

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
Иркутский государственный медицинский университет

КЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТОК ПРИ КОМПЛЕКСНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ОПУХОЛЕЙ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ



Научный руководитель:
зав. кафедрой хирургической
стоматологии и ЧЛХ, доцент
кандидат медицинских наук
И. Г. Алёшкин

Научный консультант:
профессор кафедры онкологии
доктор медицинских наук
Ю. К. Батороев

Иркутск - 2017

- **Болезни слюнных желез 3–24 % от всех заболеваний челюстно-лицевой области (Кобликов В. В. с соавт., 2011)**
- **Ошибочный диагноз при заболеваниях слюнных желез в 7–46 % случаев (Быкова А. А., с соавт., 2011)**
- **Опухоли составляют 60 % случаев патологии слюнных желез среди пациентов, находящихся на стационарном лечении (Капленко М. Е., 2015)**
- **75–80 % опухолей доброкачественные (Israel Y. et al., Sando Z. et al.; Taghavi N. et al., 2016)**
- **Заболеваемость злокачественными опухолями больших слюнных желез в разных странах:
0,6–0,9 на 100 тыс. мужчин; 0,4–0,9 на 100 тыс. женщин
(Мерабишвили В. М. с соавт., 2016)**
- **Большое разнообразие гистологических типов (МКБ-10)**

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕЙ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ

- Врачебный осмотр (опрос, осмотр)
- Сиалосонография
- Компьютерная томография
- Сиалография
- Аспирационная пункция тонкой иглой
- Магнитно-резонансная томография
- Патогистологическое исследование

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ

- Радиоавтография
- Иммунофлуоресцентный метод, в том числе экспресс-метод с использованием поликлональных антител к тимидину
- Серебрение белка, ассоциированного с ядрышковым организатором
- Проточная цитометрия и лазерная ДНК-проточная цитометрия
- Иммуногисто(cito)химические методы (Ki-67, PCNA)

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка методики повышения качества комплексной дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей слюнных желез на основе клинической оценки пролиферативного потенциала неопластических клеток.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Провести сравнительный анализ клинических проявлений новообразований слюнных желез и результатов лучевых методов обследования.
2. Оценить точность, чувствительность и специфичность аспирационной пункции тонкой иглой с последующим цитологическим исследованием для дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей слюнных желез.
3. Сравнить пролиферативную активность клеток доброкачественных и злокачественных опухолей слюнных желез путем иммуноцитохимического определения экспрессии белка Ki-67 и установить ее связь с клиническими симптомами и гистологическими вариантами новообразований слюнных желез.
4. Разработать алгоритм комплексной дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей слюнных желез, включающий в себя оценку пролиферативной активности клеток иммуноцитохимическим методом определения индекса Ki-67, и оценить ее точность, чувствительность и специфичность.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

- Впервые для определения степени злокачественности опухолей слюнных желез проведено изучение пролиферативного потенциала неопластических клеток методом иммуноцитохимического определения индекса Ki-67.
- Впервые изучена эффективность комплексной диагностики опухолей слюнных желез с включением клинической оценки пролиферативного потенциала клеток.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

- **Обследование пациентов с новообразованиями слюнных желез:**
 - общие - опрос, осмотр;
 - частные - зондирование протоков, сиалогафия;
 - специальные - сиалосонография, МСКТ, АПТИ, иммуноцитохимическое определение экспрессии белка Ki-67, патогистологическое исследование.
- **Статистическая обработка результатов с использованием описательной статистики и дискриминантного анализа.**

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

- Клинические и лучевые методы обследования на ранних стадиях канцерогенеза не позволяют в большинстве случаев проводить дифференциальную диагностику доброкачественных и злокачественных опухолей слюнных желез.
- Проллиферативная активность неопластических клеток, выявляемая путем оценки экспрессии белка Ki-67 с помощью иммуноцитохимического метода, как правило, достоверно выше в злокачественных опухолях слюнных желез, чем в доброкачественных.
- Включение в комплексное обследование иммуноцитохимического метода определения значения пролиферативного индекса Ki-67 позволяет повысить точность, чувствительность и специфичность дифференциальной клинико-морфологической диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей слюнных желез, в том числе на ранней стадии малигнизации.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ОПУХОЛЕЙ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ ПО ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЕ

