

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЦЕПТОРОВ ЭСТРОГЕНА α И ПРОГЕСТЕРОНА В КЛЕТКАХ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ ОБРАЗОВАНИЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

М.В. Савостикова

ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Цель: изучение экспрессии рецепторов эстрогена α и прогестерона в доброкачественных образованиях молочной железы с применением иммуноцитохимического метода исследования (ИЦХ).

Материалы и методы: В работе проведено 200 иммуноцитохимических исследований экспрессии рецепторов эстрогена α и прогестерона в клеточном материале 100 больных с гормонально-диспластическими образованиями молочной железы: фиброзно-кистозная болезнь (ФКБ) — 63 наблюдения, фибroadенома (ФА) — 32, гинекомастия — 5.

Результаты: Результаты исследований показали, что положительная реакция обоих рецепторов или одного из них в доброкачественных образованиях выявлялась в 51%. Коэкспрессия ЭР+ и ПР+ наблюдалась у 35% больных: практически в половине исследований (47%) при ФА, в трети (27%) — при ФКБ и в 60% при ГМ. Экспрессия рецепторов эстрогена α отмечалась у 41 пациента из 100, прогестерона — у 61.

Выводы: Выявление экспрессии рецепторов эстрогена α и прогестерона при гормонально-диспластических и доброкачественных образованиях молочной железы, а также корреляция этой экспрессии с пролиферативными и диспластическими изменениями в эпителии долек и протоков молочной железы в ряде наблюдений, требует от клиницистов применения принципиально новых подходов к лечению этой патологии.

Ключевые слова: иммуноцитохимия, рецепторы эстрогена α и прогестерона, фиброзно-кистозная болезнь, фибroadенома, гинекомастия.

IMMUNOCYTOCHEMICAL DEFINITION OF ESTROGEN RECEPTORS α (ALPHA) AND PROGESTERONE RECEPTORS IN THE CELLS OF BENIGN BREAST TUMORS

M.V. Savostikova

Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center»
of the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Objective: the study of the expression of estrogen receptors α and progesterone receptors in benign breast tumors using the method of immunocytochemical analysis (ICC).

Materials and Methods: 200 immunocytochemical analyses of the expression of estrogen receptors α (alpha) and progesterone receptors were performed in the study on the cellular material of 100 patients with hormonal — dysplastic tumors of the breast: fibrocystic breast disease (FCD) was observed in 63 cases, fibroadenoma (FA) — in 32, gynecomastia — in 5 cases.

Results: The results of the studies showed that the positive reaction of both receptors or either of them in benign tumors was revealed in 51% of cases. Co-expression of ER+ and PR+ was observed in 35% of the patients: in nearly half of the studies (47%) in the patients with FA, in one third (27%) — with FCD and in 60% — in case of GM. The expression of estrogen receptors α was registered in 41 patients of 100, and progesterone — in 61.

Conclusions: the detection of the expression of estrogen receptors α and progesterone receptors with hormonal — dysplastic and benign tumors of the breast as well as the correlation of this expression with the proliferative and dysplastic changes in the lobular and ductular epithelium of the breast in series of observations, necessitates that clinicians should use the fundamentally new approaches to the treatment of this pathology.

Key Words: immunocytochemistry, estrogen receptors α and progesterone receptors, fibrocystic breast disease, fibroadenoma, gynecomastia.

РМЖ редко возникает *de novo*, как правило, ему предшествует выраженная пролиферация эпителия долек и протоков молочной железы с развитием тяжелой дисплазии эпителия на фоне различных гормонально диспластических и доброкачественных образований: фиброзно-кистозной болезни, фиброаденомы, склерозирующего и пролиферирующего аденоза, гинекомастии. [1–5]. Мастопатия — полиэтиологическое заболевание, которое зависит от многих факторов: генетических, эндокринных, факторов окружающей среды. Согласно современным концепциям, молочные железы находятся под влиянием ряда гормонов: релизинг-факторов гипоталамуса, гонадотропных гормонов гипофиза (ФСГ и ЛГ), ХГ, пролактина, тиреотропного гормона, кортикостероидов, инсулина и половых гормонов [6].

