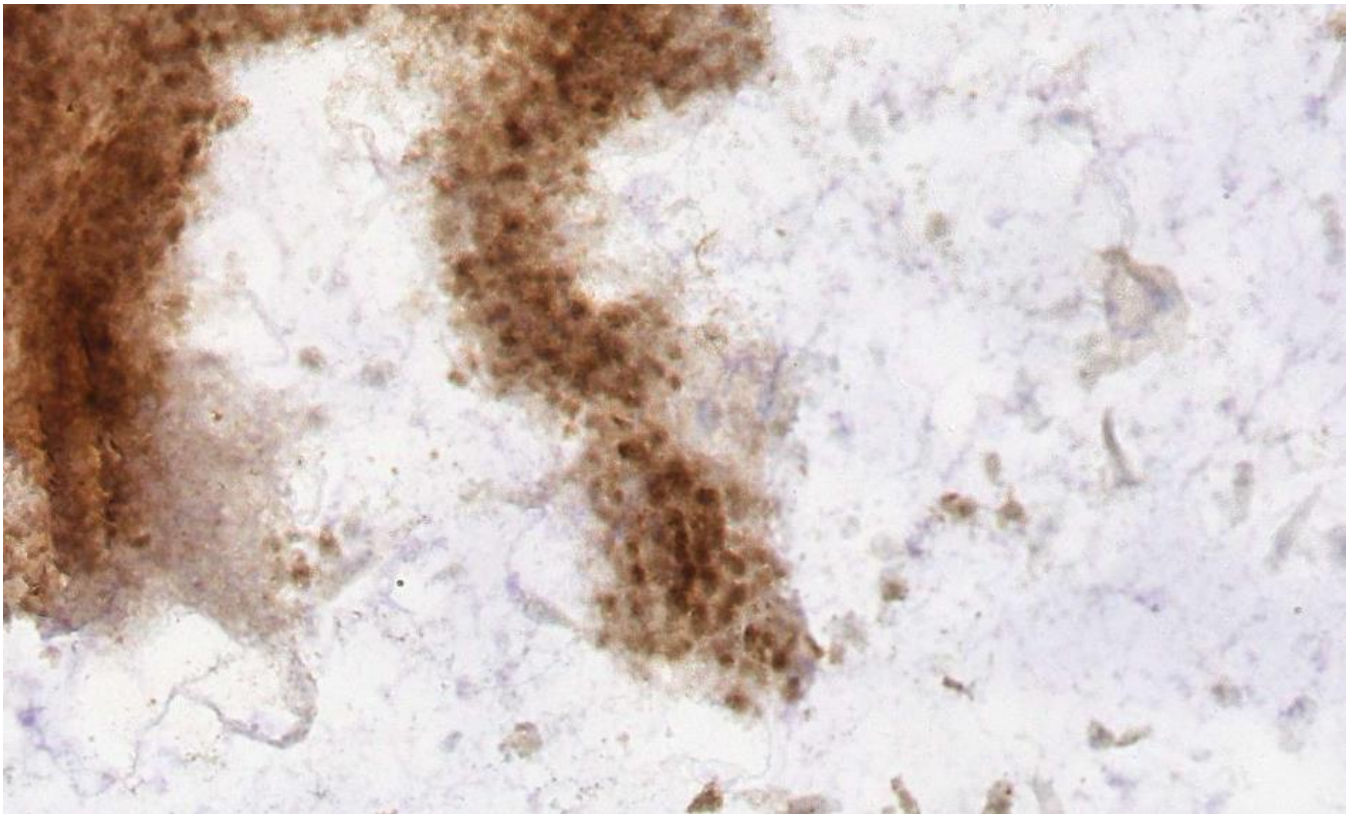


Рисунок 47. ИЦХИ. Увеличение 200. Положительная экспрессия маркера PTEN

Исходя из полученных данных, маркер СЕА можно рекомендовать в качестве дополнительного метода в диагностике атипичной гиперплазии и эндометриоидной аденокарциномы эндометрия.

ГЛАВА 4.

РАСЧЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ МЕТОДОВ ТРАДИЦИОННОЙ И ЖИДКОСТНОЙ ЦИТОЛОГИИ

При расчете статистических показателей методом бинарной логической регрессии с использованием четырехпольных таблиц сопряженности было получено: чувствительность метода ТЦ в выявлении гиперплазии эндометрия без атипии - 68,4%, специфичность 81,7%, эффективность 75%; ЖЦ – 61,8%, 88,3%, 75% соответственно.

Чувствительность ТЦ в выявлении аденокарциномы составила 45,8%, специфичность 97,4%; ЖЦ – 66,7%, 97,4%, соответственно. Однако, при объединении пациенток с АГЭ и аденокарциномой в одну группу и принятии за пороговое значение – АГЭ, чувствительность ТЦ и ЖЦ в выявлении АГЭ и аденокарциномы достигла 100%, специфичность 97,2%, эффективность 98,6%, что имеет большее значение ввиду необходимости принятия решения об оперативном вмешательстве.

Положительная прогностическая ценность (PPV) для ТЦ и ЖЦ в выявлении гиперплазии без атипии составила – 82,5% и 87,0% соответственно, в выявлении объединенных в одну группу атипической гиперплазии и аденокарциномы – 90,6% для обоих методов.

Отрицательная прогностическая ценность (NPV) для ТЦ и ЖЦ в выявлении гиперплазии без атипии составила 67,1% и 64,6% соответственно, в выявлении объединенных в одну группу атипической гиперплазии и аденокарциномы - 100% для обоих методов.

В случае комбинированного применения двух методов цитологической диагностики (ТЦ и ЖЦ) при гиперплазии эндометрия без атипии отмечен рост диагностических показателей (рисунок 49).

В нашей работе при выявлении гиперплазии эндометрия без атипии чувствительность и отрицательная прогностическая ценность были выше при

использовании метода ТЦ, а специфичность и положительная прогностическая ценность - при применении метода ЖЦ. Таким образом, совместное применение ТЦ и ЖЦ позволяет с большей вероятностью установить наличие гиперплазии без атипии.

