

ПРЕИМУЩЕСТВА ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГОРМОНАЛЬНОГО СТАТУСА, ОНКОПРОТЕИНА HER2/NEU И БЕЛКА ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ KI67 У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

М.В. Савостикова, Л.В. Мехеда, И.Ю. Коротких, К.П. Лактионов

ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

В статье приведена сравнительная оценка двух диагностических методик — иммуноцитохимического (ИЦХ) и иммуногистохимического (ИГХ) исследований в определении гормонального статуса, онкопротеина HER2/neu и белка пролиферативной активности Ki67 у больных раком молочной железы (РМЖ). Подчеркнута необходимость этих исследований при планировании лечения больных РМЖ.

Ключевые слова: иммуноцитохимия, жидкостная цитология, рецепторы эстрогенов, прогестерона, факторы прогноза.

THE ADVANTAGES OF IMMUNOHISTOCHEMICAL DEFINITION OF THE HORMONE STATUS, HER2/neu ONCOPROTEIN AND Ki67 PROTEIN OF PROLIFERATIVE ACTIVITY IN THE PATIENTS WITH BREAST CANCER

M.V. Savostikova, L.V. Mekheda, I.Yu. Korotkikh, K.P. Laktionov

Federal State Budgetary Institution Russian Oncological Scientific Center named after N.N. Blokhin of the Russian Academy of Medical Sciences

The article contains a comparative evaluation of the two diagnostic procedures — immunocytochemical (ICC) and immunohistochemical (IHC) studies in definition of the hormone status, HER2/neu oncoprotein and Ki67 protein of proliferative activity in the patients with breast cancer. It emphasizes the necessity to conduct these studies in planning treatment for breast cancer.

Key words: immunocytochemistry, liquid-based cytology, estrogen receptors, progesterone receptors, prognostic factors.

Современные тенденции в лечении РМЖ характеризуются стремлением к максимальному улучшению качества жизни больных за счет сокращения объемов оперативного вмешательства и использования высокоэффективных химио- и антигормональных препаратов. Так, установлено, что больным с гормонположительным статусом опухоли в 50–60% случаев успешно проводится антигормональная терапия [5, 6]. Лучшие результаты эндокринной терапии (главным образом тамоксифеном) РМЖ достигаются при РЭ(+) (рецепторы эстрогенов) и РП(+) (рецепторы прогестерона) [3, 17]. Непосредственные положительные результаты лечения фиксируются у 77% больных, а пятилетняя безрецидивная выживаемость возрастает на 20–30% [13, 15, 17].

Рецепторположительные опухоли молочной железы имеют более высокую дифференцировку и более благоприятное клиническое течение по срав-

нению с другими группами новообразований [3, 12]. Но назначение гормонотерапии имеет смысл и при ином рецепторном статусе: ее эффективность составляет 46% при опухолях с РЭ(+) и РП(+) и 27% при РЭ(–) и РП(–). В случаях РЭ — и РП — адекватный ответ на лечение наблюдали в 10–15% [4, 16]. В практических целях для установления положительного гормонального статуса опухоли достаточно иметь 5–10% четко окрашенных клеток [6, 9, 14].

Иммуногистохимический метод (ИГХ), получивший наибольшее распространение в клинической практике, стал «золотым стандартом» в определении рецепторов эстрогенов, прогестерона и онкопротеина HER2/neu в клетках РМЖ. Метод позволяет определить процент положительно реагирующих клеток, оценить степень интенсивности реакции и дать точную рецепторную характеристику опухоли. Однако наряду с достоинствами он имеет

свои недостатки. К ним относятся потеря и маскировка антигена при приготовлении препаратов, длительное время и нередко трудоемкость определения молекулярных маркеров, а также необходимость достаточного объема биологического материала, что в ряде случаев делает выполнение исследования на этапе предоперационного обследования затруднительным [10, 11].