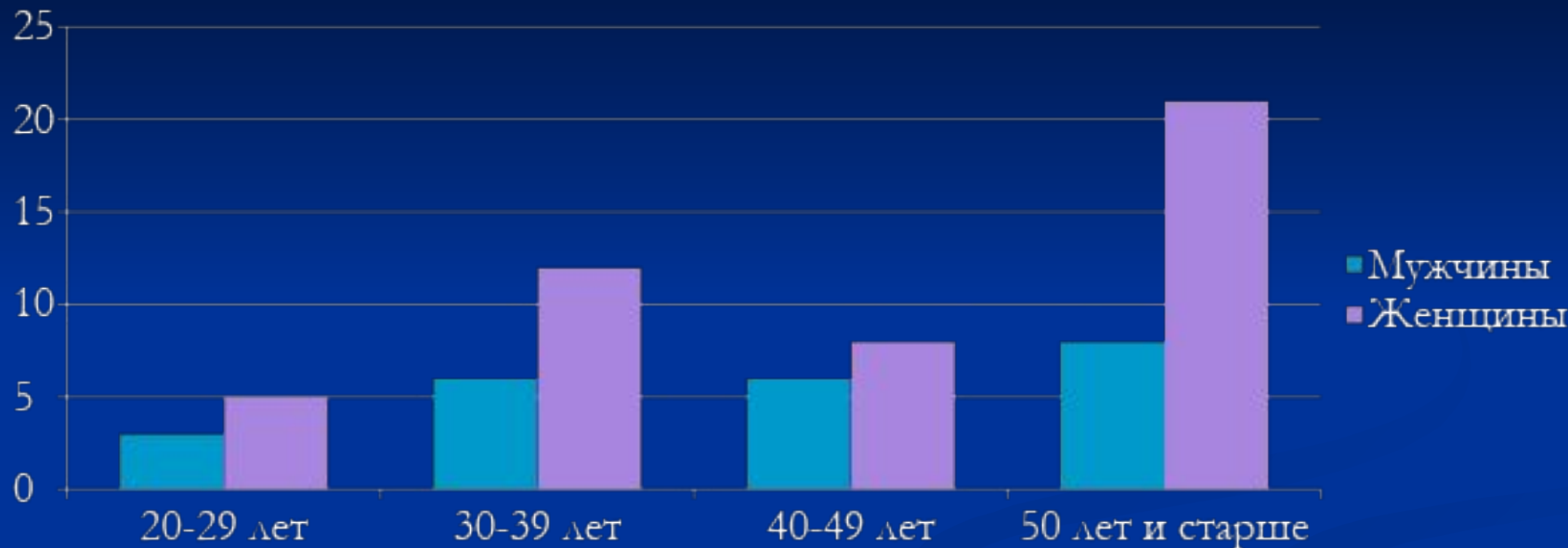
ОПУХОЛИ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ, <i>n</i> = 69	МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ ТИП ОПУХОЛИ ПО КЛАССИФИКАЦИИ МКБ-10-О (ЛИОН, 2005)	КОЛИЧЕСТВО БОЛЬНЫХ
Доброкачественные, <i>n</i> = 54 (78%)	Плеоморфная аденома 8940/0	47
	Опухоль Уортина 8561/0	6
	Мономорфная аденома, БДУ 8140/0	1
Злокачественные, <i>n</i> = 15 (22%)	Аденокистозный рак 8200/3	4
	Рак в плеоморфной аденоме 8941/3	3
	Аденокарцинома, БДУ 8140/3	3
	Мукоэпидермоидный рак 8430/3	2
	Муцинозная карцинома 8480 /3	1
	Плоскоклеточный рак БДУ 8070/3	1
	Базально-клеточная аденокарцинома 8147/3	1

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ОПУХОЛЕЙ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ ПО ЛОКАЛИЗАЦИИ

ОПУХОЛИ (n=69)	ПОДЧЕЛЮСТНАЯ ЖЕЛЕЗА	ОКОЛОУШНАЯ ЖЕЛЕЗА	МАЛЫЕ ЖЕЛЕЗЫ
Доброкачественные (n=54), абс. / %	6 / 11	47 / 87	1 / 2
Злокачественные (n=15), абс. / %	3 / 20	10 / 67	2 / 13

Достоверность различий по критерию $\chi^2 - p > 0,05$

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БОЛЬНЫХ ПО ПОЛУ И ВОЗРАСТУ



Тип опухоли	Возраст, годы Me [Q1; Q3]	Достоверность различий по <i>U</i> -критерию Манна – Уитни
Доброкачественные	58 [35; 67]	$p = 0,071$
Злокачественные	45 [33; 56]	

КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ

Признак	Доброкачественные опухоли (<i>n</i> = 54)	Злокачественные опухоли (<i>n</i> = 15)	Значимость различий
Длительность заболевания, мес. (<i>Me</i> [<i>Q1</i> ; <i>Q3</i>])	24 [12; 60]	36 [12; 120]	<i>p</i> = 0,342*
Длительность заболевания 10 лет и более, абс./%	8/15	7/47	<i>p</i> = 0,022**
Рецидив, абс.	2	2	<i>p</i> = 0,161* <i>p</i> = 0,342**
Наличие боли, абс./%	1/2	4/27	<i>p</i> = 0,001*
Отягощенный онкологический анамнез, абс.	3	3	<i>p</i> = 0,326*
Ускорение роста, абс./%	7/13	3/20	<i>p</i> = 0,790**
Размер опухоли, см (<i>Me</i> [<i>Q1</i> ; <i>Q3</i>])	2 [2; 3]	2 [2; 3]	<i>p</i> = 0,732*
Признаки инфильтрирующего роста, и/или метастазы, абс./%	—	6/40	—