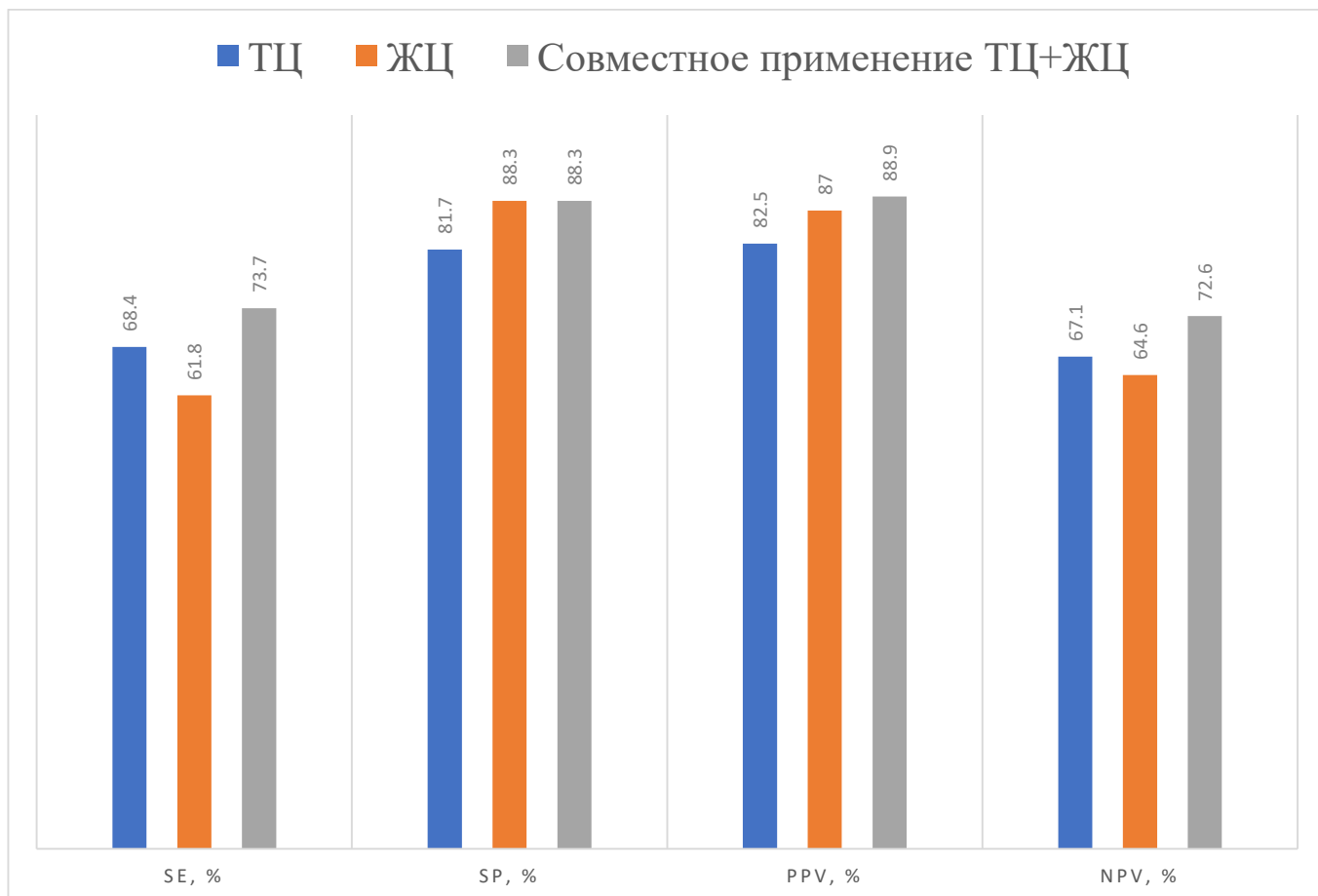


Рисунок 48. Сопоставление диагностических показателей ТЦ и ЖЦ при гиперплазии эндометрия без атипии, %.

Se – чувствительность;

Sp – специфичность;

PPV – прогностическая ценность положительного результата;

NPV – прогностическая ценность отрицательного результата.

В диагностике гиперплазии эндометрия без атипии наибольшей специфичностью обладает метод ЖЦ, а наибольшая чувствительность, положительная и отрицательная прогностическая ценность были определены при совместном применении ТЦ и ЖЦ.

Диагностические показатели ТЦ, ЖЦ и их комбинации в отношении выявления ГЭ без атипии представлены в таблице 12.

При выявлении злокачественной морфологической патологии (атипическая гиперплазия и эндометриоидная аденокарцинома) чувствительность, специфичность, отрицательная и положительная прогностическая ценность в ТЦ, ЖЦ и их комбинации имели идентичные значения.

Таблица 12

Диагностические показатели ТЦ, ЖЦ и их комбинации в отношении выявления ГЭ без атипии

Методы исследования	Чувствительность	Специфичность	Эффективность	PPV	NPV	Хи-квадрат	Уровень Р (df=1)
ТЦ	68,42%	81,67%	75,04%	82,5	67,1	33,8301	<0,0001
ЖЦ	61,84%	88,33%	75,09%	87,0	64,6	35,2597	<0,0001
ТЦ + ЖЦ	73,68%	88,33%	81,01%	88,9	72,6	51,8644	<0,0001

При получении цитологического заключения «атипическая гиперплазия» и при возникновении ситуаций «несовпадения» между ТЦ и ЖЦ цитологических заключений, применение жидкостных технологий приготовления цитологических препаратов позволяет использовать материал, находящийся в консервирующей среде для дополнительных высокотехнологичных методов, а также в случае необходимости для приготовления несколько препаратов ЖЦ.

На основе результатов, полученных в ходе исследования, нами был разработан и предложен алгоритм исследования материала из эндометрия, который представлен на рисунке 49.

Первый этап - применение традиционного цитологического исследования и жидкостной цитологии - совместно. В случаях получения цитологических заключений об отсутствии морфологической патологии эндометрия или доброкачественной морфологической патологии эндометрия (гиперплазия без атипии) пациентка остается под наблюдением в плановом порядке.

Второй этап – при получении заключения «атипическая гиперплазия» в

одном или обоих методах, применение ИЦХИ с маркером СЕА. При отрицательной экспрессии СЕА пациентка остается под наблюдением в плановом порядке. В случае положительной экспрессии пациентка направляется на раздельное диагностическое выскабливание с последующим гистологическим исследованием.

Третий этап – в случаях получения цитологического заключения «аденокарцинома эндометрия» в одном или обоих методах, пациентка направляется на раздельное диагностическое выскабливание с последующим гистологическим исследованием.