Первостепенная роль принадлежит эстрогену и прогестерону, именно они способствуют процессам усиленного клеточного размножения, отвечают за процессы пролиферации и апоптоза клеток железистого эпителия. Выявленная гормониндуцированная пролиферация создает условия для большей частоты нерепарируемых и закрепляемых в последующих клеточных поколениях повреждений ДНК или мутаций. Проникая в клетку посредством диффузии, эстрогены связываются с соответствующими рецепторами, локализующимися в ядре, в связи с чем их относят к семейству ядерных рецепторов, обладающих свойствами активаторов транскрипции эстрогензависимых генов [1, 2, 7].

В нормальной ткани молочной железы женщины в пременопаузе 6–11% клеток экспрессируют рецепторы эстрогенов (РЭ). С возрастом количество рецептороположительных клеток возрастает: после 55 лет у 34% женщин экспрессируются РЭ с преобладанием α -фракции [8, 9]. При атипичической гиперплазии и внутриэпителиальном раке экспрессия РЭ отмечается в 78–100%. Коэкспрессия РЭ и маркера пролиферативной активности Ki-67 связывается с риском развития РМЖ [10–12].

По мнению ряда авторов, малигнизация при непролиферативных формах фиброзно-кистозных мастопатий (ФКМ) составляет 0,9%, при умеренно выраженной пролиферации — 2%, при резко выраженной пролиферации — 31%. [6]. Ежегодно в США регистрируется 500 тысяч доброкачественных заболеваний молочной железы. При развитии в них тяжелых диспластических изменений эпителия риск развития рака составляет 20–25% в течение трех и четырех десятилетий жизни, 18% — пятого, 15% — шестого и 10% — седьмого десятилетия жизни [13, 14].

Развитие РМЖ на фоне гинекомастии у мужчин выявляют в 30–70% наблюдений. Частота развития рака на фоне пролиферативных форм гинекомастии зависит от длительности заболевания и периода наблюдения за больным, риск перехода узловой формы в рак колеблется от 9,3 до 12,2%. В большинстве проведенных исследований указывается на более высокий уровень рецепторов эстрогенов у мужчин, чем у женщин. Клинически значимые уровни рецепторов эстрогенов в опухоли отмечают приблизительно в 75% наблюдений, а рецепторов прогестерона — в 43% [15, 16].

Цель настоящей работы — изучить экспрессию рецепторов эстрогена α и прогестерона в доброкачественных образованиях молочной железы с применением иммуноцитохимического метода исследования (ИЦХ).

Материалы и методы

Проведено 200 ИЦХ исследований клеточного материала 100 больных с гормонально-диспластическими, доброкачественными опухолями молочной железы: фиброзно-кистозная болезнь (ФКБ) — 63 наблюдения, фиброаденома (ФА) — 32, гинекомастия — 5 (ГМ). Материал для исследования забирался интраоперационно с поверхности патологического образования в виде соскобов.

ИЦХ анализ проводился на цитологических монослойных мазках, полученных методом жидкостной цитологии: накопление материала в специальной питательной среде с последующим центрифугированием на системе Cytospin-3 (Shandon, UK), в режиме 1000 об./мин. в течение 5 минут. Для визуализации иммунной реакции использовали систему LSAB+ Detection System («ДАКО»), выявление пероксидазной активности проводили с помощью 3,3-диаминобензида (ДАБ), цитопрепараты докрашивали гематоксилином Майера. В работе использованы моноклональные кроличьи и мышьиные антитела (фирма «ДАКО», Дания): к рецепторам эстрогенов (α) (клон 1D5, разведение 1:35), к рецепторам прогестерона (клон 636, разведение 1:50).

Подсчет иммунопозитивных клеток проводили в областях с максимальным проявлением ДАБ, при анализе не менее 300 клеток, с использованием микроскопа «Axioskop» (OPTON, West Germany).

Для оценки ИЦХ результатов экспрессии рецепторов эстрогена α (РЭ) и прогестерона (РП) использовалась балльная шкала оценки Dako Cytomation, где учитывался как процент окрашенных клеток, так и степень выраженности экспрессии антигена:

