

ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н. Н. Петрова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Владимирова

Анна Владимировна

**ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА РАКА МОЛОЧНОЙ
ЖЕЛЕЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ
ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ
(ДЕНСИТОМОРФОМЕТРИЯ, ИММУНОЦИТОХИМИЯ)**

Специальность – 14.01.12 онкология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, профессор

Новик Виктор Иванович

Санкт-Петербург

2016 год

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений.....	3
Введение.....	4
ГЛАВА 1. Обзор литературы.....	5
ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования.....	37
ГЛАВА 3. Результаты собственных исследований.....	44
3.1. Результаты цитогистологических сопоставлений и оценка эффективности цитологического исследования.....	44
3.2. Анализ неопределенных и ошибочных цитологических заключений	46
3.3. Результаты денситоморфометрических измерений ядер клеток при доброкачественных процессах и РМЖ.....	60
3.4. Результаты цитологического и ИЦХ исследования лимфати- ческих узлов при РМЖ.....	66
3.5. Определение молекулярно-генетического подтипа опухоли с помощью ИЦХ исследования.....	68
ГЛАВА 4. Обсуждение результатов.....	79
Выводы.....	89
Список литературы.....	91

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ER – рецептор эстрогена
PR – рецептор прогестерона
АПГ – атипическая протоковая гиперплазия
ВДКПИС – высокодифференцированная протоковая карцинома in situ
ДКИС – дольковая карцинома in situ
ВПП – внутрипротоковая папиллома
ВППР – внутрипротоковый папиллярный рак
ЖЦ – жидкостная цитология
ИГХ – иммуногистохимия
ИО – истинно отрицательное цитологическое заключение
ИОП – интегральная оптическая плотность
ИП – истинно положительное цитологическое заключение
ИПК – инвазивная папиллярная карцинома
ИПР – инвазивный протоковый рак
ИДР – инвазивный дольковый рак
ИЦХ – иммуноцитохимия
ЛО – ложноотрицательное цитологическое заключение
ЛП – ложноположительное цитологическое заключение
НДПКИС – низкодифференцированная протоковая карцинома in situ
ОП – оптическая плотность
ППГ – простая протоковая гиперплазия
ПКИС – протоковая карцинома in situ
РМЖ – рак молочной железы
РР/КСП – радиальный рубец/комплексное склерозирующее поражение
СА – склерозирующий аденоз
СР – слизистый рак
ТАБ – тонкоигольная аспирационная биопсия
ТПДЕ - терминальная протоково-дольковая единица
ТР – тубулярный рак
УДПКИС – умеренно-дифференцированная протоковая карцинома in situ
ФА – фиброаденома

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

В структуре онкологической заболеваемости женского населения рак молочной железы (РМЖ) в мире и в России занимает первое место. Из всех новых случаев злокачественных новообразований различных органов, выявленных в мире, 10 % приходится на молочную железу. Если оценивать только женскую популяцию, удельный вес РМЖ возрастает до 22%, в промышленно развитых странах он ещё выше и составляет 27%. [В.Ф. Семиглазов, 2010]. Ежегодно в России выявляется более 52 тысяч новых случаев РМЖ [Чиссов В.И., 2013]. Злокачественные новообразования молочной железы, как причина смертности от онкологических заболеваний среди женщин, занимает также первое место как в России, так и в мире. Раннее выявление и своевременное лечение РМЖ являются ведущими факторами, снижающими смертность и увеличивающими вероятность полного выздоровления.

«Золотым стандартом» в обследовании пациенток с новообразованиями молочной железы в настоящее время является так называемый «тройной подход», включающий физикальный (осмотр, пальпация), лучевой (маммография, УЗИ) и морфологический методы исследования. Современная морфологическая диагностика РМЖ подразумевает детальную характеристику опухоли и точную оценку статуса регионарных лимфатических узлов, отвечая тем самым на ряд вопросов, имеющих решающее значение для планирования терапии и оценки прогноза заболевания. Тонкоигольная аспирационная биопсия (ТАБ) – это технически простой, безопасный, быстрый и сравнительно дешевый метод получения материала для морфологического исследования. Наиболее существенными недостатками ТАБ является довольно высокий процент получения неинформативного и малоинформативного материала, а также проблемы

интерпретации цитологических картин при высокодифференцированном раке и некоторых пролиферативных процессах, что вызывает необходимость применения более сложных инвазивных методов диагностики (трепан-биопсия, эксцизионная биопсия). Рутинное цитологическое исследование (световая микроскопия) не может решить все задачи, которые ставятся клиницистами на современном этапе. Возникает необходимость поиска и применения дополнительных методов исследования. В настоящей работе рассмотрено значение денситоморфометрических и иммуноцитохимических (ИЦХ) исследований в диагностике РМЖ.

Цель исследования

Повышение эффективности цитологической диагностики РМЖ путем проведения цитогистологических сопоставлений и применения дополнительных современных методов исследования (денситоморфометрия, иммуноцитохимия).

Задачи исследования

1. Провести сопоставление результатов цитологического исследования материала с гистологическим диагнозом. На основании полученных данных произвести расчет показателей эффективности цитологического метода исследования в диагностике новообразований молочной железы.
2. Выявить случаи, вызвавшие наибольшие затруднения в дифференциальной диагностике, проанализировать причины ошибочных цитологических заключений.
3. Произвести денситоморфометрические измерения ядер клеток при доброкачественных и злокачественных процессах и уточнить критерии цитоморфологической диагностики РМЖ.
4. Оценить информативность цитологического и ИЦХ методов в диагностике метастазов РМЖ в регионарные лимфатические узлы.

5. Определить молекулярно-генетический подтип опухоли на цитологическом материале и сопоставить полученные результаты с данными иммуногистохимического (ИГХ) исследования. Проанализировать целесообразность применения ИЦХ метода для определения прогностических маркеров при РМЖ.

Научная новизна

В работе оценена эффективность цитологической диагностики РМЖ, уточнены критерии дифференциальной цитоморфологической диагностики пролиферативных процессов и высокодифференцированного рака. Проведены денситоморфометрические измерения ядер клеток на представительном материале, включающем 12 групп наблюдения. Выявлено, что при преинвазивных формах РМЖ ядра клеток имеют большие размеры, чем при инвазивном раке. Также проанализирована целесообразность применения ИЦХ метода для определения прогностических маркеров при РМЖ и оценена информативность цитологического и ИЦХ методов в диагностике метастазов рака в лимфатические узлы.

Практическая значимость

Уточнение критериев дифференциальной цитоморфологической диагностики пролиферативных процессов и рака способствует повышению эффективности цитологического исследования в диагностике РМЖ. Определение прогностических и предиктивных факторов при РМЖ с помощью ИЦХ исследования позволит определить молекулярно-генетический подтип опухоли, что облегчит планирование адекватного лечения больных РМЖ.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В структуре онкологической заболеваемости женского населения рак молочной железы (РМЖ) в России и в мире занимает первое место. В структуре онкологической заболеваемости в Санкт-Петербурге в 2012 году РМЖ занял 1 место, составляя 12,5% от всех злокачественных новообразований (ЗНО) и 21% всех ЗНО среди женского населения. В структуре смертности населения от ЗНО РМЖ находится на 4 месте (9,5%), а среди женского населения – на первом месте (17,5 %) [Мерабишвили В.М., 2013]. В основе снижения смертности от РМЖ лежит раннее выявление заболевания, качественное и своевременное лечение.

В большинстве стран в диагностике новообразований молочной железы принят так называемый «тройной подход», включающий клинический, лучевой и морфологический методы исследования [Шабалова И.П. и др., 2005; Tse G. et al., 2013; Papeix G. et al., 2012]. Для морфологической верификации процесса на современном этапе используются малотравматичные методы (тонкоигольная аспирационная биопсия (ТАБ) и трепан-биопсия). Широко используемая ранее эксцизионная биопсия практически полностью вытеснена, поскольку требует общей анестезии и ассоциирована с высокой частотой осложнений [Tse G. et al., 2013].

При первичном обращении пациентки к маммологу для морфологической верификации новообразования оптимально использовать метод ТАБ с цитологическим исследованием. Эта процедура безопасна и редко вызывает осложнения. Также преимуществами ТАБ являются низкая стоимость исследования и возможность установления диагноза в короткие сроки, что позволяет выбрать правильную тактику ведения больных с доброкачественными и злокачественными новообразованиями [Kocjan G. et al., 2008]. Цитологическое исследование позволяет быстро диагностировать некоторые доброкачественные опухоли, гиперпластические и

воспалительные процессы, злокачественные новообразования. Уверенное цитологическое заключение о наличии рака при совпадении с данными клинического обследования и лучевых методов позволяет планировать объем хирургического вмешательства, выполнять его без затрат времени на срочное гистологическое исследование, при необходимости проводить дооперационное лечение, отказаться от эксцизионной биопсии у тяжелых пациентов при планировании нехирургических методов лечения [Шабалова И. П. и др., 2005]. Цитологический метод также успешно применяется в диагностике метастазов РМЖ в регионарные лимфатические узлы, рецидивов опухоли после проведенного лечения, отдаленных метастазов [Kocjan G., 2008].

Эффективность цитологической диагностики РМЖ довольно высока. По данным разных авторов, чувствительность метода колеблется от 66 до 99%, специфичность – от 72 до 100%, точность – от 75,5 до 98,9% [Волченко Н.Н. и др., 2014; Михетько А.А. и др., 2004; Новик В.И. и др., 1997, 1998; Abdel-Hadi M. et al., 2010; Ariga R. et al., 2002; Brancato B. et al., 2012; Frankel P. P., 2011; Homesh N.A., 2005; Lee H.C., 2000; Nguansangiam S., 2009; O'Neil S., 1997]. Цитологический метод исследования имеет ряд ограничений. Неминуемо определенное количество ложноотрицательных результатов, связанных с получением неполноценного или некачественного материала (попаданием в иглу жира и фиброзной ткани, получение материала из соседних с новообразованием участков, дефектами приготовления и окрашивания препаратов) [Шабалова И.П. и др., 2005]. Процент неинформативного материала в различных учреждениях значительно варьирует, по данным литературы, от 0,7 до 17,7% [Волченко Н.Н. и др., 2014; Михетько А.А. и др., 2004; Новик В.И. и др., 1998; Abdel-Hadi M. et al., 2010; Ariga R., 2002; Brancato B., 2012; Frankel P.P., 2011; Lee H.C., 2000; Nguansangiam S., 2009; O'Neil S., 1997].

Помимо этого, имеется риск ошибочных результатов, связанных с объективными сложностями дифференциальной диагностики некоторых

доброкачественных и злокачественных процессов. В связи с этим, в последнее время в предоперационной диагностике рака молочной железы прослеживается тенденция к снижению использования ТАБ и замена её трепан-биопсией. Причиной этого является более высокая чувствительность и специфичность гистологического исследования, меньший процент подозрительных заключений, малоинформативного и неинформативного материала [Homesh N.A. et al., 2005; Barra Ade A. et al., 2008; Shannon J., 2001]. Кроме того, трепан-биопсия позволяет получить более репрезентативный материал для дополнительных исследований [Tse G. et al., 2013]. По мнению других авторов, трепан-биопсия в дооперационной диагностике новообразований молочной железы должна выполняться по показаниям. К таковым относятся диагностика непальпируемых образований, множественных микрокальцинатов, а также случаи неопределенного цитологического заключения при ТАБ (подозрение на рак) [Kocjan G., 2008, Simsir A. et al., 2012, Shabb N.S., 2013]. ТАБ с цитологическим исследованием является методом выбора для первичной морфологической диагностики пальпируемых новообразований [Kocjan G., 2008; Rosa M. et al., 2012].

Во многих странах Европы и в США принят единый подход для интерпретации цитологической картины при ТАБ молочной железы, рекомендованный Национальным Институтом Рака в 1996 году. Согласно этому подходу, результаты исследования соответствуют одной из пяти диагностических категорий:

C1 – неинформативный материал

C2 – доброкачественный процесс

C3 – атипия, наиболее вероятно, доброкачественный процесс

C4 - подозрение, наиболее вероятно, злокачественный процесс

C5 – злокачественный процесс

Материал расценивается как C1, если клетки эпителия в препарате отсутствуют или единичны. Процессы категории C2 характеризуются

присутствием достаточного числа клеток и клеточных структур без признаков атипии. Для того чтобы отнести процесс к категории С5, необходимо присутствие в мазках достаточного количества клеток с явными признаками злокачественности. Категории С1, С2 и С5 обычно диагностируются легко и не вызывают затруднений. Для процессов категории С3 характерны черты доброкачественных процессов, однако выявляются признаки некоторой атипии. К ним относятся повышенная клеточность препарата, слабый или умеренный ядерный полиморфизм, потеря клеточных связей в пластах. Такие изменения могут быть обусловлены лечебным воздействием или гормональными влияниями. К категории С4 относятся процессы, в которых выявлены признаки атипии, более выраженные, чем в С3, однако не имеющие признаки явно злокачественных, или наоборот, когда имеются единичные явно злокачественные клетки среди доброкачественных клеточных структур. В эту же группу входят случаи, при которых в мазках обнаруживаются клетки с выраженными признаками атипии, однако, из-за скудности материала или плохой сохранности клеток однозначная оценка процесса вызывает затруднения [Deb R.A. et al., 2001; Mitra S. et al., 2015; Shabb N.S. et al., 2013].

Категории С3 и С4 объединены общим термином «серая зона». В этих случаях цитологическое заключение часто дается в предположительной форме. Большинство неопределенных цитологических заключений обусловлены ошибками на преаналитическом этапе (низкая клеточность мазка, артефакты механического повреждения, высушивания, дефекты приготовления, фиксации и окраски материала), а также ошибками, связанными с неправильной оценкой цитологических картин недостаточно подготовленным специалистом. Обе эти причины составляют, по данным Shabb N.S. (2013), около 80%. Третья причина занимает меньшую долю (около 20% случаев С3 и С4), и представляет собой так называемую «истинную серую зону».

Встречаемость «истинной серой зоны» среди всех ТАБ невелика и составляет, по данным Al-Kaisi N. (1994), около 2%. Процессы, входящие в «истинную серую зону», имеют цитологические признаки, занимающие промежуточное положение между доброкачественными и злокачественными. Доброкачественные процессы в целом характеризуются низкой или умеренной клеточностью, состоят, главным образом, из упорядоченно расположенных клеток протокового эпителия, с наличием голых ядер в фоне препарата. Злокачественные процессы, в свою очередь, часто имеют некротический фон, представлены мономорфной клеточной популяцией с заметной потерей клеточных связей, многочисленными изолированно расположенными клетками с различной степенью анизонуклеоза. Цитологические признаки, позволяющие отнести процесс к неопределенной категории, включают в себя скученность и укрупнение ядер, потерю клеточных связей. Peterse J.L. и соавт. (1989) выделили признаки, которые могут быть полезны в дифференциальной диагностике доброкачественных и злокачественных процессов, относящихся к «истинной серой зоне». Признаками, указывающими на доброкачественный характер процесса, являлись большие однослойные пласты, размер ядер менее 16 мкм, отсутствие ядерного полиморфизма, гладкие контуры ядерной мембраны и присутствие биполярных ядер в пластах и фоне препарата. Признаками злокачественности являлись расположение клеток в небольших кластерах, клеточная диссоциация, увеличение ядер более 16 мкм, анизонуклеоз, неровные границы ядерной мембраны, заметные ядрышки, участки некроза.

Наиболее часто встречающимися процессами, в дифференциальной диагностике которых цитолог сталкивается с трудностями, являются фиброаденома, простая и атипическая протоковая гиперплазия, внутрипротоковая папиллома, склерозирующий аденоз, высокодифференцированный протоковый рак, папиллярный, слизистый, криброформный рак, дольковая карцинома, а также высокодифференцированная карцинома *in situ* [Al-Kaisi N., 1994; Kanhoush R.

et al., 2004; Deb R.A. et al., 2001; Willis S.L. et al., 1995; Sneige N. et al., 1993; Layfield L.G. et al., 1996, Mitra S., 2015].

Фиброаденомы (ФА) составляют самую большую долю процессов, приводящих к ложноположительным, подозрительным и неопределенным заключениям. [Al-Kaisi N., 1994; Kanhoush R. et al., 2004; Deb R.A. et al., 2001; Willis S.L. et al., 1995; Jamal A.A. et al., 2001]. ФА - доброкачественная опухоль, характеризующаяся пролиферацией эпителия и стромальных элементов. Наиболее часто встречается у женщин репродуктивного возраста, особенно у молодых женщин до 30 лет. Обычно представляет собой безболезненный хорошо ограниченный подвижный узел, чаще одиночный. Гистологически может быть представлена двумя типами роста – периканаликулярным, с разрастанием стромальных клеток вокруг протоков, и интраканаликулярным, со сдавлением протоков пролиферирующими стромальными клетками с образованием щелевидных пространств. Стромальный компонент может содержать участки миксоматоза, гиалинизации, выраженные дистрофические изменения с кальцификацией. В эпителиальном компоненте могут быть представлены участки апокринной или плоскоклеточной метаплазии, фокусы фиброзно-кистозных изменений и склерозирующего аденоза [Lakhani S.R. et al., 2012].

В классическом варианте мазки при ФА отличаются высокой клеточностью и представлены тремя элементами – фрагментами стромы, клетками протокового эпителия, расположенных в крупных однослойных пластах в виде «пчелиных сот», «рогов оленя», ветвящихся структур, а также миоэпителиальными клетками, рассеянных по препарату, как правило, в виде голых ядер овальной формы. Характерна умеренная степень клеточной диссоциации, то есть в мазках можно наблюдать немногочисленные изолированно расположенные клетки эпителия протоков с интактной цитоплазмой. Из-за высокой клеточности, клеточной диссоциации, увеличения ядер и наличия выступающих ядрышек ФА может быть ошибочно диагностирована как высококодифференцированный рак [Al-Kaisi

N., 1994; Kollur S.M.et al., 2006; Stanley M.W.et al., 1990; Simsir A.et al., 2001; Benoit J.L.et al, 1992; Rogers L.A.et al, 1992; Lopez-Ferre P.et al, 1999]. Эпителиальные клетки при ФА немного крупнее, чем нормальные клетки протокового эпителия, но не такие крупные, как при раке. Полярность ядер в пластах сохранена при ФА и теряется при раке. Голые ядра при ФА мелкие, овальной формы; при раке они могут быть также представлены, но являются голыми ядрами опухолевых клеток, имеют более крупные размеры, полиморфны, имеют неровные очертания и сходны с ядрами окружающих опухолевых клеток. Подавляющее большинство ФА с цитологическими признаками атипии при последующем гистологическом исследовании оказываются обычными фиброаденомами [Simsir A.et al., 2001]. В меньшем числе наблюдений в таких ФА выявляются фокусы гиперплазии протокового эпителия, апокринные изменения или склерозирующий аденоз [Kollur S.M.et al., 2006, Stanley M.W.et al., 1990].

Внутрипротоковые пролиферативные процессы составляют вторую по частоте причину ложноположительных и подозрительных цитологических заключений. Это группа цитологически и структурно разнообразных пролиферативных процессов, возникающих в терминальной протоководольковой единице (ТПДЕ). Они ассоциированы с повышенным риском развития инвазивного рака. Встречаются в любом возрасте, за исключением детского и препубертатного [Lakhani S.R. et al., 2012]. Большинство этих процессов бессимптомны, выявляются при маммографии, но изредка могут быть представлены пальпируемым образованием [Shabb N.S. et al., 2013]. Наиболее часто диагностические трудности возникают при диагностике простой и атипической гиперплазии протокового эпителия и высокодифференцированной протоковой карциномы *in situ* [Sneige N., 1994; Ishikawa T. et al., 2007; O'Neil S., 1997].

Простая протоковая гиперплазия (ППГ) характеризуется пролиферацией клеток протокового эпителия, расположенных в обширных плотных пластах, с нарушением упорядоченности расположения клеток,

«закручиванием», наложением их друг на друга. Часто наблюдаются «окна», расположенные по периферии пластов. В некоторых случаях пролиферация имеет солидный характер с отсутствием «окон». Также изредка могут быть представлены микропапиллярные структуры. Клетки расположены неравномерно, имеют нечеткие границы, ядра клеток отличаются по размерам, часто видны борозды и внутриядерные инклюзии. Клеточные связи в пластах имеют тенденцию к «растягиванию». Микропапиллярные структуры, если представлены, имеют широкое основание и узкую верхушку с пикнотичными, гиперхромными ядрами. Характерно наличие миоэпителиальных клеток, участков апокринной метаплазии, кальцинатов. Изредка могут быть видны фокусы некроза [Lakhani S.R. et al., 2012].

Атипическая протоковая гиперплазия (АПГ) характеризуется пролиферацией мономорфных эпителиальных клеток в пределах ТПДЕ. Клетки расположены равномерно, отсутствует «закручивание» и скученность клеток, характерные для ППГ. Клеточные границы четкие. Пролиферация может иметь солидный, кривоформный с округлыми «штампованными» просветами, или микропапиллярный характер, с сосочковыми структурами, имеющими узкое основание и широкую верхушку. Мономорфность клеточной популяции и структурные признаки сходны с таковыми при протоковой карциноме *in situ* (ПКИС). Однако пролиферация при АПГ характеризуется присутствием в пределах ТПДЕ второй клеточной популяции с неоднородными клетками, или полностью вовлекает пространство ТПДЕ, но не выходит за ее пределы. Количественный критерий играет существенную роль в дифференциальной диагностике АПГ и ПКИС. Наиболее распространенный критерий, используемый для установления диагноза ПКИС, является присутствие мономорфной атипической пролиферации клеток по крайней мере в двух соседних ограниченных мембраной пространствах ТПДЕ, или размер пролиферирующего участка более 2 мм [Lakhani S.R. et al., 2012].

ПКИС – неопластическая пролиферация эпителиальных клеток, ограниченная протоково-дольковой системой, характеризующаяся различной степенью клеточной атипии и имеющая тенденцию к прогрессированию в инвазивный рак. Высокодифференцированная протоковая карцинома *in situ* (ВДПКИС) состоит из мелких мономорфных клеток, формирующих микропапиллярные, криброформные и солидные структуры. Солидные участки могут содержать микроацинусы, в которых клетки расположены полярно вокруг небольшого просвета, образуя розеткоподобные структуры. Ядра одинакового размера, с равномерной структурой хроматина и небольшими ядрышками. Фигуры митоза редки. Часто представлены микрокальцинаты псаммоматозного типа.

Умеренно-дифференцированная протоковая карцинома *in situ* (УДПКИС) состоит из клеток со слабо или умеренно выраженным ядерным полиморфизмом, различной степенью неравномерности хроматина и переменными ядрышками. Могут быть обнаружены митозы. Могут также быть представлены некрозы (точечные или комедо-типа).

Низкодифференцированная протоковая карцинома *in situ* (НДПКИС) характеризуется выраженной клеточной атипией с формированием солидных, криброформных, папиллярных структур. Ядра полиморфны, содержат грубый хроматин и выступающие ядрышки. Часто обнаруживаются фигуры митозов, участки некрозов, микрокальцинаты [Lakhani S.R. et al., 2012].

Критерии, используемые для цитологической диагностики пролиферативных процессов, те же, что используются при гистологическом исследовании, и включают структурные и клеточные признаки. Sneige N. и Staerckel G.A. (1994) обнаружили, что эти признаки хорошо представлены в цитологических мазках. ТАБ при ППГ характеризуется пластинами протокового эпителия с некоторым нарушением упорядоченности расположения клеток, неравномерными межклеточными промежутками, расположением клеток в виде «вереницы», вытянутостью ядер. Клетки могут

отличаться размерами и формой. Разрозненные клетки с интактной цитоплазмой встречаются редко. Структура ядерного хроматина нежная.

АПГ сложно диагностируется по цитологическому материалу и демонстрирует черты, характерные как для ППГ, так и для ВДПКИС [Abendroth C.S. et al., 1991; Silverman J.F. et al., 1993; Thomas P.A. et al., 1994].

ВДПКИС представляет значительные трудности для дифференциальной цитологической диагностики и характеризуется умеренной или высокой клеточностью, мономорфными однотипными опухолевыми клетками с тенденцией к формированию криброформных, солидных или микропапиллярных структур. Отсутствие миоэпителиальных клеток помогает отличить этот процесс от доброкачественной пролиферации. Отличить цитологически инвазивный высокодифференцированный протоковый рак от протоковой Ca in situ невозможно [Mc. Kee G.T. et al., 1999; Cangiarella J. et al., 2003; Sidawy M.K. et al., 1998; Lilleng R. et al., 1992; Sauer T. et al., 2005; Thomas P.A. et al., 1994; Abendroth C.S. et al., 1991; Silverman J.F. et al., 1993].

Инвазивный протоковый рак (ИПР) – наиболее распространенный тип РМЖ. Его высокодифференцированная форма (ИПР G1) является самой частой причиной ложноотрицательных и подозрительных цитологических заключений в группе злокачественных процессов. Как и для менее дифференцированных раков, для него характерна высокая клеточность препарата, значительная клеточная диссоциация. Мазки при высокодифференцированном ИПР обычно представлены мономорфной популяцией клеток мелкого и среднего размера с минимальной ядерной атипией, расположенных изолированно или формирующих трехмерные комплексы, синцитиальные скопления и изредка железисто-подобные структуры. Отдельные клетки имеют полигональную или кубическую форму, с округло-овальными ядрами и редкими мелкими ядрышками. Миоэпителиальные клетки в составе эпителиальных комплексов и в фоне препарата обычно отсутствуют [Deb R.A., 2001; Mitra S., 2015; Shabb N.S.,

2013]. Протоковый рак низкой степени злокачественности, а также тубулярный рак, могут содержать фрагменты стромы, а также компактные доброкачественного вида эпителиальные пласты и мелкие рассеянные голые ядра, что имитирует цитологическую картину ФА. В таких ситуациях для дифференциальной диагностики имеют большое значение клинические и рентгенологические данные [Shabb N.S.et al., 2013].

Диагноз тубулярного рака (ТР) по материалу ТАБ сложен. В менее половины случаев ставится уверенное цитологическое заключение о наличии рака [Khirwadkar N.et al., 2005; Cangiarella J.et al., 2001; Gupta R.K.et al., 1997; Dei Tos A.P. et al, 1994]. Дифференциально-диагностические трудности возникают из-за сходства с доброкачественными пролиферативными процессами, такими как склерозирующий аденоз и радиальный рубец/комплексное склерозирующее поражение. Характерными признаками ТР является наличие тубулярных структур, выраженная клеточная диссоциация, малочисленность миоэпителиальных клеток и клеточная атипия [Bondeson L.et al., 1990]. Трубочки при ТР обычно многочисленны, жесткие, ригидные, с резкими изменениями диаметра и часто заостренными концами. Они имеют неправильные углы с ответвлениями протоков, расходящиеся в хаотичном направлении. В местах ветвления напоминают «согнутый локоть». Также трубочки могут иметь конфигурацию в виде запятой. Миоэпителиальные клетки могут быть многочисленными. Их присутствие, а также минимальная клеточная диссоциация, отсутствие значительной клеточной атипии в некоторых случаях приводит к ложноотрицательному диагнозу ФА. Ригидные тубулярные структуры могут быть выявлены и при ФА, однако для последней характерно отсутствие или минимальная клеточная атипия, более обильный миоэпителиальный компонент, меньшая диссоциация клеток. В дифференциальной диагностике существенное значение имеют клинические данные.