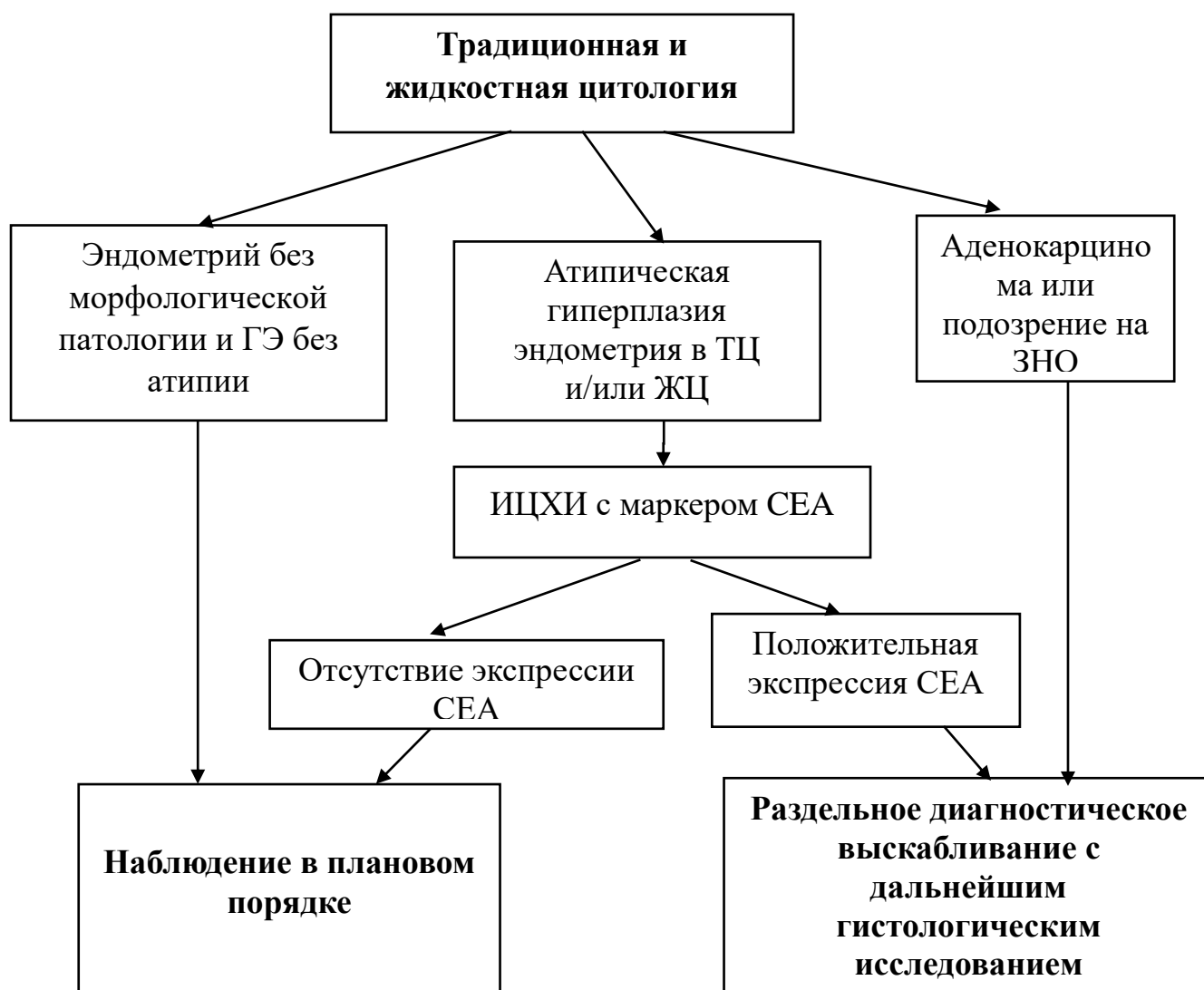


Рисунок 49. Алгоритм дифференциальной диагностики патологических состояний эндометрия

Таким образом, комбинированное использование ТЦ, ЖЦ и ИЦХИ способствует выявлению пациенток со злокачественной морфологической патологией эндометрия с целью разделения групп пациенток без атипии эндометрия и пациенток с атипической гиперплазией эндометрия и эндометриоидной аденокарциномой, нуждающихся в дальнейшем дообследовании.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ, имеющихся в настоящее время и направленных на выявление РЭ, методов диагностики показывает, что наиболее распространенным методом считается гистологическое исследование. Однако, аспирационная биопсия эндометрия и раздельное диагностическое выскабливание слизистой оболочки полости матки, в ходе которых получают материал для гистологической диагностики, сопряжены с инвазивным вмешательством и определенными дополнительными хирургическими и анестезиологическими рисками. В этой связи совершенствование цитологического исследования эндометрия приобретает все большую актуальность, особенно из-за возможности минимизации сопутствующих рисков и потенциально высокой диагностической информативности.

Несмотря на то, что гистологическое и иммуногистохимическое исследование материала из эндометрия остается «золотым» стандартом, внедрение таких высокотехнологичных методов, как ЖЦ, ИЦХИ позволяет пересмотреть роль цитологического метода в диагностике неопухолевых поражений и опухолей эндометрия.

Таким образом, существует существенная потребность определения роли и новых возможностей комбинированной цитологической диагностики патологических состояний эндометрия с применением современных дополнительных методов, в частности ЖЦ и ИЦХИ.

В нашей работе были поставлены и решены задачи, по результатам которых впервые охарактеризованы возможности совместного применения двух методов цитологической диагностики (традиционный и жидкостный) при гиперплазии без

атипии, атипической гиперплазии эндометрия и эндометриоидной аденокарциномы с определением диагностической информативности каждого из этих методов. Показано, что комбинированное применение ТЦ и ЖЦ способствует повышению эффективности диагностики патологических состояний эндометрия. Проведена оценка экспрессии иммуноцитохимических маркеров PTEN, СЕА, р63, р53 на материале ЖЦ для диагностики неопухолевых поражений и опухолей эндометрия и установлено значение каждого из маркеров в повышении эффективности диагностики патологических состояний эндометрия.

В нашей работе были выявлены и проанализированы цитологические особенности препаратов, приготовленных методом ЖЦ, при различных патологических состояниях эндометрия. В значительной степени цитологические критерии, обнаруженные при исследовании жидкостных препаратов, основаны на характеристиках, выявленных в препаратах, приготовленных методом традиционной цитологии, однако влажная фиксация материала, его обработка и последующее окрашивание по методу Папаниколау лежат в основе имеющихся цитоморфологических особенностей жидкостных препаратов, отличных от таковых при использовании ТЦ, это важно учитывать во избежание ошибок.

В диагностике патологических состояний эндометрия методом ТЦ были выявлены сложности ввиду выраженных реактивных и дегенеративных изменений эпителия, очаговых нагромождений клеток и примесей крови в значительном объеме. При изучении поражений эндометрия в препаратах ЖЦ было отмечено равномерное распределение материала на стекле, клетки в более сохранном состоянии, количество элементов крови и артефактов снижено по сравнению с традиционными препаратами. Относительно «чистый» фон препарата, приготовленного методом ЖЦ, обеспечивает возможность более детального анализа морфологии клеток, и способствует верной оценке характера изменений. Однако снижение количества фоновых элементов, предоставляющих дополнительную информацию и имеющих важное значение для трактовки

изменений, демонстрируют необходимость оценки «фона» по традиционным цитологическим препаратам.

В ходе анализа результатов исследования материала эндометрия ТЦ и ЖЦ, нами был сделан вывод, что для применения ЖЦ в дифференциальной диагностике гиперплазии эндометрия без атипии, атипической гиперплазии эндометрия и эндометриоидной аденокарциномы необходимо знать и учитывать некоторые морфологические особенности, возникающие в процессе приготовления монослойных препаратов. А учитывая во внимание факт, что не все специалисты имеют опыт в просмотре таких препаратов, требуется осторожность и внимательность в интерпретации отмеченных изменений.

Благодаря жидкостной технологии приготовления цитологических препаратов, из одной виалы с консервирующей средой имеется возможность получить несколько цитологических препаратов, а также дополнительно применить такие высокотехнологичные методы исследования, как ИЦХИ. В связи с тем, что значение иммуноцитохимических маркеров в диагностике злокачественных поражений эндометрия еще не определено и в настоящее время не выявлено маркеров, имеющих стопроцентную чувствительность и специфичность, ведется непрерывный поиск новых маркеров и их оптимального сочетания.

