

ЛИТЕРАТУРА

1. Аксель Е.М. Злокачественные новообразования молочной железы: состояние онкологической помощи, заболеваемость и смертность. Маммология 2006;(1):9—13.
2. Школьник Л.Д. Ранняя диагностика заболеваний молочной железы. Мед вестн 2005;(30):9—11.
3. Корженкова Г.П. Комплексная рентгено-сонографическая диагностика заболеваний молочной железы. М.: Стром, 2004.
4. Morris E.A. Screening for breast cancer with MRI. Semin Ultrasound CT MR 2003;24(1):45—54.
5. Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В., Клещель А.Е. Неинвазивные и инвазивные опухоли молочной железы. СПб, 2006.
6. Летагин В.П. Опухоли молочной железы: практическое руководство по лечению. М., 2004.
7. Харченко В.П., Рожкова Н.И. Клиническая маммология. Тематический сборник, 1-е изд. М., 2005.
8. Комарова Л.Е. Маммографический скрининг и его роль в снижении смертности от рака молочной железы. Маммология 2006;(3):5—10.
9. Thurfjell E. Mammography screening methods and diagnostic results. Acta Radiol Suppl 1995;395:1—22.
10. Заболотская Н.В., Заболотский В.С. Новые технологии в ультразвуковой маммографии. М.: Стром, 2005.
11. Chao T.C., Lo Y.F., Chen S.C. Color Doppler ultrasound and malignant breast tumors. Breast Cancer Res Treat 1999;57(2):193—202.
12. Сергеев П.В., Поляев Ю.А., Юдин А.Л., Шимановский Н.Л. Контрастные средства. М.: Известия, 2007. с. 401—25.
13. Рожкова Н.И., Прокопенко С.П., Якобе Л.В. Высокие инвазивные технологии при комплексном клинико-рентгено-сонографическом обследовании молочной железы. Мед визуал 2000;(2):34—7.
14. Назаренко Г.И., Юрескул И.В., Богданова Е.Г. Современная диагностика заболеваний молочных желез с использованием передовых медицинских технологий. Мед визуал 2003;(1):54—61.
15. Качанова Т.Н. Магнитно-резонансная томография молочных желез. Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М.: РНЦР, 2001.
16. Корженкова Г.П., Лукьянченко А.Б., Зернов Д.И. Возможности магнитно-резонансной томографии в алгоритме обследования пациентов с заболеваниями молочной железы. Маммология 2006;(1):39—45.
17. Jacobs M.A., Barker P.B., Bluemke D.A. Bening and malignant breast lesions: Diagnosis with multiparametric MR imaging Radiology 2003;229:225—32.
18. Маряшева Ю.А., Морозов С.П., Силицын В.Е. и др. Современные аспекты магнитно-резонансной томографии. Мед визуал 2003;(4):83—8.
19. Knopp M.V., Bourne M.W., Sardanelli F. Gadobenate dimeglumine-enhanced MRI of the breast: Analysis of dose response and comparison with gadopentetate dimeglumine. AJR 2003;181:663—76.

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ И РАДИОЛОГИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В КОМПЛЕКСНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ПАТОЛОГИИ АКСИЛЛЯРНОЙ ОБЛАСТИ

Н.И. Рожкова, В.К. Боженко, Д.К. Фомин, А.И. Плосница, А.А. Ташчан, Е.А. Кудинова, Е.Ф. Васкевич, М.Л. Мазо
ФГУ РНЦР, Москва

MOLECULAR BIOLOGICAL AND RADIOLOGICAL TECHNOLOGIES IN THE COMPLEX DIAGNOSIS OF AUXILIARY PATHOLOGY

N.I. Rozhkova, V.K. Bozhenko, D.K. Fomin, A.I. Ploshnitsa, A.A. Tashchan, E.A. Kudina, E.F. Vaskevich, M.L. Mazo
Russian Radiology Research Center, Moscow

Introduction. A diversity of axillary pathologies was a prerequisite for the development of a new differential approach to diagnosing such conditions. There are new technologies (pre- and intraoperative radionuclide studies, molecular genetic techniques), that have shown themselves, along with classical methods (physical examination, mammography, X-ray and ultrasound studies).