Дооперационное ИГХ исследование проводят на столбиках ткани, полученных при сог-биопсии. Многие специалисты сетуют на преобладание стромальных и на скудность клеточных элементов в препаратах. По сравнению с тонкоигольной аспирационной биопсией (ТАБ) эта процедура более травматична [1, 2, 7].

В качестве альтернативы ИГХ методу все большее практическое значение приобретает метод определения экспрессии молекулярных маркеров на клеточном уровне — иммуноцитохимический (ИЦХ) [8]. Материал для такого исследования может быть получен при пункционной биопсии — простой, малотравматичной процедуре, не сопровождающейся такими осложнениями, как кровотечение, воспаление, и в то же время позволяющей получить полноценный клеточный материал. А применение новой технологии получения цитологических препаратов с использованием жидкостных систем и concentra-

цией клеток дает возможность приготовить высококачественные монослойные мазки. ИЦХ не требует и больших временных затрат и может быть выполнена в течение трех часов.

Сопоставление результатов изучения экспрессии молекулярных маркеров при ИГХ и ИЦХ методах проводилось рядом исследователей [1, 2, 9]. Совпадение составило от 61% до 92% случаев [10, 12, 13].

Цель настоящей работы — определить возможности ИЦХ метода в оценке гормонального и HER/2neu статуса, пролиферативной активности (Ki67) при раке молочной железы, а также сравнить их с результатами ИГХ исследования.

Выполнено 156 ИЦХ и 176 ИГХ исследований (132 ИГХ исследований удаленной опухоли и 44 ИГХ сог-биопсии) от 39 больных РМЖ. До операции проведено полихимиотерапевтическое (ПХТ), лучевое (ЛТ) и антигормональное лечение 10 пациенткам. Возраст пациенток варьировал от 23 до 84 лет (медиана 53,7 года). Все ИЦХ исследования проводились на материале, полученном путем соскоба с разреза опухоли, выполненного непосредственно после операции и помещенного в питательную среду накопления (V=800 мкл).

Клинические стадии заболевания распределились следующим образом: Tis — в одном наблюдении, T1 — в 15, T2 — в 16, T3 — 0, T4 — у семи пациенток (табл. 1).

В 35 из 39 наблюдений (90%) гистологически поставлен диагноз — «инфильтративный протоковый рак» (ИПР), в двух — «инфильтративный дольковый» (ИДР), в одном случае — метапластический комбинированный вариант с элементами железистого и плоскоклеточного рака и в одном — медуллярная карцинома (табл. 2).

В работе были использованы моноклональные кроличьи и мышьиные антитела (ДАКО): к рецепторам эстрогенов (клон 1D5, разведение 1:35), к рецепторам прогестерона (клон 636, разведение 1:50), к белку пролиферативной активности Ki-67 (клон MiB-1, разведение 1:50 — 1:75), онкопротеину C-erbB-2 (разведение 1:250–1:350). Для визуализации иммунной реакции использовали систему LSAB+ Detection System (ДАКО) согласно инструкции, выявление пероксидазной активности проводили с помощью 3,3-диаминобензидина (DAB), цитопрепараты докрашивали гематоксилином Майера. Реакции проводились на цитоспиновых монослойных мазках. Подсчет иммунопозитивных клеток проводили в областях с максимальным проявлением диаминобензидина на 300–500 опухолевых клеток на микроскопе «ZEISS» (Germany).

Таблица 1

Распределение клинических стадий

Стадия заболевания	Число пациенток
Tis	1
T1	15
T2	16
T3	0
T4	7
Всего	39

Таблица 2

Гистологические формы РМЖ

Гистологический диагноз	Число пациенток
ИПР	35
ИДР	2
Медуллярный рак	1
Метапластический комбинированный рак	1
Всего	39

Для оценки ИЦХ результатов экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона использовалась балльная шкала оценки Dako Cytomation, где учитывается не только процент окрашенных клеток, но и степень выраженности экспрессии антигена:

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.
- От 0 до 1% — 1.
- От 1% до 10% — 2.
- От 10% до 33% — 3.
- От 33% до 66% — 4.
- От 66% до 100% — 5.