Склерозирующий аденоз (СА) и радиальный рубец/комплексное склерозирующее поражение (РР/КСП) – это, как правило, образования

небольшого размера, выявляемые при маммографии. Однако если очаги множественные и сливаются, то могут быть представлены пальпируемым образованием с нечеткими границами. Цитологические признаки СА – переменная клеточность, группы клеток протокового эпителия разного размера, формирующие тубулярные структуры или рыхлые пласты, а иногда расположенные в виде разрозненных клеток. В большинстве случаев обнаруживаются также ацинарные структуры. Плотные, шаровидные скопления пролиферирующих клеток протокового эпителия расположены в плотной соединительной ткани. Стромальный компонент состоит из характерных мелких плотных гиалинизированных фиброзных фрагментов, изредка прикрепленных к эпителиальным пластам. Некоторые трубочки имеют угловатую конфигурацию, имитируя соответствующие структуры при тубулярном раке. Миоэпителиальные клетки представлены в фоне, но не всегда обнаруживаются в составе эпителиальных пластов [Kundu U.R. et al., 2001; Cho E.Y. et al., 2001]. Трудности в дифференциальной диагностике возникают в том случае, если в материале обнаруживают атипичные структуры, такие как угловатые трубочки, изолированно расположенные эпителиальные клетки и признаки атипичности ядер, присутствующие одновременно [Kundu U.R. et al., 2012]. Трубочки с угловатой конфигурацией или подчеркнутыми «обрубленными» концами, наблюдаемые при СА, являются характерными для тубулярного рака. Тубулярный рак обычно гиперклеточный, представлен многочисленными трубочками, которые имеют неправильную конфигурацию, более ригидные жесткие контуры и могут иметь конфигурацию острых углов. Диссоциированные клетки также более многочисленны [Khirwadkar N. et al., 2005; Cangiarella J. et al., 2001]. В половине случаев СА при цитологическом исследовании дается неопределенное заключение [Bonzanini M. et al., 1997].

PP / КСП характеризуются смешанным клеточным составом, в котором крупные и мелкие эпителиальные пласты, апокринные клетки, биполярные голые ядра, пенистые клетки и эластические стромальные волокна

представлены в различном соотношении. Папиллярные структуры, кальцинаты, тубулярные структуры без резких угловатых очертаний, связанные с миоэпителиальными клетками, также могут быть представлены в мазках. Высокая клеточность, грязный фон мазка, тубулярные структуры и клеточная диссоциация могут привести в некоторых случаях к диагностической категории С3 или С4. Цитологические признаки неспецифичны и диагноз РР/КСП может быть установлен только в предположительной форме, с учетом клинических и радиологических данных [Mak A.et al., 2006; De la Torre M. et al., 1994; Field A. et al., 2007; Lamb J. et al., 1994].

Диагноз криброформного рака сложен из-за тенденции опухолевых клеток к формированию обширных пластов и низкой ядерной атипии [Ng W.K.,2001; Cai G.et al., 2004; Phillipson J.et al., 1994; Vicandi V.et al., 2004]. Ключ к достижению правильного диагноза – распознавание криброформных структур от «пчелиных сот», отсутствие или незначительное количество миоэпителиальных клеток, низкая степень ядерной атипии. Также при криброформном раке в мазках могут встречаться остеокласто-подобные гигантские клетки.

Инвазивный дольковый рак (ИДР) – вторая по частоте гистологическая форма рака и составляет 5-15% всех случаев РМЖ [Jemal A.et al., 2004]. Классическая лобулярная карцинома ассоциирована с наибольшим числом ложноотрицательных результатов среди всех типов РМЖ [Shabb N.S. et al., 2013]. Процент ошибок при диагностике ИДР варьирует от 4 до 60% [Choi Y.D. et al., 2004; Leach C.et al., 1992; Jayaram G.et al., 2000; Hwang S.et al., 2004]. Это происходит в основном из-за получения неинформативного или малоинформативного материала, поскольку опухолевые клетки тесно связаны с десмопластической стромой. Часто причиной ложноотрицательного диагноза являются ошибки интерпретации, так как опухолевые клетки имеют мелкие размеры, и признаки атипии в них выражены минимально. Препараты переменны по клеточности, клетки

мелкие, однотипные, с небольшими ядрами, расположены изолированно, вереницей или в небольших шаровидных структурах. Характерны эксцентричное расположение ядер. Клеточная атипия незначительна. Мономорфность клеточной популяции и отсутствие миоэпителиальных клеток - ключевые признаки отличия ИДР от доброкачественного процесса [Shabb N.S.et al., 2013; Mucha Dufloth R.M. et al., 2015]. Клинические и радиологические данные также имеют большое значение для дифференциальной диагностики.

Аспираты при слизистом раке обычно клеточные, состоят из мономорфных клеток, расположенных в составе обильного внеклеточного слизистого фона. Опухолевые клетки могут располагаться трехмерными группами со сглаженными, закругленными контурами, однослойными пластами или многочисленными изолированными клетками. Клетки, как правило, мономорфны, доброкачественного вида, с нежной мелковакуолизированной цитоплазмой. Обнаружение диффузной гиалинизации цитоплазмы описывается как характерная черта слизистого рака. Ядра эксцентричны, с равномерным петлистым хроматином. Ядерный полиморфизм минимальный. Ядрышки мелкие и незаметные [Weaver M.G.et al., 1993; Stanley M.W. et al., 1989; Ro J.Y.et al., 1991; Fisher C.J.et al., 1992; Duane G.B.et al., 1989]. Обнаружение значительного полиморфизма и некрозов указывает на наличие смешанной карциномы. Фоновая слизь имеет вязкий тягучий вид. Может иметь вид тяжей, пленчатых образований и шаров. Окрашивается эозинофильно при окраске по Лейшману. В тяжах слизи часто видны тонкостенные капилляры и фибробласты. Муцинозный рак часто симулирует миксоидную ФА. Последняя чаще встречается у молодых женщин. В мазках, в отличие от муцинозного рака, присутствуют стромальные фрагменты, миоэпителиальные клетки, а эпителий представлен разветвленными пластами в виде «рогов оленя».

Опухоли папиллярного строения

Внутрипротоковая папиллома (ВПП) – доброкачественное новообразование, представленное фибро-васкулярным стержнем, покрытым слоем эпителиальных и миоэпителиальных клеток. ВПП подразделяются на периферические и центральные. Центральные ВПП образуются в крупных протоках, обычно в субареолярной зоне, без вовлечения ТПДЕ, тогда как периферические ВПП всегда имеют основание в ТПДЕ [Lakhani S.R. et al., 2012]. ВПП являются довольно частой доброкачественной опухолью (5,3% всех доброкачественных новообразований молочной железы). Возраст больных варьирует в большом диапазоне, наиболее часто они встречаются в возрастной группе 30-50 лет [Lewis J.T. et al., 2006]. Чаще встречаются центральные ВПП. Частым клиническим симптомом являются односторонние кровянистые выделения из соска. Пальпируемое образование выявляется редко. Маммографически выявляется ретроареолярное образование доброкачественного вида, расширение протока за образованием и изредка микрокальцинаты. Мелкие ВПП могут быть маммографически оккультными. При ультразвуковом исследовании выявляется хорошо очерченный гладкостенный гипоэхогенный солидный узел или дольчатое гладкостенное кистозное образование с солидным компонентом. Дуктография обычно выявляет дефект наполнения внутри протока или расширение протока. Магнитно-резонансная томография может также оказать помощь в диагностике ВПП. Мелкие папилломы могут выглядеть как выступающее в просвет протока образование с четким ровным контуром. В крупных ВПП контуры могут быть неровными. Периферические папилломы часто клинически бессимптомны, но могут проявляться выделениями из соска, или реже, пальпируемым образованием при слиянии нескольких ВПП. Часто маммографически они также оккультны, но могут обнаруживаться множественные мелкие хорошо очерченные образования или периферически расположенные микрокальцинаты, узловатые выступы в протоке. Макроскопически центральные ВПП могут формировать хорошо

ограниченный опухолевый узел с папиллярными разрастаниями, прикрепленный одной или несколькими ножками к стенке расширенного протока. Размер центральных ВПП варьирует от нескольких миллиметров до 5 см и более. В крупных папилломах могут быть участки некроза и кровоизлияния. Гистологически как центральные, так и периферические ВПП характеризуются компактными ветвящимися структурами, состоящими из фибро-вакулярного стержня, покрытого слоем миоэпителиальных клеток, а сверху – эпителием. Миоэпителиальный слой представлен всегда, но может быть почти незаметным. В этом случае иммуногистохимическое (ИГХ) исследование с антителами к гладкомышечному актину, p63 и кальпонию имеет значительную диагностическую ценность. В других случаях миоэпителиальный слой может быть хорошо выражен. Изредка встречается гиперплазия миоэпителиальных клеток. Эпителиальный компонент может состоять из одного слоя кубических или столбчатых клеток. Иногда обнаруживаются фокусы ППГ в составе ВПП. Также часто обнаруживают апокринные изменения и участки плоскоклеточной метаплазии. Метаплазия особенно заметна там, где есть участки некрозов. Очень редко встречаются очаги муцинозной, светлоклеточной и сальноклеточной метаплазии. Иногда могут обнаруживаться фокусы АПГ и ДКИС. Такие находки чаще встречаются при периферических ВПП.

ВПП с АПГ характеризуется локальной популяцией мономорфных однотипных клеток с цитологическими и структурными признаками внутрипротоковой неоплазии. Миоэпителиальные клетки в этих участках единичны или отсутствуют. ИГХ окрашивание с антителами к высокомолекулярным цитокератинам также отсутствует.

Протяженность изменений и соотношение размеров фокуса атипических клеток к размеру ВПП используются для дифференциальной диагностики ВПП с АПГ и внутрипротоковой карциномой в составе ВПП. Если протяженность атипической эпителиальной популяции составляет менее 3 мм, процесс расценивается как ВПП с фокусами АПГ; при

протяженности изменений 3 мм и более - как внутрипротоковая карцинома. Необходимо различать ПКИС в папилломе от папиллярной карциномы *in situ*/внутрипротоковой папиллярной карциномы. Папиллярная карцинома *in situ* представляет собой возникший *de novo* процесс, в котором не выявляется признаков подлежащей ВПП [Lakhani S.R. et al., 2012].

Внутрипротоковый папиллярный рак, или папиллярная карцинома *in situ* (ВППР) – злокачественная неинвазивная пролиферация эпителия с папиллярными разрастаниями, возникающая в просвете протоково-дольковой системы. Встречается достаточно редко. Клинические проявления неспецифичны, чаще всего это прозрачные или кровянистые выделения из соска. Периферически расположенные ВППР могут выявляться на маммографии в виде образования или микрокальцинатов. При гистологическом исследовании видны протоки или ТПДЕ, заполненные тонкими разветвленными фиброваскулярными стержнями, покрытыми мономорфной популяцией опухолевых эпителиальных клеток, расположенными в один или несколько слоев. Клетки расположены упорядоченно, имея обманчиво доброкачественный вид. Также могут присутствовать микропапиллярные, криброформные и солидные структуры. Ядерная атипия выражена слабо или умеренно. Миоэпителиальные клетки отсутствуют или единичны.

Инкапсулированная папиллярная карцинома встречается также редко, чаще у женщин старшей возрастной группы (средний возраст пациенток около 65 лет). Клинически проявляется как пальпируемое округлое хорошо очерченное образование, чем напоминает доброкачественную опухоль, могут также присутствовать выделения из соска. Гистологически характеризуется пролиферацией тонких фиброваскулярных стержней, покрытых опухолевыми эпителиальными клетками с низкой или умеренной степенью ядерной атипии, окруженных фиброзной капсулой. Клетки обычно формируют солидные и криброформные структуры. В большинстве случаев миоэпителиальные клетки отсутствуют [Lakhani S.R. et al., 2012].

Солидная папиллярная карцинома – это редкая гистологическая форма РМЖ, насчитывает менее 1% случаев. Чаще встречается у женщин в постменопаузе, средний возраст пациенток 70 лет. В зависимости от размера опухоли может быть представлена пальпируемым образованием или выявляться только маммографически. Кровянистые выделения из соска встречаются в 20-25% случаев. Гистологическая картина представлена множественными хорошо ограниченными узлами, состоящими из плотно расположенных клеток с экспансивным типом роста. Эпителиальные пролиферирующие структуры могут быть заключены в плотную фиброзную строму. Клеточная пролиферация в опухолевых узлах мономорфная, отсутствуют явные папиллярные и кривоформные структуры. Опухолевые клетки обычно мелкие, мономорфные, часто имеют вытянутую или веретеновидную форму. Цитоплазма мелковакуолизированная. Могут быть представлены перстневидные клетки. Митозы немногочисленны. В мазках могут встречаться участки внеклеточной слизи [Lakhani S.R. et al., 2012].

ВПП при цитологическом исследовании в классическом варианте представляют собой пролиферирующие древовидные сосочковые эпителиальные образования, которые окружают фибро-вакулярный стержень. Однако в диагностике ВПП по цитологическому материалу возникают затруднения. Во-первых, сосочкоподобные структуры могут выявляться при некоторых других процессах, как доброкачественных, так и злокачественных. В исследовании Simsir A. и соавт. (2003) только в половине случаев, диагностированных цитологически как ВПП, при дальнейшем исследовании диагноз был подтвержден гистологически. В остальных случаях выявлялись различные процессы, от ФА до ИПР. Наиболее полезными отличительными признаками являются клеточность препарата, присутствие доброкачественных столбчатых клеток. По данным Mickael C.W. и Buschmann B. (2002), отличительным признаком ВПП, помимо наличия истинных фибро-вакулярных стержней, покрытых столбчатыми клетками, являются большие «взъерошенные» пласты клеток с маленькими

языкоподобными выпячиваниями. Также подчеркивается полное отсутствие очагов апокринной метаплазии в карциномах в отличие от доброкачественных папиллом. Изредка встречающиеся инфильтрированные ВПП тоже могут представлять значительные трудности для дифференциальной диагностики из-за наличия выраженной реактивной атипии эпителия. В этом случае в пользу доброкачественного характера процесса могут говорить присутствующие в мазках дегенеративно-измененные столбчатые клетки, обширные участки некроза и участки апокринной или плоскоклеточной метаплазии [Greenberg M.L. et al., 2006; Ishihara A. et al., 1994].

Дифференциальная диагностика доброкачественных и злокачественных опухолей папиллярного строения довольно сложна, поскольку наблюдается довольно значительное совпадение цитологических признаков [Naji B.E. et al., 2007; Jayaram G. et al., 2007]. Наиболее часто упоминающиеся в литературе признаки, свидетельствующие в пользу злокачественного процесса – это высокая клеточность материала, тонкие одиночные фибро-вазкулярные стержни, сложные ветвящиеся структуры, разрозненные клетки с вариабельностью цитологической атипии, отсутствие доброкачественных биполярных ядер, а также апокринных клеток, рассеянных в фоне [Weigner J. et al., 2015; Greenberg M.L. et al., 2006; Bardales R.H. et al., 1994]. Однако ни один из этих признаков не является патогномоничным для рака. Поэтому некоторые авторы рекомендуют в случаях выявления папиллярной опухоли при цитологическом исследовании выполнять трепан-биопсию с гистологическим исследованием [Ibarra J.A., 2006]. Также во всех случаях принимают во внимание клинические и радиологические данные для решения вопроса о тактике ведения таких пациенток [Shabb N.S. et al., 2013; Papeix G., 2012].

Таким образом, цитологическая диагностика при высокодифференцированном раке и ряде доброкачественных пролиферативных процессов трудна и достаточно субъективна, что нередко

заставляет формулировать цитологическое заключение в предположительной форме. Возникает необходимость поиска дополнительных методов исследования, помогающих объективизировать критерии диагностики. Одним из таких методов является компьютерная денситоморфометрия [Волченко Н.Н. и др., 2006; Новик В.И., 2000; Dey P. et al., 2000; Kalhan S. et al., 2010; Nagashima T. et al., 2000; Tahlan A. et al., 2000; Ruiz A. et al., 1999; Norris H.J. et al., 1988].

Компьютерная денситоморфометрия – это измерение различных параметров клетки с помощью компьютерного анализа микроизображений. Предпосылкой для морфометрических исследований следует считать существующую гистогенетическую модель возникновения рака, согласно которой его проявлению предшествуют гиперпластические изменения в эпителии, сопровождающиеся поэтапными морфологическими изменениями в клетках, достигающих максимальной выраженности в предраковых процессах. Дальнейшее нарастание дисплазии эпителия может приводить к злокачественной трансформации клеток, возникновению преинвазивного (карцинома *in situ*), а затем инвазивного рака. Эта модель не исключает возможность возникновения рака *de novo* [Волченко Н.Н. и др., 2006; Skjorten F. et al., 1991; Vombonati A. et al., 2011].

Прогрессия от нормальной ткани молочной железы до ППГ и АПГ, переходящей в ПКИС, а затем в инвазивный рак, характеризуется постепенным нарастанием морфологических изменений клетки. Изменение структуры ядра – наиболее значимый морфологический критерий злокачественного процесса. Поэтому в большинстве исследований внимание сфокусировано на измерении морфометрических параметров ядер. Прогрессирование морфологических изменений ядер было подчеркнуто во многих исследованиях [Van Diest P.J. et al., 1999; Pienta K.J. et al., 1991; Moroz K. et al., 1997; Abdalla F. et al., 2008; Skjorten F. et al., 1991; Mommers E.C. et al., 2001; Ruiz A. et al., 1999] с постепенным увеличением измеряемых значений от доброкачественных процессов к протоковой гиперплазии,

карциноме *in situ*, далее к инвазивному раку и инвазивному раку с метастазами в лимфатические узлы.

Изучались различные геометрические (характеризующие размер и форму ядра) и текстуральные (характеризующие особенности распределения ядерного хроматина) параметры ядер – площадь ядра, периметр, диаметр, форма ядра, число и размер ядрышек, оптическая плотность и другие [Михетько А.А. и др., 2006; Волченко Н.Н. и др., 2006; Skjorten F. et al., 1991; Van Diest P.J. et al., 1989; Pienta K.J. et al., 1991; Moroz K. et al., 1997; Abdalla F. et al., 2008; Dey P. et al., 2000; Kalhan S. et al., 2010; Nagashima T. et al., 2000; Elzagheid A. et al., 2003; Wittekind C. et al., 1987]. Средняя площадь ядер, по данным большинства исследований, является наиболее значимым из них [Arora B. et al., 2007, Abdalla F. et al., 2008, Wittekind C. et al., 1987, Skjorten F. et al., 1991].

В исследовании Волченко Н.Н. и соавт. (2006) изучали материал ТАБ молочной железы с различной степенью дисплазии. Было выявлено нарастание площади ядер, периметра, оптической плотности с увеличением степени дисплазии. Также пропорционально степени дисплазии увеличивались и значения площади и периметра ядрышек. Таким образом, морфометрические измерения позволили объективизировать цитологические критерии дисплазии.

Wittekind C. и Schulte E. (1987) изучали площадь, периметр и максимальный диаметр ядер в 4 группах процессов – доброкачественные опухоли, ИПР без метастатического поражения регионарных лимфатических узлов, ИПР с метастазами не более чем в 3 лимфатических узлах и ИПР с метастатическим поражением 4 и более лимфатических узлов. Среднее значение ядерного периметра позволило разграничить все 4 группы. Сходные данные получены в исследовании Pienta K.J. (1991), в котором анализировались параметры ядер в следующих группах – нормальная ткань железы, ПКИС, ИПР без регионарных метастазов и ИПР с метастазами в

регионарных лимфатических узлах. Параметры ядерного полиморфизма увеличивались последовательно от неинвазивного к метастатическому раку.

Многими авторами были предприняты попытки дифференциальной диагностики пограничных процессов, входящих в «серую зону», с помощью морфометрических измерений. В исследовании Kalhan S. и соавт. (2010) изучались морфометрические параметры различных доброкачественных и злокачественных процессов. Получены статистически значимые отличия таких параметров как средняя площадь ядра, периметр, минимальный и максимальный диаметр, а также параметров распределения хроматина. В этом исследовании удалось четко разграничить АПГ и ПКИС по морфометрическим параметрам. Nagashima T. и соавторы (2000) отметили трудности диагностики внутрипротоковых пролиферативных процессов. Изучали морфометрические параметры при ПКИС, ППГ и ВПП. При ПКИС средняя площадь ядра, коэффициент вариации средней площади и периметр были больше, чем при ППГ и папилломах.

Однако такие данные получены не всеми исследователями. В работе Mommers E.C. и соавт. (2001) при измерении параметров ядер не обнаружено статистически значимых различий между АПГ и ВДПКИС, а также между ВДПКИС и высокодифференцированным ИПР. Elzagheid A. и соавт. (2003) изучали среднюю площадь ядра при раке, ФА и ФКБ. Полученные данные не позволили отдифференцировать рак от ФА. Rajesh L. и соавт. (2002) измеряли ядерные параметры при ИДР, ИПР, пограничных и доброкачественных процессах. Все ядерные параметры при ИПР были значительно больше, чем при ИДР, более того, не было выявлено статистически значимых отличий между ИДР и пограничными и доброкачественными процессами. Skjorten F. и соавт. (1991) измеряли площадь ядер у пациенток с ИПР, ИДР и карциномами *in situ*. Измерение средней площади ядер при инвазивном и неинвазивном раке не выявило статистически значимой разницы, а средняя площадь ядер при ИПР и ИДР существенно отличалась. Ruiz A. и соавт. (1999) акцентировали внимание на

дифференциальной диагностике ППГ, АПГ и ПКИС. Было показано, что средняя площадь и объем ядер прогрессивно уменьшается от ПКИС до ППГ. Различие было статистически значимым при сравнении ППГ и АПГ, а также при сравнении АПГ и НДПКИС. Однако при сравнении АПГ и ВДКИС не было получено статистически значимых отличий.

Некоторые исследователи изучали корреляции между морфометрическими параметрами ядер и степенью дифференцировки опухоли. Kalhan S. и соавт. (2010) выявили статистически значимые различия в группах ВДПКИС и УДПКИС, но не получили статистически значимых отличий в группах УДПКИС и НДПКИС. В исследовании Ruiz A. и соавт. (2002) показано, что средняя площадь ядра постепенно увеличивалась от ВДПКИС до НДПКИС, но эти различия оказались статистически незначимыми. Mogozi K. с соавт. (1997) получены статистически значимые результаты в разграничении высоко- и низкодифференцированных форм ИПР.

Таким образом, компьютерная цитометрия представляет собой ценный дополнительный метод в дифференциальной диагностике доброкачественных и злокачественных процессов, позволяющий преодолеть субъективизм рутинного цитологического исследования и объективизировать критерии диагностики, особенно в спектре «серой зоны», где часто встречаются диагностические дилеммы. Также морфометрия может использоваться в цитологической градации РМЖ, что в совокупности с клиническими данными, такими как статус лимфатических узлов, размер опухоли и митотическая активность, может быть полезно для разделения пациенток на группы высокого и низкого риска. Однако противоречивые результаты работ, посвященных этому вопросу, требуют проведения дальнейших исследований.

Современные тенденции в лечении РМЖ характеризуются стремлением к максимальному улучшению качества жизни больных за счет сокращения объемов хирургического вмешательства – выполнения

органосохраняющих операций и ограничения показаний к полной подмышечной лимфаденектомии. Вовлеченность регионарных лимфатических узлов в опухолевый процесс – ключевой элемент в стадировании РМЖ, один из главных прогностических факторов и решающих параметров для выбора тактики лечения пациента [Семиглазов В.Ф., 2002, 2003; Altomare V. et al., 2007; Monaco S. et al., 2012; Leenders M. et al., 2012; Khout H. et al., 2013; Jankowski C. et al., 2015; Gurleyik G. et al., 2015; Ciatto S. et al., 2007;].

На протяжении многих лет в стандарты хирургического лечения РМЖ входило обязательное удаление всех групп лимфатических коллекторов. Однако такая хирургическая тактика была сопряжена с множеством осложнений, влияющих на качество жизни пациента. Современный уровень обследования, в том числе внедрение маммографического скрининга, позволяет выявлять больных РМЖ ранней стадии, без поражения лимфатических узлов. У этой категории пациентов полная подмышечная лимфаденэктомия является избыточной, калечащей процедурой. Существующие методы инструментальной диагностики метастазов в регионарные лимфатические узлы характеризуются недостаточной точностью и высокой частотой ложноотрицательных заключений. Для этих целей наиболее широко используется ультразвуковое исследование. По данным различных авторов, в сочетании с ТАБ точность его значительно увеличивается [Altomare V. et al., 2007; Jankowski C. et al., 2015; Gurleyik G. et al., 2015]. Сегодня ТАБ под УЗ-навигацией известна как одна из рутинных процедур у больных с подозрением или подтвержденным диагнозом РМЖ [Sauer T. et al., 2012; 2014]. ТАБ позволяет получить материал в том числе и для дополнительных методов исследования (жидкостная цитология, ИЦХ исследования), выполнение которых увеличивает вероятность обнаружения метастазов, так как рутинная окраска цитологических препаратов не всегда позволяет определить наличие опухолевых клеток, особенно если речь идет о микрометастазах. Однако определяющим условием для предотвращения

ложноотрицательного результата является получение адекватного материала, многоточковая пункция лимфатического узла с акцентом на подкапсульную зону, приготовление качественных препаратов и определенный опыт специалиста [Волченко Н.Н., Савостикова М.В., 2010].

Для повышения точности определения статуса лимфатических узлов разработана и широко применяется в настоящее время техника биопсии сигнального лимфатического узла. Эта процедура приобретает все большее признание, позволяя избежать ненужных лимфаденэктомий у большинства пациентов. Чувствительность срочного гистологического исследования «замороженных срезов» составляет 64-74%. Предложенные в процессе становления метода биопсии сигнальных лимфатических узлов дополнительные методики морфологического исследования (серийно-ступенчатые срезы, ИГХ окраска для обнаружения эпителиальных клеток) позволяют точнее оценивать состояние лимфатических узлов, вплоть до выявления микрометастазов опухоли, не различаемых при использовании рутинных методов [Семиглазов В.Ф. и др., 2003]. Однако при срочном гистологическом исследовании не всегда возможно применение полного набора современных методов, в том числе ИГХ [Ермилова В.Д., 2002]. Для повышения шансов обнаружения опухолевых клеток в сигнальных лимфатических узлах возможно, наряду с гистологическим исследованием, использовать цитологический и ИЦХ методы. Результаты цитологического и ИЦХ исследований могут быть использованы в качестве дополнительных критериев для назначения адъювантной терапии. Для выявления микрометастазов и изолированных опухолевых клеток в лимфатических узлах используются антитела к эпителиальным маркерам (цитокератинам, эпителиальному антигену (Ber-EP4), эпителиальному мембранному антигену (EMA), раково-эмбриональному антигену (CEA)). Наиболее эффективным в обнаружении раковых клеток является применение антицитокератиновых антител. Однако исследователям приходится считаться с возможными ошибками, обусловленными наличием в лимфатических узлах цитокин-

положительных ретикулярных дендритных клеток, а также изредка встречающихся неопухолевых эпителиальных включений в некоторых группах лимфатических узлов [Глузман Д.Ф. и др., 2003]. Клиническое значение микрометастазов и изолированных клеточных кластеров опухолевых клеток в настоящее время остается спорным вопросом, требующим проведения дальнейших исследований.