Materials and methods. The subject of the analysis is the results of a comprehensive examination of 502 women aged 22 to 84 years. Different groups were comprehensively examined using both X-ray, ultrasound, radionuclide, and molecular genetic (polymerase chain reaction) studies.

Results. The molecular genetic and cytological studies could provide the actual results in 95 and 84% of cases, respectively; but a comprehensive clinical study and X-ray ultrasound computed tomography could yield them in marginal metastases in only 65.3%.

Conclusion. The authors have proposed the optimal diagnostic algorithm for examination in the ambulatory-outpatient network and specialized institutions.

Key words: axillary diseases, diagnosis, radiological and molecular genetic studies

Результаты успешного лечения заболеваний аксиллярной области зависят от точной дифференциальной диагностики. Однако частота диагностических ошибок остается высокой и колеблется от 8 до 32%.

Публикации, посвященные проблеме образований аксиллярной области, немногочисленны и касаются в основном онкологической патологии. Это связано с высокой частотой метастазирования ряда опухолей, преимущественно рака молочной железы (РМЖ).

Наряду с классическими и широко применяемыми методами обследования (клинический осмотр, маммография, ультразвуковое исследование — УЗИ) появляются новые технологии, хорошо зарекомендовавшие себя в других областях диагностики. Так, с появлением радиофармпрепарата (РФП) ^{99m}Tc -Технетрил, избирательно накапливающегося в опухолевой клетке, метод стал применяться для диагностики и оценки распространенности РМЖ. Лимфография с РФП ^{99m}Tc -Наноцисс позволяет визуализировать и удалить первый («сторожевой») лимфатический узел (ЛУ) на пути оттока лимфы от пораженной молочной железы.

Во время выявления первичной опухоли 30% больных имеют клинически определяемые метастазы, а 30—35% — микрометастазы [1]. В настоящее время для диагностики метастазов в регионарные ЛУ используется клиничко-рентгено-сонографический комплекс методов, который лишь в 70—90% случаев позволяет выявить патологию. Тем не менее есть значительные трудности в дифференциальной диагностике заболевания. Цитологическое исследование является технически простым, сравнительно дешевым методом, однако во многом зависит от способа получения материала и его обработки [2]. Достоверность цитологической диагностики РМЖ составляет 70—85%. В 25—30% случаев пункция оказывается неинформативной и требует поиска новых более эффективных методов исследования. Внедряемые в практику молекулярно-генетические технологии обладают высокой чувствительностью и позволяют выявить единичные раковые клетки среди 100 000—1 000 000 окружающих нормальных клеток [3]. Для обнаружения метастазов наибольшей чувствительностью обладает метод полимеразно-цепной реакции (ПЦР). В литературе наиболее часто упоминается об исследованиях матричной РНК (мРНК) следующих маркеров: РЭА (раковый эмбриональный антиген), СК-19 (цитокератин-19), СК-20 (цитокератин-20), маммаглобин, MUC-1. Сравнение гистологического исследования и молекулярно-генетического метода показывает, что большей информативностью обладает ПЦР-диагностика [4].

Цель исследования — разработка новой технологии для повышения эффективности диагностики при образованиях аксиллярной области с помощью использования современных радиологических и молекулярно-генетических методов.

Материалы и методы

Материалом анализа послужили результаты комплексного обследования 502 женщин в возрасте от 22 до 84 лет со следующими изменениями в подмышечной области: добавочные

дольки в аксиллярной области у 64 (12,7%) пациенток, РМЖ — у 10 (2%), фиброаденома — у 1 (0,2%) больной, кисты молочной железы — у 3 (0,6%), липомы — у 5 (1%), атеромы — у 2 (0,4%), увеличенные ЛУ — у 417 (83%), из них метастазы — у 169 (40,6%), неспецифическая гиперплазия — у 214 (51,4%), липоматоз — у 34 (8%) пациенток.