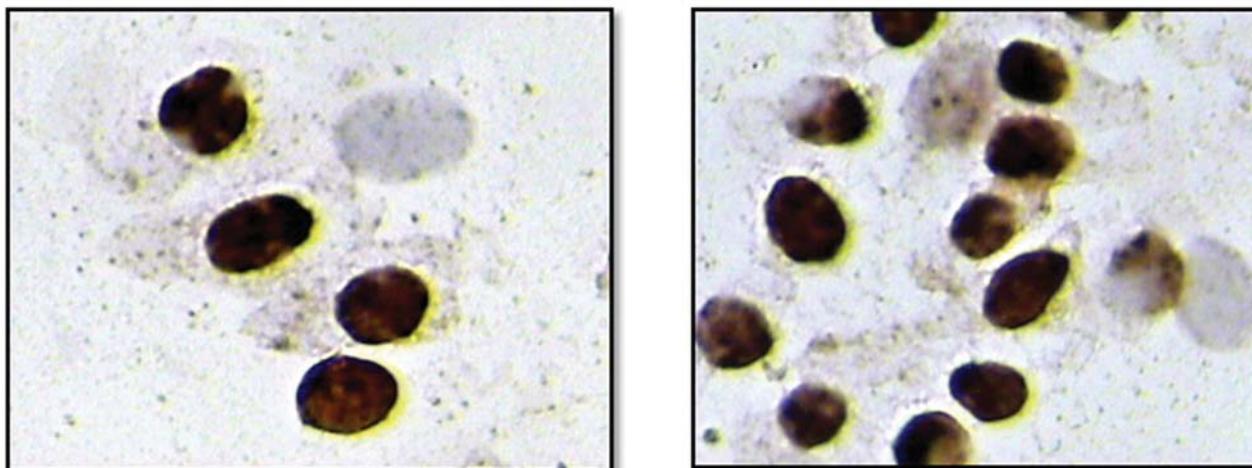


Рис. 1. Экспрессия РЭа в клетках ФКБ: 8 баллов. (X1000)

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 баллов — позитивный результат.

Результаты и обсуждение

ИЦХ исследование экспрессии РЭ и РП проводилось у 100 больных в возрасте от 18 и до 77 лет (средний возраст 43 года). Результаты исследования показали, что положительная реакция обоих рецепторов или одного из них в доброкачественных образованиях выявлялась в 51%. Коэкспрессия ЭР+ и ПР+ наблюдалась у 35% больных: практически в половине исследований (47%) при ФА, в трети (27%) — при ФКБ и в 60% при ГМ. Экспрессия рецепторов эстрогена α отмечалась у 41 пациента из 100, прогестерона — у 61 (табл. 1, рис. 1, 2).

Эстрогенпозитивный фенотип (ЭР+ ПР–) наблюдался в небольшом проценте — 3% при ФКБ и ФА (возраст пациентов 54, 41 и 77 лет); только прогестеронпозитивный фенотип (ЭР– ПР+) при ФА и ФКБ отмечался чаще — в 13%, т.е. в 9 наблюдениях при ФКБ и 4 — при ФА (возраст пациентов — от 35 до 65 лет, средний — 47,5 года) (табл. 1).

Таблица 1

Варианты экспрессии РЭа и РП при доброкачественных образованиях молочной железы

Доброкачественные образования МЖ	Кол-во набл./кол-во исследований	ЭР+ ПР+	ЭР+ ПР–	ЭР– ПР+	ЭР– ПР–
Фиброзно-кистозная болезнь	63/126	17(27%)	2(3%)	9(14%)	35(55,6%)
Фибroadенома	32/64	15(47%)	1(3%)	4(12,5%)	12(37,5%)
Гинекомастия	5/10	3(60%)	—	—	2(40%)
ВСЕГО	100/200	35 (35%)	3(3%)	13 (13%)	49(49%)
		51%			49%

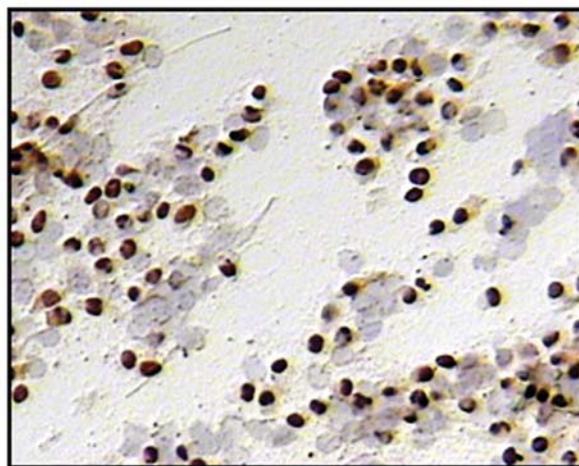
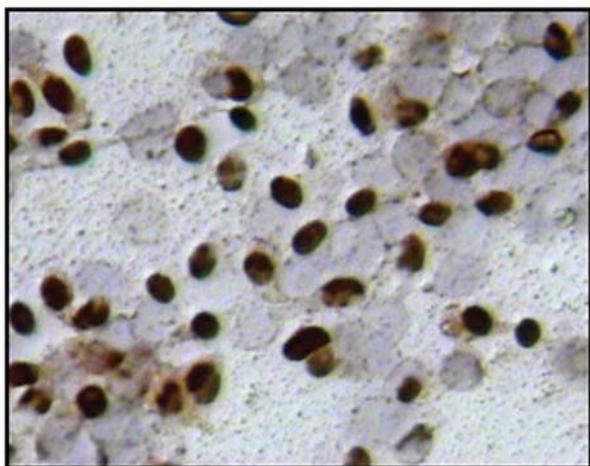