Определение общего балла TS:

TS = IS + PS.

Интерпретация результатов:

- 0–2 балла — негативный результат.
- 3 и более — позитивный результат.

Для оценки экспрессии HER2 используют следующие критерии:

«0» — отсутствие окрашивания или окрашивание менее 30% опухолевых клеток с любой интенсивностью;

«1+» — слабое неполное мембранное окрашивание более 30% опухолевых клеток;

«2+» — от слабого до умеренного окрашивание всей цитоплазматической мембраны более 30% опухолевых клеток;

«3+» — сильное окрашивание всей цитоплазматической мембраны более 30% опухолевых клеток.

Мы получили следующие результаты: ИЦХ исследование при оценке экспрессии четырех маркеров (ЭР, ПР, Ki67, C-erbB-2) совпали с ИГХ (независимо от того, на чем проводились исследования: на материале сог-биопсии или на фрагменте опухоли после операции) в 30 из 39 наблюдений (77%). Совпадение экспрессии по трем-четырем маркерам наблюдали в 37 из 39 случаев (95%).

В 11 наблюдениях ИГХ исследование проводилось до начала лечения на «столбике» опухоли, и при сопоставлении с ИЦХ результаты совпали

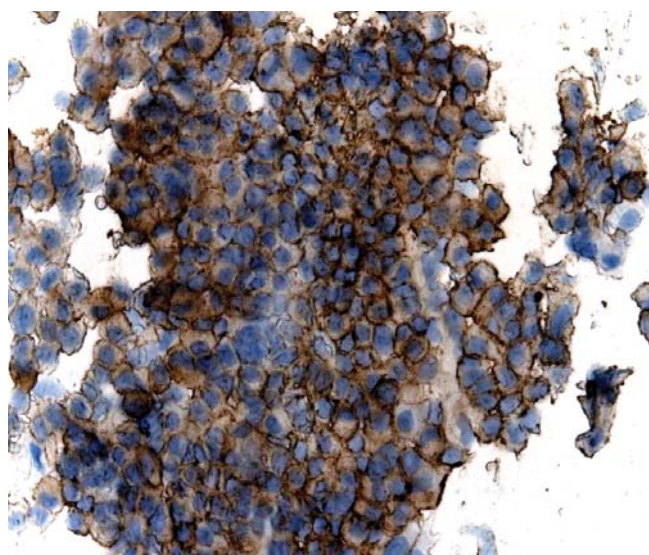


Рис. 1. Умеренная экспрессия белка пролиферативной активности Ki-67 в клетках рака молочной железы. Увеличение × 200

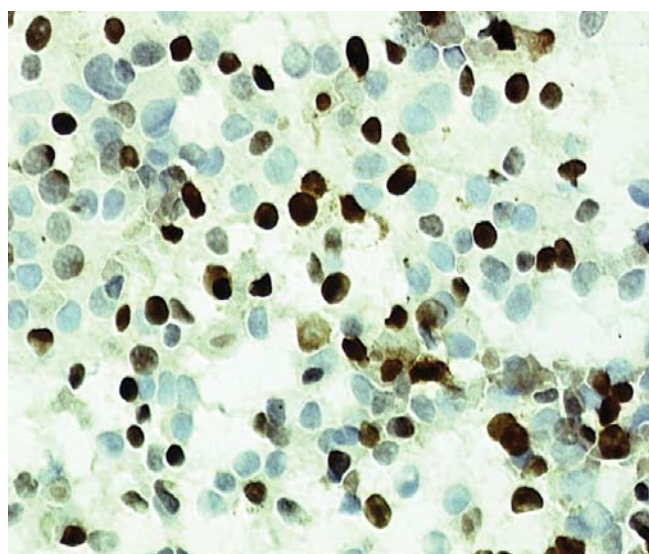


Рис. 2. Выраженная экспрессия онкопротеина C-erbB-2 в клетках рака молочной железы (+2). Увеличение × 200

только в 45,5% наблюдений (в пяти из 11). Аналогичный анализ после удаления опухоли выявил совпадение в 82% наблюдений (27 из 33) (табл. 3).