Рентгенологическое исследование проводили на маммографической установке MAMMODI-AGNOST US фирмы «Philips». Традиционная маммография дополнялась рентгенографией аксиллярной области и при необходимости прицельной рентгенографией. УЗИ осуществлялось с помощью аппаратов SONOLINE Elegra фирмы «Siemens» и Vivid 4 фирмы «GE». Сцинтиграфическое исследование молочных желез и зон регионарного метастазирования проводили с применением РФП ^{99m}Tc -Технетрил на томографической гамма-камере большого поля зрения с коллиматором высокого разрешения для низких энергий гамма-излучения.

Для определения локализации сторожевых ЛУ в качестве лимфотропного РФП использовался меченный ^{99m}Tc -Наноцисс. Поиск сторожевых ЛУ осуществлялся посредством портативного гамма-сканера Neo2000 («NeoProbe», США).

С целью получения биологического материала для цитологического и молекулярно-генетического анализов использовались такие методики, как тонкоигольная аспирационная биопсия под контролем ультразвуковой биолокации и биопсия с применением специального пистолета PRO-MAG 2.2 фирмы «Manan».

В качестве молекулярно-генетического маркера присутствия раковых клеток использовался анализ экспрессии мРНК СК-19. Уровень мРНК СК-19 определяли методом количественной ПЦР в реальном времени [5, 6]. Все образцы также параллельно исследовались цитологическим методом. Для окрашивания мазков использовали панхромную окраску азур-эозином по Романовскому—Гимзе в различных модификациях (по Лейшману, Паппенгейму). Критерием достоверности цитологического и молекулярно-генетического методов явились результаты сопоставления с плановым гистологическим исследованием ткани после выполнения мастэктомии с радикальной лимфодиссекцией.

Выделение тотальной РНК проводили набором RNeasy Plus mini kit («Qiagen», Германия) по протоколу производителя. С помощью реакции обратной транскрипции полученная РНК переводилась в комплементарную ДНК (кДНК). Далее кДНК использовалась для постановки ПЦР в реальном времени.

ПЦР в реальном времени осуществляли на приборе АНК-32К-4Ц (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия).

Критический цикл и исходное количество копий кДНК определяли с помощью компьютерной программы АНК-32, поставляемой вместе с прибором.

Для оценки относительного содержания мРНК СК-19 в том же образце использовали анализ содержания мРНК референтного гена гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы (HPRT1), характеризующегося низким и стабильным уровнем экспрессии мРНК в клетках [7]. Для этого оценивали отношение экспрессии изучаемого гена (СК-19) к уровню экспрессии внутреннего контрольного гена (HPRT1).

При отношении экспрессии мРНК СК-19 к мРНК HPRT1 < 1 делали заключение об отсутствии метастатического поражения в ЛУ. Повышенная экспрессия мРНК СК-19 подтверждала наличие метастаза РМЖ.

Результаты

Диагностика патологии аксиллярной области представляет особый интерес, так как, несмотря на множество существующих диагностических методов, не всегда используется самый рациональный комплекс, обеспечивающий эффективную диагностику в кратчайший срок с наименьшими экономическими затратами.

Среди обследованных пациенток 49% имели гиперплазированные ЛУ, метастазы встречались в 37% наблюдений, острый гнойный лимфаденит — в 2,5%, жировое перерождение ЛУ — в 8%. Контрольную группу составили 40 человек без признаков наличия патологии в ЛУ.