Жидкостная цитология, являясь новым подходом к приготовлению цитологических препаратов, позволяет проводить как морфологические, так и ИЦХИ для изучения патологических состояний эндометрия. Применяя комбинацию из двух методов цитологической диагностики эндометрия (ТЦ и ЖЦ), мы предлагаем за основу брать данные полученные при традиционном цитологическом исследовании, и в дополнение использовать цитологические критерии ЖЦ, с возможным применением ИЦХИ в случаях заключений «атипическая гиперплазия» или аденокарцинома.

В заключении проведенного исследования, важно отметить, что комбинированное применение методов традиционной и жидкостной цитологии с возможностью ИЦХИ способствует повышению диагностической

информативности и улучшению результатов цитологической диагностики неопухолевых поражений и опухолей эндометрия.

Результаты работы реализованы в практику клиничко-диагностической лаборатории ГБУЗ ГKB им. С.П. Боткина (акт о внедрении №1-21/3398 от 20.05.2022), и внедрены в учебную деятельность кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (акт от 01.09.2022).

ВЫВОДЫ

1. При сравнении результатов традиционной и жидкостной цитологии с результатами гистологического исследования у пациенток с гиперплазией эндометрия без атипии заключение традиционной и жидкостной цитологии совпало с гистологическим заключением в 83,9%, и в 75,8% наблюдениях соответственно. При исследовании материала эндометрия у пациенток с атипической гиперплазией эндометрия и аденокарциномой заключение традиционной и жидкостной цитологии совпало с гистологическим в 100% наблюдений. При использовании жидкостной цитологии неадекватный материал был получен у 11,8% пациенток, традиционной цитологии – у 8,1%. При использовании двух цитологических методов совместно число наблюдений с неадекватным материалом снизилось до 5,9%, что указывает на преимущество комбинированного применения традиционной и жидкостной цитологии.

2. Существует корреляция результатов цитологического исследования с результатами гистологического исследования (пороговое значение атипическая гиперплазия) ($p < 0,001$), что подтверждает значение цитологического исследования в диагностике поражений эндометрия, как высокоэффективного метода. Чувствительность и специфичность традиционной цитологии в выявлении гиперплазии эндометрия без атипии составили 68,4% и 81,7%, жидкостной цитологии – 61,8% и 88,3%, при совместном применении двух цитологических методов – 73,7% и 88,3% соответственно. Чувствительность и специфичность традиционной и жидкостной цитологии в выявлении атипической

гиперплазии и аденокарциномы эндометрия достигли 100% и 97,5% соответственно.

3. Уточнены цитологические критерии гиперплазии эндометрия, атипической гиперплазии эндометрия и эндометриоидной аденокарциномы в препаратах традиционной и жидкостной цитологии. В отличие от традиционных препаратов в препаратах жидкостной цитологии клетки и скопления расположены в разных плоскостях просмотра, встречаются трехмерные структуры, размер клеток несколько уменьшен по сравнению с клетками в традиционном цитологическом препарате, признаки полиморфизма менее выражены. Отсутствие фоновых элементов в препаратах жидкостной цитологии способствует более детальному анализу морфологии клеток и верной оценке характера изменений, однако фоновые элементы в традиционных препаратах предоставляют дополнительную информацию и имеют важное значение для трактовки изменений.

4. Получено статистически значимое различие экспрессии СЕА между группой пациенток с гиперплазией без атипии и группой пациенток с эндометриоидной аденокарциномой и атипической гиперплазией эндометрия ($p < 0,001$), что подтверждает возможность применения СЕА в иммуноцитохимическом исследовании в качестве дополнительного метода в диагностике эндометриоидной аденокарциномы эндометрия. Для маркеров PTEN, p53, p63 статистически значимых различий при определении экспрессии в группе пациенток с аденокарциномой и атипической гиперплазией эндометрия и пациенток с гиперплазией эндометрия без атипии выявлено не было ($p > 0,05$), однако отмеченные изменения этих показателей в исследуемых группах могут подтверждать участие генетических факторов в патогенезе гиперпластических процессов эндометрия.

5. Разработан алгоритм исследования материала эндометрия у пациенток с подозрением на патологию эндометрия, включающий комбинированное использование традиционной, жидкостной цитологии, а также иммуноцитохимических маркеров, что позволяет провести дифференциальную

диагностику между гиперплазией без атипии и атипической гиперплазией и эндометриоидной аденокарциномой эндометрия.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Врачам клинической лабораторной диагностики, занимающимся исследованием цитологического материала, рекомендуется:

- при проведении цитологического исследования материала неопухолевых поражений и опухолей эндометрия комбинировать традиционную и жидкостную цитологию и при необходимости использовать иммуноцитохимическое исследование с целью выявления пациенток со злокачественной морфологической патологией эндометрия;

- при получении заключения «атипическая гиперплазия эндометрия» по результатам традиционной и жидкостной цитологии использовать иммуноцитохимическое исследование, в частности, определение маркера СЕА, экспрессия которого может указывать на наличие эндометриоидной аденокарциномы.

2. Врачам-акушерам-гинекологам, занимающимся ведением пациенток с подозрением на патологию эндометрия, рекомендуется направлять пациенток на комбинированное цитологическое исследование материала эндометрия с целью проведения сортировки групп пациенток без атипии эндометрия и пациенток с атипической гиперплазией эндометрия и эндометриоидной аденокарциномой, нуждающихся в дальнейшем дообследовании, в том числе в виде отдельного диагностического выскабливания.

Перспективы дальнейшей разработки темы диссертационного исследования

Имеются перспективы дальнейшей разработки темы диссертационного исследования в виде возможности применения разработанного алгоритма на базе цитологических лабораторий многопрофильных медицинских организаций, оказывающих специализированную медицинскую помощь по профилю: онкология и акушерство и гинекология, а также имеются перспективы изучения

выявления экспрессии других маркеров в клетках эндометрия при неопухолевых поражениях и опухолях с использованием ЖЦ. На основе полученных результатов могут быть созданы базы изображений и сканированных препаратов, а также система поддержки принятия решений для использования при обучении врачей клинической лабораторной диагностики.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГЭ – атипическая гиперплазия эндометрия