Таблица 3

Результаты сопоставления результатов ИЦХ и ИГХ на сог-биопсии новообразования, ИЦХ и ИГХ удаленной опухоли

ИГХ метод	ИЦХ метод (% совпадений)	ИЦХ метод (не совпало %)
Сог-биопсия опухоли	45,5% (5 из 11)	54,5% (6 из 11)
Удаленная опухоль	82% (27 из 33)	18% (6 из 33)

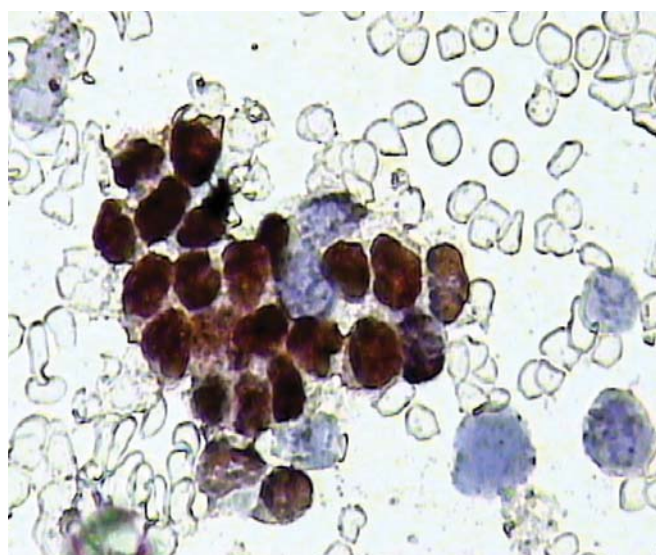


Рис. 3. Экспрессия РЭ в клетках рака молочной железы. 8 баллов. Увеличение $\times 400$

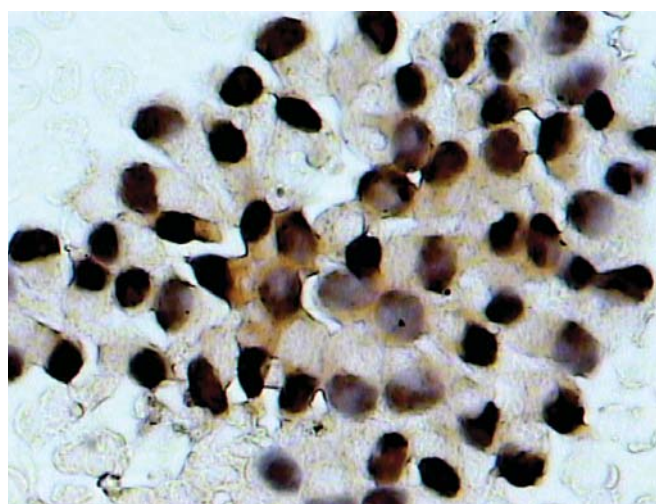


Рис. 4. Экспрессия РП в клетках рака молочной железы. 8 баллов. Увеличение $\times 400$

В шести наблюдениях пациенткам РМЖ проведены три исследования:

- ИГХ материала COR-биопсии опухоли;

- ИГХ удаленной опухоли;
- ИЦХ соскоба с разреза опухоли во время операции.