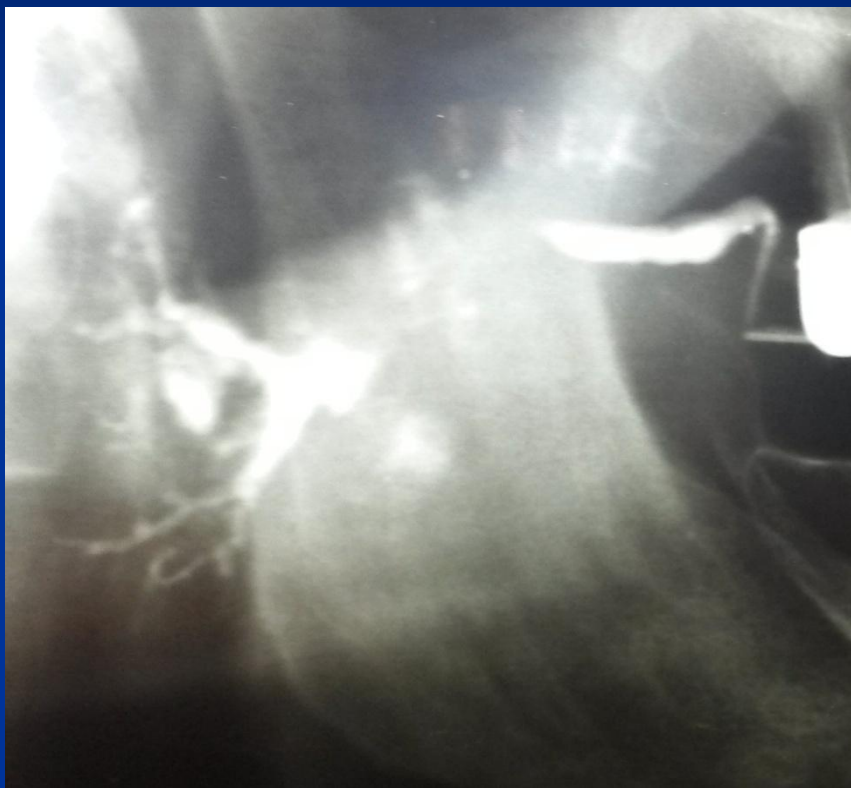
Примечание: *n* – количество наблюдений; * – статистическая значимость различий по *U*-критерию Манна–Уитни; ** – статистическая значимость различий по критерию *Z*.

УЛЬТРАЗВУКОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

ПРИЗНАКИ	ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫЕ ОПУХОЛИ, $n = 18$	ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ ОПУХОЛИ, $n = 8$	ДОСТОВЕРНОСТЬ РАЗЛИЧИЙ ПО КРИТЕРИЮ χ^2
Гипоэхогенность, абс. / %	15 / 83	8 / 100	$p = 0,995$
Неоднородность, абс. / %	14 / 78	8 / 100	$p = 0,918$
Нечеткость границ опухоли, абс. / %	1 / 6	2 / 25	$p = 0,550$
Неровность краев опухоли, абс. / %	6 / 33	4 / 50	$p = 0,895$
Кровоток в опухоли, абс. / %	6 / 33	4 / 27	$p = 0,895$

СИАЛОГРАФИЯ

Пациент И., 60 лет
Плоскоклеточный рак



Пациентка Б., 42 года
Плеоморфная аденома



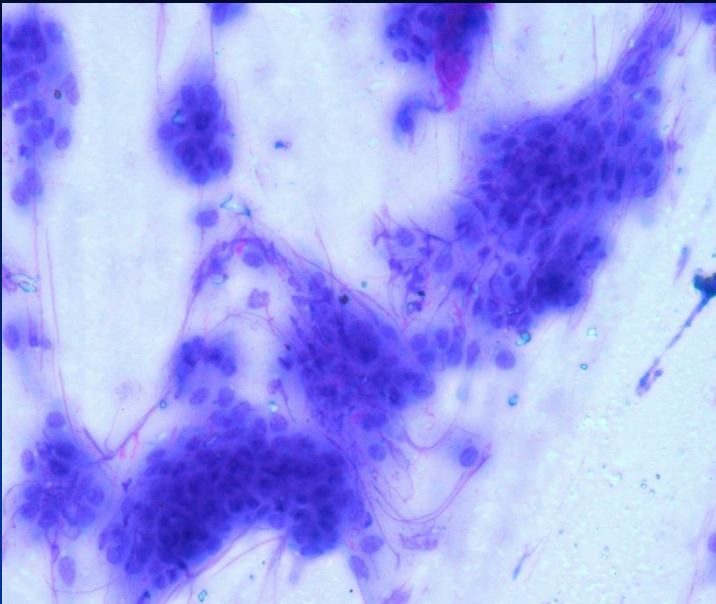
МСКТ-ПРИЗНАКИ ОПУХОЛЕЙ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ

Диагностические признаки	Доброкачественные опухоли ($n = 11$)	Злокачественные опухоли ($n = 6$)	Достоверность различий по U -критерию Манна-Уитни
Плотность до введения контраста, Me [Q1;Q3]	29 [36-42] HU	41 [36-42] HU	$p = 0,03$
Соотношение плотности до и после введения контраста, Me [Q1;Q3]	2,7 [2; 3]	2 [1,5-2]	$p = 0,046$
Нечёткость границ, абс. /%	2 /18,8	3 / 50	$p = 0,016$
Неоднородность, абс./%	10/90,9	5/83,3	$p = 0,291$
Неровность краев, абс./%	10/90,9	6/100	$p = 0,345$
Признаки инвазивного роста опухоли, абс. /%	нет	3 / 50	-