При пальпации аксиллярных областей только в 5% случаев выявлены неизменные ЛУ, что объяснялось невыраженным подкожно-жировым слоем. Эффективность рентгенологического метода составила 22,5%, УЗИ позволило выявить 100% ЛУ. Средний размер их составил 1,14 x 0,85 см, отношение поперечного диаметра к продольному — 1,41. Отношение толщины коркового слоя к диаметру лимфоузла составила 0,19±0,03. В 95% наблюдений определялись ворота (hilus) ЛУ, размер которых достигал 1—2 мм.

Рентгенологические и ультразвуковые методы обладают 100% специфичностью, однако чувствительность маммографии составила 78,6%, а сонографии — 100%. Диагностически значимыми признаками явились отношение поперечного диаметра к продольному (1,1±0,25), характер внутренней структуры, отношение толщины коры к диаметру узла (0,05±0,02).

Для реактивных гиперплазий характерно увеличение размеров ЛУ, равномерное утолщение коркового слоя (98%). При данной патологии чув-

ствительность и специфичность маммографии составили 79 и 97,7%, УЗИ в режиме серой шкалы — 90,3 и 97% соответственно. В итоге при применении всего комплекса исследований чувствительность составила 97,4%, специфичность — 98,7%.

Метастазы РМЖ определились в 40,6% случаев. Характерными рентгенологическими признаками были округлая форма (86%), высокая плотность по сравнению с окружающим фоном (84%), однородная структура (76%), четкость контуров (89,4%). Отношение поперечного диаметра к продольному составило 1,3±0,22. Несмотря на наличие совокупности всех признаков, чувствительность диагностики метастатической природы изменений составила 73,6%.

УЗИ в В-режиме позволяет более точно оценить ранее описанные признаки. В 17,8% наблюдений выявлена сохраненная структура ЛУ. Корковый слой неравномерно расширен, разница толщины составила 4—6 мм. Отношение толщины коры к диаметру ЛУ 0,51±0,23, показатель не имеет статистических различий с показателями при гиперплазии, однако неравномерность расширения коры (70%) однозначно указывала на метастатическую природу изменений.

Цветовая и энергетическая доплерография внесла значимый вклад в дифференциальную диагностику природы изменений. Для метастатического узла в 44,4% случаев характерен периферический кровоток, в 18,9% — деформированный хилусный, в 23,7% — смешанный. Кровоток не удалось выявить в 11,2% измененных ЛУ, что связано с их малыми размерами (< 1 см) и глубоким залеганием. Применение доплерографии в диагностическом комплексе повысило чувствительность обследования до 92,2%, специфичность — до 98,1%.

С целью поиска дополнительных дифференциально-диагностических критериев нами проведена оценка сцинтиграфического исследования молочных желез и зон регионарного метастазирования с применением РФП ^{99m}Tc-(МИБИ)-Технетрил.

Было обследовано 72 пациентки с поражением молочной железы. Поражение аксиллярных ЛУ удалось обнаружить у 6 женщин, из них у 2 изменения не были диагностированы рентгенологическим и ультразвуковым методами. При окончательном патоморфологическом исследовании операционного материала метастатическое поражение ЛУ аксиллярной области было обнаружено у 17 пациенток. У 1 пациентки выявлен микрометастаз в 1 ЛУ. Также было зафиксировано 5 случаев метастазирования, которые не были обнаружены ни одним из лучевых методов.

Чувствительность метода составила 35,3%, специфичность — 100%, точность — 84,7%. Таким

образом, сочетание высокой стоимости процедуры, дозовой нагрузки на пациента и низкой чувствительности метода делают обзорную сцинтиграфию аксиллярных областей нецелесообразной для применения в комплексе методов обследования распространенности РМЖ.

С большей эффективностью радионуклидный метод используется при определении сторожевого ЛУ. Больным с узловой формой РМЖ ($n=30$) за 2—24 ч до операции вводили препарат Наноцисс, меченный ^{99m}Tc . У 26 из них были выявлены сторожевые ЛУ, выполнена их эксцизия и проведено гистологическое исследование.