Рис. 2. Экспрессия РП в клетках ФКБ: 6 баллов. (Х400;200)

Наличие или отсутствие рецепторов гормонов существенно не зависело от возраста пациентов: с гормонопозитивным фенотипом (ЭР+ ПР+) возраст колебался от 18 до 71 года (медиана — 46 лет), отсутствие экспрессии наблюдалось у женщин в возрасте от 22 до 66 лет (медиана — 44 года).

Таблица 2

Степень выраженности экспрессии рецепторов РЭ и РП при доброкачественных образованиях молочной железы

Маркеры	Степень выраженности экспрессии рецептора		
	3–4 балла	5–6 баллов	7–8 баллов
При ФКБ			
РЭ+	11(58%)	6(31,5%)	2(10,5%)
РП+	15(58%)	9(35%)	2(7%)
При ФА			
РЭ+	10(62,5%)	5(31%)	1(6,5%)
РП+	11(58%)	6(31,5%)	2(10,5%)
При гинекомастии			
РЭ+	2(66,7%)	1(33,3%)	—
РП+	2(66,7%)	1(33,3%)	—
Всего	51(59,3%)	28(32,6%)	7(8,1%)

Таблица 3

Зависимость экспрессии РЭ от наличия или отсутствия менструального цикла

Наличие менструального цикла	Степень выраженности экспрессии РЭ+			Отсутствие экспрессии РЭ–
	3–4 балла	5–6 баллов	7–8 баллов	
Менструируют (число/%)	16(61,5%)	8(31%)	2(7,5%)	39(60%)
	Всего 26 (40%)			
Не менструируют (число/%)	5(55,6%)	3(33,3%)	1(11,1%)	21(70%)
	Всего 9(30%)			



Рис. 3. Экспрессия РП в клетках ФА: 7 баллов. (X1000; 200)

Степень выраженности экспрессии ЭР была различной: выраженная (7–8 баллов) экспрессия ЭР+ выявлена в 8% исследований — в единичном случае при ФА и в двух при ФКБ; умеренная (5–6 баллов) экспрессия ЭР+ отмечена в целом в 31,5%: у 5 пациенток с ФА, у 6 — с ФКБ и одним наблюдением гинекомастии; слабая (3–4 балла) экспрессия ЭР+ преобладала — (60,5%): 10 исследований при ФА, 11 при ФКБ и в 2-х наблюдениях при гинекомастии (табл. 2, рис. 3).

Экспрессия РП имела такую же тенденцию, что и экспрессия РЭ: выраженная (7–8 баллов) реакция отмечалась только у четырех пациенток (8,3%) — в двух наблюдениях при ФА и также в двух при ФКБ; умеренная (5–6 баллов) экспрессия прогестерона отмечена в 33,4%: в шести наблюдениях при ФА, девяти — при ФКБ и одном при гинекомастии; слабая (3–4 баллов) экспрессия РР+ наблюдалась чаще всего — 58,3%: в 11 наблюдениях при ФА, 15 при ФКБ и двух — при гинекомастии (табл. 2).