На сегодняшний день известно, что особенностью РМЖ является его биологическая гетерогенность в пределах одного гистологического типа и стадии заболевания. Благодаря успехам биохимии и молекулярной биологии, в настоящее время в арсенале исследователей и клиницистов имеется огромное количество биологически значимых показателей, которые могут помочь в оценке прогноза и выборе адекватной терапии РМЖ. В их число входят онкогены и протоонкогены, онкобелки, различные факторы роста и их рецепторы (в большинстве случаев также являющиеся продуктами онкогенов), рецепторы стероидных и пептидных гормонов, супрессорные гены и продукты их экспрессии, гормонозависимые белки, протеазы, участвующие в процессах метастазирования, интегрины, отвечающие за межклеточные контакты, и т.д. [Герштейн Е.С., 2002]. Среди них значительное место занимают прогностические маркеры, которые включают рецепторы гормонов (эстрогена и прогестерона), маркеры пролиферации (PCNA, Ki-67), протоонкогены (Her-2/neu (C-erbB2), bcl-2), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), гены-супрессоры (Rb, p53) и другие. Обсуждается также роль протоонкогенов Ras, C-мус, INT2. Большое внимание уделяется изучению опухолевого ангиогенеза как независимого фактора прогноза при ранних стадиях РМЖ. [Петров С.В, Райхлин Н.Т., 2004]. Тканевые маркеры, определяемые непосредственно в опухолевой ткани, характеризуют определенные биологические особенности опухоли, специфику ее поведения и регуляции – например, гормональную чувствительность или склонность к инвазии и метастазированию. Их основная роль заключается в том, что, характеризуя биологические

особенности каждой конкретной опухоли, они могут помочь в прогнозировании исхода заболевания и в индивидуализации лекарственного лечения [Герштейн Е.С., 2002].

Perou и соавт. (2000) с помощью анализа экспрессии генов с использованием ДНК-микрочипов разделили РМЖ на 4 подтипа – люминальный, HER2-сверхэкспрессирующий, нормально-подобный и базально-подобный. Анализ выживаемости пациентов показал, что выделенные подтипы хорошо коррелировали с клиническими исходами, при этом наиболее неблагоприятный прогноз отмечен при HER2-сверхэкспрессирующем и базально-подобном подтипах рака молочной железы [Sorlie T. et al., 2001]. Экстенсивный геномный анализ РМЖ открыл четыре когерентные группы, схожие с биологическими подтипами, определяемыми профилированием генной экспрессии. Подтипы РМЖ могут быть определены мультипараметрическими молекулярными тестами, такими как PAM-50 или Mamma Print/Blue Print. В рутинной клинической практике молекулярно-генетическое тестирование трудно осуществимо, что объясняется высокой стоимостью подобных исследований и сложностью интерпретации данных одновременного анализа множества прогностических факторов. Для этих целей разработаны суррогатные подходы, использующие ИГХ тесты для рецепторов эстрогена (ER), прогестерона (PR), маркера пролиферативной активности Ki-67 и онкопротеина HER-2 [Семиглазов В.Ф., 2015].

У пациентов с РМЖ необходимость определения перечисленных маркеров не вызывает сомнений, поскольку они являются важнейшими факторами, влияющими на прогноз заболевания и чувствительность к лечению [Семиглазов В.Ф., 2000]. Рутинным методом определения экспрессии рецепторов гормонов и маркера пролиферативной активности Ki-67 является ИГХ исследование, тогда как для выявления сверхэкспрессии HER-2 используется ИГХ исследование и флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH-анализ) [Петров С.В., Райхлин Н.Т., 2004, Пожарисский К.М.,

Леенман Е.Е., 2000]. ИГХ исследование выполняется на операционном или биопсийном материале, фиксированном формалином и заключенном в парафин. В последнее время появляется все больше работ, в которых эти исследования выполняются на цитологических препаратах. Анализ проводят на материале, полученном при ТАБ, отпечатках с трепан-биоптатов или соскобах с операционного материала. Используются различные способы обработки материала – стандартные мазки, жидкостная цитология, метод клеточных блоков. Результаты определения маркеров на цитологическом материале имеют высокие уровни корреляции с данными, полученными при ИГХ исследовании [Волченко Н.Н. и др., 2014; Bueno Angela S.P. et al., 2013; Bédard Y.C. et al., 2003; Domanski A.M. et al., 2012; Hanley K.Z., 2009; Kinsella M.D., 2011; Kumar S.K., 2012; Pegolo E., 2012, Zoppi J.A., 2001].

Для выполнения иммуноцитохимического исследования важно получить качественный материал. Выполнение ИЦХ исследования на стандартных препаратах может приводить к ложноположительному результату вследствие артефактов высушивания на воздухе, загрязнения фона препарата кровью [Domanski A.M. et al., 2012]. Оптимальным способом для выполнения ИЦХ является метод жидкостной цитологии (ЖЦ). ЖЦ – технология приготовления препаратов, предложенная с целью преодолеть недостатки традиционной методики и, тем самым, повысить эффективность цитологической диагностики. Материал для цитологического исследования собирают в специальную виалу с жидкой средой. Все аппараты для приготовления жидкостных препаратов используют разный принцип работы: цитоцентрифугирование, двойная мембранная фильтрация и преципитация, клеточное обогащение на градиенте плотности, но обладают общим достоинством – позволяют получить монослойное равномерное распределение клеток на стекле, которое может использоваться как для рутинных окрасок и морфологического исследования, так и для дополнительных методов (ИЦХ, молекулярно-генетические исследования) [Волченко Н.Н., 2013]. Этот способ приготовления цитологических

препаратов обладает рядом преимуществ по сравнению с рутинным способом: клетки распределяются равномерно на ограниченном участке препарата, лежат в один слой, что упрощает интерпретацию результата, а также экономит расход реагентов. Немедленная фиксация предотвращает появление артефактов высушивания на воздухе. Кроме того, при использовании некоторых консервирующих сред происходит денатурация белков и лизис эритроцитов, что снижает неспецифическое фоновое окрашивание [Волченко Н.Н., 2010; Pegolo E., 2012]. Для проведения ИЦХ исследований некоторые авторы предлагают метод клеточных блоков. В процессе центрифугирования образца клеточная суспензия приобретает форму шара, затем заливается в парафин и обрабатывается таким же образом, как залитый в парафин гистологический материал. Способ клеточных блоков сходен с обычным ИГХ исследованием и требует больше времени, чем приготовление препаратов для ЖЦ [Domanski A.M. et al., 2012].

Экспрессия рецепторов гормонов и HER2-статус учитываются при выборе неoadъювантной терапии для первичного РМЖ и системного паллиативного лечения при прогрессировании РМЖ. Во многих работах было доказано, что экспрессия гормональных рецепторов и онкопротеина HER2 в первичной опухоли и в метастатических очагах могут отличаться. Поэтому в случаях рецидива или появления метастазов опухоли для выбора адекватной схемы терапии рекомендуется повторное определение молекулярно-генетического подтипа. У таких пациентов ТАБ часто является методом выбора, поскольку получение материала для гистологического исследования сопряжено с риском осложнений [Domanski A.M. et al., 2012]. ИЦХ метод как альтернатива ИГХ исследованию в этих ситуациях представляет интерес. Однако не всеми авторами признается надежность результатов ИЦХ исследований, особенно относительно определения HER-2 [Beatty G. et al., 2004].

Представленные литературные данные показывают, что в цитологической диагностике новообразований молочной железы по-прежнему существуют трудности, обусловленные объективными сложностями диагностики ряда процессов, составляющих так называемую «серую зону». Попытки объективизировать критерии диагностики пролиферативных процессов и высокодифференцированных форм рака с помощью морфометрических исследований имеют противоречивые результаты и нуждаются в дальнейшем уточнении и изучении.

Современные тенденции в лечении РМЖ предполагают точное стадирование опухолевого процесса, а также получение максимальной информации о прогностических и предиктивных факторах до начала лечения для определения хирургической тактики и оценки необходимости назначения неoadьювантной терапии. Цитологическое исследование регионарных лимфатических узлов под контролем УЗИ может оказаться полезным и точным методом, при простоте, низкой стоимости и минимальном количестве осложнений. Дополнительные методы исследования, такие как иммуноцитохимическое выявление микрометастазов и изолированных клеточных кластеров опухолевых клеток, могут быть дополнительным критерием в решении вопроса о назначении адьювантного лечения. Целесообразность выполнения и точность результатов исследований по определению прогностических и предиктивных маркеров на цитологическом материале обсуждается в литературе и требует дальнейшего изучения.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе рассмотрено несколько аспектов цитологической диагностики новообразований молочной железы. Проведен ретроспективный анализ результатов цитологической диагностики опухолей молочной железы у 3415 пациентов. Для объективизации цитологических данных у 47 пациентов выполнены денситоморфометрические исследования. Оценка эффективности цитологической диагностики метастазов РМЖ в регионарные лимфатические узлы выполнена ретроспективно у 42 пациентов; еще у 42 проведены проспективные цитологические и ИЦХ исследования сигнальных лимфатических узлов. Определение молекулярно-генетического подтипа опухоли с помощью ИЦХ исследования выполнена у 70 больных РМЖ (табл. 1).

Таблица 1

Количество исследований и пациентов в различных аспектах цитологической диагностики новообразований молочной железы

Цитологический материал	Количество пациентов	Количество исследований
Ретроспективный анализ результатов цитологической диагностики новообразований молочной железы	3415	4091
Морфо-денситометрические исследования	47	5077*
Ретроспективный анализ результатов цитологического исследования лимфатических узлов	42	42
Цитологическое исследование мазков-отпечатков сигнальных лимфатических узлов	42	60
Иммуноцитохимическое исследование мазков-отпечатков сигнальных лимфатических узлов	10	10
Иммуноцитохимическое исследование соскобов с опухолей молочной железы	70	350

*количество измеренных ядер

Проведен ретроспективный анализ результатов цитологических исследований новообразований молочной железы, выполненных в лаборатории цитологии ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» МЗ РФ с января 2009 г. по декабрь 2013 г. За указанный период было выполнено 4091 исследование у 3415 пациентов, из которых 3378 (99%) составили женщины и 37 (1%) – мужчины. Средний возраст обследованных составил 50 лет (от 11 до 89 лет). В 3597 (88%) случаях материал для исследования был получен с помощью ТАБ, в 169 (4%) исследовались выделения из соска, в 237 (6%) - отпечатки трепан-биоптата, и в 86 (2%) - соскобы с поверхности поражения или отпечатки изъязвления опухоли. Мазки фиксировали в спирте (96% этанол). В подавляющем большинстве случаев материал окрашивали гематоксилином и эозином, в некоторых случаях – азур-эозином по Лейшману.

У 1434 пациентов было проведено сопоставление цитологического заключения с результатами гистологического исследования биопсийного и/или операционного материала. На основании полученных данных рассчитаны основные показатели эффективности цитологического метода исследования – чувствительность, специфичность, предсказательное значение положительного результата, предсказательное значение отрицательного результата, точность. Для расчета этих показателей учитывались истинно положительные (ИП), истинно отрицательные (ИО), ложноположительные (ЛП) и ложноотрицательные (ЛО) в отношении рака цитологические заключения. Случаи цитологического подозрения на рак, а также неинформативный материал не учитывались. Расчет показателей эффективности цитологической диагностики производился по общепринятым формулам:

$$\text{Чувствительность} = \text{ИП} / (\text{ИП} + \text{ЛО}) * 100\%$$

$$\text{Специфичность} = \text{ИО} / (\text{ИО} + \text{ЛП}) * 100\%$$

$$\text{Предсказательное значение положительного теста} = \text{ИП} / (\text{ИП} + \text{ЛП}) * 100\%$$

$$\text{Предсказательное значение отрицательного теста} = \text{ИО} / (\text{ИО} + \text{ЛО}) * 100\%$$

Точность = ИП + ЛО / ИП+ЛП+ИО+ЛО * 100%.

При ретроспективном пересмотре цитологических препаратов с проведением цитогистологических сопоставлений были проанализированы ошибки цитологической диагностики и выявлены случаи, вызвавшие наибольшие затруднения в дифференциальной диагностике рака молочной железы и доброкачественных процессов.

С целью объективизации цитологических данных были произведены денситоморфометрические исследования у 47 пациентов со следующими окончательными морфологическими диагнозами: доброкачественные опухоли (5), АПГ (8), ВДПКИС (3), УНДПКИС (5), ДКИС (5), ИДР (4), ИПР G1 (3), ИПР G2 (4), ИПР G3 (3), ВПП (2), ВППР (2), ИПК (3). Группу доброкачественных опухолей составили пациенты с окончательным диагнозом ФА (4) и кистозный фиброаденоматоз (1) (табл. 2).

Таблица 2

Количество обследованных пациентов в различных группах наблюдений

Окончательный морфологический диагноз	Количество пациентов	Количество измеренных ядер
Доброкачественные опухоли (ДО)	5	548
Атипическая протоковая гиперплазия (АПГ)	8	730
Высокодифференцированная протоковая карцинома in situ (ВДКИС)	3	330
Умеренно- и низкодифференцированная протоковая карцинома in situ (УНДКИС)	5	542
Дольковая карцинома in situ (ДКИС)	5	598
Инвазивный дольковый рак (ИДР)	4	408
Высокодифференцированный инвазивный протоковый рак (ИПР G1)	3	321
Умеренно-дифференцированный инвазивный протоковый рак (ИПР G2)	4	448
Низкодифференцированный инвазивный протоковый рак (ИПР G3)	3	313
Внутрипротоковая папиллома (ВПП)	2	259
Внутрипротоковый папиллярный рак (ВППР)	2	196
Инвазивная папиллярная карцинома (ИПК)	3	384
ВСЕГО	47	5077

При формировании групп наблюдений для сравнения мы включили 13 случаев несовпадения цитологического и гистологического диагноза.

С помощью монохромной цифровой камеры BMR-1340 LM-DE (фирма EZ-experts, СПб, Россия) черно-белые изображения ядер эпителиальных клеток молочной железы в цитологических мазках, окрашенных гематоксилином и эозином, записывали в формате BMP при увеличении объектива 40x (МИ) и стабилизированном освещении. Параметры ядер клеток (площадь ядра, периметр, максимальный и минимальный диаметры, оптическая плотность окраски - ОП, интегральная оптическая плотность – ИОП) определяли с помощью программы ВидеоТест Морфо 5.2. В каждом случае измеряли не менее 100 клеток. Для статистического анализа полученных данных использовали программу Statgraphics Plus 5.1. Результаты считались значимыми при $p < 0,05$.

Проведен ретроспективный анализ результатов цитологических исследований лимфатических узлов, выполненных в лаборатории цитологии НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова с 2009 г. по 2014 г. В исследование включены пациенты с гистологически подтвержденным диагнозом РМЖ, которым между проведением ТАБ и операцией не проводилось никакого лечения.

Всего было исследовано 102 лимфатических узла у 84 пациентов. В 42 случаях исследовался материал, полученный при тонкоигольной аспирационной биопсии. Клинический диагноз был сформулирован следующим образом: рак молочной железы (34), первично-множественные злокачественные новообразования (3), лимфома (1), меланома (1), лимфаденит неясного генеза (3). Локализация лимфатических узлов: подмышечные (36), надключичные (4), лимфатические узлы средостения (2). У 42 пациентов исследовались мазки-отпечатки сигнальных лимфатических узлов (всего было исследовано 60 лимфатических узлов) с клиническим диагнозом РМЖ, локализация лимфатических узлов - подмышечная область.

Материал, полученный при ТАБ, окрашивали азур-эозином по Лейшману, мазки-отпечатки сигнальных лимфатических узлов - методом срочной окраски (Leukodif) в течение 1 минуты. ИЦХ реакции выполняли на обычных мазках с использованием системы визуализации Novolink Polymer Detection System, Leica, и антител к эпителиальному антигену (клон BerEP-4) и цитокератину (клон MNF-116) фирмы «Dako».

Для определения молекулярно-генетического подтипа опухоли были отобраны 78 пациентов (77 женщин и 1 мужчина). У большинства пациентов (66) клинический диагноз РМЖ был установлен впервые и подтвержден морфологическими методами (с помощью цитологического или гистологического исследования), у 9 по данным инструментального и клинического обследования высказано подозрение на рак, у 3 пациенток выявлен рецидив РМЖ после проведенного ранее хирургического лечения. У 12 больных проводилась неoadьювантная химиотерапия. Все пациенты подвергнуты оперативному вмешательству. Материал для цитологического исследования получали с разреза удаленного новообразования путем соскабливания материала со всей поверхности опухолевого узла (или с наиболее подозрительных участков при отсутствии четко выраженного узла опухоли). Соскоб помещали в специальную транспортную среду, состоящую из альбумина, полиглюкина и раствора Хенкса, и доставляли в лабораторию. Далее материал обрабатывали с помощью цитоцентрифуги Shandon Cytospin 4 (Thermo, США). В процессе центрифугирования клетки равномерно распределялись на обработанных полилизинном стеклах. В каждом случае готовили и окрашивали один препарат по рутинной методике (гематоксилин-эозин) для морфологической оценки и подсчета количества клеток. Если клеток было достаточно (не менее 300), готовили еще 5 препаратов (4 препарата для ИЦХ реакций и 1 для отрицательного контроля). Мазки подсушивали на воздухе, фиксировали 96% спиртом в течение 10 минут. Далее проводилась демаскировка антигенов в цитратном буфере (pH=6) на водяной бане при температуре 98 °С в течение 20 минут (для HER-2 - 40

минут). Затем выполняли протокол ИЦХ реакции в соответствии с инструкцией производителя. Для выявления ER, PR и Ki-67 использовали систему детекции Novolink Polymer Detection System (Leica, Великобритания). Для определения экспрессии HER-2 использовали набор HercepTest (Dako, Германия). Антитела к ER (клон 1D5, Dako), PR (клон PgR636, Dako) и Ki-67 (клон SP6, Diagnostic Biosystems) разводили согласно инструкции. Препараты инкубировали в течение 30 минут во влажной камере. При определении HER-2 в каждой серии ставили позитивный и негативный контроль. Для негативного контроля использовалась иммуноглобулиновая фракция нормальной кроличьей сыворотки, для позитивного контроля использовали стекло фирмы-производителя (набор HercepTest), на котором представлены клетки РМЖ с уровнем экспрессии HER-2 «0», «1+» и «3+».

Для определения экспрессии рецепторов гормонов использовалась система подсчета баллов по системе Оллреда. Подсчитывали процент окрашенных клеток (proportional score, PS) и интенсивность окрашивания ядер (intensity score, IS). Общее заключение давалось на основании подсчета общего балла (total score, TC), который рассчитывался как сумма IS и PS (таблица 3).

Таблица 3

Балльная шкала оценки экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона

Интенсивность окрашивания – баллы IS	
Отсутствие окрашивания	0
Окрашивание слабой интенсивности	1
Окрашивание умеренной интенсивности	2
Окрашивание сильной интенсивности	3
Количество окрашенных ядер опухолевых клеток – баллы PS	
Отсутствие окрашивания	0
0 – 1 %	1
2 – 10 %	2
11 – 33 %	3
34 – 66 %	4
67 – 100 %	5

Определение общего балла TS = IS + PS	
Интерпретация результатов	
0 – 2 балла	Негативный результат
3 – 8 баллов	Позитивный результат

Маркер пролиферативной активности Ki-67 подсчитывали в процентах. Для подсчета выбирали участки препарата, где процент окрашенных клеток был наибольшим. Минимальное число клеток для подсчета 300. Пороговое значение принято равным 20%.

Результат тестирования HER-2 оценивался в соответствии с рекомендациями ASCO/CAP [Wolff A.C. et al., 2013] для ИГХ исследования следующим образом: выраженное полное кольцевое мембранное окрашивание более 10% опухолевых клеток расценивалось как «3+», неполное кольцевое окрашивание слабой или умеренной интенсивности более 10% клеток опухоли или полное кольцевое мембранное окрашивание сильной интенсивности менее 10% опухолевых клеток – «2+», неполное едва заметное мембранное окрашивание более 10% опухолевых клеток – «1+», отсутствие окрашивания или едва заметное окрашивание менее 10% опухолевых клеток – «0». Образцы опухоли с результатом «0» или «1+» считаются негативными, «2+» - неопределенными, и «3+» - позитивными. В случае неопределенной экспрессии HER-2 по результатам ИГХ, для выявления амплификации гена HER-2 рекомендуется выполнять FISH-исследование.

ГЛАВА III

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Результаты цитогистологических сопоставлений и оценка эффективности цитологического исследования

В период с 2009 по 2013 гг. было выполнено 4091 цитологическое исследование у 3415 пациентов с новообразованиями молочной железы. У 1214 (35,6%) обследованных установлен диагноз злокачественной опухоли, у 203 (6%) высказано подозрение на рак, у 1483 (43,4%) выявлен доброкачественный процесс и у 515 (15%) получен неинформативный материал.

У 1434 (42%) больных результат цитологического исследования был сопоставлен с данными гистологического исследования. Злокачественные процессы при окончательном гистологическом исследовании выявлены у 1165 (81,3%) из 1434 пациентов, доброкачественные процессы - у 269 (18,7%). При цитологическом исследовании у 898 (62,6%) пациентов диагностирован рак, у 145 (10,1%) – высказано подозрение на рак, у 196 (13,7%) выявлены доброкачественные процессы, у 194 (13,5%) получен неинформативный материал. Сопоставление данных цитологического и гистологического исследований представлено в таблице 4.

Таблица 4

Сопоставление данных цитологического и гистологического исследований новообразований молочной железы

Цитологический диагноз	Количество наблюдений	Гистологический диагноз	
		Рак	Доброкачественный процесс
Рак	898	885 (ИП)	13 (ЛП)
Подозрение на рак	145	122	23

Доброкачественный процесс	196	8 (ЛО)	188 (ИО)
Неинформативный материал	194	150	45
Всего	1434	1165	269

Примечание: ИП – истинно положительное в отношении рака цитологическое заключение, ИО – истинно отрицательное заключение, ЛП – ложноположительное заключение, ЛО – ложноотрицательное заключение.

Как видно из таблицы 4, у 1007 (86,4%) из 1165 больных, у которых гистологически было подтверждено наличие рака, он был выявлен (885, 76%) или заподозрен (122, 10%). Ложноотрицательные в отношении рака цитологические заключения даны в 8 (0,7%) случаях. Неинформативный материал при РМЖ получен у 150 больных (12,8%).

Правильные отрицательные в отношении рака цитологические заключения даны у 188 (70%) из 269 больных. У 13 (4,8%) пациентов были даны ложноположительные в отношении рака заключения, и у 23 (8,5%) цитологическое подозрение на рак впоследствии не подтвердилось.

Полученные данные позволили рассчитать основные показатели эффективности цитологического исследования. Результаты этих расчетов, произведенных по общепринятым формулам, без учета подозрительных заключений и неинформативного материала, приведены в таблице 5.

Таблица 5

Результаты цитологической диагностики опухолей молочной железы

Показатель	Результат	Формула расчета
Чувствительность	99,1%	$(ИП/ИП+ЛО) \times 100$
Специфичность	93,5%	$(ИО/ИО+ЛП) \times 100$
Предсказательное значение положительного теста	98,5%	$(ИП/ИП+ЛП) \times 100$
Предсказательное значение отрицательного теста	95,9%	$(ИО/ИО+ЛО) \times 100$
Точность	98%	$(ИП+ЛО/ИП+ИО+ЛП+ЛО) \times 100$

3.2. Анализ неопределенных и ошибочных цитологических заключений

При проведении цитогистологических сопоставлений и ретроспективном пересмотре препаратов были выявлены основные причины ошибочных заключений и проанализированы цитологические особенности материала, послужившие причиной ошибки. Наиболее частой причиной ложноотрицательного цитологического заключения при РМЖ является малоинформативный материал. Из 1165 пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом РМЖ неинформативный цитологический материал получен у 150 (12,9%), тогда как ошибочное отрицательное в отношении рака заключение дано в 8 (0,7%) наблюдениях. При пересмотре 122 случаев, в которых высказано подозрение на злокачественный характер процесса, было выявлено, что причиной неопределенного диагноза в 92 (75,4%) случаях также был малоинформативный материал, когда в пунктате присутствовало недостаточное количество опухолевых клеток для установления диагноза, и только в 30 (24,6%) случаях имела место недооценка признаков клеточной атипии.

Ложноотрицательные заключения даны в 8 наблюдениях. При гистологическом исследовании в 3 случаях выявлен ИПР, при цитологическом исследовании предполагалось наличие в мазках пролиферирующего эпителия молочной железы. В 1 наблюдении гистологически диагностирован внутрикистозный папиллярный рак (цитологически отмечена лишь пролиферация эпителия), в 2-х других – протоковый неинвазивный и микроинвазивный протоковый рак (цитологически в обоих случаях предполагалось наличие внутрипротоковой папилломы). У двух пациенток при гистологическом исследовании диагностирован слизистый рак (цитологически у одной пациентки диагностирована фиброаденома, у второй пациентки отмечена пролиферация эпителия). При гистологическом исследовании 30 случаев, в которых имела место недооценка степени клеточной атипии и высказано подозрение о

наличии РМЖ, у большинства пациентов (25) выявлен ИПР, в том числе у двух пациенток – смешанная карцинома (ИПР в сочетании со слизистым раком), у двух – инвазивный папиллярный рак. Был выявлен 1 случай криброформного рака и один случай протоковой карциномы *in situ*. У двух пациенток диагностированы неэпителиальные опухоли (злокачественная филоидная опухоль и злокачественная опухоль из оболочек периферических нервов).