Для оценки накопления РФП ЛУ до операции использовали обзорную сцинтиграфию. Признаками наличия метастатического поражения служили:

- 1) отсутствие накопления РФП;
- 2) визуализация только 1—2 сторожевых ЛУ при отсутствии накопления РФП в несторожевых ЛУ;
- 3) накопление РФП не носило равномерно уменьшающегося от периферии к центру характера;
- 4) определялись дополнительные очаги накопления РФП неправильной формы.

Показатели чувствительности, специфичности и точности составили 90, 100 и 95% соответственно. На том же уровне они находятся в группе с непальпируемыми аксиллярными ЛУ.

Несмотря на появление множества новых методов диагностики, ведущим остается патоморфологическое исследование биоптата. Цитологическое подтверждение метастатического поражения получено нами в 89% случаев. Такой низкий процент объясняется малыми размерами патологического очага (< 6 мм). Это вызвало необходимость поиска новых более эффективных методов исследования.

Мы изучили возможность использования молекулярно-генетического метода определения мРНК СК-19 для подтверждения метастатической природы изменений в ЛУ. Известно, что клетки костно-мозгового ряда не экспрессируют мРНК и, соответственно, белки СК-19 и СК-20 в норме не обнаруживаются в ЛУ. Выявление мРНК СК-19

(20) свидетельствует о присутствии в ЛУ эпителиальных клеток, т.е. клеток рака.

Данные молекулярно-генетического анализа совпали с данными цитологического анализа в 15 пробах (83,3% от выборки). Из них истинно положительный результат (наличие раковых клеток и присутствие экспрессии СК-19) зафиксирован у 8 больных. Истинно отрицательный результат (отсутствие раковых клеток и экспрессии СК-19 при цитологическом исследовании) имел место у 7 пациенток.

Экспрессия СК-19 в образцах с отрицательным результатом цитологического анализа, но с окончательным подтверждением метастатического поражения ЛУ была показана для 2 пациенток. Таким образом, применение молекулярно-генетического метода позволило установить истинный результат в 95% наблюдений, цитологическое исследование — в 84%, а комплексное клиничко-рентгенологическое ультразвуковое компьютерно-томографическое обследование при краевых метастазах — лишь в 65,3%.

Результаты работы свидетельствуют о том, что анализ экспрессии СК-19 в образцах ЛУ может использоваться в качестве маркера метастазирования.

Заключение

Применение молекулярно-генетических технологий для диагностики метастазов в ЛУ целесообразно при небольшом количестве биопсийного материала, наличии краевых метастазов ЛУ и отрицательных результатах повторного цитологического заключения.

В итоге на основании комплексного обследования разработан клиничко-рентгено-соно-патоморфологический симптомокомплекс, позволяющий проводить дифференциальную диагностику образований аксиллярной области.

Дооперационной уточняющей дифференциальной диагностики образований возможно лишь при комплексном обследовании с использованием клинического метода, рентгенографии, сонографии и методов интервенционной радиологии, что в руках одного специалиста обеспечивает 96,4% точность дооперационного заключения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fisher B., Osborn K., Margolese R. et al. Neoplasms of the breast. In: Cancer medicine. 3d ed. Eds. J. Holland et al. Baltimore, 1993. p. 1706—74.
2. Волченко Н.Н. Цитологическая диагностика опухолей молочной железы. Маммология 2006;(1):35—9.
3. Глузман Д.Ф., Осинский С.П. Молекулярные технологии в диагностике злокачественных новообразований. Doctor 2003;(4): 17—25.
4. Sakaguchi M., Virmani A., Ashfaq R. et al. Clinical relevance of reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of axillary lymph node metastases in breast cancer. Ann Surg Oncol 2003;10(2):117—25.
5. Bustin S.A., Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. Clin Science 2005;109:365—79.
6. Bustin S.A., Benes V., Nolan T. et al. Quantitative real-time RT-PCR — a perspective. J Mol Endocrinol 2003;34:597—601.
7. Ginzinger D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. Exper Hematol 2002;30:503—12.