Таблица 4

Зависимость экспрессии РП от наличия или отсутствия менструального цикла

Наличие менструального цикла	Степень выраженности экспрессии РП+			Отсутствие экспрессии РП–
	3–4 балла	5–6 баллов	7–8 баллов	
Менструируют (число/%)	22(63%)	9(26%)	4(11%)	30(46%)
	Всего 35(54%)			
Не менструируют (число/%)	6(60%)	4(40%)	0	20(66,7%)
	Всего 10(33,3%)			

Таблица 5

Гистологические особенности ФКБ в зависимости от гормонального статуса образования

Гистологические особенности при ФКБ	Положительная экспрессия или коэкспрессия РЭ и РП	Отсутствие экспрессии РЭ и РП
1. ФКБ с пролиферацией клеток эпителия разной степени выраженности (умеренная, выраженная)	8(28,5%)	8(23,1%)
2. ФКБ с диспластическими изменениями и очагами карциномы in situ.	14(50%)	12(34,3%)
Всего	22 из 28 (78,5%)	20 из 35(57,4%)
Средний возраст	43,5(30–65)	46,7(32–73)

Из 95 пациентов (пять мужчин с гинекомастией) с доброкачественными образованиями молочных желез — 65 (68,5%) были с сохраненным менструальным циклом, 30 (31,5%) — в менопаузе. Анализ полученных данных показал, что у менструирующих пациенток положительная экспрессия РЭ (40%) и РП (54%) выявлялась несколько чаще, чем у женщин в менопаузе — 30% (РЭ+) и 33,3% (РП+) (табл. 3–4).

Анализ полученных данных показал, что изменения по типу пролиферации, дисплазии клеток эпителия разной степени выраженности вплоть до появления микроочагов карциномы *in situ* (CIS) в доброкачественных образованиях молочной железы с гормонопозитивным фенотипом (РЭ+, РП+) выявлялись несколько чаще — в 67%, чем при патологии с отсутствием рецепторов — 57%. В большей степени патологические изменения с РЭ+ и РП+ отмечены при ФКБ — в 78,5%, против 57,4% с РЭ-, РП- статусом: пролиферация и дисплазия клеток эпителия протоков разной степени выраженности с гормонопозитивным фенотипом отмечена в 28,5% и 50% наблюдений, тогда как при той же патологии с отсутствием экспрессии рецепторов гормонов: в 23,1% и 34,3% соответственно. Средний возраст пациенток при ФКБ с рецепторопозитивным фенотипом и рецепторонегативным практически не отличался: 43,5 года и 46,7 соответственно (табл. 5).

При анализе характера патологии в зависимости от рецепторного статуса при ФА получены несколько иные данные: прогностически рецепторонегативные ФА «выглядели» несколько хуже — пролиферация клеток эпителия и/или очаги дисплазии в образованиях с отрицательным гормональным статусом (РЭ-, РП-) выявлялась несколько чаще — 58%, чем при рецепторопозитивном (РЭ+, РП+) фенотипе ФА — 45%. Средний возраст пациенток с наличием или отсутствием экспрессии рецепторов в ФА практически совпал: 40,1 и 40,4 соответственно (табл. 6).

При гинекомастии у мужчин в трех из пяти наблюдений ИЦХ исследование выявило коэкспрессию РЭ+ и РП+: в двух вариантах слабую и в одном — умеренную. Гистологически в них была отмечена пролиферация клеток эпителия. Средний возраст пациентов с гинекомастией при экспрессии рецепторов гормонов был немного старше — медиана 48,7 года, чем при гинекомастии с отсутствием рецепторов — медиана 42 года.

Выводы:

1. Экспрессия рецепторов эстрогена α и/или прогестерона в доброкачественных образованиях молочной железы с применением ИЦХ анализа выявлялась в 51% исследований.

2. Коэкспрессия ЭР+ и ПР+ наблюдалась у 35% больных: практически в половине исследований при ФА — 47%, в трети при ФКБ — 27% и у трех пациентов из пяти при ГМ.

3. У пациенток с наличием менструального цикла положительная экспрессия РЭ (40%) и РП (54%) в доброкачественных образованиях молочной железы выявлялась несколько чаще, чем у женщин в менопаузе — 30% (РЭ+) и 33,3% (РП+).

4. ИЦХ определение степени выраженности экспрессии ЭР и ПР в доброкачественных образованиях молочной железы показало следующее:

3–4 балла — в 58–66,7% исследований;

5–6 баллов — в 31–35%;

7–8 баллов — в 6,5–10,5% наблюдений.

5. Достоверной зависимости наличия или отсутствия экспрессии рецепторных белков, степени их выраженности в доброкачественных образованиях молочной железы от возраста пациентов не выявлено.