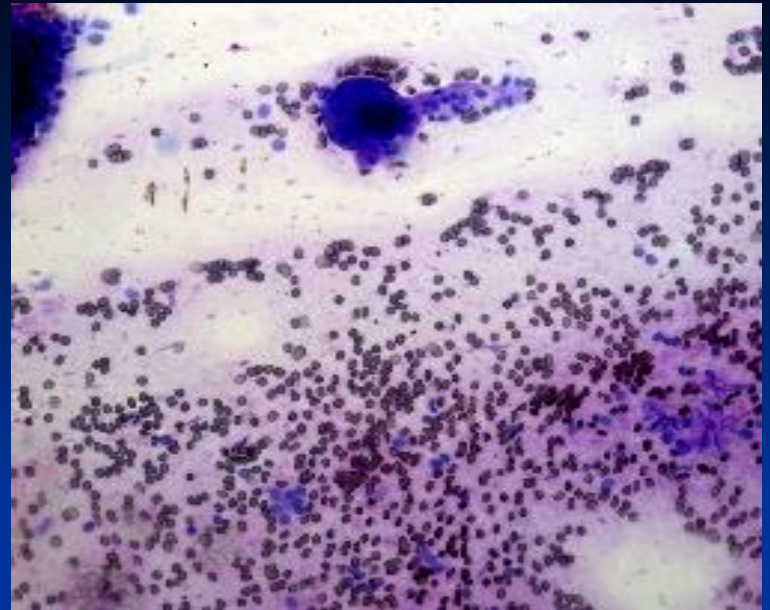
АСПИРАЦИОННАЯ ПУНКЦИЯ ТОНКОЙ ИГЛОЙ

ОПУХОЛИ	РЕЗУЛЬТАТЫ КЛАССИФИКАЦИИ ПО РЕШАЮЩИМ ПРАВИЛАМ		КОЛИЧЕСТВО НАБЛЮДЕНИЙ
	отнесение к первой группе	отнесение ко второй группе	
Первая группа (доброкачественные)	53*	1***	54
Вторая группа (злокачественные)	9*	6**	15
ВСЕГО	62	7	69
ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ТОЧНОСТЬ		82 %	
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ		100 %	
СПЕЦИФИЧНОСТЬ		50 %	

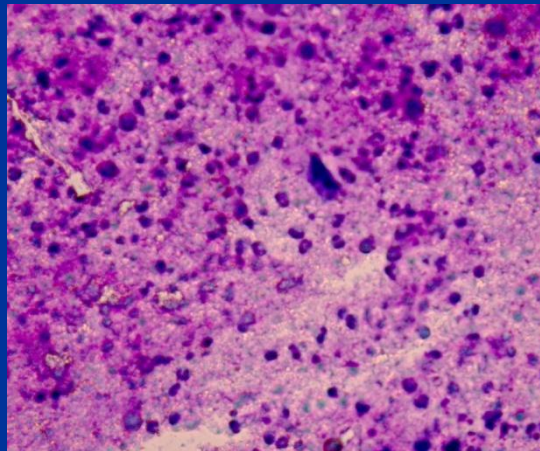
Примечание: * – нет признаков клеточной атипии; ** – есть признаки клеточной атипии; *** – наряду с клетками плеоморфной аденомы небольшой участок, напоминавший цитологическую картину злокачественной опухоли.



Плеоморфная аденома. АПТИ.
Азур-эозин. Об. 40×.
Пласты клеток опухоли, среди
которых виден оксифильный
внеклеточный матрикс.



Аденокистозный рак. АПТИ.
Азур-эозин. Об. 20×.
Клетки опухоли окружают
внеклеточный матрикс.



Аденолимфома. АПТИ
Азур-эозин. Об. 40×
«Грязный» фон мазка; множество
онкоцитов, зрелые лимфоциты;
клетки фолликулов; макрофаги

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРА ПРОЛИФЕРАЦИИ Ki-67

- Г. Киль, лунка планшета № 67, 1983 г.
- 10-я хромосома 10q25ter
- Все фазы клеточного цикла, кроме фазы G_0
- Используется в большинстве исследований [Mercel D. E., McGuier W. L., 1990]
- Моноклональные мышиные антитела Ki-67 (ДАКО, Дания)