Был произведен анализ всех ошибочных и неопределенных заключений. У двух пациенток с гистологическим диагнозом слизистого рака при цитологическом исследовании не удалось верифицировать злокачественный процесс. У одной пациентки цитологически предполагалось наличие фиброаденомы. При ретроспективном пересмотре препаратов в мазках выявлена выраженная пролиферация клеток эпителия железы. Клетки мноморфные, мелкого размера, расположены в небольших скоплениях и пластах. Ядра преимущественно округлой формы, ядерный полиморфизм выражен слабо, в единичных клетках видны мелкие ядрышки. Фон препарата представлен обильными слизистыми массами с включениями капилляров (рис. 1, 2). В данном случае цитологическое заключение о наличии фиброаденомы было обусловлено низкой степенью клеточной и ядерной атипии, хотя выраженный слизистый фон препарата, обилие материала и отсутствие в мазках элементов стромы и миоэпителиальных клеток, характерных для фиброаденомы, были недооценены, что привело к гиподиагностике рака. У второй пациентки при цитологическом исследовании отмечена лишь пролиферация протокового эпителия. При ретроспективном пересмотре в мазках обнаружен пролиферирующий эпителий железы в виде компактных плотных пластов, состоящих из мелких эпителиальных клеток со слабо выраженными признаками ядерного полиморфизма. Слизь в фоне препарата отсутствовала. В этом случае цитологически установить злокачественный характер процесса не

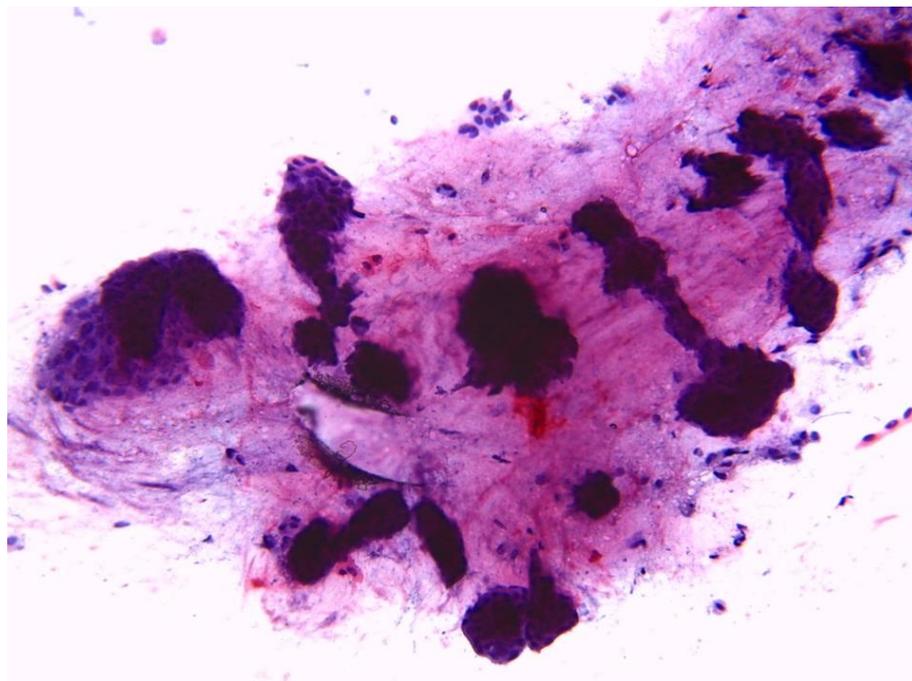


Рисунок 1. Слизистый рак. ТАБ. Цитологический препарат. Окраска гематоксилином и эозином (ГЭ). Ув. Обь.10х.

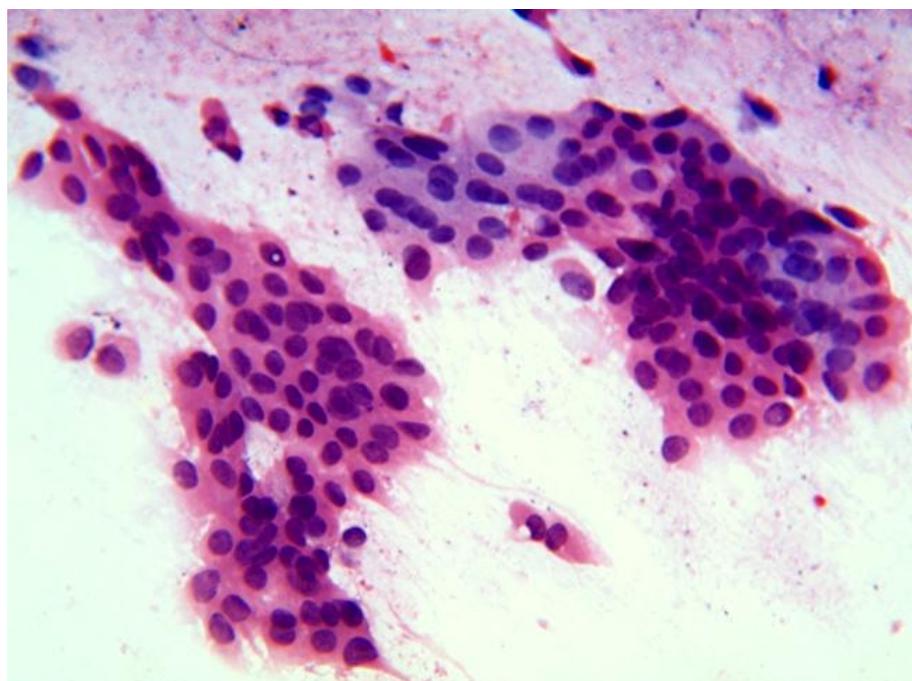


Рисунок 2. Слизистый рак. ТАБ. Цитологический препарат. Окраска ГЭ. Ув. Обь.40х.

представлялось возможным. Необходимо отметить, что в обоих случаях клинически предполагалось наличие фибroadеномы. У двух пациенток при исследовании мазков-отпечатков выделений из соска цитологически предполагалось наличие внутрипротоковой папилломы. При гистологическом исследовании в одном случае выявлена протоковая карцинома *in situ*, в другом – микроинвазивный рак. В обоих случаях клинически также предполагалось наличие доброкачественного процесса (ВПД). При пересмотре цитологических препаратов при протоковой карциноме *in situ* на фоне элементов крови и многочисленных рассеянных по препарату макрофагов с гранулами гемосидерина в цитоплазме обнаружены пролиферирующие клетки эпителия железы в виде пластов и папиллярных структур. Отмечается нарушение упорядоченности расположения клеток в структурах, наложение клеток друг на друга. В клетках выявлены слабые признаки полиморфизма, отмечено незначительное укрупнение ядер, слабовыраженная гиперхромия. (рис. 3).



Рисунок 3. Протоковая карцинома *in situ*. Цитологический препарат. Мазок-отпечаток выделений из соска. Окраска ГЭ. Ув. Обь.40х.

Дифференциальная диагностика между злокачественным процессом и внутрипротоковой папилломой в данном случае вызвала значительные затруднения. Признаками, указывающими на злокачественный характер процесса, являются отсутствие в мазках миоэпителиальных клеток, а также очагов апокринной и плоскоклеточной метаплазии, характерных для внутрипротоковой папилломы.

У пациентки с гистологически выявленным микроинвазивным раком при пересмотре цитологических препаратов на фоне элементов крови обнаружены мелкие эпителиальные клетки, расположенные в небольших группах и разрозненно. В клетках отмечены признаки атипии, не учтенные при первоначальном цитологическом исследовании.

В ходе цитогистологических сопоставлений выявлен 1 случай гиподиагностики внутрикистозного папиллярного рака. В цитологических препаратах при первоначальном исследовании дано заключение о наличии пролиферации эпителия железы без убедительных признаков злокачественности. При пересмотре цитологического материала в мазках выявлены немногочисленные клетки эпителия мелкого размера с небольшими ядрами, умеренным ядерным полиморфизмом и слабовыраженной ядерной гиперхромией. Клетки расположены в небольших группах и разрозненно. Выявлено большое количество диссоциированных клеток с интактной цитоплазмой, среди которых встречаются клетки веретеновидной и овальной формы, возможно, миоэпителиальные (рис. 4). В данном случае причиной ложноотрицательного заключения была недооценка степени клеточной атипии, хотя присутствие миоэпителиальных клеток, низкая клеточность препарата и многочисленные гистиоциты в фоне препарата, характерные для доброкачественных внутрипротоковых папиллом, вызвали затруднения в дифференциальной диагностике.

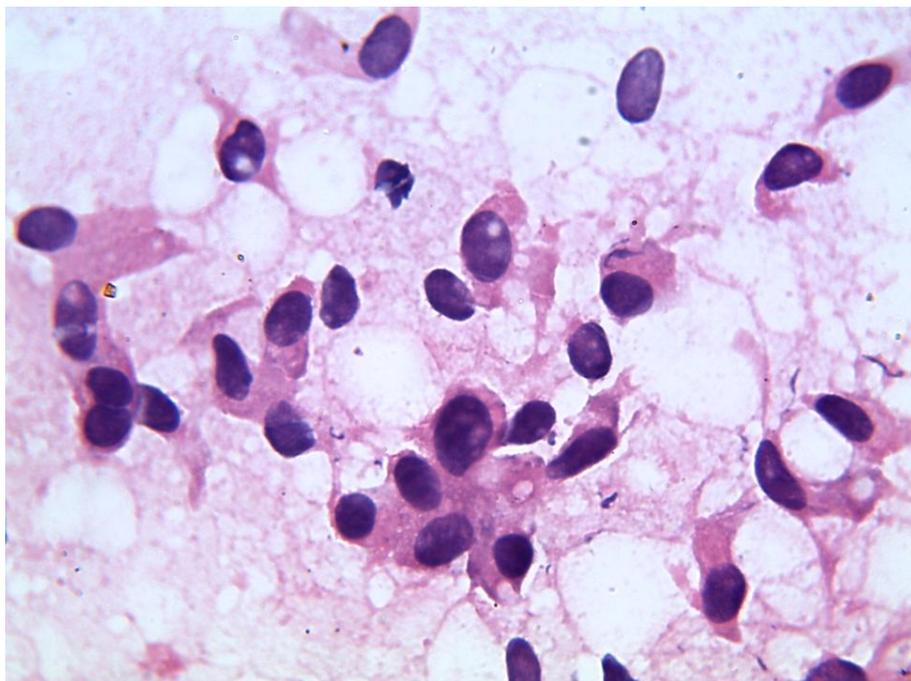


Рисунок 4. Внутрикистозный папиллярный рак. ТАБ. Цитологический препарат. Окраска ГЭ. Ув. Обь.100х.

У трех пациенток при окончательном гистологическом исследовании выявлен ИПР. У одной пациентки при первоначальном цитологическом исследовании выявить убедительные признаки злокачественного процесса не удалось. При пересмотре препаратов обнаружены многочисленные пласты пролиферирующих эпителиальных клеток со слабополиморфными ядрами. Часть пластов имеет структуру «пчелиных сот». Отмечено нарушение упорядоченности расположения клеток в пластах, умеренная ядерная гиперхромия. Структура хроматина равномерная, ядрышки отсутствуют, митозы не обнаружены (рис. 5). В фоне препарата – фрагменты стромы и голые ядра, характерные для цитологической картины фиброаденомы.

В двух других случаях в мазках при ретроспективном просмотре обнаружены опухолевые клетки с признаками злокачественности, которые были недооценены при первичном цитологическом исследовании.

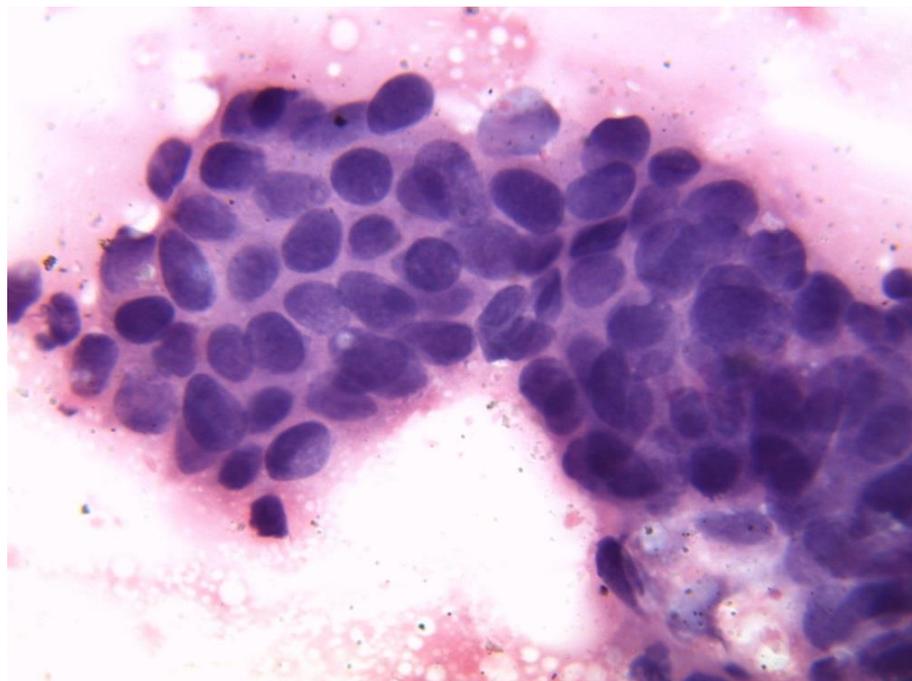


Рисунок 5. Инвазивный протоковый рак. ТАБ. Цитологический препарат. Окраска ГЭ. Ув. Обь.100х

Ложноположительные заключения были даны в 13 наблюдениях. Причиной ошибочных положительных в отношении рака ответов чаще всего является выраженная пролиферация клеток протокового эпителия, в ряде случаев с признаками клеточной атипии. При гистологическом исследовании в 4 случаях выявлена гиперплазия протокового эпителия, в том числе атипическая у 2 пациентов, в 3 случаях выявлена фибroadенома, в 2 - внутрипротоковая папиллома. В остальных 4 наблюдениях были выявлены: склерозирующий аденоз, кистозный фибroadеноматоз, липогранулема и киста с хроническим воспалением. В 23 случаях цитологически высказано подозрение на рак, которое не подтвердилось впоследствии при гистологическом исследовании. При пересмотре препаратов выявлено, что в этих случаях имела место переоценка степени клеточной атипии. При гистологическом исследовании у большинства пациентов выявлены фибroadеномы (10 случаев) и цистаденопапилломы (6 случаев). В двух наблюдениях при гистологическом исследовании выявлены фокусы

атипической протоковой гиперплазии, у одной пациентки – фокусы склерозирующего аденоза. У остальных пациентов выявлена пролиферация эпителия железы с участками простой гиперплазии, метаплазии и апокринизации протокового эпителия.

Все случаи ложноположительных заключений были также подвергнуты ретроспективной оценке. У трех пациенток гистологически установлен диагноз фиброаденомы. При пересмотре цитологических препаратов отмечена выраженная пролиферация эпителия, с укрупнением клеток и наложением их друг на друга, укрупнением ядер и их слабым или умеренным полиморфизмом. Во всех случаях упорядоченные обширные пласты в виде «пчелиных сот» и «рогов оленя» отсутствовали, а клетки эпителия располагались группами, небольшими пластами и скоплениями, при этом отмечено большое количество диссоциированных клеток с сохранившейся цитоплазмой (рис. 6).

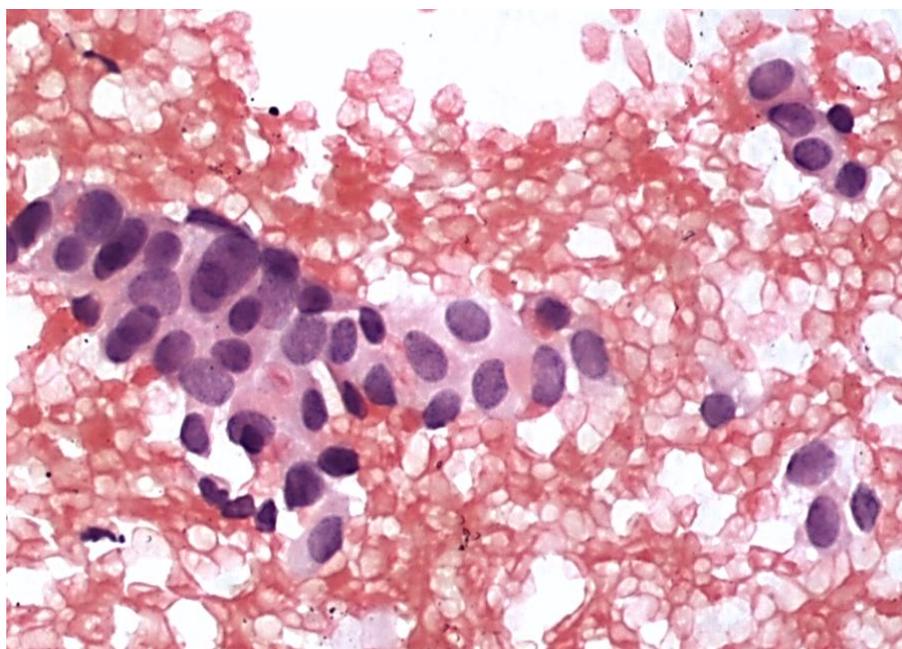


Рисунок 6. Фиброаденома. ТАБ. Цитологический препарат. Окраска ГЭ. Ув. Обь. 40х.

У двух пациенток с цитологическим заключением о наличии РМЖ при гистологическом исследовании операционного материала выявлены внутрипротоковые папилломы. При пересмотре цитологических препаратов на фоне элементов крови обнаружены многочисленные пролиферирующие пласты и папиллярные структуры из мелких клеток эпителия железы с беспорядочным расположением ядер, наложением их друг на друга, умеренным ядерным полиморфизмом. В отдельных ядрах выявлена фрагментация и неравномерное распределение хроматина (рис.7).

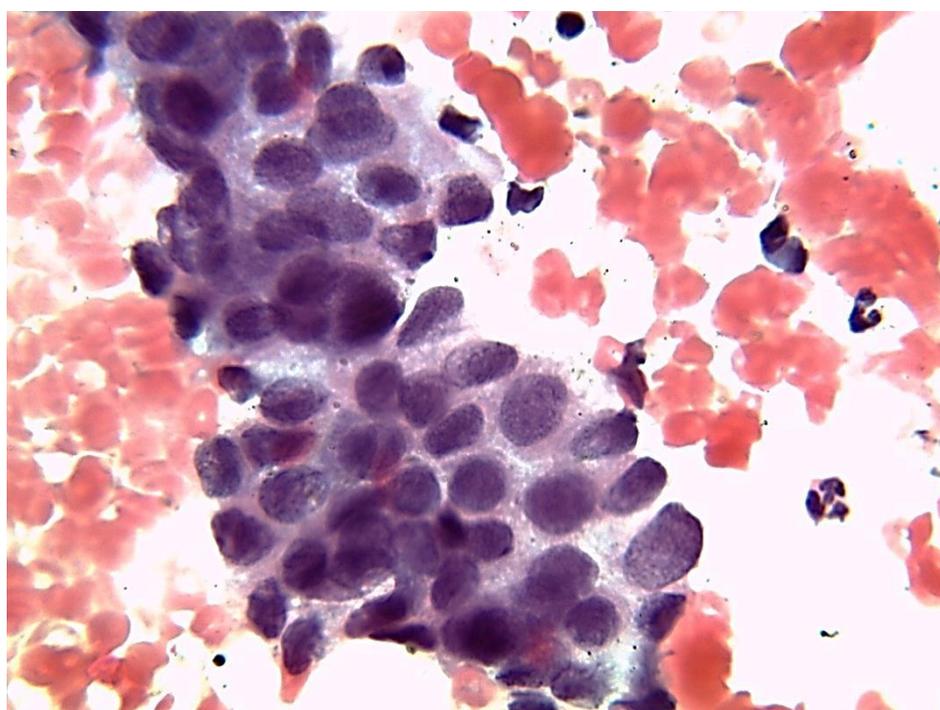


Рисунок 7. ВПП. Цитологический препарат. Окраска Г-Э. Ув.100х

Высокая клеточность препарата, отсутствие миоэпителиальных клеток в фоне, а также признаки ядерной атипичности послужили причиной ошибочного заключения о наличии рака.

В 2 случаях при гистологическом исследовании выявлена простая гиперплазия протокового эпителия, в 2 случаях – атипичная. При пересмотре цитологических препаратов при простой протоковой гиперплазии отмечены признаки пролиферации эпителия со слабым ядерным

полиморфизмом. При атипической протоковой гиперплазии в мазках выявлены пласты и скопления клеток эпителия железы с нарушением упорядоченности расположения клеток в пластах, наложением их друг на друга, клеточным и ядерным полиморфизмом умеренной степени. В некоторых ядрах выявлены неровные контуры ядерной мембраны и неравномерная структура хроматина (рис.8).

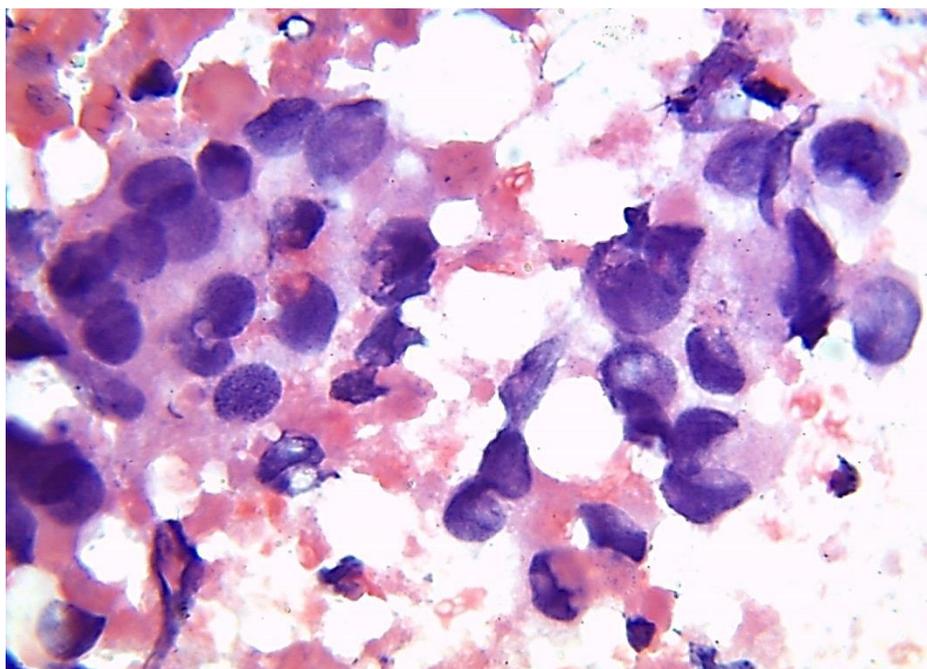


Рисунок 8. Атипическая гиперплазия протокового эпителия. ТАБ. Цитологический препарат. Окраска ГЭ. Ув. Обь.100х.

Диагноз атипической протоковой гиперплазии по цитологическому материалу установить крайне сложно, поскольку цитологическая картина характеризуется одновременным присутствием признаков, характерных как для злокачественных, так и для доброкачественных процессов. В данном случае в пользу злокачественного характера процесса свидетельствовали высокая клеточность препарата, структурная атипия, признаки ядерного полиморфизма. При пересмотре препаратов удалось обнаружить в фоне

единичные клетки с биполярными ядрами (наиболее вероятно, миоэпителиальные), характерные для доброкачественных процессов.

В цитологических препаратах при кистозном фиброаденоматозе были выявлены пласты пролиферирующего эпителия железы без признаков атипии. Ошибочное цитологическое заключение о наличии рака в этом случае дано из-за низкого качества окраски препарата, вследствие чего имела место переоценка признаков клеточной атипии.

Ложноположительное цитологическое заключение при липогранулеме было обусловлено наличием в препарате клеток эпителия протоков с выраженными дегенеративными изменениями. Расположение клеток небольшими группами с нарушением упорядоченности, большое количество изолированно расположенных клеток и некротический фон препарата также способствовали ошибочному заключению о наличии рака.

При ретроспективном пересмотре цитологических препаратов, полученных при пункции кисты, выявлены участки выраженной пролиферации эпителия железы с участками атипии – укрупнением ядер, их полиморфизмом, грубой структурой хроматина (рис.9). При пересмотре гистологических препаратов обнаружены участки атипической протоковой гиперплазии, не выявленные при первичном гистологическом исследовании (рис.10).

При пересмотре цитологических препаратов в случае, расцененном гистологически как склерозирующий аденоз, в мазках обнаружены группы клеток эпителия протоков с выраженной пролиферацией, нарушением упорядоченности расположения клеток в пластах, клеточным и ядерным полиморфизмом (рис.11).

При пересмотре гистологических препаратов, наряду с участками склерозирующего аденоза, выявлены участки атипической гиперплазии протокового эпителия (рис.12).

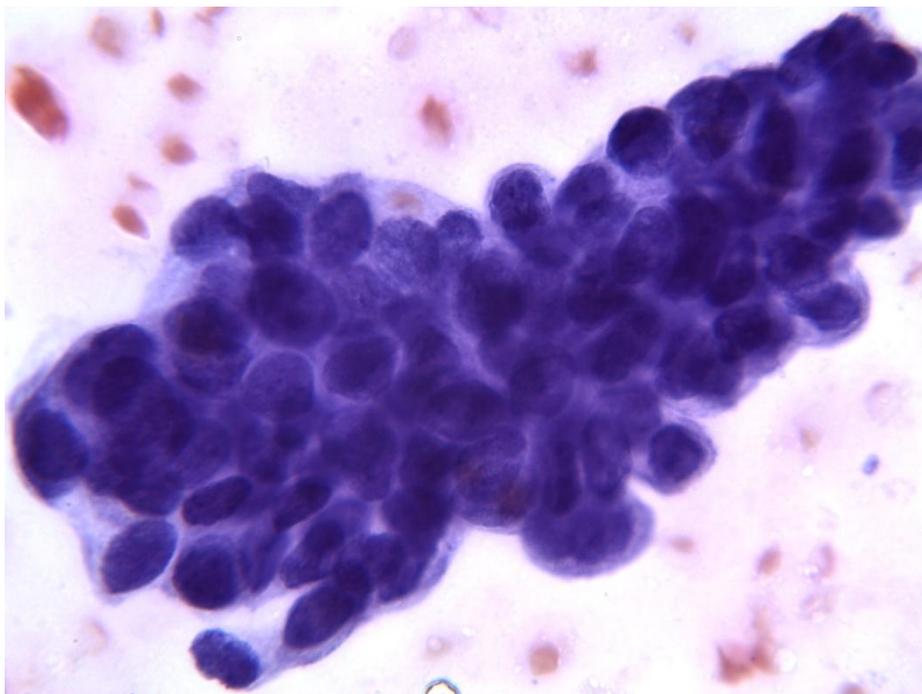


Рисунок 9. Окончательный морфологический диагноз – атипичная гиперплазия протокового эпителия. ТАБ. Цитологический препарат. Окраска ГЭ. Ув. Обь.100х

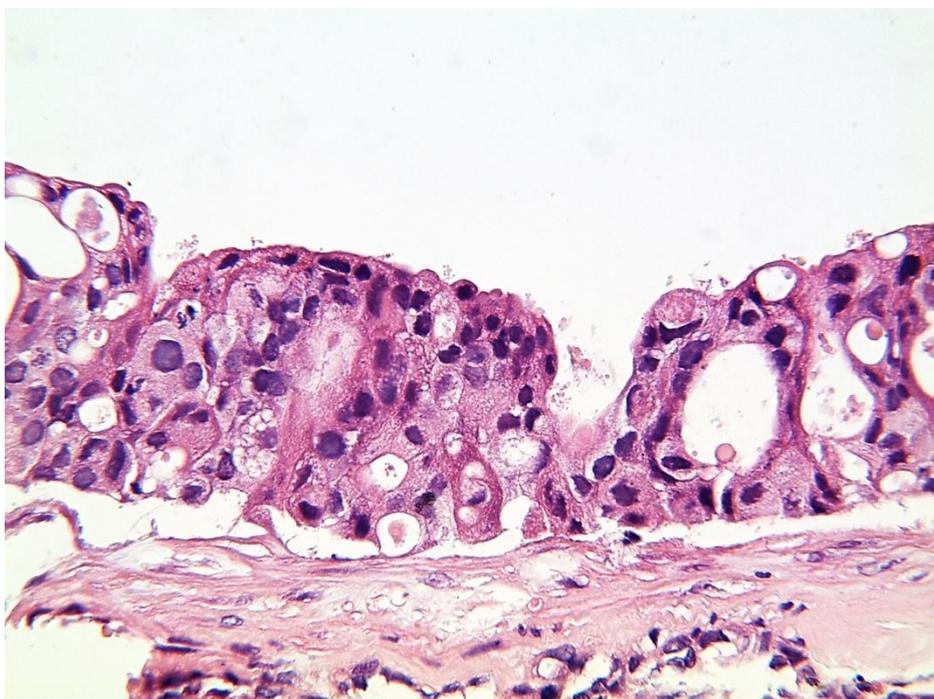


Рисунок 10. Окончательный морфологический диагноз – атипичная гиперплазия протокового эпителия. Гистологический препарат операционного материала. Окраска ГЭ. Ув. Обь.40х.