ГС - гистероскопия

ГЭ – гиперплазия эндометрия

ЖЦ – жидкостная цитология

ИЦХИ – иммуноцитохимическое исследование

РДВ – раздельное диагностическое выскабливание

РЭ – рак эндометрия

ТЦ – традиционная цитология

УЗИ – ультразвуковое исследование

ЦИ – цитологическое исследование

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бохман Я. В. Руководство по онкогинекологии. / Я. В. Бохман // Л.: Медицина, 1989. - 563 с.
2. Вторушин С. В. Современные предпосылки для молекулярно-генетической классификации рака эндометрия. / С. В. Вторушин, Р. Д. Малых, // Архив патологии. - 2017. - № 79 (3). - С. 57-62.
3. Давыдов А.И. Гиперплазии эндометрия: анализ классификации ВОЗ 2014 и протокола RCOG & BSGE с позиций собственных результатов / А. И. Давыдов Н. Х. Новрузова, А. Н. Стрижаков // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. - 2018. - № 17(4). – С. 11–24
4. Демидов В.Н. Современные принципы ультразвуковой диагностики генитального эндометриоза. / В.Н. Демидов, А.И. Гус // Гинекология. - 2002. № 2. - С. 48-52.
5. Дикарева Л. В. Способ диагностики гиперпластических процессов эндометрия у больных миомой матки. / Л. В. Дикарева, Е. Г. Шварев, Д. Л. Теплый // Российский патент 2008 года. МПК G01N33/50. RU2327164C1.
6. Доброхотова Ю. Э., Гиперплазия эндометрия / Ю. Э. Доброхотова, Л. В. Сапрыкина // Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2018. - 112 с.
7. Жордания К. И. Рак эндометрия или рак яичников? / К.И. Жордания, Ю. Г. Паяниди, М. В. Савостикова и др. // Акушерство и гинекология: Новости. Мнения. Обучения. – 2017. - № 1 (15). - С. 63-68.
8. Жордания К.И. Синхронные эндометриоидные опухоли матки и яичников Сложности интерпретации / К.И. Жордания, Ю.Г. Паяниди, В.И. Логинов и др. // Проблемы репродукции. - 2018. - №24. (4). – С. 66-70.
9. Зиновьева О.С. Исследование пролиферативного потенциала гипопластичного эндометрия у пациенток с репродуктивными нарушениями в анамнезе методом флуоресцентной иммуноцитохимии / О. С. Зиновьева, Т.

- М. Мотовилова, Т. С. Качалина и др. // Медицинский альманах. - 2017. № 6. - С. 84-87.
10. Каприн А. Д. Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, А. О. Шахзадовой. - М.: МНИОИ им. П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. - 252 с.
 11. Клиническая лабораторная диагностика: в 2 т. Т2 / под ред. В. В. Долгова - М.: ФГБОУ ДПО РМАНПО, 2018. - 624 с.
 12. Клиническая онкогинекология: руководство для врачей / под ред. В. П. Козаченко. – М.: ОАО «Изд-во Бином», 2016. - С. 424 с.
 13. Клинические рекомендации. Гиперплазия эндометрия. – 2021. – 45 с.
 14. Клинические рекомендации. Рак тела матки и саркомы матки. – 2020. – 53 с.
 15. Коваленко Т.Ф. Псевдоген PTENP1, в отличие от гена PTEN, метилирован в нормальных, гиперпластических и малигнизированных тканях эндометрия женщин среднего и пожилого возраста / Т. Ф. Коваленко, К. В. Морозова, Л. А. Озолия, и др. // Acta Naturae. - 2018. - Т. 10. - № 1. - С. 43-50.
 16. Колева Н. Н. Диагностика рака шейки матки (РШК) цитологическим исследованием (стандартным пап - тестом и жидкостной онкоцитологией) / Н. Н. Колева // Концепции фундаментальных и прикладных научных исследований: сборник статей Международной научно-практической конференции. - 2018. - С. 145-147.
 17. Кондриков Н. И. Патология матки. Руководство для врачей / Н. И. Кондриков, И. В. Барина // - М.: Практическая медицина, 2019. - 352 с.
 18. Леонов М.Г. Исторические аспекты цитологического скрининга рака шейки матки / М. Г. Леонов, Т. В. Шелякина, Л. В. Лукьянова, С. Н. Чернов // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2012. – № 4(36). – С. 6-11.

19. Леонов М.Г. Совершенствование цитологической диагностики рака мочевого пузыря / М.Г. Леонов, Т.В. Шелякина, А.А. Тхагапсо и др. // Онкоурология. – 2014. - №10(4). – С. 37-41.
20. Лысенко О.В. Использование цитологического и морфологического методов исследования при проведении аспирационной биопсии эндометрия: новый подход к диагностике гиперпластических процессов эндометрия / О.В. Лысенко, С.Н. Занько, Е.Д. Кожар // Охрана материнства и детства. - 2014. - № 2 (24). - С. 19-22.
21. Мамедалиева Н. М. Динамика ультразвуковых и доплерометрических параметров на фоне комплексного лечения у пациенток с невынашиванием беременности, ассоциированным с синдромом «тонкого» эндометрия / Н. М. Мамедалиева, И. А. Лялькова, А. М. Курманова и др. // Вестник Казахского национального медицинского университета. - 2021. - № 4. - С. 8-15.
22. Новик В.И. Гормонозависимые опухоли // Материалы IX Всероссийской конференции онкологов. С-Пб., 2002. – С. 258-260.
23. Новик В.И. Цитологическая диагностика заболеваний тела матки. В руководстве «Цитологическая и гистологическая диагностика заболеваний шейки и тела матки» под ред. Хмельницкого О.К. – СОТИС, 2000. – С. – 123-146.к
24. Пашов А. И. Иммуногистохимические аспекты органосохраняющего лечения начального рака эндометрия в репродуктивном возрасте / А. И. Пашов, Е. Н. Сивова, А. В. Букреев // III Международный Конгресс «Новые технологии в акушерстве, гинекологии, перинатологии и репродуктивной медицине». – Новосибирск, 2017. – С. 142-143.
25. Практические рекомендации RUSSCO. Практические рекомендации по лечению рака тела матки и сарком. / В. М. Нечушкина, Н. В. Деньгина, Л. А. Коломиец и др. // Злокачественные опухоли. 2018. - С. 190-203.

26. Протасова А.Э. Эндометриальный рак: современные представления о скрининге. / А. Э. Протасова, М. С. Собивчак, Н. Н. Байрамова и др. // Казанский мед. ж. - 2019. - № 100 (4). - С. 662–672.
27. Романовский О.Ю. Гиперпластические процессы эндометрия в репродуктивном периоде / О. Ю. Романовский // Гинекология. - 2004. - № 6. - С. 296-302.
28. Серов В.Н. Диагностика гинекологических заболеваний с курсом патологической анатомии / В.Н. Серов, И.Н. Звенигорский // - М.: БИНОМ. Лаб. знаний, 2003. - 139 с.
29. Сухих Г. Т. Ранняя диагностика основных локализаций рака органов репродуктивной системы у женщин: проблемы и перспективы [электронный ресурс] / Г. Т. Сухих, Л. А. Ашрафян, И. Н. Кузнецов // - 2018. № 2 (146). – режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/rannyyaya-diagnostika-osnovnyh-lokalizatsiy-raka-organov-reproduktivnoy-sistemy-u-zhenschin-problemy-i-perspektivy>.
30. Табакман Ю. Ю. Возможности цитологического исследования для диагностики рака эндометрия / Ю. Ю. Табакман, А. Е. Иванов, О. В. Тараканова // Московская медицина. - 2019. - № 6 (34). - С. 95-96.
31. Толибова Г.Х. Молекулярные механизмы циклической трансформации эндометрия / Г.Х. Толибова, Т.Г. Траль, Э.К. Айламазян и др. // Журнал акушерства и женских болезней. - 2019. - Т. 68. - № 1. - С. 5-12.
32. Уткин Д. О. Молекулярно-биологические аспекты рака эндометрия: современное состояние проблемы/ Д. О. Уткин, Н. М. Попова, О. В. Выборнова // Наука молодых (Eruditio Juvenium). - 2018. - Т. 6. - № 1. - С. 144-156.
33. Фролова М.Ю. Возможности метода определения карбонильных групп белков сыворотки крови для оценки состояния «окислительного стресса» в клинической практике: автореф. дисс. канд. биол. наук: 14.00.46 / Фролова Милена Юрьевна – Москва, 2003. – 24 с.