6. Изменения по типу пролиферации, дисплазии клеток эпителия разной степени выраженности, вплоть до появления микроочагов карциномы *in situ* (CIS), в доброкачественных образованиях молочной железы с гормонопозитивным фенотипом (РЭ+, РП+) выявлялись несколько чаще —

Таблица 6

Гистологические особенности ФА в зависимости от гормонального статуса образования

Гистологические особенности при ФА	Положительная экспрессия или коэкспрессия РЭ и РП	Отсутствие экспрессии РЭ и РП
ФА с пролиферацией клеток эпителия разной степени выраженности (умеренная, выраженная)	6 (30%)	5(41,4%)
ФА с очагами дисплазии эпителия разной степени выраженности (D-I; D-II; D-III)	3(15%)	2(16,6%)
Всего	9 из 20 (45%)	7 из 12 (58%)
Средний возраст	40,1 (18–71)	40,4 (22–57)

Опухоли молочных желез

в 67%, чем при патологии с отсутствием рецепторов — 57%. В большей степени патологические изменения с РЭ+ и РП+ отмечены при ФКБ — в 78,5% против 57,4% с РЭ–, РП– статусом.

Таким образом, выявление экспрессии рецепторов эстрогена α и прогестерона при гормонально-диспластических и доброкачественных

образованиях молочной железы, а также корреляция этой экспрессии с пролиферативными и диспластическими изменениями в эпителии долек и протоков молочной железы в ряде наблюдений требуют от клиницистов применения принципиально новых подходов к лечению этой патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берштейн Л.М. Гормональный канцерогенез. СПб.: Наука, 2000.
2. Берштейн Л.М. Современная эндокринология гормонозависимых опухолей // Вопросы онкологии. 2002; 48 (4): 496–504.
3. Dooby W.C. et al. Ductal lavage for detection of cellular atypia in woman of high risk for breast cancer. J. Nat. Cancer. 2001; 93; 1624–1632.
4. Lhon G. et al. Cyclin D in breast premalignancy and early breast cancer: implications for prevention and pre-treatment. Cancer Letters. 2001; 162: 3–17.
5. Takama F., Kanuma T., Wang D. Oestrogen receptor beta expression and depth of myometrial invasion in human endometrial cancer. Brit. J. Cancer. 2001. Vol. 84. P. 545–549.
6. Корженкова Г.П. Фиброзно-кистозная мастопатия: вариант нормы или болезнь? // Онкогинекология, 2012; 3: 52.
7. Gustafsson Jan-Ake. Warner Margaret. Saji Shigeira. Estrogen receptors: Karo Bio AB. 2001; 0016230: 5.
8. Shoker B.S., Jarvis C., Clarke R.B., Anderson E., Munro C., Davies MPA, Sibson D.R., Sloane J.P. «Abnormal regulation of the estrogen receptor in benign breast lesions». J. Clin Pathol 2000; 53: 778–783.
9. Stark A., Hulka B.S., Joens S., Novotny D., Thor A. et al. Her 2/new Amplification in Benign Breast Disease and the Risk of Subsequent Breast Cancer. J. Clin. Oncol. 2000, 18 (2): 267–276.
10. Page D.L. et al. Atypical Lobular Hyperplasia as unilateral predictor of breast cancer risk : a retrospective cohort study. Lancet 2003; 361: 125–129.
11. Shoker B.S., Jarvis S.C., Sibson D.R., Walker S., Sloane J.P. Oestrogen receptor expression in the normal and precancerous breast J. of Pathology 1999; 188: 237–244.
12. Shoker B.S., Jarvis S.C., Clarke R.B., Anderson E., et al. Estrogen Receptor Positive Proliferating Cells in the Normal and Precancerous Breast. An. J. Pathol 1999; 155: 1811–1815.
13. O'Shaughnessy J.A. Ductal Lavage: clinical utility and future promise. Surg. Clin. N. Am. 2003, 83: 753–769.
14. Page D.L., Dupont W.D. Anatomic markers of human premalignancy and risk of breast cancer. Cancer 1990; 66: 1326–1335.
15. Летагин В.П. Опухоли молочных желез у мужчин // Маммология. 2006. № 2. С. 13–20.
16. Быкова А.В., Воротников И.К., Любченко Л.Н., Денчик Д.А. Особенности рака молочных желез у мужчин // Онкогинекология. 2013. № 1. С. 54–57.