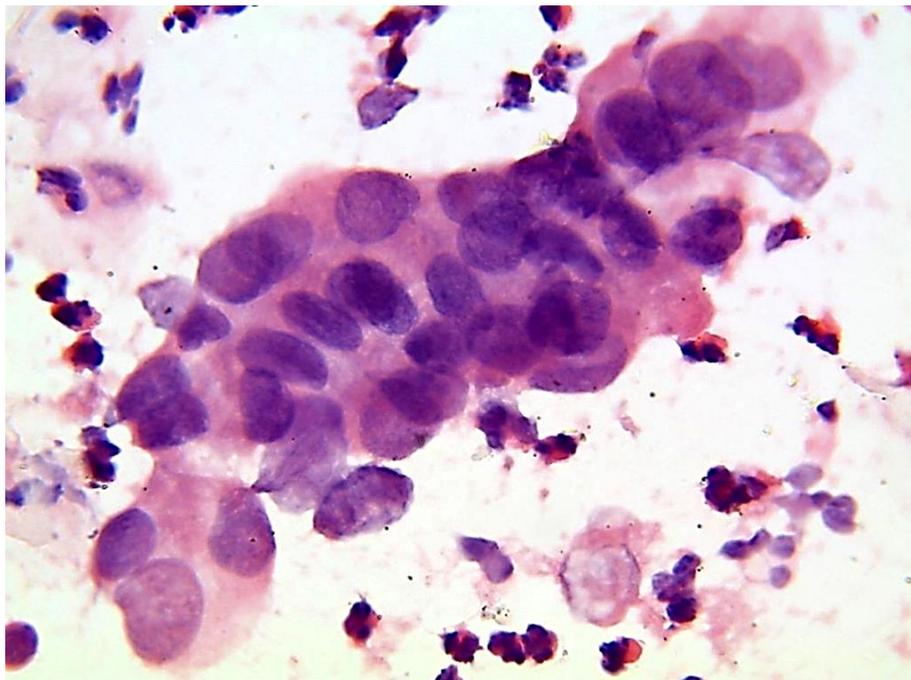


Рисунок 11. Склерозирующий аденоз. ТАБ. Цитологический препарат. Окраска ГЭ. Ув. Обь.100х

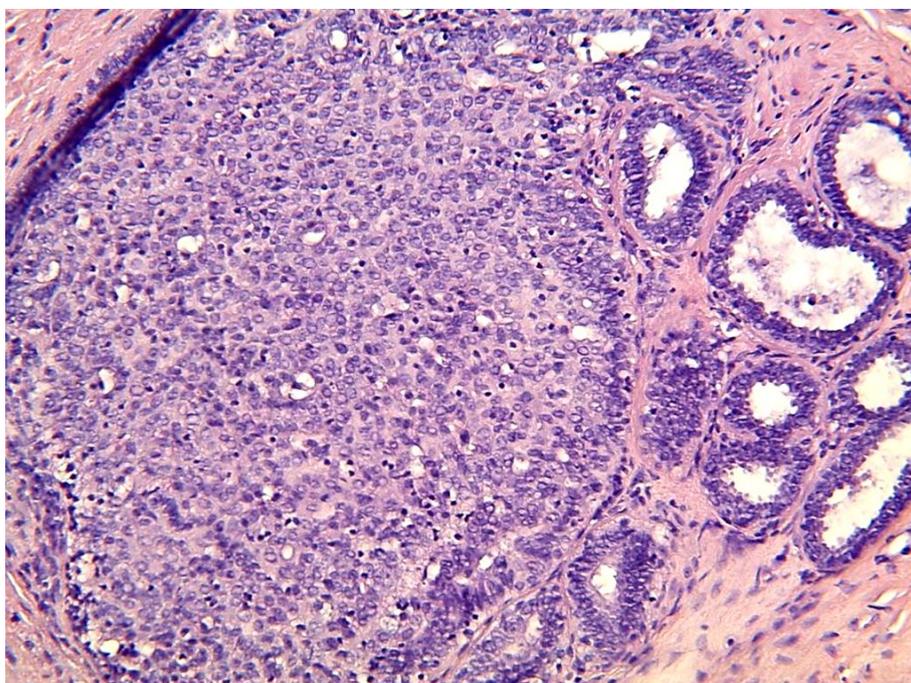


Рисунок 12. Окончательный морфологический диагноз – атипичная гиперплазия протокового эпителия. Гистологический препарат операционного материала. Окраска ГЭ. Ув. Обь 20х

Таким образом, причинами ложноотрицательных в отношении рака цитологических заключений является чаще всего получение неинформативного материала. Меньший процент ошибок связан с объективными сложностями диагностики процессов, при которых признаки клеточной атипии выражены минимально. По нашим данным наиболее частыми процессами, приводящими к гиподиагностике рака, являются протоковый рак (5 случаев из 8, причем в двух наблюдениях – неинвазивная и микроинвазивная формы) и слизистый рак (2 случая). Минимальное число ошибочных заключений обусловлено недооценкой степени атипии клеток вследствие недостаточной подготовленности специалиста, проводящего анализ.

Наиболее часто причиной ложноположительных заключений является гиперплазия протокового эпителия. Из 13 ложноположительных заключений атипическая гиперплазия эпителия выявлена в 4 случаях, простая протоковая гиперплазия – в двух. Второй по частоте нозологической формой, приводящая к гипердиагностике рака, является фиброаденома. В нашем исследовании фиброаденома была диагностирована у 3 из 13 пациентов с ложноположительным цитологическим диагнозом. Затем следует внутрипротоковая папиллома (2 случая). Остальные процессы реже приводят к ошибкам диагностики. Большинство ошибок при перечисленных процессах обусловлено присутствием в мазках выраженной эпителиальной пролиферации с участками клеточной и ядерной атипии. Ошибки, обусловленные переоценкой степени атипии вследствие недостаточного опыта врача-цитолога или низкого качества материала также имеют место, и во многих случаях причиной ложноположительных и ложноподозрительных заключений является малоинформативный материал.

3.3. Результаты денситоморфометрических измерений ядер клеток при доброкачественных процессах и раке молочной железы

Для объективизации цитологической диагностики были проведены денситоморфометрические измерения параметров ядер клеток у 47 пациентов. При формировании групп наблюдений мы включили 13 случаев расхождения цитологического и гистологического диагнозов. В 3-х из них были даны ложноотрицательные цитологические заключения: в одном при гистологическом исследовании диагностирована высокодифференцированная протоковая карцинома *in situ*, во втором – внутрипротоковый папиллярный рак, в третьем – инвазивный дольковый рак. В 10 случаях имели место ложноположительные в отношении рака цитологические заключения. В 1 из них установлен диагноз фиброаденомы, в 2 – внутрипротоковой папилломы, в 7 – атипической протоковой гиперплазии эпителия. Всего было сформировано 12 групп наблюдения с различными доброкачественными и злокачественными заболеваниями молочной железы – АПГ (8 пациентов), ВДПКИС (3), УНДПКИС (5), ДКИС (5), ИДР (4), ИПР G1 (3), ИПР G2 (4), ИПР G3 (3), ВПП (2), ВППР (2), ИПК (3). Группу доброкачественных опухолей составили пациенты с окончательным морфологическим диагнозом фиброаденома (4) и фиброаденоматоз (1). Всего было измерено 5077 ядер (таблица 6).

В каждой группе проводились измерения следующих параметров ядер клеток - площадь ядра, периметр, максимальный и минимальный диаметры, оптическая плотность окраски, интегральная оптическая плотность. Данные морфо-денситометрических измерений представлены в таблице 7.

Как видно из таблицы 7, наименьшие морфометрические показатели и интегральная оптическая плотность отмечены при доброкачественных опухолях, хотя оптическая плотность окраски достаточно высокая.

Таблица 6

Количество обследованных пациентов и измеренных ядер в различных группах наблюдений.

Окончательный морфологический диагноз	Количество пациентов	Количество измеренных ядер
Доброкачественные опухоли (ДО)	5	548
Атипическая протоковая гиперплазия (АПГ)	8	730
Высокодифференцированная протоковая карцинома in situ (ВДКИС)	3	330
Умеренно- и низкодифференцированная протоковая карцинома in situ (УНДКИС)	5	542
Дольковая карцинома in situ (ДКИС)	5	598
Инвазивный дольковый рак (ИДР)	4	408
Высокодифференцированный протоковый рак (ИПР G1)	3	321
Умереннодифференцированный протоковый рак (ИПР G2)	4	448
Низкодифференцированный протоковый рак (ИПР G3)	3	313
Внутрипротоковая папиллома (ВПП)	2	259
Внутрипротоковый папиллярный рак (ВППР)	2	196
Инвазивная папиллярная карцинома (ИПК)	3	384
ВСЕГО	47	5077

Таблица 7

Данные морфо-денситометрических измерений в различных группах наблюдений ($M \pm m$)

Группы наблюдений	Площадь (мкм ²)	Периметр (мкм)	Д. макс. (мкм)	Д. мин. (мкм)	ОП (отн. ед.)	ИОП (усл. ед.)
ДО	45,34 +/- 1,47	24,27 +/- 0,38	8,85 +/- 0,14	6,65 +/- 0,12	0,27 +/- 0,004	1044,26 +/- 26,23
АПГ	95,67 +/- 2,66	35,79 +/- 0,50	12,77 +/- 0,18	9,76 +/- 0,15	0,235 +/- 0,004	1947,62 +/- 58,77
ВДПКИС	71,59 +/- 1,99	31,25 +/- 0,47	11,15 +/- 0,18	8,62 +/- 0,14	0,218 +/- 0,003	1360,99 +/- 32,72
УНДПКИС	151,68 +/- 4,35	44,88 +/- 0,63	15,97 +/- 0,24	12,30 +/- 0,20	0,262 +/- 0,003	3430,86 +/- 91,08
ДКИС	73,68 +/- 2,8	31,59 +/- 0,64	11,24 +/- 0,24	8,73 +/- 0,19	0,233 +/- 0,004	1474,49 58,03
ИДР	77,51 +/- 2,35	32,00 +/- 0,45	11,57 +/- 0,17	8,74 +/- 0,16	0,21 +/- 0,005	1427,85 +/- 42,26
ПР G1	52,60 +/- 1,74	26,84 +/- 0,72	9,80 +/- 0,32	7,19 +/- 0,14	0,27 +/- 0,003	1276,4 +/- 37,30
ПР G2	80,79 +/- 3,024	32,76 +/- 0,61	11,92 +/- 0,22	8,80 +/- 0,18	0,23 +/- 0,004	1580,83 +/- 43,71
ПР G3	104,72 +/- 5,62	37,09 +/- 0,95	13,31 +/- 0,34	10,09 +/- 0,27	0,26 +/- 0,004	2458,61 +/- 140,97
ВПП	58,13 +/- 2,26	28,48 +/- 0,58	10,58 +/- 0,21	7,34 +/- 0,18	0,261 +/- 0,004	1317,24 +/- 45,53
ВППР	48,84 +/- 2,33	26,33 +/- 0,69	9,80 +/- 0,29	6,67 +/- 0,19	0,249 +/- 0,005	1059,93 +/- 48,98
ИПК	73,53 2,04	31,63 +/- 0,49	11,35 +/- 0,21	8,68 +/- 0,14	0,200 +/- 0,004	1260,82 +/- 31,46

Среди предопухолевых заболеваний и ранних форм рака наиболее высокие морфометрические и денситометрические показатели ядер клеток отмечены при УНДПКИС по сравнению с АПГ и при АПГ по сравнению с ВДПКИС ($p < 0,05$). При АПГ все параметры имели значительно более высокие показатели по сравнению с ДКИС, за исключением ОП ($p > 0,05$). Не

отмечено существенных различий морфометрических показателей ядер атипических клеток при ДКИС и ВДПКИС, однако денситометрические параметры (ОП и ИОП) были более высокими при ДКИС по сравнению с ВДПКИС ($p < 0,05$). Сравнение ядерных параметров при ДКИС и ИДР не выявило статистически значимых различий между ними ($p > 0,05$), за исключением максимального диаметра ядер и оптической плотности. Однако при сравнении морфометрических и денситометрических показателей ядер ВДПКИС и УНДПКИС с соответствующими показателями при инвазивных протоковых раках соответствующей степени дифференцировки (ВДПКИС против ИПР G1 и УНДПКИС против ИПР G2 и G3) оказалось, что при инвазивных формах рака эти показатели имеют значительно меньшие значения, чем при внутрипротоковых (карциноме *in situ*). При сравнении морфометрических и денситометрических показателей ядер (за исключением ОП) в группе инвазивных протоковых раков установлены значительно более высокие показатели при низкокодифференцированном раке (G3) по сравнению с умереннокодифференцированным (G2) раком и последнего с высококодифференцированным (G1) раком.

В группе папиллярных опухолей молочной железы при ВПП все морфометрические и денситометрические показатели ядер имели меньшие значения, чем при ИПК, но большие значения, чем при ВППР ($p < 0,05$). Небольшое количество наблюдений в этих группах требует проведения дальнейших исследований.

Полученные результаты, возможно, отражают определенные закономерности морфогенеза при развитии и прогрессировании злокачественного процесса при различных гистологических формах рака молочной железы. Выявленные закономерности, в совокупности с другими цитоморфологическими данными, могут учитываться при проведении дифференциальной цитоморфологической диагностики. Из таблицы 7 видно, что в случаях атипической протоковой гиперплазии в мазках имелись довольно крупные, часто гиперхромные ядра, параметры которых были

выше, чем при других формах начального рака молочной железы (за исключением умеренно- и низкодифференцированной протоковой карциномы *in situ*). Возможно, именно это послужило причиной ложноположительных в отношении рака цитологических заключений. Наоборот, слабо выраженные признаки атипии, особенно при высокодифференцированном протоковом раке и внутрипротоковом папиллярном раке, могли быть причиной ложноотрицательных заключений.

Вместе с тем, отмечалась значительная вариабельность ядерных параметров, как между различными группами наблюдений, так и в пределах одной группы. В разных группах наблюдений встречались случаи со сходными морфометрическими параметрами. Эти данные объективно свидетельствуют о трудностях проведения дифференциальной цитоморфологической диагностики в ряде случаев, заставляющих формулировать цитологическое заключение в предположительной форме. Один из таких примеров представлен на рис. 13 и 14, на которых дается сравнение цитологических картин и средних цитометрических данных 2-х наблюдений из группы АПГ и ДКИС. Отмечается сходство атипических клеток в обоих наблюдениях, отсутствует значимое различие в показателях площади ядер, ОП и ИОП ($p > 0,05$), однако стандартное отклонение площади, которое характеризует полиморфизм ядер, значительно выше в случае ДКИС по сравнению с АПГ ($p < 0,0005$).

Эти данные объективно свидетельствуют о трудностях проведения дифференциальной цитоморфологической диагностики в ряде случаев, заставляющих формулировать цитологическое заключение в предположительной форме.

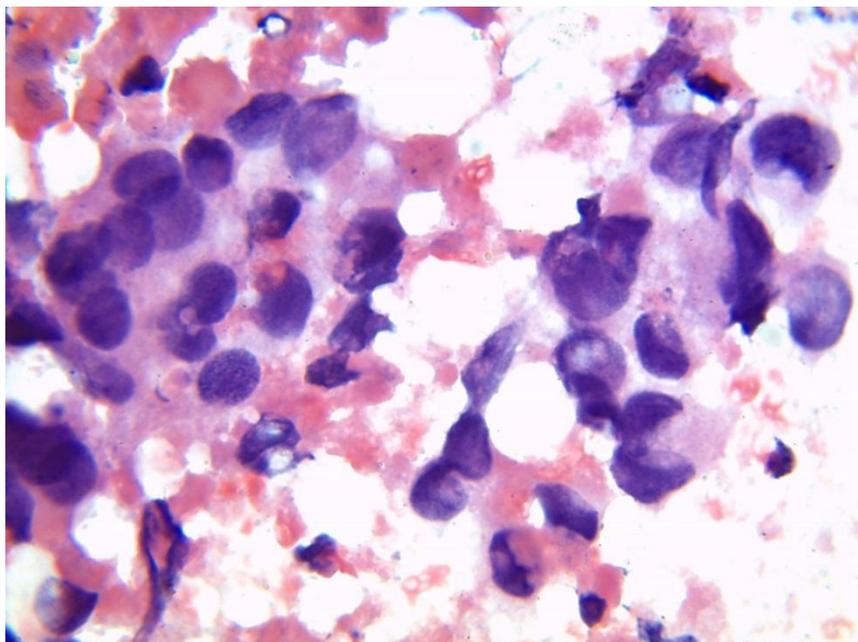


Рис. 13. Цитологическая картина при атипической протоковой гиперплазии. Окраска ГЭ, ув. Обь. 100х. Показатели цитометрии: площадь ядер = 92,22 мкм², ОП = 0,25, ИОП = 2062,05, стандартные отклонения площади ядер = 23,07.

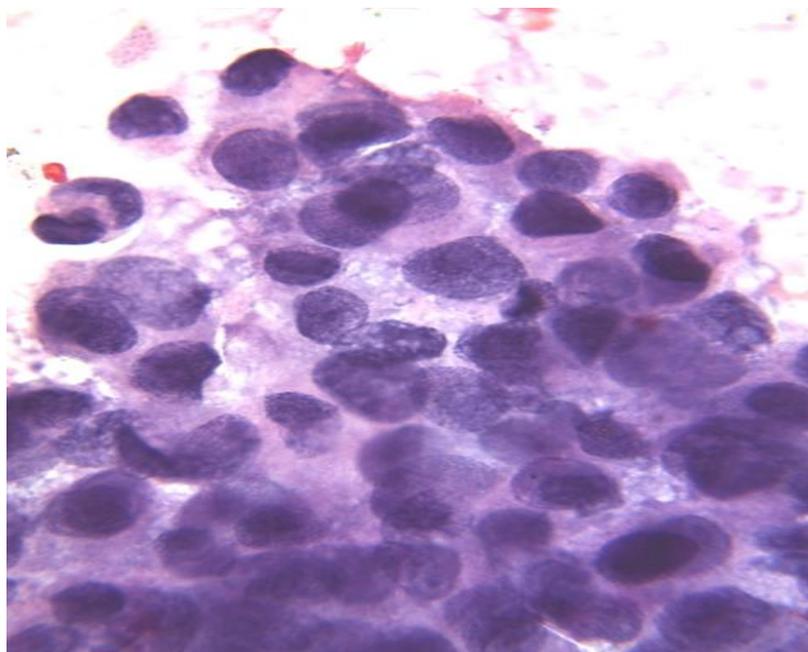


Рис. 14. Цитологическая картина дольковой карциномы in situ. Окр. ГЭ, ув. Обь. 100х. Показатели цитометрии: площадь ядер = 93,22 мкм², ОП = 0,26, ИОП = 2026,54, стандартные отклонения площади = 42,9.

3.4. Результаты цитологического и ИЦХ исследования лимфатических узлов при РМЖ

Проведен ретроспективный анализ результатов цитологических исследований лимфатических узлов у пациенток с гистологически подтвержденным диагнозом РМЖ, выполненных за пятилетний период (с 2009 по 2014 годы). Выполнено 42 исследования материала, полученного при ТАБ. Клинический диагноз метастаз РМЖ был установлен у 34 пациенток, метастаз опухоли неизвестной локализации у 3, лимфопролиферативное заболевание у 1, метастаз меланомы у 1 и лимфаденит неясного генеза у 3 пациенток. Выполнена ТАБ лимфатических узлов подмышечной области у 36 больных, надключичных лимфатических узлов у 3, лимфатических узлов средостения у 2 пациенток. У 37 пациенток из 42 цитологически установлено метастатическое поражение лимфатических узлов, которое во всех случаях подтверждено при гистологическом исследовании. У трех из них цитологически был выявлен метастаз злокачественной опухоли, однако гистогенез установлен неверно (меланома, плазмоцитомы, папиллярный рак щитовидной железы). В 4 случаях (9,5%) материал ТАБ был неинформативным. Случаи ложноположительных и ложноотрицательных заключений отсутствовали. Точность цитологического исследования составила 90,5%. Чувствительность (без учета неинформативного материала) составила 100%.

Результаты сопоставления цитологического заключения с данными гистологического исследования операционного материала представлены в таблице 8.

Таблица 8.

Сопоставление цитологического заключения при ТАБ с данными гистологического исследования операционного материала

Диагноз	Цитологическое заключение	Гистологическое заключение
Метастаз обнаружен	34+3*	41
Метастаз отсутствует	1	1
Неинформативный материал	4	0
Всего	42	42

*Примечание: у 3 пациенток установлено метастатическое поражение лимфатического узла, однако гистогенез установлен неверно

У 42 пациенток выполнено проспективное цитологическое исследование мазков-отпечатков сигнальных лимфатических узлов во время оперативного вмешательства. У 10 из них при плановом гистологическом исследовании выявлены метастазы, в том числе у двух - микрометастазы (размером менее 2 мм). В этих случаях проводилась дополнительная вырезка материала и исследовались серийно-ступенчатые срезы. Цитологически из этих 10 случаев метастазы удалось обнаружить в 5 наблюдениях, при срочном гистологическом исследовании – в 6. При ретроспективном пересмотре цитологических препаратов в 5 наблюдениях, в том числе в 2-х с микрометастазами, опухолевые клетки выявить не удалось. Для их поиска было выполнено иммуноцитохимическое исследование с антителами к эпителиальному антигену (клон Ber-EP4); в 4 случаях окрашивание отсутствовало, в 1 выявлены изолированные окрашенные клетки и единичные комплексы окрашенных клеток. В 1 наблюдении в мазке-отпечатке сигнального лимфатического узла удалось обнаружить изолированные клеточные кластеры РМЖ, в то время как ни при срочном, ни при плановом гистологическом исследовании опухолевые клетки не были выявлены. В этом случае также было проведено иммуноцитохимическое исследование с антителами к эпителиальному антигену (Ber-EP4) и

цитокератину (MNF-116), получено четкое выраженное окрашивание опухолевых клеток (рис.15).

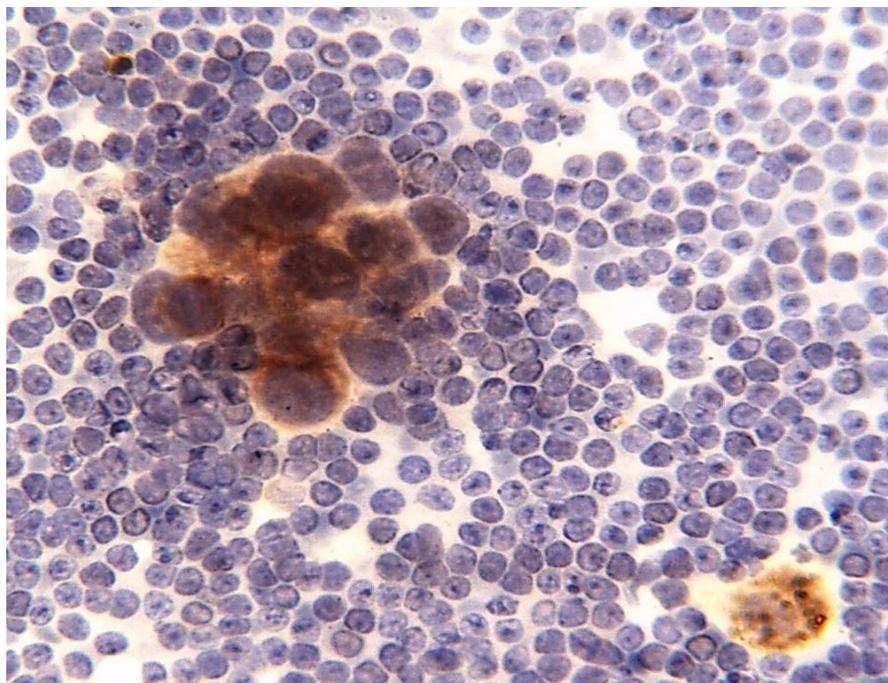


Рисунок 15. Иммуноцитохимическая реакция с эпителиальным антигеном (клон BerEP-4). Ув.Объ.100х.

3.5. Определение молекулярно-генетического подтипа опухоли с помощью ИЦХ исследования

Для выполнения ИЦХ исследований были отобраны 78 пациентов с клиническим диагнозом РМЖ или подозрение на рак. Исследования выполняли на материале, полученном путем соскоба с поверхности опухоли, удаленной во время хирургического вмешательства.

Результаты гистологического исследования операционного материала представлены в таблице 9.

Таблица 9

Результаты гистологического исследования операционного материала

Гистологическое заключение	Количество пациентов
Инвазивный протоковый (неспецифицированный) рак G1	6
Инвазивный протоковый (неспецифицированный) рак G2	26
Инвазивный протоковый (неспецифицированный) рак G3	29
Инвазивный дольковый рак	7
Инвазивный папиллярный рак	1
Муцинозный рак	1
Смешанный рак (ИПР в сочетании со слизистым, папиллярным и т.д.)	6
Отсутствие остаточной опухоли после проведения неоадьювантной химиотерапии	1
Доброкачественный процесс	1
Всего	78

При цитологическом исследовании материала у двух пациенток опухолевые клетки в соскобе отсутствовали. У одной пациентки диагностирован доброкачественный процесс. В 5 случаях опухолевые клетки в цитологических препаратах были выявлены, но их количество было недостаточным для проведения ИЦХ исследования. Примечательно, что у 4 из них при гистологическом исследовании установлен диагноз инвазивного долькового рака. В остальных 70 случаях выполнено ИЦХ исследование (табл.10).

Таблица 10

Результаты цитологического исследования операционного материала

Цитологическое заключение	Количество пациентов
Обнаружены опухолевые клетки рака	70
Единичные опухолевые клетки рака (материала для ИЦХ исследования недостаточно)	5
Опухолевые клетки не обнаружены	2
Доброкачественный процесс	1

В каждом случае оценивали экспрессию рецепторов эстрогена, рецепторов прогестерона, Ki-67 и онкопротеина HER-2. Результат ИЦХ сопоставляли с результатами ИГХ исследования операционного материала.

По результатам ИЦХ исследования, в 57 из 70 случаев экспрессия ER была позитивной, в 13 - негативной. При сравнении ИЦХ и ИГХ экспрессии ER в 63 (90%) случаев результаты совпали (рис.16, 17).