ПОДГОТОВКА ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

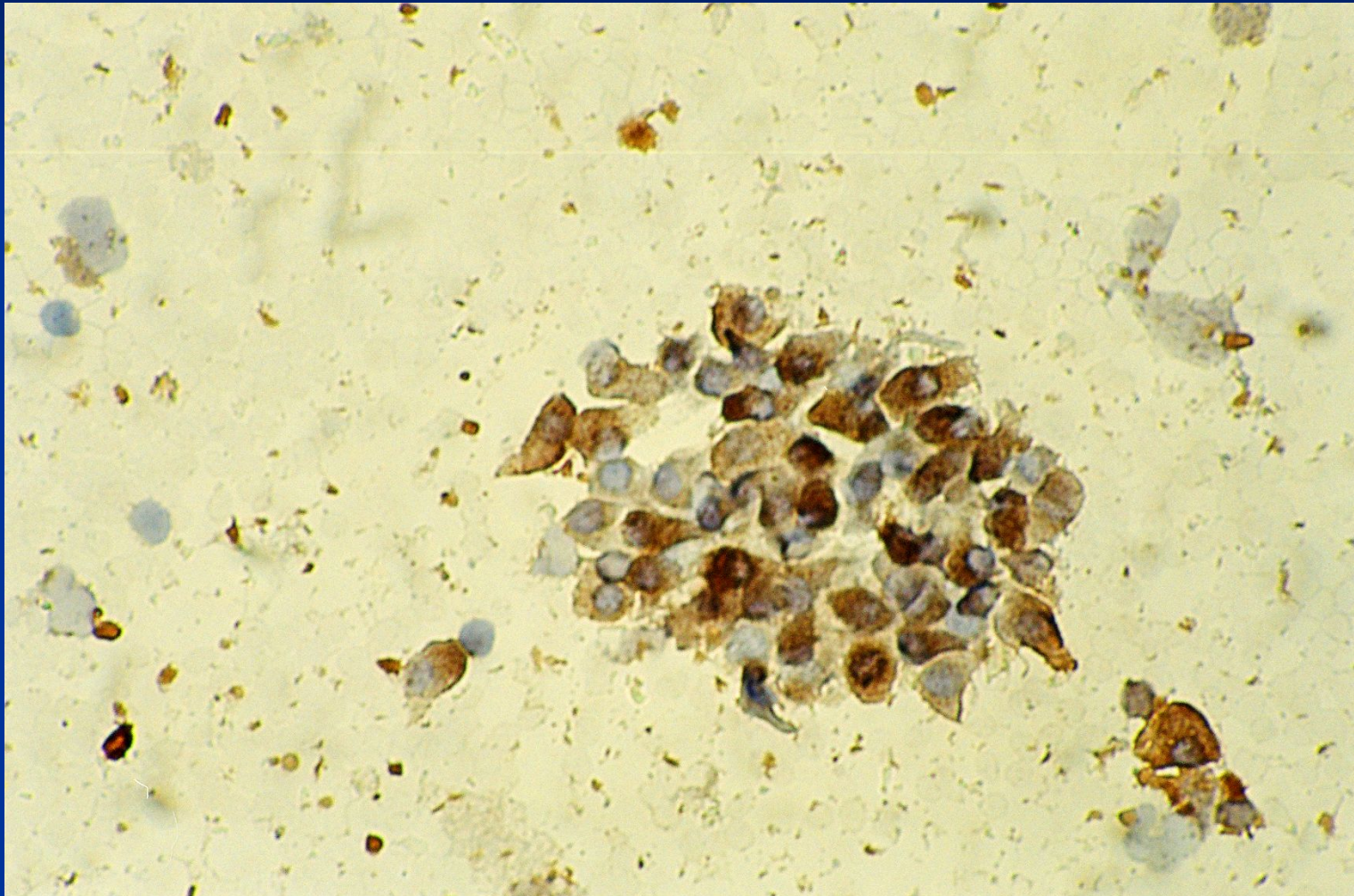
Шприц с иглой 22 G, мазки для
иммунофенотипирования и
окраски, микропробирка
Эппендорф со средой накопления
(10%-й раствор альбумина,
реополигюкин, раствор Хэнкса -
1:1:1)

Цитоцентрифуга Shandon Cytospin 4
- (1000 об./мин в течение 5 мин) для
получения монослойных мазков в
очерченном поле диаметром 6 мм



МИТОТИЧЕСКИЙ ИНДЕКС

– процент позитивных клеток, ядра которых окрашивались в коричневый цвет, в случайно выбранных полях зрения



ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ИНДЕКС КИ-67 В ОПУХОЛЯХ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ

ОПУХОЛИ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ	ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ИНДЕКС КИ-67 (%) *				
	Медиана	Минимум	Максимум	Нижняя квартиль	Верхняя квартиль
Доброкачественные	3	1	18	2	5
Злокачественные	20	3	50	12	32

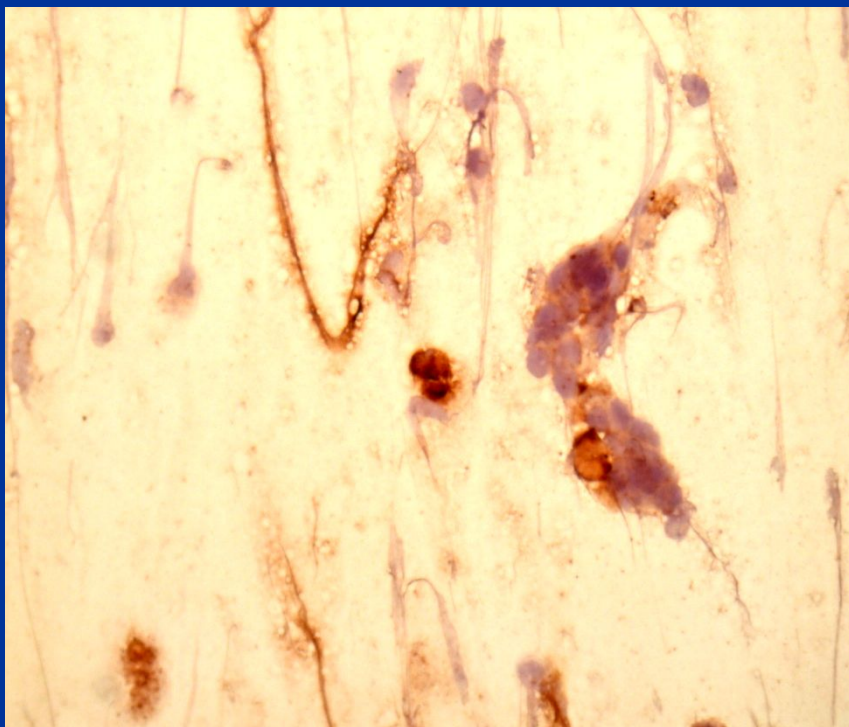
*ДОСТОВЕРНОСТЬ РАЗЛИЧИЙ ПО U КРИТЕРИЮ МАННА-УИТНИ $p < 0,05$