Были получены следующие результаты: ИЦХ и ИГХ дооперационной сог-биопсии совпали в одном из шести наблюдений (17%), ИЦХ и ИГХ удаленной опухоли совпали в пяти из шести наблюдений (83%), тогда как ИГХ сог-биопсии и ИГХ опухоли совпали только в двух из шести наблюдений (33%). При этом основной массе пациенток, которым проводилась сог-биопсия, за время, прошедшее между исследованием и хирургическим вмешательством, проводилось какое-либо неоадьювантное лечение, что, несомненно, могло повлиять на рецепторный статус новообразования.

При анализе ИЦХ и ИГХ методов (независимо от того, на чем проводились исследования: на материале сог-биопсии или на ткани удаленной опухоли) в оценке гормонального статуса при РМЖ положительная экспрессия РЭ при ИЦХ методе отмечалась в 69,2%, при ИГХ — в 74,3%, экспрессия РП при ИЦХ методе выявлена в 54%, при ИГХ — 58,9%, выраженная положительная экспрессия онкопротеина (+3) C-erbB-2 на цитоспиновых цитологических препаратах наблюдалась в 13% исследований, на гистопрепаратах — 8%. В 79% наблюдений отмечено совпадение ИЦХ и ИГХ в определении белка пролиферативной активности Ki67 практически абсолютное, в 21% — показатели ИЦХ были ниже ИГХ результатов на 10–15% (табл. 4).

Сопоставление данных ИЦХ и ИГХ исследования у 39 больных РМЖ показало совпадение результатов при определении рецепторов эстрогенов и прогестерона в 89,7% и 84,6% соответственно, пролиферативной активности (Ki-67) — в 79%, онкопротеина C-erbB-2 — в 95% наблюдений. Ряд исследователей отметили, что мембранные и цитоплазматические маркеры чаще положительно окрашиваются при ИЦХ в цитологических препаратах, чем гистологических при ИГХ.

Таблица 4

Результаты ИЦХ и ИГХ исследований

Маркеры	ИЦХ результаты	ИГХ результаты	% совпадений
ЭР	27 (69,2%)	29 (74,3%)	89,7%
ПР	21 (54%)	23 (58,9%)	84,6%
Белок пролиферативной активности Ki67	В 79% наблюдений отмечено совпадение ИЦХ и ИГХ в определении белка пролиферативной активности Ki67 практически абсолютное, в 21% — показатели ИЦХ были ниже ИГХ результатов на 10–15%.		
Онкопротеин C-erbB-2 (+3)	5 (13%)	3 (8%)	95%

Возможно, это связано с более щадящей обработкой цитопрепаратов, отсутствием потери и маскировки антигенов при проводке и депарафинизации материала с использованием агрессивных химических реагентов, что негативно сказывается на мембранных и цитоплазматических рецепторах. Несовпадение экспрессии белка пролиферативной активности в 21% наблюдений при ИЦХ и ИГХ исследовании объясняется асинхронностью митотической активности в опухолевых клетках и, как следствие, значительным разбросом в значениях индекса Ki-67 в пределах одной опухоли.

Отметим влияние проводимых до операции ПХТ и ЛТ на результаты ИЦХ и ИГХ исследований: из 10 пациенток, которым проводилось предоперационное лечение, у пяти наблюдали расхождение результатов ИЦХ и ИГХ по одному-двум маркерам. Если исключить из расчета сопоставления ИЦХ и ИГХ у таких больных, то совпадение двух методов (ИЦХ и ИГХ) повышается с 77% до 86%.

Корреляция экспрессии биологических маркеров при ИЦХ и ИГХ исследованиях изучали отечественные и зарубежные исследователи. Авторы считают, что цитологическое определение прогностических маркеров при РМЖ коррелирует с гистологическим и может иметь большой «вес» в выборе метода лечения, в том числе у пациенток с неоперабельными опухолями.

Выводы

- Сопоставление данных ИЦХ и ИГХ исследования (независимо от того, проводилось ПХТ или нет, на каком материале проводились ИГХ исследования) у 39 больных РМЖ показало совпадение результатов при определении экспрессии РЭ и РП в 89,7% и 84,6% соответственно, белка Ki-67 — 79% , онкопротеина C-erbB-2 в 95% наблюдений.