В 7 (10%) наблюдениях наблюдалось расхождение результатов. В 4 случаях по данным ИЦХ экспрессия ER оценена как положительная, тогда как по данным ИГХ экспрессия не выявлена, и в трех случаях результат ИЦХ определения ER отрицательный, а результат ИГХ – положительный. Таким образом, 4 случая расценены как ложнопозитивные, и 3 – как ложнонегативные (таблица 11).

Таблица 11

Результаты ИЦХ и ИГХ определения рецепторов эстрогена.

Результат	Иммуноцитохимическое исследование	Иммуногистохимическое исследование	
		Позитивный	Негативный
Позитивный (3-8 баллов)	57	53	4
Негативный (0-2 баллов)	13	3	10
Всего	70	56	14

При ИЦХ определении экспрессии PR 56 случаев из 70 были положительными, 14 – отрицательными. Совпадение результатов ИЦХ и ИГХ отмечено в 57 (81,5%) наблюдениях (рис.18, 19).

Расхождение результатов наблюдалось в 13 (18,5%) случаях. В 8 случаях результат ИЦХ оказался ложнопозитивным, в 5 случаях - ложнонегативным (таблица 12).

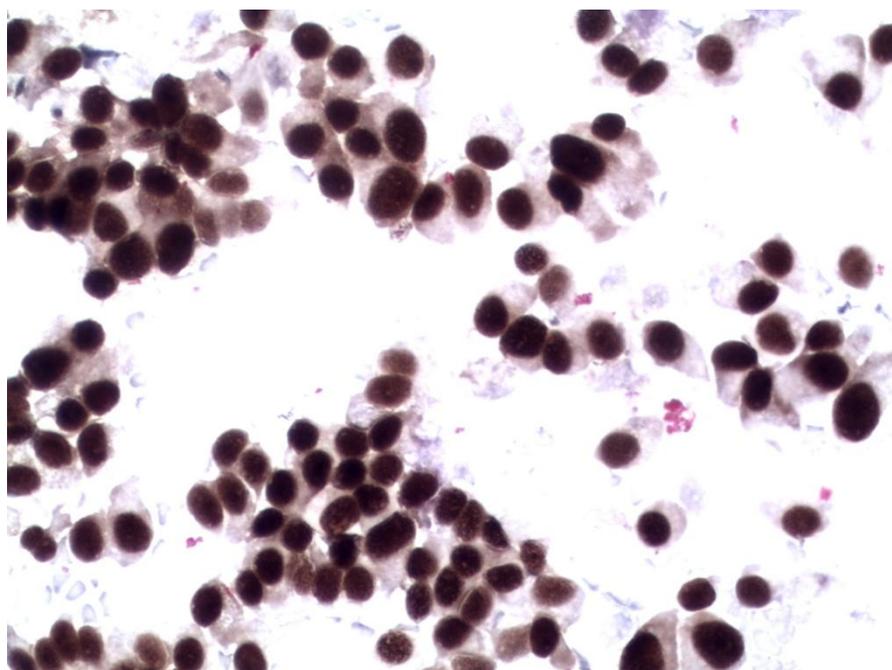


Рис. 16. Иммуноцитохимическая экспрессия рецепторов эстрогена в клетках РМЖ. Количество окрашенных ядер опухолевых клеток – 100% (5 баллов), интенсивность окрашивания – 3 балла. TS - $5+3=8$ баллов.

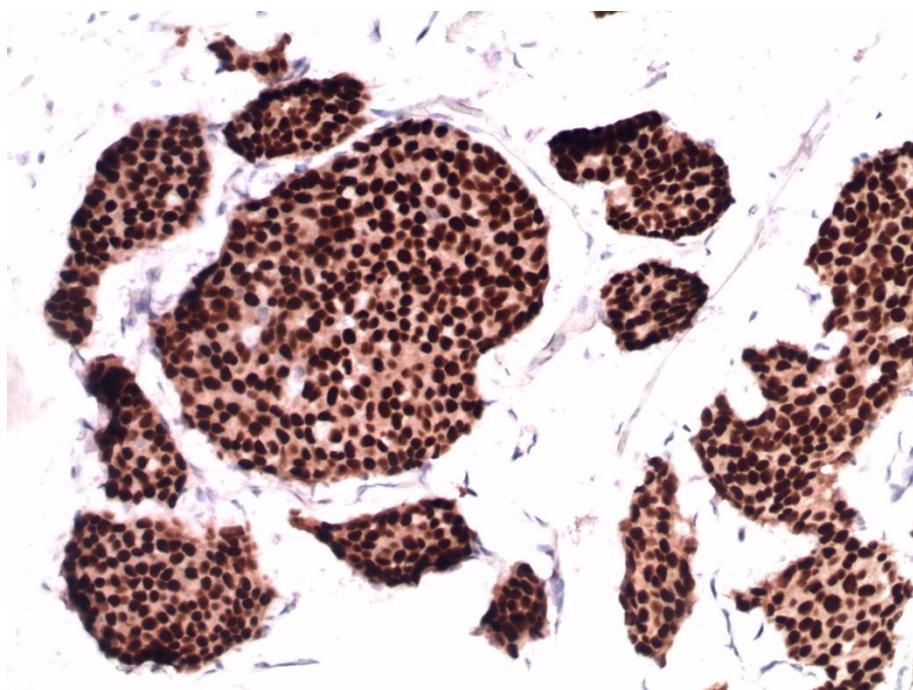


Рисунок 17. Иммуногистохимическая экспрессия рецепторов эстрогена в клетках РМЖ. Количество окрашенных ядер опухолевых клеток – 100% (5 баллов), интенсивность окрашивания – 3 балла. TS - $5+3=8$ баллов.

Таблица 12

Результаты ИЦХ и ИГХ определения рецепторов прогестерона

Результат	Иммуноцитохимическое исследование	Иммуногистохимическое исследование	
		Позитивный	Негативный
Позитивный (3-8 баллов)	56	48	8
Негативный (0-2 баллов)	14	5	9
Всего	70	53	17

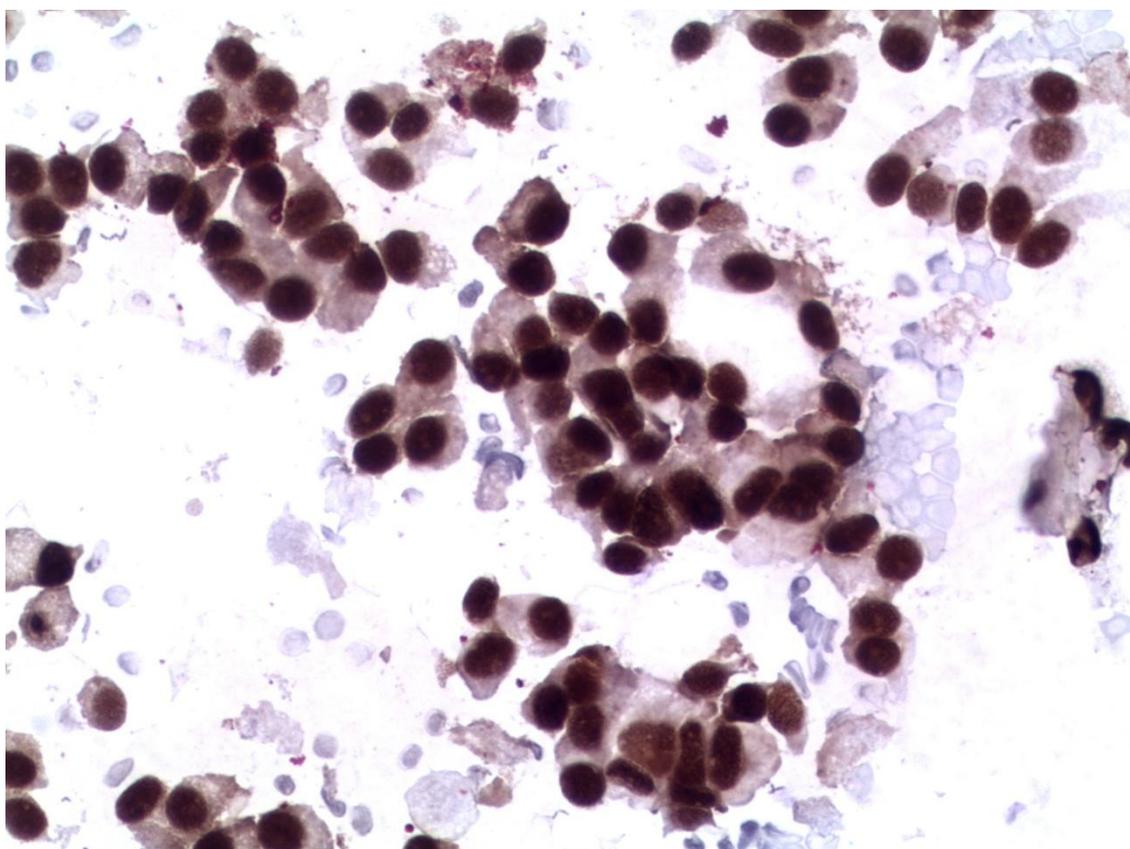


Рис. 18. Иммуноцитохимическая экспрессия рецепторов прогестерона в клетках РМЖ. Количество окрашенных ядер опухолевых клеток – 100% (5 баллов), интенсивность окрашивания – 3 балла. TS - 5+3=8 баллов.

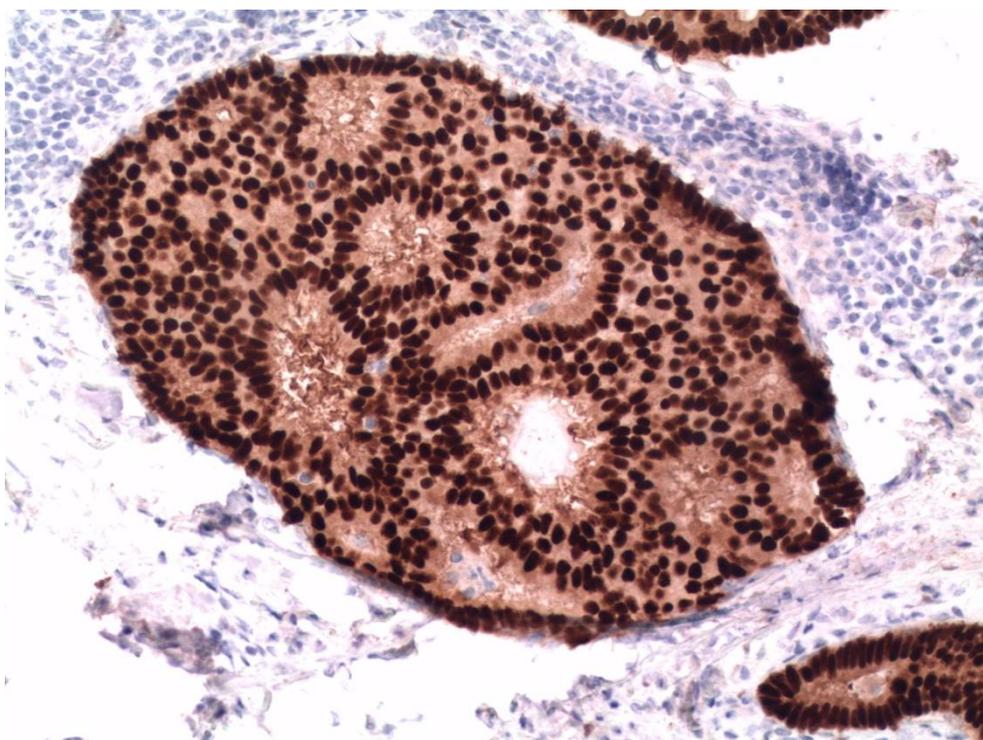


Рисунок 19. Иммуногистохимическая экспрессия рецепторов прогестерона у пациентки с РМЖ. Количество окрашенных ядер опухолевых клеток – 100% (5 баллов), интенсивность окрашивания – 3 балла. TS - 5+3=8 баллов.

Сравнение ИЦХ и ИГХ экспрессии Ki-67 выполнено у 66 больных. 4 пациента были исключены из сравнения, так как данные ИГХ экспрессии Ki-67 отсутствовали. Совпадение данных ИЦХ и ИГХ отмечено в 58 (88%) случаях (рис.20, 21), расхождение в 8 (12%). Ложноположительных результатов было 5, ложноотрицательных – 3 (таблица 13).

Таблица 13

Результаты ИЦХ и ИГХ определения маркера пролиферации Ki-67

Индекс Ki-67	ИЦХ исследование	ИГХ исследование	
		Высокий (20% и выше)	Низкий (менее 20%)
Высокий (20% и выше)	42	37	5
Низкий (менее 20%)	24	3	21
Всего	66	40	26

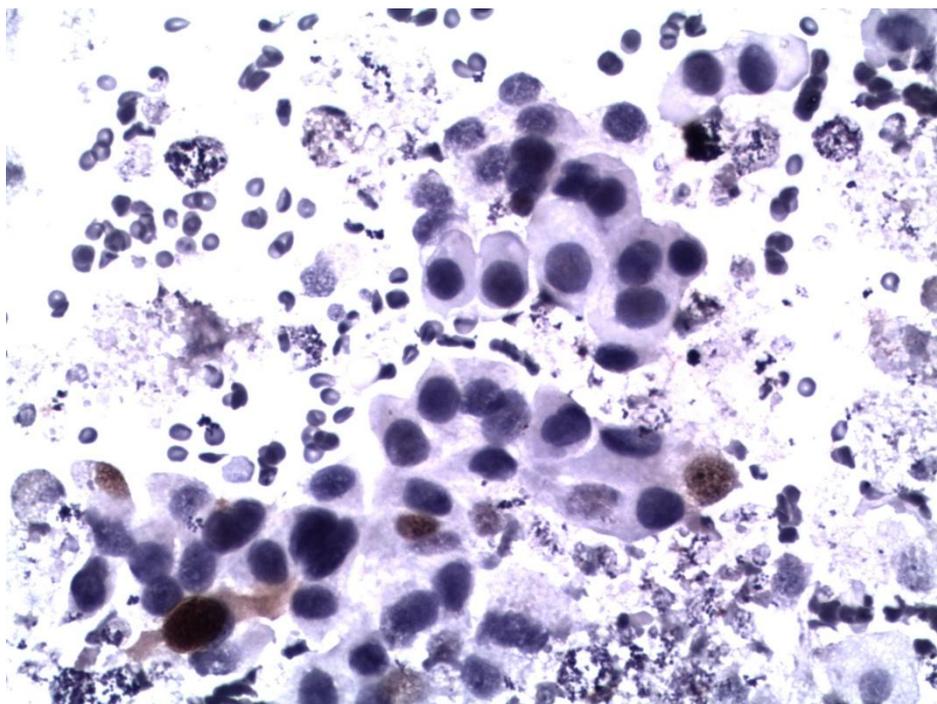


Рисунок 20. Иммуноцитохимическая экспрессия Ki-67 в клетках РМЖ. Количество окрашенных ядер – 5-10%.

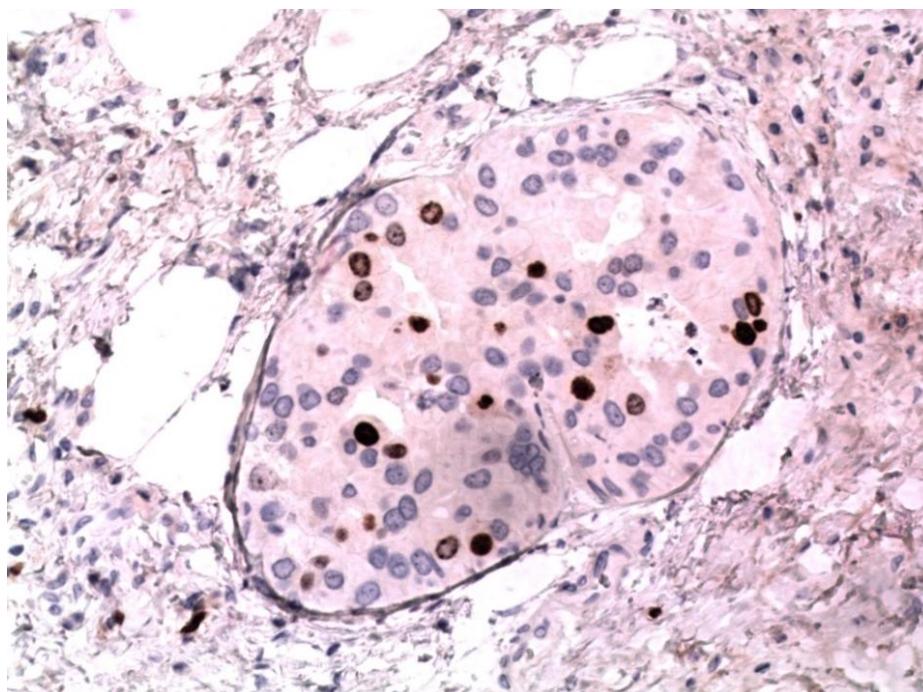


Рисунок 21. Иммуногистохимическая экспрессия Ki-67 в клетках РМЖ. количество окрашенных ядер – 10%.

Иммуноцитохимическое определение экспрессии HER-2 выполнено у 70 пациентов, однако в двух сериях исследований (всего 19 случаев) отсутствовало окрашивание препарата с позитивным контролем, таким образом, у этих 19 пациентов сопоставление результатов ИГХ и ИЦХ исследований не выполнялось. Также исключены из сравнения 7 пациентов с неопределенным (2+) заключением ИГХ и 1 пациентка с неопределенным (2+) заключением ИЦХ, поскольку в этих случаях исследование FISH не проводилось.

Таким образом, сравнение ИГХ и ИЦХ определения HER-2 проведено у 43 пациентов (таблица 14). Совпадение данных ИЦХ и ИГХ отмечено в 41 (95,3%) наблюдениях (рис.22, 23).

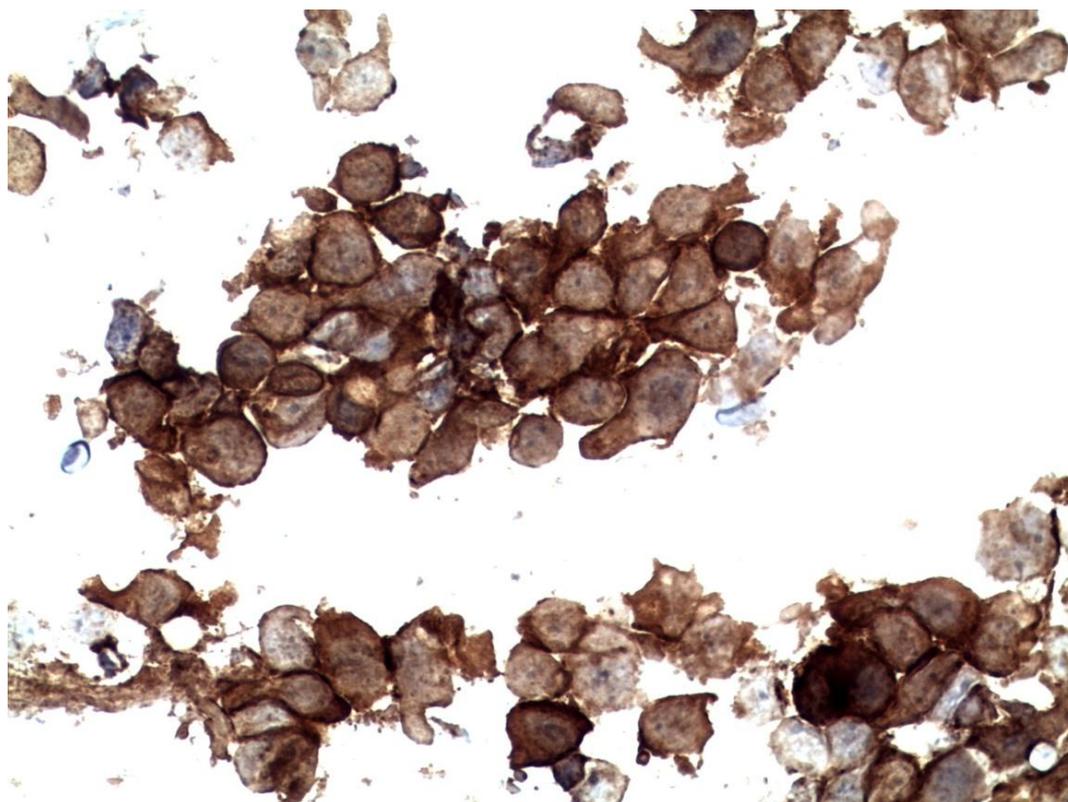


Рисунок 22. Иммуноцитохимическая экспрессия онкопротеина HER-2 у пациентки с РМЖ. Выраженное кольцевое мембранное окрашивание более 30% опухолевых клеток – 3+.

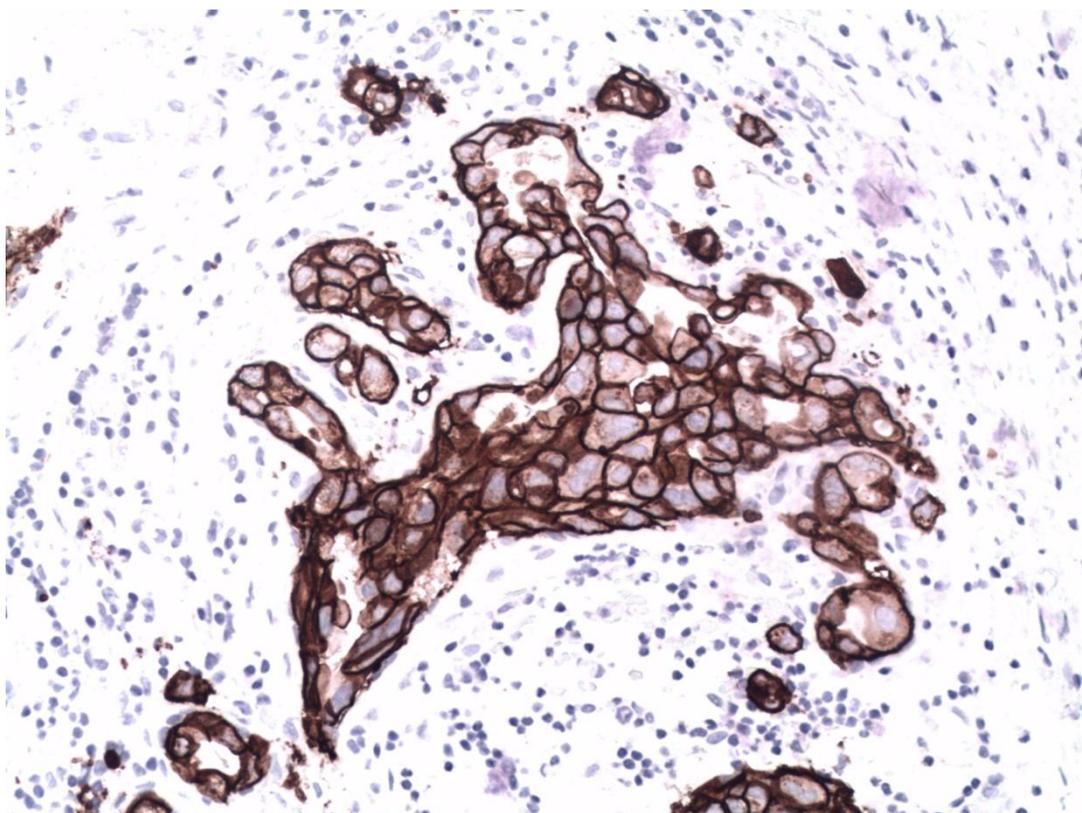


Рисунок 23. Иммуногистохимическая экспрессия онкопротеина HER-2 у пациентки с РМЖ. Выраженное кольцевое мембранное окрашивание более 30% опухолевых клеток – 3+.

По результатам ИЦХ опухоль была HER-2 негативной у 37 пациентов. Из них по данным ИГХ у одной пациентки выявлена экспрессия HER-2 «3+», у трех – «2+», и у 33 – экспрессия «1+» или «0». У пациенток с неопределенным заключением ИГХ выполнено FISH-исследование, амплификация гена не выявлена ни в одном из трех наблюдений. Таким образом, при ИЦХ исследовании в одном случае дано ложноотрицательное заключение. У 6 пациенток по данным ИЦХ была выявлена HER-2 позитивная (3+) опухоль. У 5 из них по результатам ИГХ экспрессия HER-2 также позитивная «3+», у одной пациентки – негативная «1+». Таким образом, 1 случай расценен как ложнопозитивный (табл.15).

Таблица 15

Результаты ИЦХ и ИГХ определения онкопротеина HER-2

Экспрессия HER-2	ИЦХ исследование	ИГХ исследование	
		Позитивная	Негативная
Позитивная	6	5	1
Негативная	37	1	33+3*
Всего	43	6	37

*Примечание: у 3 пациенток по результатам ИГХ экспрессия HER-2 оценена как неопределенная (2+). По результатам FISH-анализа в этих трех образцах амплификация гена не выявлена.

Сопоставление всех 4 маркеров (ER, PR, Ki-67 и HER-2) и установление молекулярно-генетического подтипа опухоли было проведено у 40 больных (табл.16). По результатам ИЦХ исследования люминальный А подтип был определен у 15 (37,5%) пациентов, люминальный В HER-2 негативный – у 14 (35%), люминальный В HER-2 позитивный – у 5 (12,5%), нелюминальный HER-2 позитивный – у 1 (2,5%), трижды-негативный у 5 (12,5%) больных. По данным ИГХ у 14 (35%) больных определен люминальный А подтип, у 15 (37,5%) – люминальный В, у 4 (10%) – люминальный HER-2 позитивный, у 2 (5%) – HER-2 позитивный нелюминальный, и у 5 (12,5%) – трижды-негативный подтип. Совпадение результатов ИЦХ и ИГХ наблюдалось у 31 (77,5%) пациента.

Таким образом, иммуноцитохимический метод определения биологических маркеров при РМЖ является достаточно точным. Совпадение результатов ИЦХ и ИГХ исследования отмечено в 90%, 81,5%, 88% и 95,3% для ER, PR, Ki-67 и HER-2 соответственно. Полное совпадение молекулярно-генетического подтипа получено в 77,5% наблюдений.