34. Хадарцева К.А. Гистероскопия в оценке состояния эндометрия / К.А. Хадарцева, М.В. Паньшина // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2015. - № 10-5. - С. 830-833.
35. Хохлова И.Д. Диагностика и лечение гиперпластических процессов эндометрия / И.Д. Хохлова, Е.А. Куприна // Акушерство и гинекология. - 1996. - №4. - С. 50-55.
36. Чехоева А.Н. Клинико-диагностические аспекты и лечебная тактика гиперпластических процессов эндометрия с современных позиций (обзор литературы) [электронный ресурс] / А.Н. Чехоева, Г.М. Габараев, М.Д. Бароева // Вестник новых медицинских технологий. - 2019. - № 4. – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/kliniko-diagnosticheskie-aspekty-i-lechebnaya-taktika-giperplasticheskikh-protsessov-endometriya-s-sovremennyh-pozitsii-obzor>.
37. Шабалова И.П. Цитологическая диагностика заболеваний шейки и тела матки / И. П. Шабалова, К. Т. Касоян // - Российская медицинская академия последиplomного образования МЗ РФ. - 3-е изд., 2010. - 232 с.
38. Шварев Е.Г. Опухолевые маркеры в диагностике и оценке эффективности гормонотерапии рака эндометрия: автореф. дисс. д-ра. мед. наук: 14.00.14 / Шварев Евгений Григорьевич – СПб., 1993, - 34 с.
39. Юрасова И. В. Проблемы повышения эффективности цитологического исследования аспиратов эндометрия / И. В. Юрасова, Н. В. Соколова, В. П. Нажимов // Новости клинической цитологии России. - 2015. - Т. 19. - № 1-2. - С. 3-7.
40. Abd El-Maqsoud NM. Differential Expression Patterns of PTEN in Cyclic, Hyperplastic and Malignant Endometrium: Its Relation with ER, PR and Clinicopathological Parameters / Abd El-Maqsoud, S. El-Gelany // J Egypt Natl Canc Inst. - 2009. - №21(4). - P. 323-331.
41. Abdelazim I. A. Accuracy of endometrial sampling compared to traditional dilation and curettage in women with abnormal uterine bleeding / I. A. Abdelazim,

- K. M. Abdelrazak, A. A. Elbiaa et al. // Arch Gynecol Obstet - 2015. - 291 (5). - P. 1121-1126.
42. Aoun BA. Utility of p63 and PTEN staining in distinguishing cervical microglandular hyperplasia from endometrial endometrioid carcinoma with microglandular/mucinous features / BA Aoun, SL Skala // Histopathology. – 2022. - №80(7). - P.1102-1111.
43. Bouet P. E. Chronic endometritis in women with recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure: prevalence and role of office hysteroscopy and immunohistochemistry in diagnosis / P. E. Bouet, H. El. HaShem, E. Monceau et al // Fertility and Sterility. - 2016. Vol. 105. №1. P. 106-110.
44. Buccoliero A. M. Liquid-based endometrial cytology: its possible value in postmenopausal asymptomatic women / A. M. Buccoliero, F. Castiglione, C. F. Gheri et al. // Int J Gynecol Cancer. -2007. – № 17 (1). - P. 182-7.
45. Cancel K. Normal endometrial cells in cervical Cytology: a systematic review of the prevalence and Association with significant endometrial pathology / K. Cancel, Y. J. King, M. Clements et al // J Med Screen. - 2008. - № 15. - P. 188-198.
46. Casteillo F. TTF-1-positive Metastatic Endometrioid Carcinoma: A Case Report and Review of Literature of a Potential Diagnostic Pitfall / F Casteillo, P Fournel, V Da Cruz et al. // Appl Immunohistochem Mol Morphol. – 2020. - № 28(1). – P. 6-9.
47. Chen W. Immunohistochemical Profiling of Endometrial Serous Carcinoma /W Chen, A Husain, GS Nelson et al. // Int J Gynecol Pathol. – 2017. - №36(2). - P.128-139.
48. Chen C. An improved method for generating formalin-fixed, paraffin-embedded cell blocks / C. Chen, L. Yu, L. Wang // Journal of histotechnology. - 2012. – № 35 (1). - P. 11-16.
49. Colombo N. ESMO-ESGO-ESTRO Endometrial Consensus Conference Working Group. ESMO-ESGO-ESTRO Consensus Conference on Endometrial

- Cancer: diagnosis, treatment and follow-up / N. Colombo, C. Creutzberg, F. Amant et al. // *Ann Oncol* - 2017. № 27 (1). – P. 16–41.
50. De Witt A.C. Diagnostic hysteroscopy: a valuable diagnostic tool in the diagnosis of structural intra-quarterly pathology and endometrial hyperplasia or cancer? Six years of experience with non-clinical diagnostic hysteroscopy / A.C. De Witt, M.P.G. Vleugels, J.H. de Kruif // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* - 2003. - № 1100. - P. 79-82.
51. Edmund S. Cytology: diagnostic principles and clinical correlates / Edmund S. Cibas, Barbara S. Ducatman// 5th Edition, 2019.
52. Esmaili H.A. Study on the prognostic value of p53 and PTEN immunomarkers for endometrial cancer using immunohistochemistry / H.A. Esmaili, H. Amidfar, E. Mostafidi et al // *J Anal Res Clin Med.* - 2017. - № 5(4). - P. 112-117.
53. Ferreira S.R. Function of the uterus: from normal to polycystic ovary syndrome / S. R. Ferreira, A. B. Motta // *Current medicinal chemistry.* - 2018. - № 25 (15). - P. 1792-1804.
54. Fischler DF. Nongynecologic cytology utilizing the ThinPrep Processor / DF. Fischler, SM. Toddy // *Acta Cytol.* – 1996. - № 40(4). – P. 669–75.
55. Fulciniti F. The Yokohama system for reporting directly sampled endometrial cytology: the quest to develop a standardized terminology / F. Fulciniti, K. Yanoh, P. Karakitsos et al. // *Diagnost Cytopathol.* - 2018. - № 46. – P.400–12.
56. Gatus S. Practical issues in the diagnosis of serous carcinoma of the endometrium. / S. Gatus, X. Matias-Guiu // *Mod Pathol.* - 2016. - № 29. - P. 45-58.
57. Geels Y.P. Immunohistochemical and genetic profiles of endometrioid endometrial carcinoma arising from atrophic endometrium / Y.P. Geels, L.J. van der Putten, A.A. van Tilborg et al. // *Gynecol Oncol.* - 2015. - № 137(2). – P. 245-251.