- В половине наблюдений (пяти из десяти) у больных РМЖ после химиотерапии происходит блокада антигенных белков, поэтому результаты экспрессии искажаются. Поэтому, если исключить результаты сопоставления ИЦХ и ИГХ у пролеченных пациенток РМЖ, совпадение двух методов изменится с 77% до 86%.

- Мембранные и цитоплазматические HER2/neu маркеры чаще проявляют положительное окрашивание в цитологических, чем в гистологических препаратах (гиперэкспрессия HER2/neu при ИГХ исследовании выявлялась в трех наблюдениях, а в ИЦХ — в пяти).

- Результаты исследований уже на небольшом материале (6 наблюдений) показали, что ИГХ исследование гормонального, HER2/neu статуса и белка пролиферативной активности Ki67 на сор-биопсийном материале значительно реже (33%) совпадает с ИГХ удаленной опухоли, чем ИЦХ исследование соскоба с разреза опухоли на цитоспиновых препаратах (83%).

Пример 1

Пациентка К., 71 год, диагноз: РМЖ T4N2M0				
ИГХ сор-биопсии опухоли:	ЭР — 0 баллов	ПР — 0 баллов	белок Ki-67 — 38%	онкопротеин C-erbB-2 — (+3)
Проведено 4 курса ПХТ: трастузумаб+лапатиниб.				
ИЦХ исследование соскоба с опухоли	ЭР- 0 баллов	ПР- 0 баллов	белок Ki-67 — 5%	онкопротеин C-erbB-2 — (0)
Произошла блокада антигенного белка C-erbB-2 иммуноглобулинами (трастузумаб) на поверхности клеточной мембраны, в результате чего онкопротеин HER2/neu не выявляется				

Пример 2

Пациентка А., 58 лет, диагноз: РМЖ T2N0M0				
ИГХ сор-биопсии опухоли:	ЭР — 6 баллов	ПР — 3 балла	белок Ki-67 — 40%	онкопротеин C-erbB-2 — (0)
Проведено 6 курсов ПХТ: ФАС + лучевая терапия				
ИЦХ исследование соскоба с опухоли	ЭР- 0 баллов	ПР- 0 баллов	белок Ki-67 — 5%	онкопротеин C-erbB-2 — (0)
ИГХ исследование удаленной опухоли	ЭР- 0 баллов	ПР- 0 баллов	белок Ki-67 — 10%	онкопротеин C-erbB-2 — (0)
В исследовании отчетливо демонстрируется воздействие и блокада антигенных белков при ПХТ и ЛТ терапии				

Учитывая все вышесказанное, в качестве альтернативы ИГХ метода может быть предложен метод определения экспрессии молекулярных маркеров на цитологических препаратах — иммуноцитохимический. Отсутствие маскировки и потери антигенов, экономия дорогих сывороток и сокращение времени исследования делают ценность ИЦХ метода неоспоримой. Применение ИЦХ определения биомаркеров в качестве альтернативы ИГХ методу должно стать