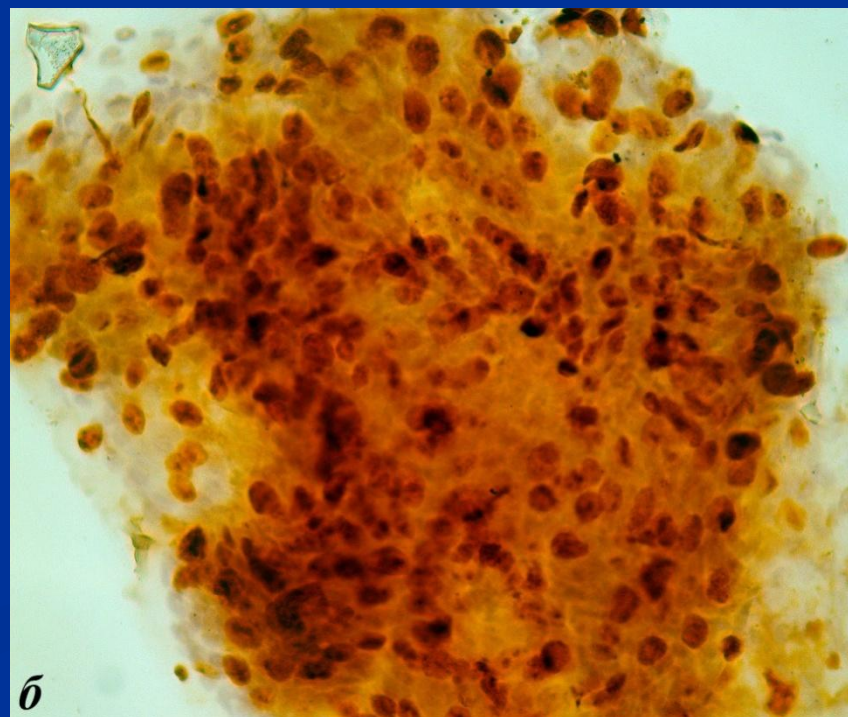
Антиген КИ-67 в клетке мономорфной аденомы, БДУ 8140/0 добавочной доли левой околоушной слюнной железы. АПТИ. Иммуноцитохимический метод. Об. 63х.