58. Granberg S. Endometrial thickness as measured by endovaginal ultrasonography for identifying endometrial abnormality / S. Granberg, M. Wikland, B. Karlsson, et al. // Am. J. Obstet. Gynecol. - 1991. - №. 164. - C. 47-52.
59. Hecht J. L. Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. / J. L. Hecht, G. L. Mutter // J Clin Oncol. - 2006. - № 24 (29). – P. 4783-91.
60. Holtz D. PTEN expression in tamoxifen-associated endometrial cancers / D. Holtz, L.M. Ramondetta, T.W. Burke et al // Anticancer Res. - 2002. - № 22(5). - P. 2945-2948.
61. Houghton O. The expression and diagnostic utility of p63 in the female genital tract / O Houghton, WG. McCluggage //Adv Anat Pathol. – 2009. - № 16(5). - P.316-321.
62. Hutchinson ML. A new look at cervical cytology. ThinPrep multicenter trial results / ML. Hutchinson, P. Agarwal, T. Denault, et al. // Acta Cytol. – 1992. - № 36(4). - P. 499–504.
63. Jambhekar N.A. Immunohistochemistry in surgical pathology practice a current perspective of a simple, powerful, yet complex, tool / N.A. Jambhekar, A. C. Chaturvedi, B. P. Madur. // Indian J Pathol Microbiol. -2008. - № 51. - P. 2-11.
64. Kitson S. Ki-67 in endometrial cancer: Scoring optimization and prognostic relevance for window studies / S. Kitson, V. N. Sivalingam, J. Bolton et al // Modern Pathology. - 2017. - № 30 (3). - P. 459 - 468.
65. Köbel M. Interpretation of P53 Immunohistochemistry in Endometrial Carcinomas: Toward Increased Reproducibility / M Köbel, BM Ronnett, N Singh et al. // Int J Gynecol Pathol. – 2019. - №38. – P.123-131.
66. Köbel M. The Many Uses of p53 Immunohistochemistry in Gynecological Pathology: Proceedings of the ISGyP Companion Society Session at the 2020 USCAP Annual Meeting / Köbel M, Kang EY. // Int J Gynecol Pathol. – 2021. - №40(1). - P. 32-40.

67. Kosmas K. Expression of p53 in imprint smears of endometrial carcinoma. / K. Kosmas, M. Stamoulas, A. Marouga et al. // *Diagn Cytopathol.* - 2014. - № 42 (5). P. 416-22.
68. Kuhn E. Diagnostic immunohistochemistry in gynecological neoplasia: a brief survey of the most common scenarios / E. Kuhn, A. Ayhan // *BMP.* - 2018. № 71. - P. 98-109.
69. Kyushima N. Expression of cyclin A in endometrial adenocarcinoma and its correlation with proliferative activity and clinicopathological variables. / N. Kyushima J. Watanabe, H. Hata et al.// *J Cancer Res Clin Oncol.* – 2002. - № 128 (6). - P. 307-12.
70. Laskov I. Anti-diabetic doses of metformin decrease proliferation markers in tumors of patients with endometrial cancer / I. Laskov, L. Drudi, M.C. Beauchamp et al // *Gynecol Oncol.* - 2014. - № 134. - P. 607–614.
71. Lax S.F. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. / S. F. Lax. // *Virchows Arch.* - 2004. - № 444 (3). - P. 213-23.
72. Lee S.K. Immune cells in the female reproductive tract / S.K. Lee, C.J. Kim, D.J. Kim et al // *Immune Netw.* - 2015. - 15(1). - P. 16-26.
73. Ma K. Liquid-based endometrial cytology associated with curettage in the investigation of endometrial carcinoma in postmenopausal women / K. Ma, X. Yang, R. Chen et al. // *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology.* - 2016. - № 55(6). – P. 777–781.
74. Malpica A. How to approach the many faces of endometrioid carcinoma. / A. Malpica // *Mod Pathol.* - 2016. - № 29. - P. 29-44.
75. Mao T.L. Immunohistochemical study of endometrial high-grade endometrioid carcinoma with or without a concurrent low-grade component: Implications for pathogenetic and survival differences / T.L. Mao, A. Ayhan, K.T. Kuo et al // *Histopathology.* - 2015. - № 67(4). - P. 474-482.

76. Matsuzaki S. Uterine carcinosarcoma: Contemporary clinical summary, molecular updates, and future research opportunity / S Matsuzaki, M Klar, S Matsuzaki, et al. // *Gynecol Oncol.* – 2021. - № 160(2). - P.586-601.
77. Mitsuhashi A. Effects of metformin on endometrial cancer cell growth in vivo: a preoperative prospective trial / A. Mitsuhashi, T. Kiyokawa, Y. Sato et al // *Cancer.* - 2014. - № 120. - P. 2986-2995.
78. Moroney J.W. Normal endometrial cells in liquid-based cervical cytology specimens in women aged 40 or older. / J. W. Moroney, C. M. Zahn, R. B. Heaton et al. // *Gynecologic oncology.* - 2007. №. -105. - P. 672-6.
79. Munakata S. Diagnostic value of endometrial cytology and related technology / S. Munakata // *Diagn Cytopathol.* – 2022. - № 50(7). - P. 363-366.
80. Murali R. High-grade Endometrial Carcinomas: Morphologic and Immunohistochemical Features, Diagnostic Challenges and Recommendations / R Murali, B Davidson, O Fadare, et al. // *Int J Gynecol Pathol.* – 2019. - № 38. - P. 40-63.
81. Nishimura Y. Cytologic scoring of endometrioid adenocarcinoma of the endometrium / Y. Nishimura, J. Watanabe, T. Jobo et al. // *Cancer.* - 2005. - № 105(1). - P. 8-12.
82. Norimatsu Y. Nuclear morphometry as an adjunct to cytopathologic examination of endometrial brushings on LBC samples: A prospective approach to combined evaluation in endometrial neoplasms and look alikes / Y Norimatsu, S Irino, Y Maeda, et al. // *Cytopathology.* – 2021. - № 32(1). – P. 65-74.
83. Norimatsu Y. A Diagnostic Approach to Endometrial Cytology by Means of Liquid-Based Preparations / Y. Norimatsu, K. Yanoh, Y. Hirai, et al. // *Acta Cytologica.* - 2020. - № 64 (3). - P. 195–207.
84. Norimatsu Y. Immunohistochemical expression of PTEN and beta-catenin for endometrial intraepithelial neoplasia in Japanese women / Y. Norimatsu, T. Moriya, T. K. Kobayashi et al. // *Ann Diagn Pathol.* – 2007. - № 11(2). - P. 103-8.