Таблица 16

Молекулярно-генетические подтипы РМЖ

Подтип РМЖ	Иммуногистохимическая характеристика	Количество пациентов	
		ИЦХ	ИГХ
Люминальный А	ER/PrR (+) Her-2 (-) Ki-67 < 20%	15 (37,5%)	14 (35%)
Люминальный В HER-2 негативный	ER/PrR (+) Her-2 (-) Ki-67 > 20%	14 (35%)	15 (37,5%)
Люминальный В HER-2 позитивный	ER/PrR (+) Her-2 (+) Ki-67 > 20%	5 (12,5%)	4 (10%)
Нелюминальный HER-2 позитивный	ER/PrR (-) Her-2 (+) Ki-67 > 20%	1 (2,5%)	2 (5%)
Трижды- негативный	ER/PrR (-) Her-2 (-) Ki-67 > 20%	5 (12,5%)	5 (12,5%)
Всего		40	40

ГЛАВА 4

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведение цитогистологических сопоставлений с ретроспективным пересмотром препаратов позволило определить основные показатели эффективности цитологического метода в диагностике РМЖ и выявить процессы, при которых наиболее часто встречаются ошибки цитологической диагностики. Чувствительность цитологического исследования оказалась высокой (99,1%), что соответствует показателям, опубликованным в литературе. Специфичность цитологического исследования, полученная при анализе наших данных (93,5%), уступает показателям, полученным другими авторами. По различным данным, чувствительность метода колеблется от 66 до 99%, специфичность – от 72 до 100%, точность – от 75,5 до 98,9% [Волченко Н.Н. и др., 2014; Новик В.И. и др., 1998; Brancato V. et al., 2012; Frankel P.P., 2011; Lee H.C., 2000]. Учитывая довольно большое число подозрительных на рак заключений при доброкачественных процессах (8,5%), а также довольно высокий процент ложноположительных ответов (4,8%), можно сделать вывод о том, что в цитологической диагностике опухолей молочной железы за указанный период времени имелась тенденция к гипердиагностике.

По результатам анализа расхождений цитологического и гистологического диагнозов был сделан вывод о том, что наиболее частой причиной ложноположительных в отношении рака ответов были трудности дифференциальной диагностики между атипической гиперплазией и раком. Из 13 случаев, в которых дано ложноположительное цитологическое заключение, атипическая протоковая гиперплазия выявлена у 4 пациентов. Второе место по частоте ошибочных цитологических заключений заняла фибroadенома – 3 случая из 13. Два ложноположительных заключения даны при внутрипротоковой папилломе. Остальные процессы встречались реже. Ложноотрицательные заключения наиболее часто встречались при

протоковом раке (5 случаев из 8, в том числе в двух – неинвазивные формы) и слизистом раке (в двух случаях).

Полученные нами результаты не противоречат данным, опубликованным другими исследователями. По данным литературы, наибольшее число ложноположительных заключений встречается при фиброаденоме, на втором месте находятся различные внутрипротоковые пролиферативные процессы, наиболее частыми из которых являются простая и атипическая протоковая гиперплазия. Наиболее частыми формами злокачественных процессов, приводящих к гиподиагностике рака, является высококодифференцированная форма ИПР, а также другие формы высококодифференцированного рака, в том числе слизистый рак [Al-Kaisi N., 1994; Kanhoush R. et al., 2004; Deb R.A. et al., 2001; Willis S.L. et al., 1995; Jamal A.A. et al., 2001].

Таким образом, анализ ложноположительных и ложноотрицательных заключений показал, что часть ошибок обусловлена дефектами получения, приготовления и окраски материала или недостаточным опытом специалиста, проводящего анализ. В нашем исследовании таких случаев было 6. Остальные 15 случаев соответствуют категории «истинная серая зона», поскольку при ретроспективном пересмотре не удалось выявить четких признаков, позволяющих отнести процесс к категории доброкачественных или злокачественных. Таким образом, в цитологической диагностике новообразований молочной железы существует ряд процессов, где дифференциальная цитологическая диагностика представляет значительные затруднения и «неопределенная» диагностическая категория неизбежна.

Основной процент отрицательных цитологических заключений при раке связан с получением неинформативного или малоинформативного материала. Ложноотрицательные заключения имели место в 8 (0,7%) наблюдениях, в то время как неинформативный материал был причиной отрицательного результата цитологического исследования у 150 (13%) больных. Получение качественного препарата напрямую зависит от

соблюдения врачом, проводящим манипуляцию, правил получения материала. Снижение количества неинформативных мазков может быть достигнуто совершенствованием и тщательной отработкой техники выполнения ТАБ. Некоторые авторы отмечают, что наименьшее количество неинформативных мазков получают в тех учреждениях, где процедуру забора материала осуществляет непосредственно сам цитопатолог. По другим данным, хорошие результаты могут быть достигнуты при выполнении ТАБ квалифицированными хирургами, имеющими опыт в проведении данной процедуры. По нашему мнению, оптимальные результаты могут быть достигнуты, когда пункция осуществляется хирургом под контролем визуализирующей аппаратуры в присутствии цитопатолога. Это дает цитопатологу возможность получить полную клиническую информацию о пациенте, необходимую для постановки диагноза, а также позволяет оперативно оценить информативность материала и произвести в случае необходимости повторное исследование.

Таким образом, проведенное исследование показало высокую эффективность цитологического метода в дооперационной диагностике новообразований молочной железы. Дальнейший рост точности цитологической диагностики зависит от совершенствования методов забора материала для исследования и от дальнейшей разработки критериев дифференциальной диагностики между доброкачественными и злокачественными заболеваниями молочной железы.

Попытка разработки таких критериев послужила основанием для использования объективных компьютерных цитометрических методов исследования. Литературные данные, посвященные этому вопросу, являются довольно противоречивыми, что, возможно, связано с подбором разных групп наблюдений для сравнения. В ряде работ показано, что проведение морфометрических и денситометрических исследований с помощью анализа изображений или цитометрии могут быть полезными для улучшения результатов дифференциальной диагностики [Волченко Н.Н. и др., 2002,

2004; Михетько А.А. и др., 2006; Kalhan S. et al., 2010; Nagashima T. et al., 2000; Ruiz A. et al., 1999]. Отмечено значительное увеличение морфометрических параметров ядер при сравнении простой протоковой гиперплазии с атипической гиперплазией, атипической гиперплазии с низкодифференцированной протоковой карциномой *in situ*, однако не было значимых различий между атипической протоковой гиперплазией и высокодифференцированной протоковой карциномой *in situ* [Norris H.J. et al., 1988; Ruiz A. et al., 1999]. В ретроспективном исследовании на нашем материале такое различие было установлено, причем как морфометрические, так и денситометрические показатели при АПГ были значительно более высокими, чем при ВДПКИС, что, возможно, и послужило причиной ложноположительных цитологических заключений.

В нескольких работах при сопоставлении ядерных морфометрических показателей с цитологической градацией рака молочной железы установлено, что при высокодифференцированном раке они имеют значительно меньшие значения, чем при умеренно- и низкодифференцированном раке, однако различие этих показателей при последних двух формах оказалось не достоверным [Dey P. et al., 2000; Kalhan S. et al., 2010; Tahlan A. et al., 2000]. На нашем материале трудно было морфологически разделить умеренно- и низкодифференцированные формы протоковой карциномы *in situ*, поэтому мы объединили их в одну группу, однако при сравнении ядерных параметров инвазивных протоковых раков выявлено статистически значимое различие между G1, G2 и G3 формами ИПР.

Наши данные не подтверждают представления некоторых авторов [Van Diest P.J. et al., 1999; Abdalla F. et al., 2008; Mommers E.C. et al., 2001; Ruiz A. et al., 1999] о линейном последовательном увеличении морфометрических параметров ядер эпителиальных клеток в ряду простая гиперплазия – атипическая гиперплазия – карцинома *in situ* – инвазивный рак молочной железы. Этому противоречат полученные нами данные о более высоких цитометрических показателях ядер при атипической гиперплазии по

сравнению с высокодифференцированной протоковой карциномой *in situ*. Также мы не выявили постепенного нарастания показателей степени ядерной атипии от протоковой карциномы *in situ* к инвазивным формам рака. В нашем исследовании установлено, что инвазивные формы рака имеют гораздо менее выраженные морфометрические показатели ядерной атипии, чем преинвазивные формы рака соответствующей степени дифференцировки (ВДПКИС против ИПР G1 и УНДПКИС против ИПР G2 и G3). Возможно, это связано с селекцией клонов опухолевых клеток в процессе опухолевой прогрессии.

Как и другие авторы, мы отметили значительную вариабельность морфометрических и денситометрических показателей, как в различных группах наблюдений, так и в пределах одной группы. Конечно, в практической работе помимо основных цитологических признаков (величина ядер и интенсивность их окраски), параметры которых подвергались объективной оценке, используются и другие критерии: обилие материала, взаимное расположение клеток, ядерно-цитоплазматическое соотношение, структура ядерного хроматина и другие, которые при совокупной оценке цитологической картины позволяют установить точный диагноз. Однако в ряде случаев эти признаки перекрывают друг друга, что является причиной трудностей дифференциальной цитоморфологической диагностики и заставляет формулировать цитологическое заключение в предположительной форме. Кроме того, полученный при тонкоигольной биопсии или трепан-биопсии материал довольно часто бывает малоинформативным или неинформативным. Все это, с учетом рентгенологических и клинических данных, является предпосылкой для выполнения секторальной резекции и получения срочного морфологического заключения по значительно более информативному материалу, с учетом структурных тканевых особенностей. В настоящее время для повышения точности и информативности цитологического исследования в диагностике новообразований молочной железы изучаются и разрабатываются молекулярно-генетические методы,

одним из которых является оценка экспрессии микроРНК в материале ТАБ в целях уточнения диагноза и оптимизации выбора терапии [Колесников Н.Н. и соавт., 2016].

Для оценки эффективности цитологической диагностики метастазов РМЖ в лимфатические узлы также было выполнено сопоставление цитологических заключений с результатами гистологического исследования операционного материала. Чувствительность цитологического исследования для диагностики метастазов РМЖ в регионарные лимфатические узлы составила 100%. Это значительно более высокий показатель, чем данные, опубликованные в литературе. По результатам различных исследователей, чувствительность метода составила от 24,7 до 92,5%. Такая значительная разница в значениях обусловлена различным дизайном исследования. В тех из них, куда были включены пациенты и с пальпируемыми, и не пальпируемыми лимфатическими узлами, показатели чувствительности гораздо более низкие (24,7 – 72,6%) [Altomare V. Et al., 2007; Jankovski C. et al., 2015; Leenders M. et al., 2013; Monaco S. et al., 2012], чем в тех, куда были включены только пациенты с клинически определяемыми метастазами (91,7 – 92,5%) [Ciatto S. et al., 2007; Gilani S. et al., 2014]. В нашем исследовании в большинстве наблюдений ТАБ выполнялась пациенткам с клинически определяемыми метастазами.

Неинформативный материал получен в 9,5% случаев. Для предотвращения получения неинформативного материала пункция лимфатических узлов должна проводиться опытным хирургом-онкологом под контролем визуализирующей аппаратуры, и при возможности – быстрой окраски препарата для оценки качества полученного материала. Это дает возможность в случае необходимости немедленно произвести повторную пункцию и получить достаточное для оценки количество материала. Проблема ложноотрицательных заключений при ТАБ - хорошо известный спорный момент в цитологической диагностике, приводящий к снижению чувствительности метода. В проведенном нами исследовании все

ложноотрицательные заключения были обусловлены недостатками забора материала (в мазках были обнаружены только эритроциты и фрагменты жировой ткани), и ни одного – ошибками интерпретации результатов.

Эффективность интраоперационной диагностики метастазов РМЖ в сигнальные лимфатические узлы составила 5 из 10 при срочном цитологическом исследовании и 6 из 10 при срочном гистологическом исследовании. Ложноотрицательный результат цитологического исследования в большинстве случаев (в четырёх из пяти) обусловлен тем, что опухолевые клетки присутствовали не во всех участках лимфатического узла и соответственно не попадали в цитологические препараты, так как мазки-отпечатки готовились с одной поверхности разреза лимфатического узла. В одном наблюдении изолированные клеточные кластеры опухолевых клеток были пропущены при рутинном цитологическом исследовании и выявлены ретроспективно при проведении иммуноцитохимического исследования. Ещё в одном наблюдении цитологически были обнаружены небольшие комплексы опухолевых клеток, проведено иммуноцитохимическое исследование с антителами к эпителиальному антигену (клон BerEP-4) и мультицитокератину (клон MNF-116), в обеих реакциях получено четкое выраженное окрашивание опухолевых клеток. Данный случай не расценен нами как ложнопозитивный, несмотря на то, что ни при срочном, ни при плановом гистологическом исследовании метастаз не был выявлен. Таким образом, специфичность срочного цитологического исследования отпечатков сигнальных лимфатических узлов составила 100%.

Известны достоинства ТАБ – простой, экономически выгодный, малоинвазивный метод предоперационной диагностики, который может быть с успехом применен для стадирования РМЖ. Специфичность исследования, близкая к 100%, и крайне низкое количество ложноположительных заключений позволяет в случае положительного цитологического ответа избежать выполнения биопсии сигнальных лимфатических узлов и непосредственно приступить к подмышечной лимфаденэктомии.

Отрицательный результат ТАБ требует дальнейшей оценки статуса лимфатических узлов посредством биопсии сигнального лимфатического узла. В соответствии с данными литературы и с полученными нами результатами, ТАБ под контролем УЗИ при раке молочной железы должна быть включена в стандарт предоперационного обследования больных.

При выполнении биопсии сигнальных лимфатических узлов параллельно с гистологическим исследованием можно выполнять цитологическое исследование мазков-отпечатков. В подавляющем большинстве случаев срочное гистологическое исследование превосходит цитологическое по своим критериям эффективности, тем не менее, в некоторых наблюдениях цитологическое исследование позволяет выявить единичные опухолевые клетки и микрометастазы. Клиническое значение микрометастазов и изолированных клеточных кластеров опухолевых клеток при небольших опухолях (категории T1-T2) в настоящее время остается спорным вопросом, требующим проведения дальнейших исследований.

Иммуноцитохимический метод определения биологических маркеров при РМЖ, по результатам проведенного исследования, является достаточно точным. На сегодняшний день многими авторами опубликованы сведения о высокой корреляции данных ИЦХ и ИГХ определения рецепторов гормонов в клетках РМЖ, несмотря на то, что используются различные протоколы фиксации (спирт, ацетон, формалин и другие), способы выполнения (ручная методика или автостейнер), клоны антител и системы визуализации. В нашем исследовании уровень корреляции для ER и PR составил соответственно 90 и 81,5%, что несколько ниже, чем результаты других исследователей. По данным литературы, результаты определения маркеров на цитологическом материале имеют высокие уровни корреляции с данными, полученными при ИГХ исследовании: совпадение результатов иммуноцитохимического и иммуногистохимического определения экспрессии ER отмечено в 92-98% случаев, экспрессии PR – в 72-96% [Волченко Н.Н. и др., 2014, Bueno Angela S.P. et al., 2013, Bédard Y.C. et al., 2003, Domanski A.M. et al., 2012, Hanley

K.Z., 2009, Kinsella M.D., 2011, Kumar S.K., 2012, Pegolo E., 2012, Zoppi J.A., 2001]. В нашем исследовании ложноположительных случаев было 4 для рецепторов эстрогена и 8 для рецепторов прогестерона, причем в половине из них по данным ИЦХ общий балл (TS) был равен 3, а по данным ИГХ – 2 баллам. Поэтому часть ошибок можно объяснить неправильной интерпретацией результата вследствие отсутствия опыта специалиста, проводящего анализ. Ложноотрицательные случаи составили 3 для рецепторов эстрогена и 5 для рецепторов прогестерона, и часть из них тоже можно объяснить аналитическими ошибками, поскольку почти во всех случаях ИГХ методом выявлен небольшой процент окрашенных клеток – от 1 до 10%, слабой или умеренной интенсивности с общим баллом TS равным 3-4. Другая половина ошибок обусловлена, по-видимому, гетерогенностью опухоли. Вследствие этого, даже небольшое число окрашенных клеток в цитологическом препарате может расцениваться как позитивное, поскольку в процентном соотношении к общему числу клеток в препарате оно может быть гораздо более высоким, чем соответствующее соотношение в гистологических препаратах.

Анализ экспрессии онкобелка HER-2 в клетках РМЖ стал стандартом обследования, так как позволяет клиницистам выбрать пациентов для таргетной терапии герцептином. Во многих лабораториях алгоритм определения HER-2 включает ИГХ исследование; FISH выполняется в случаях неопределенной экспрессии («2+»). В литературе имеются ограниченные данные относительно выполнения ИЦХ исследований для этих целей, и их результаты противоречивы. По мнению одних авторов, цитологические мазки, фиксированные спиртом, дают много ложноположительных результатов и не являются надежным методом определения экспрессии HER-2 [Hanley K.Z. et al., 2009; Beatty V.G. et al., 2004], другие описывают удовлетворительную корреляцию между ИЦХ исследованием материала клеточных блоков и ИГХ [Williams S.L. et al., 2009; Sumiyoshi K. Et al., 2006]. Третьи сообщают о 100 % корреляции данных ИГХ и ИЦХ

[Волченко Н.Н., 2013, Moriki T., 2004, Kumar S.K., 2012]. В нашем исследовании совпадение результатов ИЦХ и ИГХ для HER-2 отмечено в 95,3% случаев.

Таким образом, ИЦХ определение биологических маркеров при РМЖ является достаточно надежным методом и может являться альтернативой ИГХ исследованию в случаях рецидива, метастазов или прогрессирования опухоли для оценки иммунофенотипа во вторичных очагах ранее диагностированного рака, а также в ситуациях, когда получение материала для гистологического исследования сопряжено с трудностями или высоким риском осложнений.

ВЫВОДЫ

1. Показатели эффективности цитологической диагностики РМЖ довольно высоки и составляют: чувствительность – 99,1%, специфичность – 93,5%, предсказательное значение положительного теста – 98,5%, предсказательное значение отрицательного теста – 95,9%, точность – 98%.

2. Среди доброкачественных процессов наибольшее число ложноположительных в отношении рака цитологических заключений выявлено при атипической гиперплазии протокового эпителия (30% всех ЛП ответов), фиброаденоме (23%) и внутрипротоковой папилломе (15%). Ложноотрицательные заключения наиболее часто (62,5% всех ЛО результатов) встречались при протоковом (в том числе, при неинвазивных формах) и слизистом раке (25%).

3. Наши данные не подтверждают представление о линейном последовательном увеличении морфометрических параметров ядер эпителиальных клеток в ряду простая гиперплазия – атипическая гиперплазия – карцинома *in situ* – инвазивный рак молочной железы. Как морфометрические, так и денситометрические показатели при АПГ были значительно более высокими по сравнению с ВДПКИС, а также при карциномах *in situ* по сравнению с инвазивными формами рака соответствующей степени дифференцировки.

4. Значительная вариабельность морфометрических и денситометрических показателей, как в различных группах наблюдений, так и в пределах одной группы, в ряде случаев не позволяет четко отнести процесс к доброкачественной или злокачественной диагностической категории, что является причиной трудностей дифференциальной цитоморфологической диагностики и заставляет формулировать цитологическое заключение в предположительной форме.

5. Чувствительность цитологического исследования в диагностике метастазов РМЖ в регионарные лимфатические узлы равна 100%. Специфичность исследования, близкая к 100%, и крайне низкое количество ложноположительных заключений позволяет в случае положительного цитологического ответа избежать выполнения биопсии сигнальных лимфатических узлов и непосредственно приступить к подмышечной лимфаденэктомии. Отрицательный результат ТАБ требует дальнейшей оценки статуса регионарных лимфатических узлов посредством биопсии сигнального лимфатического узла.

6. При выполнении биопсии сигнальных лимфатических узлов параллельно с гистологическим исследованием можно выполнять цитологическое исследование мазков-отпечатков, которое в некоторых наблюдениях позволяет обнаружить единичные опухолевые клетки и микрометастазы, не выявленные при срочном гистологическом исследовании.

7. ИЦХ определение биологических маркеров при РМЖ является достаточно надежным методом. Совпадение результатов ИЦХ и ИГХ для ER, PR, Ki-67 и HER-2 отмечено в 90%, 81,5%, 88% и 95,3% соответственно. Таким образом, ИЦХ метод может являться альтернативой ИГХ исследованию в случаях рецидива, метастазов или прогрессирования опухоли для оценки иммунофенотипа во вторичных очагах ранее диагностированного рака, а также в ситуациях, когда получение материала для гистологического исследования сопряжено с трудностями или высоким риском осложнений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волченко Н.Н., Гладунова З.Д., Славнова Е.Н. и др. Диагностика дисплазий молочной железы с использованием цитоморфометрии // Новости клин. цитологии России. – 2004. – 8. – № 1-2. – С. 14-17.
2. Волченко Н. Н., Медовый В. С., Славнова Е. Н., и др. Сравнительный морфометрический анализ цитограмм инвазивного протокового и инвазивного долькового рака молочной железы // Архив патологии. – 2002. – 64. – №6. – С. 37-39.
3. Волченко Н.Н., Савостикова М.В. Атлас цитологической и иммуноцитохимической диагностики опухолей. М., 2010. – 236 с.: ил.
4. Волченко Н.Н., Славнова Е.Н., Гладунова З.Д. и др. Цитоморфологическая характеристика дисплазий молочной железы // Российский онкологический журнал. – 2006. – №1. – С. 21-24.
5. Волченко Н.Н., Славнова Е.Н., Тугулукова А.А. Сравнительный анализ различных вариантов приготовления жидкостных препаратов // Новости клин. цитологии России. – 2013. – Т.17. – №1-2. – С. 3-8.
6. Волченко Н.Н., Славнова Е.Н., Тугулукова А.А. Тонкоигольная биопсия и трепанобиопсия при раке молочной железы // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2014. – № 5. – С. 11-15.
7. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Тканевые маркеры как факторы прогноза при раке молочной железы // Практ. онкол. – 2002. – Т.3. – №1. – С.38-44.
8. Глузман Д.Ф., Скляренко Л.М., Надгорная В.А., Крячок И.А. Диагностическая иммуноцитохимия опухолей / Под ред. Д.Ф Глузмана. – К.: МОРИОН, 2003. – 156 с.
9. Ермилова В.Д. Роль современной патоморфологии в характеристике рака молочной железы // Практ. онкол. – 2002. – Т.3. - № 1. – С. 15-20.
10. Колесников Н.Н., Титов С.Е., Веряскина Ю.А. и др. Повышение точности и информативности тонкоигольной аспирационной

- пункционной биопсии опухолей молочной железы путем анализа микроРНК в материале цитологического мазка // Успехи молекулярной онкологии. – 2016. – Т.3. - №1. – С.44-52.
11. Мерабишвили В.М. Онкологическая служба Санкт-Петербурга (оперативная отчетность за 2011-2012 годы, углубленная разработка базы данных регистра по международным стандартам). Популяц. раковый регистр, том 18 / Под ред. Колабутина А.М., Беляева А.М. СПб.: ООО «Издат.-полиграф. комп. «КОСТА», 2013. 368 с.
 12. Михетько А.А., Новик В.И. Дифференциальная цитологическая диагностика новообразований молочной железы с использованием компьютерной денсито-морфометрии // Новости клин. цитологии России. – 2006. – Т.10. – №1-2. – С. 27-33.
 13. Михетько А.А., Новик В.И. Применение компьютерной денситоморфометрии в дифференциальной цитологической диагностике новообразований молочной железы // Вопр. онкол. – 2006. – Т.52. – №1. – С. 129-130.
 14. Михетько А.А., Перов В.В. Цито-клинико-гистологические сопоставления при опухолях и опухолеподобных заболеваниях молочных желез // Новости клин. цитологии России. – 2004. – Т.8. – № 3-4. – С. 29-33.
 15. Новик В.И. Использование компьютерных технологий в цитологической диагностике новообразований // Вопр. онкол. – 2000. – Т.46. – №2. – С. 239-242.
 16. Новик В.И., Красильникова Л.А., Шейко Е.В. Анализ результатов цитологической диагностики поражений молочных желез // Клин. лаб. диагностика. – 1997. – №7. – С. 53-54.
 17. Новик В.И., Семиглазов В.Ф., Красильникова Л.А. и др. Результаты цитологической диагностики опухолей молочных желез // Вопр. онкол. – 1998. – Т.44. – №1. – С. 108-112.

18. Петров С.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Казань, 2004. – 456 с.
19. Пожарисский К.М., Леенман Е.Е. Значение иммуногистохимических методик для определения характера лечения и прогноза опухолевых заболеваний // Архив патологии. – 2000. – Т. 62. – №5. – с. 3-11.
20. Семиглазов В.Ф. Значение прогностических и предсказывающих факторов при выборе лечения у больных метастатическим раком молочной железы // Практик. онкол. – 2000. – № 2. – с. 26-30.
21. Семиглазов В.Ф. Хирургическое лечение рака молочной железы (история и современность) // Практик. онкол. – 2002. – Т.3. – №1. – с.21-28.
22. Семиглазов В.Ф. Рак молочной железы: мультидисциплинарный подход к лечению // Практик. онкол. – 2015. – Т.16. –№ 2. – С. 49-54.
23. Семиглазов В.Ф. и др. Общие рекомендации St. Gallen - 2015 по лечению рака молочной железы (адаптированные экспертами Российского Общества Онкомаммологов [РООМ]). Руководство. – Алматы, 2015. – 71 с.
24. Семиглазов В.Ф., Петровский С.Г., Канаев С.В. и др. Нужна ли биопсия сигнальных лимфатических узлов у больных раком молочной железы // Материалы VII Российского онкол. конгресса. – М., 2003. – С. 85-90.
25. Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В. Скрининг рака молочной железы // Практик.онкол. – 2010. – Т.11. – № 2. – с.60-65.
26. Чиссов В.И., Давыдов М.И. Онкология. Национальное руководство. Краткое издание. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 576 с.
27. Шабалова И.П., Джангирова Т.В., Волченко Н.Н., Пугачев К.К. Цитологический атлас: Диагностика заболеваний молочной железы. – М. – Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2005. – 119 с.
28. Abdalla F., Boder J., Buhmeida A. et al. Nuclear morphometry in FNABs of breast disease in Libyans // Anticancer Res. – 2008. – Vol.28. – P. 3985–9.

29. Abdel-Hadi M., Abdel-Hamid G.F., Abdel-Razek N., Fawzy R.K. Should fine-needle aspiration cytology be the first choice diagnostic modality for assessment of all nonpalpable breast lesions? The experience of a breast cancer screening center in Alexandria, Egypt // *Diagn Cytopathol.* – 2010. – Vol. 38. – No. 12. – P. 880-889.
30. Abendroth C.S., Wang H.H., Ducatman B.S. Comparative features of carcinoma in situ and atypical ductal hyperplasia of the breast on fine-needle aspiration biopsy specimens // *Am. J. Clin. Pathol.* – 1991. – Vol.96. – P. 654–659.
31. Al-Kaisi N. The spectrum of the 'gray zone' in breast cytology. A review of 186 cases of atypical and suspicious cytology // *Acta Cytol.* – 1994. – Vol.38. – P. 898–908.
32. Altomare V., Guerriero G., Carino R. et al. Axillary lymph node echo-guided fine needle aspiration cytology enables breast cancer patients to avoid a sentinel lymph node biopsy. Preliminary experience and a review of the literature // *Surg. Today.* – 2007. – Vol.37. – P. 735-739.
33. Ariga R., Bloom K., Reddy V.B. et al. Fine-needle aspiration of clinically suspicious palpable breast masses with histopathologic correlation // *Am J Surg.* – 2002. – Vol. 184(5). – P. 410-413.
34. Arora B, Renu, Kakade AC, Rekhi B. Diagnostic application of mean nuclear area (MNA) measured by computerized interactive morphometry in breast cancer. *Int J Pathol.* – 2007. – Vol. 5(2).
35. Bardales R.H., Suhrland M.J., Stanley M.W. Papillary neoplasms of the breast: fine-needle aspiration findings in cystic and solid cases // *Diagn. Cytopathol.* – 1994. – Vol.10 – P. 336–341.
36. Barra Ade A., Gobbi H., de L. Rezende C.A. et al. A comparison of aspiration cytology and core needle biopsy according to tumor size of suspicious breast lesions // *Diagn. Cytopath.* – 2008. – Vol. 36(1). – P. 26-31.