ЭКСПРЕССИЯ КИ-67 В КЛЕТКАХ ОПУХОЛЕЙ

Пациентка О., 75 лет.
Плеоморфная аденома
Об. 40х



Пациентка Д., 58 лет.
Аденокистозный рак
Об. 40х



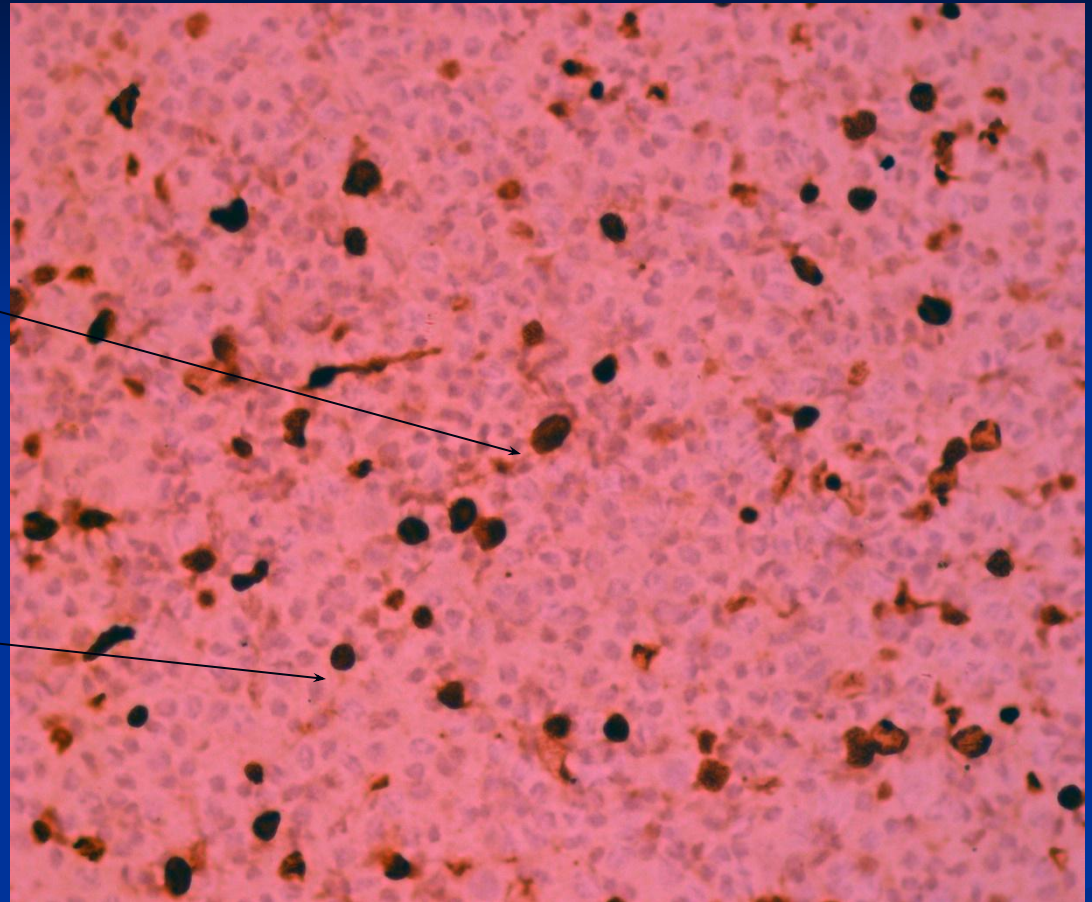
ЭКСПРЕССИЯ Ki-67 В ОПУХОЛИ УОРТИНА

Пролиферативный
индекс Ki-67:

в клетках эпителия

в среднем составил
2,1 % (95 % ДИ = от 1 до
3,2 %);

в лимфоцитах -
от 0 до 30 %.



Антиген Ki-67 в клетках аденолимфомы
околоушной слюнной железы.

АПТИ. Иммуноцитохимический метод. Об. 40х.

ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ИНДЕКС КИ-67 В ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЯХ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ

КЛИНИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ	ИНДЕКС Ki-67, % Me [Q1; Q3]	ДОСТОВЕРНОСТЬ РАЗЛИЧИЙ ПО U КРИТЕРИЮ МАННА-УИТНИ
КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ИНФИЛЬТРИРУЮЩЕГО РОСТА И МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ, n=6	16 [12-25]	$p > 0,05$
ОТСУТСТВУЮТ ПРИЗНАКИ ИНФИЛЬТРИРУЮЩЕГО РОСТА И МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ, n=9	20 [12-32]	

КОРРЕЛЯЦИЯ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК С КЛИНИЧЕСКИМИ И МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ПРИЗНАКАМИ ОПУХОЛЕЙ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ

ОПУХОЛИ	КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ				
	Размер опухоли	Быстрый рост	Рецидив опухоли	Стадия опухоли	Вариант строения
Доброкачественные (плеоморфная аденома)	$r = 0,3889^*$ $p = 0,004$	$\rho = 0,233^{**}$ $p > 0,05$	$\rho = 0,703^{**}$ $r = 0,333^*$ $p < 0,05$	-	$\rho = - 0,109$ $p > 0,05$
Злокачественные	$r = 0,264$ $p = 0,342$	$\rho = - 0,214$ $p > 0,05$	$\rho = 0,137$ $p > 0,05$	$\rho = 0,137^{**}$ $p > 0,05^{**}$	-

*Метод ранговой корреляции Пирсона

**Метод ранговой корреляции Спирмена

Дискриминантный анализ – статистический метод, позволяющий с помощью решения уравнений линейных классификационных функций отнести объект с определенным набором признаков (симптомов) к одному из известных классов
[Михалевич И. М., Юрьева Т. Н., 2015]

Задачи:

- оценить информативность различных признаков (симптомов), включенных и не включенных в линейные дискриминантные функции (уровень значимости по F -критерию соответствовал $p < 0,05$);
- найти коэффициенты линейных классификационных функций (ЛКФ);
- определить классификационную матрицу с оценками точности диагностики новообразований слюнных желез;
- сравнить классификационные матрицы при включении в признаки пролиферативного индекса Ki-67 и без него.

МАТЕМАТИКО-СТАТИСТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ

МОДЕЛЬ № 1

(без включения индекса Ki-67)

- x_1 – длительность заболевания;
- x_2 – боль;
- x_3 – инфильтрация окружающих органов и тканей;
- x_4 – поражение нервов;
- x_5 – метастазы
- x_6 – возраст больного
- x_7 – рецидив опухоли

МОДЕЛЬ № 1

(с включением индекса Ki-67)

- x_1 – длительность заболевания;
- x_2 – боль;
- x_3 – инфильтрация окружающих органов и тканей;
- x_4 – поражение нервов;
- x_5 – метастазы;
- x_6 – результаты цитологического исследования;
- x_7 – пролиферативный индекс Ki-67.