85. Norimatsu Y. Utility of liquid-based cytology in endometrial pathology: diagnosis of endometrial carcinoma/ Y. Norimatsu, H. Kouda, T. K. Kobayashi et al. // *Cytopathology*. - 2009. - № 20(6). - P. 395-402.
86. Norimatsu Y. Utility of thinlayer preparations in the endometrial cytology: evaluation of benign endometrial lesions / Y. Norimatsu, H. Kouda, T. K. Kobayashi et al. // *Ann Diagn Pathol*. - 2008. - № 12(2). - P. 103-11.
87. Nucci M. R. Biomarkers in diagnostic obstetric and gynecologic pathology: A review / M.R. Nucci, D.H. Castrillon, H. Bai et al. // *Adv Anat Pathol*. - 2003. – № 10 (2). - P. 55-68.
88. Odashima H. Morphological Differences between Liquid-Based Cytology and Conventional Preparation in Endometrial Endometrioid Carcinoma Grade 1 and Grade 3, and the Differentiation of Grades in Each Method / H Odashima, H Yoshioka, K Ota, et al.// *Acta Cytol*. – 2021. - № 65(3). - P. 227-234.
89. Papaefthimiou M. Study on the morphology and reproducibility of the diagnosis of endometrial lesions utilizing liquid-based cytology / M. Papaefthimiou, H. Symiakaki P. Mentzelopoulou et al. // *Cancer*. - 2005. –105(2). - P. 56-64.
90. Prat J. Endometrial carcinoma: Pathology and genetics / J. Prat, A. Gallardo, M. Cuatrecasas et al. // *Pathology*. - 2007. - № 39(1). - P. 72-87.
91. Pusztai L. Estrogenand HER-2 receptor discordance between primarybreast cancer and metastasis / L. Pusztai, G. Viale, C.M. Kelly et al // *The Oncologist*. - 2010. - № 15. – P. 1164-1168.
92. Romay L. M. Liquid Biopsy in Endometrial Cancer: New Opportunities for Personalized Oncology / L. M. Romay, C.C. Arozamena, M. Abal // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2018. - № 19. - P. 2311.
93. Sanam M. Comparison the Diagnostic Value of Dilatation and Curettage Versus Endometrial Biopsy by Pipellea Clinical Trial / M. Sanam, M.M. Majid // *Asian Pac J Cancer Prev*. - 2015. - 16(12). – P. 4971-4975.

94. Schuler K. M. Antiproliferative and metabolic effects of metformin in a preoperative window clinical trial for endometrial cancer / K. M. Schuler, B.S. Rambally, M. J. DiFurio et al // *Cancer Med.* - 2015. - № 4. - P.161-173.
95. Shinagawa A. Evaluation of the benefit and use of the new terminology in endometrial cytology reporting system / A. Shinagawa, T. Kurokawa, M. Yamamoto et al. // *Diagnost Cytopathol.* - 2018. № 46. - P. 314–319.
96. Sivalingam V. N. Measuring the biological effect of presurgical metformin treatment in endometrial cancer / V.N. Sivalingam, S. Kitson, R. McVey et al. // *Br J Cancer.* - 2016. - № 114. - P. 281-289.
97. Solomon D. The 2001 Bethesda system: terminology for presenting cervical Cytology results / D. Solomon, D. Davey, R. Kurman et al // *JAMA.* - 2002. № 287. - P. 2114-2119.
98. Staples J. N. Cancer screening and prevention highlights in gynecologic cancer. / J. N. Staples, L. R. Duska // *Obstet Gynecol Clin North Am.* - 2019. № 46 (1). - P. 19-36.
99. Steurer S. p63 expression in human tumors and normal tissues: a tissue microarray study on 10,200 tumors / S Steurer, C Riemann, F Büscheck, et al. // *Biomark Res.* – 2021. - № 9(1). – P.7.
100. Sung H. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries/ H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel et al // *CA Cancer J Clin.* - 2021. № 71(3). – P. 209-249.
101. Thangavelu A. Neoadjuvant treatment of endometrial cancer using anastrozole: a randomised pilot study / A. Thangavelu, M. J. Hewitt, N. D. Quinton et al // *Gynecol Oncol.* - 2013. - № 131. - P. 613-618.
102. Tsionou C. Expression of carcinoembryonic antigen and ferritin in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium / C Tsionou, D Minaretzis, I Papageorgiou et al.// *Gynecol Oncol.* – 1991. - № 41(3). – P. 193-198.
103. Tzur T. Current strategies in the diagnosis of endometrial cancer / T. Tzur, R. Kessous, A.Y. Weintraub // *Arch Gynecol Obstet.* - 2017. - № 296(1). - P. 5-14.

104. Wang Q. Endometrial Cytology as a Method to Improve the Accuracy of Diagnosis of Endometrial Cancer: Case Report and Meta-Analysis / Q. Wang, Q. Wang, L. Zhao et al. // *Frontiers in Oncology*. - 2019. - № 9. P. 256.
105. Wang Y. Evaluation of liquid from the Papanicolaou test and other liquid biopsies for the detection of endometrial and ovarian cancers / Y. Wang, L. Li, C. Douville, et al. // *Science Translational Medicine*. - 2018. - № 10(433).
106. Wappenschmidr B. PTEN mutations do not cause nuclear betacatenin accumulation in endometrial carcinomas. / B. Wappenschmidr, E. Wardelmann, A. Gehrig et al. // *Hum Pathol*. - 2004. - № 35(10). - P. 1260-5.
107. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Female Genital Tumours: WHO Classification of Tumours, 5th ed.; IACR: Lyon, France, 2020. - Vol. 4.
108. Yanaki F. Liquid-based endometrial cytology using SurePath™ is not inferior to suction endometrial tissue biopsy for detecting endometrial malignancies: Midterm report of a multicenter study advocated by Japan Association of Obstetricians and Gynecologists / F. Yanaki, Y. Hirai, K. Sakamoto et al // *Cytopathology*. - 2019. - № 30(2). – P. 223-228.
109. Yanaki F. Liquid-based endometrial cytology using surepath™ is not inferior to suction endometrial tissue biopsy in clinical performance for detecting endometrial cancer including atypical endometrial hyperplasia / F. Yanaki, Y. Hirai, A. Hanada et al. // *Acta Cytol*. - 2017. - № 61. - P. 133-139.
110. Yang X. Liquid-based endometrial cytology associated with curettage in the investigation of endometrial carcinoma in a population of 1987 women / X. Yang, K. Ma, R. Chen et al // *Archives of Gynecology and Obstetrics*. - 2017. - Vol. 296. - №1. - P. 99-105.
111. Yanoh K. New terminology for intrauterine endometrial samples: a group study by the Japanese Society of Clinical Cytology / K. Yanoh, Y. Hirai, A. Sakamoto, et al. // *Acta Cytol*. – 2012. - № 56(3). – P. 233–41.
112. Yasa C. Evaluation of the diagnostic role of transvaginal ultrasound measurements of endometrial thickness for the detection of endometrial

- malignancies in asymptomatic postmenopausal women / C. Yasa, O. Dural, E. Bastu et al // Arch Gynecol Obstet. - 2016. - 294 (2). - P. 311-316.
113. Zhang H. Role of Liquid-based Cytology and Cell Block in the Diagnosis of Endometrial Lesions / H. Zhang, J. Wen, P.L. Xu // Chinese medical journal. - 2016. – № 129 (12). – P. 1459.
114. Zhao K. Cytopathology and more. Endometrial cells in PAP tests - when are they significant? [Electronic resource] / K. Zhao, Z.Li // Issues. - 2013. <https://www.captodayonline.com/endometrial-cells-pap-tests-significant/>
115. Zorn K. K. Gene expression profiles of serous, endometrioid, and clear cell subtypes of ovarian and endometrial cancer / K.K. Zorn, T. Bonome, L. Gangi et al // Clin Cancer Res. - 2005. - № 11(18). - P. 6422-6430.