37. Beatty G., Bryant R., Wang W. et al. HER-2/neu detection in fine needle aspirates of breast cancer: fluorescence in situ hybridization and immunocytochemical analysis // *Am J Clin Pathol.* – 2004. – Vol. 122(2). – P.246-255.
38. Bédard Y.C., Pollett A.F., Leung S.W., O'Malley F.P. Assessment of thin-layer breast aspirates for immunocytochemical evaluation of HER2 status // *Acta Cytologica.* – 2003. – Vol. 47(6). – p. 979-984.
39. Benoit J.L., Kara R., McGregor S.E., Duggan M.A. Fibroadenoma of the breast: diagnostic pitfalls of fine needle aspiration // *Diagn Cytopathol.* – 1992. – Vol. 8. – P.643–648.
40. Bombonati A., Sgroi D.S. The molecular pathology of breast cancer progression // *J. Pathol.* – 2011. – Vol. 223. – P. 307-317.
41. Bondeson L., Lindholm K. Aspiration cytology of tubular breast carcinoma // *Acta Cytol.* – 1990. – Vol. 34. – P.15–20.
42. Bonzanini M., Gilioli E., Brancato B. et al. Cytologic features of 22 radial scar/complex sclerosing lesions of the breast, three of which associated with carcinoma: clinical, mammographic, and histologic correlation // *Diagn. Cytopathol.* – 1997. – Vol.17. – P.353–362.
43. Brancato B., Crocetti E., Bianchi S. et al. Accuracy of needle biopsy of breast lesions visible on ultrasound: audit of fine needle versus core needle biopsy in 3233 consecutive samplings with ascertained outcomes // *Breast.* – 2012. – Vol. 21(4). – P. 449-454.
44. Bueno Angela S.P., Viero R.M., Soares C.T. Fine needle aspirate cell blocks are reliable for detection of hormone receptor and HER-2 by immunohistochemistry in breast carcinoma // *Cytopathology.* – 2013. – 24. – p. 26-32.
45. Cai G., Simsir A., Cangiarella J. Invasive mammary carcinoma with osteoclast-like giant cells diagnosed by fine-needle aspiration biopsy: review of the cytologic literature and distinction from other mammary

- lesions containing giant cells // *Diagn. Cytopathol.* – 2004. – Vol.30. – P.396–400.
46. Cangiarella J., Waisman J, Simsir A. Cytologic findings with histologic correlation in 43 cases of mammary intraductal adenocarcinoma diagnosed by aspiration biopsy // *Acta Cytol.* – 2003. – Vol.47. – P. 965–972.
 47. Cangiarella J., Waisman J., Shapiro R.L., Simsir A. Cytologic features of tubular adenocarcinoma of the breast by aspiration biopsy // *Diagn. Cytopathol.* – 2001. – Vol.25. – P. 311–315.
 48. Cho E.Y., Oh Y.L. Fine needle aspiration cytology of sclerosing adenosis of the breast // *Acta Cytol.* – 2001. – Vol. 45. – P. 353–359.
 49. Choi Y.D., Choi Y.H., Lee J.H. et al. Analysis of fine needle aspiration cytology of the breast: a review of 1297 cases and correlation with histologic diagnoses // *Acta Cytol.* – 2004. – Vol.48. – P. 801-806.
 50. Ciatto S., Brancato B., Risso G. et al. Accuracy of fine needle aspiration cytology (FNAC) of axillary lymph nodes as a triage test in breast cancer staging // *Breast Cancer Res Treat.* – 2007. – Vol. 103(1). – P. 85-91.
 51. De la Torre M., Lindholm K., Lindgren A. Fine needle aspiration cytology of tubular breast carcinoma and radial scar // *Acta Cytol.* – 1994. – Vol.38. – P. 884–890.
 52. Deb R.A., Matthews P., Elston C.W. et al. An audit of ‘equivocal’ (C3) and ‘suspicious’ (C4) categories in fine needle aspiration cytology of the breast // *Cytopathology.* – 2001. – Vol.12. – P. 219–226.
 53. Dei Tos A.P., Della Giustina D., De Martin V. et al. Aspiration biopsy cytology of tubular carcinoma of the breast // *Diagn. Cytopathol.* – 1994. – Vol. 11. – P. 146–150.
 54. Dey P., Ghoshal S., Pattari S.K. Nuclear image morphometry and cytologic grade of breast carcinoma // *Anal Quant Cytol Histol.* – 2000. – Vol. 22(6). – P. 483-485.
 55. Domanski A.M., Monsef N., Domanski H.A. et al. Comparison of the oestrogen and progesterone receptor status in primary breast carcinomas as

- evaluated by immunocytochemistry and immunohistochemistry: a consecutive series of 267 patients // *Cytopathology*. – 2013. – Vol.24. – P. 21-25.
56. Duane G.B., Kanter M.H., Branigan T., Chang C. A morphologic and morphometric study of cells from colloid carcinoma of the breast obtained by fine needle aspiration. Distinction from other breast lesions // *Acta Cytol.* – 1987. – Vol. 31. – P. 742–750.
 57. Elzagheid A., Collan Y. Fine needle aspiration biopsy of the breast: value of nuclear morphometry after different sampling methods. *Anal Quant Cytol Histol.* – 2003. – Vol.25. – P.73–80.
 58. Field A., Mak A. The fine needle aspiration biopsy diagnostic criteria of proliferative breast lesions: a retrospective statistical analysis of criteria for papillomas and radial scar lesions // *Diagn Cytopathol.* – 2007. – Vol. 35. – P. 386–397.
 59. Fisher C.J., Millis R.R. A mucocele-like tumour of the breast associated with both atypical ductal hyperplasia and mucoid carcinoma // *Histopathology*. – 1992. – Vol. 21. – P. 69–71.
 60. Frankel P.P., Esteves V.F., Thuler L.C. Vieira R.J. Diagnostic accuracy of the fine needle aspiration cytology and core needle biopsy as a diagnostic method for breast lesions // *Rev Bras Ginecol Obstet.* – 2011. – Vol. 33(3). – P.139-143.
 61. Greenberg M.L., Middleton P.D., Bilous A.M. Infarcted intraduct papilloma diagnosed by fine-needle biopsy: a cytologic, clinical, and mammographic pitfall // *Diagn Cytopathol.* – 1994. – Vol.11. – P.188–191.
 62. Gupta R.K., Dowle C.S. Fine needle aspiration cytology of tubular carcinoma of the breast // *Acta Cytol.* – 1997. – Vol. 41. – P. 139–1143.
 63. Gurleyik G., Gurleyik E., Aktekin A., Aker F. Preoperative assessment of the axilla by surgeon performed ultrasound and cytology in patient with breast cancer // *J Clin Med Res.* – 2015. – Vol.7. – №6. – P. 440-445.

64. Haji B.E., Das D.K., Al-Ayadhy B. et al. Fine needle aspiration cytologic features of four special types of breast cancers: mucinous, medullary, apocrine, and papillary // *Diagn Cytopathol.* – 2007. – Vol. 35. – P.408–416.
65. Hanley K.Z., Birdsong G.G., Cohen C., Siddiqui M.T. Immunohistochemical detection of estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 expression in breast carcinomas: comparison on cell block, needle-core, and tissue block preparations // *Cancer.* – 2009. – Vol. 117(4). – P. 279-288.
66. Homesh N.A., Issa M.A., El-Sofiani H.A. The diagnostic accuracy of fine needle aspiration cytology versus core needle biopsy for palpable breast lump(s) // *Saudi Med J.* – 2005. – Vol. 26(1). – P. 42-46.
67. Hwang S., Ioffe O., Lee I. et al. Cytologic diagnosis of invasive lobular carcinoma: factors associated with negative and equivocal diagnoses // *Diagn. Cytopathol.* – 2004. – Vol. 31. – P. 87-93.
68. Ibarra J.A. Papillary lesions of the breast // *Breast J.* – 2006. – Vol.12. – P. 237-251.
69. Ishihara A., Kobayashi T.K. Infarcted intraductal papilloma of the breast: cytologic features with stage of infarction // *Diagn Cytopathol.* – 2006. – Vol. 34. – P.373–376.
70. Ishikawa T., Hamaguchi Y., Tanabe M. et al. False-positive and false-negative cases of fine-needle aspiration cytology for palpable breast lesions // *Breast Cancer.* – 2007. – Vol. 14. – P.388–392.
71. Jamal A.A., Mansoor I. Analysis of false positive and false negative cytological diagnosis of breast lesions // *Saudi Med J.* – 2001. – Vol.22. – P.67–71.
72. Jankowski C., Hudry D., Vaillant D. et al. Evaluation of axillary involvement by ultrasound-guided lymph node biopsy: a prospective study // *Gynecol Obstet Fertil.* - 2015. – Vol. 43(6). – P. 431-436.
73. Jayaram G., Elsayed E.M., Yaccob R.B. Papillary breast lesions diagnosed on cytology. Profile of 65 cases // *Acta Cytol.* – 2007. – Vol.51. – P. 3–8.

74. Jayaram G., Swain M., Chew M.T., Yip C.H. Cytologic appearances invasive lobular carcinoma of the breast. A study of 21 cases // *Acta Cytol.* – 2000. – Vol.44. – P. 169-174.
75. Jemal A., Tiwari R.C., Murray T. et al. American Cancer Society: cancer statistics // *CA Cancer J. Clin.* – 2004. – Vol.54. – P. 8-29.
76. Kalhan S., Dubey S., Sharma S. et al. Significance of nuclear morphometry in cytological aspirates of breast masses // *J. Cytol.* – 2010. – Vol. 27(1). – P.16-21.
77. Kanhoush R., Jorda M., Gomez-Fernandez C. et al. ‘Atypical’ and ‘suspicious’ diagnoses in breast aspiration cytology // *Cancer.* – 2004. – Vol.102. – P.164–167.
78. Khirwadkar N., Clark A.H. Fine needle aspiration cytology of tubular carcinoma of the breast // *Acta Cytol.* – 2005. – Vol. 49. – P.344–345.
79. Khout H., Richardson C., Toghyan H., Fasih T. The role of combined assessment in preoperative axillary staging // *Ochsner J.* – 2013. – Vol. 13(4) – P. 489-494.
80. Kinsella M.D., Birdsong G.G., Siddiqui M.T. et al. Immunohistochemical detection of estrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 in formalin-fixed breast carcinoma cell block preparations: correlation of results to corresponding tissue block (needle core and excision) samples // *Diagn. Cytopath.* – 2012. – Vol. 41(3). – P. 192-198.
81. Kocjan G. Needle aspiration cytology of the breast: current perspective on the role in diagnosis and management // *Acta Med Croatica.* – 2008. – Vol. 62(4). – P. 391-401.
82. Kocjan G., Bourgain C., Fassina A. et al. The role of breast FNAC in diagnosis and clinical management: a survey of current practice // *Cytopathology.* – 2008. – Vol. 19(5). – P. 271-278.

83. Kollur S.M., El Hag I.A. FNA of breast fibroadenoma: observer variability and review of cytomorphology with cytohistologic correlation // *Cytopathology*. – 2006. – Vol.17. – P.239–244.
84. Kumar S.K., Gupta N., Rajwanshi A. et al. Immunohistochemistry for oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2 on cell blocks in primary breast carcinoma // *Cytopathology*. – 2012. – Vol. 23(3). – P. 181-186.
85. Kundu U.R., Guo M., Landon G. et al. Fine-needle aspiration cytology of sclerosing adenosis of the breast: a retrospective review of cytologic features in conjunction with corresponding histologic features and radiologic findings // *Am J Clin Pathol*. – 2012. – Vol. 138. – P. 96–102.
86. Lakhani S.R., Ellis I.O., Schnitt S.J. et al. World Health Organization Classification of Tumors of the breast. 4th edition / International Agency for Research on Cancer. Lyon, 2012.
87. Lamb J., McGoogan E. Fine needle aspiration cytology of breast in invasive carcinoma of tubular type and in radial scar/complex sclerosing lesions // *Cytopathology*. – 1994. – Vol.5. – P.17–26.
88. Layfield L.J., Dodd L.G. Cytologically low grade malignancies: an important interpretative pitfall responsible for false negative diagnoses in fine-needle aspiration of the breast // *Diagn. Cytopath.* – 1996. – Vol.15. – P.250–259.
89. Leach C., Howell L.P. Cytodiagnosis of classic lobular carcinoma and its variants // *Acta Cytol.* – 1992. – Vol.36. – P. 199-202.
90. Lee H.C., Ooi P.J., Poh W.T., Wong C.Y. Impact of inadequate fine-needle aspiration cytology on outcome of patients with palpable breast lesions // *Aust N Z J Surg*. – 2000. – Vol. 70(9). – P. 656-659.
91. Leenders M., Broeders M., Croese C. et al. Ultrasound and fine needle aspiration cytology of axillary lymph nodes in breast cancer. To do or not to do? // *Breast*. – 2012. – Vol. 21(4). – P. 578-583.

92. Leenders M., Richir M., Broeders M. et al. Axillary staging by ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology in breast cancer patients. Still up to date? // *Breast J.* – 2013. – Vol. 19(6). – P. 637-642.
93. Lewis J.T., Hartman L.C., Vierkant R.A. et al. An analysis of breast cancer risk in women with single, multiple, and atypical papilloma // *Am. J. Pathol.* – 2006. – Vol.30. – P.665-672.
94. Lilleng R., Hagmar B.M., Farrants G. Low grade cribriform ductal carcinoma in situ of the breast. Fine needle aspiration cytology in three cases // *Acta Cytol.* – 1992. – Vol. 36. – P.48–54.
95. Lopez-Ferre P., Jimenez-Heffernan J.A., Vicandi B. et al. Fine needle aspiration of the breast fibroadenoma. A cytohistologic correlation study of 405 cases // *Acta Cytol.* – 1999. – Vol. 43. – P.579–586.
96. Mak A., Field A.S. Positive predictive value of the breast FNAB diagnoses of epithelial hyperplasia with atypia, papilloma, and radial scar // *Diagn. Cytopathol.* – 2006. – Vol.34. – P.818–823.
97. McKee G., Tildsley G., Hammond S. Cytologic diagnosis and grading of ductal carcinoma in situ // *Cancer.* – 1999. – Vol.87. – P.203–209.
98. Michael C.W., Buschmann B. Can true papillary neoplasms of breast and their mimickers be accurately classified by cytology? // *Cancer.* – 2002. – Vol.96. – P.92–100.
99. Mitra S., Dey P. Grey zone lesions of breast: potential areas of error in cytology // *J. Cytol.* – 2015. – Vol. 32(3). – P.145–152.
100. Mommers E.C., Poulin N., Sangulin J. et al. Nuclear cytometric changes in breast carcinogenesis // *J. Pathol.* – 2001. – Vol. 193(1). – P. 33-39.
101. Monaco S., Colaizzi A., Kanbour A. et al. The role of axillary lymph node fine needle aspiration in breast cancer staging prior to chemotherapy with histological correlation // *Acta Cytol.* – 2012. – Vol.56. – P. 139-145.
102. Moriki T., Takahashi T., Ueta S. et al. Hormone receptor status and HER2/neu overexpression determined by automated immunostainer on routinely fixed cytologic specimens from breast carcinoma: correlation with

- histologic sections determinations and diagnostic pitfalls // *Diagn. Cytopathol.* – 2004. – Vol. 30(4). – P.251-256.
103. Moroz K., Lipscomb J., Vial L.J., Dhurandhar N. Cytologic nuclear grade of malignant breast aspirates as a predictor of histologic grade: light microscopy and image analysis characteristics // *Acta Cytol.* – 1997. – Vol.41. – P.1107–1111.
 104. Mucha Dufloth R., Xavier-Junior J.C., Moraes Neto F.A. et al. Fine needle aspiration cytology of lobular breast carcinoma and its variants // *Acta Cytol.* – 2015. – Vol.59. – P.37-42.
 105. National Cancer Institute Fine-Needle Aspiration of Breast Workshop Subcommittees: the uniform approach to breast fine-needle aspiration biopsy // *Diagn. Cytopathol.* – 1997. – Vol.16. – P. 295–311.
 106. Nagashima T., Suzuki M., Yagata H., et al. Cytomorphometric differentiation of intraductal proliferative breast lesions // *Breast Cancer.* - 2000. – Vol. 7(1). - P.43-7.
 107. Ng W.K. Fine needle aspiration cytology of invasive cribriform carcinoma of the breast with osteoclast-like giant cells: a case report // *Acta Cytol.* – 2001. – Vol.45. – P.593–598.
 108. Nguansangiam S., Jesdapatarakul S., Tangjitgamol S. Accuracy of fine needle aspiration cytology from breast masses in Thailand // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2009. – Vol. 10(4). – P. 623-626.
 109. Norris H.J., Bahr G.F., Mikel U.V. A comparative morphometric and cytophotometric study of intraductal hyperplasia and intraductal carcinoma of the breast // *Anal Quant Cytol Histol.* – 1988. – Vol. 10(1). – P.1-9.
 110. O'Neil S., Castelli M., Gattuso P. et al. Fine-needle aspiration of 697 palpable breast lesions with histopathologic correlation // *Surgery.* – 1997. – Vol. 122(4). – P. 824-828.
 111. Papeix G., Zardawi I.M., Douglas C.D. et al. The accuracy of the «triple test» in the diagnosis of papillary lesions of the breast // *Acta Cytol.* – 2012. – Vol.56. – P. 41-46.

112. Pegolo E., Machin P., Riosa F. et al. Hormone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 status evaluation on thin-prep specimens from breast carcinoma. Correlation with histologic sections determination // *Cancer Cytopatol.* – 2012. – Vol. 120(3). – P. 196-205.
113. Perou C M, Sorlie T, Eisen M B. et al. Molecular portraits of human breast tumors // *Nature.* – 2000. – Vol.406. – P. 747–752.
114. Peterse J.L., Koolman-Schellekens M.A., vande Peppel-van de Ham T., van Heerde P. Atypia in fine-needle aspiration cytology of the breast: a histologic follow-up study of 301 cases // *Semin. Diagn. Pathol.* – 1989. – Vol. 6. – P. 126–134.
115. Phillipson J., Ostrzega N. Fine needle aspiration of invasive cribriform carcinoma with benign osteoclast-like giant cells of histiocytic origin. A case report // *Acta Cytol.* – 1994. – Vol.38. – P.479–482.
116. Pienta K.J., Coffey D.S. Correlation of nuclear morphometry with progression of breast cancer // *Cancer.* – 1991. – Vol.68. – P. 2012–2016.
117. Sauer T., Karesen R. The role of preoperative ultrasound guided fine-needle aspiration cytology of radiologically suspicious axillary lymph nodes in breast cancer // *Cytojournal.* – 2014. – Vol. 11(26).
118. Sauer T., Lomo J., Garred O., Naess O. Cytologic features of ductal carcinoma in situ in fine-needle aspiration of the breast mirror the histopathologic growth pattern heterogeneity and grading // *Cancer.* – 2005. – Vol.105. – P. 21–27.
119. Sauer T., Suci V. The role of preoperative axillary lymph node fine needle aspiration in locoregional staging of breast cancer // *Ann. Pathol.* – 2012. – Vol. 32(6). – P. 410-414.
120. Shabb N.S., Boulos F.I., Abdul-Karim F.W. Indeterminate and erroneous fine-needle aspirates of breast with focus on the ‘true gray zone’: a review // *Acta cytol.* – 2013. – Vol.57. – P.316-331.

121. Shannon J., Douglas-Jones A.G., Dallimore N.S. Conversion to core biopsy in preoperative diagnosis of breast lesions: is it justified by result? // *J. Clin. Pathol.* – 2001. – Vol.54. – P. 762–765.
122. Sidawy M.K., Stoler M.H., Frable W.J. et al. Interobserver variability in the classification of proliferative breast lesions by fine-needle aspiration: results of the Papanicolaou Society of Cytopathology study // *Diagn. Cytopathol.* – 1998. – Vol.18. – P.150–165.
123. Silverman J.F., Masood S., Ducatman B.S. et al. Can FNA biopsy separate atypical hyperplasia, carcinoma in situ, and invasive carcinoma of the breast? Cytomorphologic criteria and limitations in diagnosis // *Diagn. Cytopathol.* – 1993. – Vol.9. – P.713–728.
124. Sinsir A., Cangiarella J., Challenging breast lesions: pitfalls and limitations of fine-needle aspiration and the role of core biopsy in specific lesions// *Diagn. Cytopathol.* – 2012. – Vol.40. – P.262–272.
125. Sinsir A., Waisman J., Cangiarella J. Fibroadenomas with atypia: causes of under- and overdiagnosis by aspiration biopsy // *Diagn Cytopathol.* – 2001. – Vol. 25. – P.278–284.
126. Sinsir A., Waisman J., Thorner K., Cangiarella J. Mammary lesions diagnosed as ‘papillary’ by aspiration biopsy: 70 cases with follow-up // *Cancer.* – 2003. – Vol.99. – P. 156–165.
127. Skjorten F., Kaaresen R., Jacobsen U. et al. Nuclear morphometry of benign and malignant breast lesions. *Eur. J. Surg. Oncol.* – 1991. – Vol.17. – P. 350–353.
128. Sneige N. Fine-needle aspiration of the breast: a review of 1995 cases with emphasis on diagnostic pitfalls // *Diagn. Cytopathol.* – 1993. – Vol. 9. – P.106–112.
129. Sneige N., Staerke G.A. Fine-needle aspiration cytology of ductal hyperplasia with and without atypia and ductal carcinoma in situ // *Hum. Pathol.* – 1994. – Vol.25. – P. 485–492.

130. Sorlie T., Perou C.M., Tibshirani R. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2001. – Vol. 98(19). - P. 10869-10874.
131. Stanley M.W., Tani E.M., Skoog L. Mucinous breast carcinoma and mixed mucinous-infiltrating ductal carcinoma: a comparative cytologic study // Diagn. Cytopathol. – 1989. – Vol. 5. – P.134–138.
132. Stanley M.W., Tani E.M., Skoog L. Fine needle aspiration of fibroadenomas of the breast with atypia: a spectrum including cases that cytologically mimic carcinoma // Diagn. Cytopathol. – 1990. – Vol. 6. – P.375–382.
133. Sumiyoshi K., Shibayama Y., Akashi S. et al. Detection of human epidermal growth factor receptor 2 protein and gene in fine needle aspiration cytology specimens and tissue sections from invasive breast cancer: Can cytology specimens take the place of tissue sections?// Oncology reports. – 2006. – Vol.15. – P. 803-808.
134. Tahlan A., Nijhawan R., Joshi K. Grading of ductal breast carcinoma by cytomorphology and image morphometry with histologic correlation // Anal. Quant. Cytol. Histol. – 2000. – Vol. 22(3). – P.193-198.
135. Thomas P.A., Raab S.S., Cohen M.B. Is the fine needle aspiration biopsy diagnosis of proliferative breast disease feasible? // Diagn. Cytopathol. – 1994. – Vol. 11. – P. 301–306.
136. Tse G., Tan P.H., Schmitt F. Fine needle aspiration cytology of the breast. Atlas of cyto-histologic correlates / Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2013. – 192 P.
137. Rajesh L., Dey P., Joshi K. Automated image morphometry of lobular breast cancer // Anal. Quant. Cytol. Histol. – 2002. – Vol.24(2). – P.81-84.
138. Ro J.Y., Sneige N., Sahin A.A. et al. Mucocele like tumor of the breast associated with atypical ductal hyperplasia or mucinous carcinoma. A clinic pathologic study of seven cases // Arch. Pathol. Lab. Med. – 1991. – Vol.115. – P.137–140.

139. Rogers L.A., Lee K.R. Breast carcinoma simulating fibroadenoma or fibrocystic change by fine-needle aspiration. A study of 16 cases // *Am. J. Clin. Pathol.* – 1992. – 98. – P. 155–160.
140. Rosa M., Mohammadi A., Masood S. The value of fine needle aspiration biopsy in the diagnosis and prognostic assessment of palpable breast lesions // *Diagn. Cytopathol.* – 2012. – Vol.40. – P. 26–34.
141. Ruiz A., Almenar S., Callaghan R.C., Llombart-Bosch A. Benign, preinvasive and invasive ductal breast lesions. A comparative study with quantitative techniques: morphometry, image- and flow cytometry // *Pathol. Res. Pract.* – 1999. – Vol. 195(11). – P.741-746.
142. Ruiz A., Almenar S., Cerda M. et al. Ductal carcinoma in situ of the breast: a comparative analysis of histology, nuclear area, ploidy, and neovascularization provides differentiation between low- and high-grade tumors // *Breast J.* – 2002. – Vol. 8(3). – P. 139-144.
143. Van Diest P.J. Ductal Carcinoma in situ in breast carcinogenesis // *J. Pathol.* – 1999. – Vol.187. – P.383–384.
144. Van Diest P.J., Mouriquand J., Schipper N.W., Baak J.P. Prognostic value of nucleolar morphometric variables in cytological breast cancer specimens // *J. Clin. Pathol.* – 1990. – Vol.43. – P.157–159.
145. Van Diest P.J., Risse E.K., Schipper N.W. et al. Comparison of light microscopic grading and morphometric features in cytological breast cancer specimens // *Pathol. Res. Pract.* – 1989. – Vol.185. – P.612–616.
146. Vicandi B., Jiménez-Heffernan J.A. et al. Fine needle aspiration cytology of mammary carcinoma with osteoclast-like giant cells // *Cytopathol.* – 2004. – Vol.15. – P.321–325.
147. Weaver M.G., Abdul-Karim F.W., al-Kaisi N. Mucinous lesions of the breast. A pathological continuum // *Pathol. Res. Pract.* – 1993. – Vol. 189. – P.873–876.

148. Weigner J., Zardawi I., Braye S., McElduff P. The conundrum of papillary breast lesions within C3 category // *Acta Cytol.* – 2015. – Vol.59. – P.289-297.
149. Williams S.L., Birdsong G.G., Cohen C., Siddiqui M.T. Immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptor and HER2 expression in breast carcinomas: comparison of cell block and tissue block preparations // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2009. – Vol. 2(5). – P.476-480.
150. Willis S.L., Ramzy I. Analysis of false results in a series of 835 fine needle aspirates of breast lesions // *Acta Cytol.* – 1995. – Vol.39. – P.858–864.
151. Wittekind C., Schulte E. Computerized morphometric image analysis of cytologic nuclear parameters in breast cancer // *Anal. Quant. Cytol. Histol.* – 1987. – Vol.9. – P.480–484.
152. Wolff A.C., Hammond M.E., Hicks D.G. et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update // *Journal of Clinical Oncology.* – 2013. – Vol.31. – P.3397 – 4013.
153. Zoppi J.A., Rotundo A.V., Sundblad A.S. Correlation of immunocytochemical and immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in breast cancer // *Acta Cytol.* – 2002. – Vol. 46(2). – P. 337-340.