таким же «золотым» стандартом в установлении рецепторного и HER2/neu статуса в клетках РМЖ, как ИГХ исследование. Особенно это важно для пациенток, которым первым этапом лечения показана не операция, а химио- или лучевая терапия при исходно диссеминированном раке или прогрессирующей ранее пролеченной опухоли, а также в случаях, когда хирургическое вмешательство противопоказано в связи с сопутствующей патологией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волченко Н.Н., Савостикова М.В. Возможности иммуноцитохимического исследования в онкологии: Тезисы // Новости клинической цитологии России. 2003. Т. 7. № 1–2. С. 49–50.
2. Волченко Н.Н., Савостикова М.В. Опыт применения иммуноцитохимического исследования в онкологической практике: Тезисы // Новые диагностические и лечебные технологии в онкологии. Томск, 2003.
3. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Тканевые маркеры как факторы прогноза при раке молочной железы // Практическая онкология Т. 3. № 1. 2002. С. 38–44.
4. Глузман Д.Ф., Скляренок Л.М., Надгорная В.А., Крячок И.А. Диагностическая иммуноцитохимия опухолей. Киев: Морион, 2003. С. 28–31.
5. Глухова Е.И. Экспрессия белков, контролирующих апоптоз, при раке молочной железы // Дис. ... канд. мед. наук, М., 2003.
6. Петров С.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Казань, 2000. С. 13–14.
7. Пожарисский К.М., Леенман Е.Е. Значение иммуногистохимических методик для определения характера лечения и прогноза опухолевых заболеваний // Архив патологий. № 5. Т. 62. М., 2000. С. 3–11.
8. Семглазов В.Ф. Карцинома in situ молочной железы — морфологические и клинические проблемы // Практическая онкология. 2002. Т. 3. № 1. С. 60–68.
9. Бедард У.С., Поллетт А.Ф., Леунг Ю., О'Мэлли Ф.Р. Assessment of thin-layer breast aspirates for immunocytochemical evaluation of HER2 status. // Acta Cytol 2003; 47: 979–84.
10. Bozzetti C., Nizzoli R., Naldi N., et al. Fine-needle aspiration technique for the concurrent immunocytochemical evaluation of multiple biologic parameters in primary breast carcinoma // Breast Cancer Res Treat. 1994. V.32. P. 221–228.
11. Cecilia Bozzetti Ph.D.1, Nicola Personeni M.D.1, Rita Nizzoli Ph.D.1, Annamaria Guazzi Ph.D.1, Marcella Flora Ph.D.2, Cristina Bassano Ph.D.2, Francesca Negri M.D.1, Eugenia Martella M.D.3, Nadia Naldi Ph.D.1, Vittorio Franciosi M.D.1, Stefano Cascinu M.D. HER-2/neu amplification by fluorescence in situ hybridization in cytologic samples from distant metastatic sites of breast carcinoma // Cancer (Cancer Cytopathol) 2003; 99:310–5.
12. Nizzoli R., Bozzetti C., Naldi N., et al. Comparison of the results of immunocytochemical assays for biologic variables on preoperative fine-needle aspirates and on surgical specimens of primary breast carcinomas // Cancer Cytopathology, 2000. V. 90. P. 61–66.
13. Nizzoli R., Bozzetti C., Savoldi L., et al. //Immunocytochemical assay of estrogen and progesterone receptors in fine needle aspirates from breast cancer patients// Acta Cytol. 1994. V. 38. P. 933–938.
14. Sartelet H., Lagonotte E., Lorenzato M., Duval I., Lechki C., Rigaud C., Cucherousset J., Durlach A., Graesslin O., Abboud P., Doco-Fenzy M., Quereux C., Costa B., Polette M., Munck J.N., Birembaut P. Comparison of liquid based cytology and histology for the evaluation of HER-2 status using immunostaining and CISH in breast carcinoma // PubMed — indexed for MEDLINE.
15. Solomides C.C., Zimmerman R., Bibbo M. Semiquantitative assessment of c-erbB-2 (HER-2) status in cytology specimens and tissue sections from breast carcinoma. // 1999. Apr; 21(2):121–5.
16. Toshiaki Moriki M.D., Tamotsu Takahashi C.T., I.A.C., Shousuke Ueta C.T., Miko Mitani C.T., Miho Ichien M.T. 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 // Diagnostic Cytopathology, P. 251–256. April 2004.
17. Troncone G., Panico L., Vetrani A., de Divitiis B., Zeppa P., Fulciniti F., Pettinato G., Palombini L. C-erbB-2 expression in FNAB smears and matched surgical specimens of breast cancer // PubMed — indexed for MEDLINE.