УРАВНЕНИЯ

ДИСКРИМИНАНТНЫХ ФУНКЦИЙ

■ Модель № 1

$$F_1 = -0,48 - 0,27 \times x_1 - 0,72 \times x_2 - 0,77 \times x_3 - 0,53 \times x_4 + 0,52 \times x_5 - 0,22 \times x_6 - 0,23 \times x_7$$

$$F_2 = -4,59 + 0,96 \times x_1 + 2,59 \times x_2 + 2,76 \times x_3 + 1,9 \times x_4 - 1,88 \times x_5 + 0,8 \times x_6 + 0,83 \times x_7$$

■ Модель № 2

$$F_1 = -0,77 - 0,52 \times x_1 - 0,49 \times x_2 - 0,44 \times x_3 - 0,85 \times x_4 + 0,72 \times x_5 - 0,53 \times x_6 - 1,4 \times x_7$$

$$F_2 = -7,5 + 1,87 \times x_1 + 1,84 \times x_2 + 1,67 \times x_3 + 2,95 \times x_4 - 2,48 \times x_5 + 1,73 \times x_6 + 4,6 \times x_7.$$

$F_1 > F_2$ опухоль доброкачественная

$F_2 > F_1$ – опухоль злокачественная

Точность дифференциальной диагностики злокачественных и доброкачественных опухолей слюнных желез с применением комплексной оценки симптомов

ОПУХОЛИ (n=69)	МАТРИЦА КЛАССИФИКАЦИИ	
	МОДЕЛЬ №1 (без оценки Ki-67)	МОДЕЛЬ №2 (с оценкой Ki-67)
ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫЕ, n=54 (точные результаты, %)	96,2	100
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ, n=15 (точные результаты, %)	73,1 *	86,7 **
ИТОГО (точные результаты, %)	91,3	97,1

При отсутствии признаков инфильтрирующего роста и метастазирования - * 66,7 %; ** - 88,9 %.

ВЫВОДЫ

1. Характерные клинические и/или лучевые признаки злокачественных опухолей выявлены у 40 % пациентов с карциномами слюнных желез. При злокачественных новообразованиях длительность заболевания 10 лет и более отмечена в 47 % случаев, боль – в 27 %, при доброкачественных в 15 и в 2 % соответственно ($p < 0,05$). В группе пациентов со злокачественными опухолями слюнных желез с течением болезни 10 лет и более преобладали рак в плеоморфной аденоме и аденокарцинома, БДУ; в 71,4 % симптомы инфильтрирующего роста и метастазы не наблюдались. Отсутствие на ранних стадиях злокачественной трансформации клинических и лучевых признаков малигнизации требует применения дополнительных морфологических методов исследования.

ВЫВОДЫ

2. Диагностическая точность аспирационной пункции тонкой иглой с последующим цитологическим исследованием для определения доброкачественного или злокачественного характера новообразования слюнной железы была равна 85,5 %; правильная верификация морфологического типа – 76,8 %. Точность дифференциальной диагностики плеоморфной аденомы составила 84 %. Высокая чувствительность метода (98,5 %) сочеталась с низкой специфичностью (40 %), что обусловлено большим разнообразием гистологических вариантов злокачественных опухолей и развитием их путем малигнизации доброкачественных.

ВЫВОДЫ

3. Пролиферативная активность клеток, определяемая иммуноцитохимическим методом, в большинстве наблюдений значительно выше в злокачественных новообразованиях слюнных желез по сравнению с доброкачественными ($p < 0,05$). Пролиферативный индекс Ki-67 (медиана и интерквартильная широта) в доброкачественных опухолях равен 3 % (от 2 до 5), в злокачественных – 20 % (от 12 до 32). В плеоморфных аденомах, как наиболее часто встречающихся доброкачественных опухолях слюнных желез, вне зависимости от особенностей их гистологического строения, установлена корреляция между пролиферативным индексом Ki-67, размером новообразования ($r = 0,441; p < 0,05$) и рецидивом ($\rho = 0,356; p < 0,05$).

ВЫВОДЫ

4. Метод комплексной дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей слюнных желез с применением разработанного алгоритма, включающего в себя результаты клинического обследования, лучевого и цитологического исследования в сочетании с оценкой пролиферативного индекса Ki-67, обладает высокой точностью (97,1 %), чувствительностью (100 %) и специфичностью (86,7 %). Предложенный диагностический алгоритм позволяет выявить раннюю стадию малигнизации в отсутствии клинических и лучевых признаков злокачественности.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- Определение индекса пролиферации Ki-67 необходимо проводить в первую очередь в случае наличия боли, длительного течения заболевания (10 лет и более), неясной цитологической картины мазков пунктата.
- Оптимальный срок после забора материала путем АПТИ должен быть не позднее 1 недели.
- При отсутствии клинических, лучевых и цитологических признаков злокачественности, а также при индексе Ki-67 менее 10–12 % опухоль предварительно верифицируется как доброкачественная, и лечение в зависимости от локализации и размеров новообразования проводится в стоматологической поликлинике или отделении челюстно-лицевой хирургии.
- При высоком индексе пролиферации (более 10–12 %) необходимо направление больного к онкологу с целью повторной АПТИ или инцизионной биопсии либо срочного интраоперационного цитологического исследования.

**СПАСИБО
ЗА ВНИМАНИЕ**