

**В.О.Бондарєва**

Дніпропетровська державна  
медична академія

УДК 618.19-006.66:57.086.12:57.086.14

## **ЗНАЧЕННЯ ІМУНОМОРФОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ У ДІАГНОСТИЧНОМУ АЛГОРИТМІ ПРИ ДИФЕРЕНЦІЮВАННІ ДОБРОЯКІСНИХ ТА ЗЛОЯКІСНИХ НОВОУТВОРЕНЬ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ**

*Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи „Індивідуалізація лікування злоякісних пухлин з урахуванням біологічних показників активності пухлинного процесу та маркерів хіміогормонорезистентності” (№ держреєстрації 0101U001002).*

**Ключові слова:** доброякісні та злоякісні новоутворення молочної залози, діагностичні маркери, імуногістохімічний метод, диференціальна діагностика.

*Надійшла: 14.01.2007*

*Прийнята: 26.02.2007*

**Резюме.** Ріст захворюваності і висока смертність хворих на рак молочної залози (РМЗ) зумовлює необхідність пошуку ефективних методів діагностики і лікування злоякісних новоутворень, а також вивчення факторів, що визначають перебіг захворювання і його прогноз. В роботі було проаналізовано рівень експресії спектру маркерів, що найбільш часто використовуються при проведенні диференціальної діагностики (ДД) доброякісних та злоякісних процесів молочної залози, який включав  $\alpha$ -SMA, MSA, колаген IV типу, S-100, різні фракції цитокератинів – цитокератинів 7, 19 (СК7, СК19), цитокератини плоских епітеліїв, панцитокератини та виментин у пацієток різних вікових груп, що потребували верифікації діагнозу, з метою оцінки ступеня значущості та діагностичної цінності вказаних маркерів. Нами було отримано, що серед 35 випадків у хворих із підозрою на РМЗ діагноз злоякісного захворювання було підтверджено у 15 випадках (42,8%), тоді як серед жінок із попередньо доброякісними процесами (80 хворих), у 12 з них (15%) було встановлено РМЗ. Також нами було визначено імуногістохімічні профілі найбільш складних відносно ДД форм новоутворень молочної залози, що не тільки вирішує об'єм хірургічного втручання, але й сприяє визначенню прогнозу, якості життя та виживання пацієток.

**Bondareva V.O. The importance of immunohistochemical methods in diagnostic algorithm at differentiation of benign and malignant processes of breast.**

**Summary.** Increasing of morbidity and high death rate among of patients with breast cancer (BC) stipulates a necessity of looking for effective methods of diagnostic and treatment of malignant tumors, and also analysis of the factors, that determine clinical course of disease and its forecast. In our investigation the level of expression of markers spectrum was analyzed, that most often used at conducting of differential diagnostic (DD) of benign and malignant process of breast. This spectrum includes  $\alpha$ -SMA, MSA, collagen IV, S-100, fractions of cytokeratins – CK7, CK19, CK of squamous epithelium, pancytokeratins and vimentin for patients with different age, who need in verification of the diagnosis, with the purpose of an estimation of degree of the significance and diagnostic value of the indicated markers. It was obtained, that among 35 cases for the patients with suspicion on BC the diagnosis of a malignant was affirmed in 15 cases (42,8%), whereas among the women with previously benign (80), for 12 of them (15%) was established BC. Also it was established the immunohistochemical profile for the most difficult diagnostical cases of breast, that not only decides the volume of a surgical intervention, but also promotes definition of the forecast, quality of life and survival rate.

**Key words:** benign and malignant processes of breast, diagnostic markers, immunohistochemical method, differential diagnostic.

### **Вступ**

В даний час імуногістохімічні методи дослідження отримали високу оцінку та широке розповсюдження в онкологічній практиці у зв'язку з їх надзвичайною чутливістю та інформативністю, що разом із рутинними методами забарвлення парафінових зрізів дозволяє патоморфологам більш глибоко інтерпретувати препарат, встановити тонкі відмінності між гістологічно подібними патологічними процесами та нівелювати можливість встановлення помилкового діагнозу (Петров С.В., Райхлин Н.Т., 2000; Шпонька И.С. та співавт., 2005). Патоморфологічна діагностика є невід'ємною ланкою при вивченні рака молочної залози (РМЗ) як з клінічних позицій, так і в дослі-

дженнях загальнобіологічного плану, оскільки лише патоморфолог здатен надати точну характеристику гістологічних структур пухлини та адекватно оцінити її біологічні властивості (Воробьева О.А., Нейштадт Э.Л., 2003).

Враховуючи лідуєче місце новоутворень молочної залози серед онкологічної патології у жінок, диференціальна діагностика (ДД) гіперпластичних та диспластичних процесів у тканині молочної залози від малігнізації являє собою велими актуальну проблему, оскільки не тільки визначає об'єм оперативного втручання, але також впливає на терапевтичні заходи, прогноз, якість життя, психічну та соціальну реабілітацію пацієнток (Lee K. et al., 1996; Wang N. et al., 1997). Не-

обхідно вказати, що в більшості випадків ДД, як правило, не викликає суттєвих труднощів у до-свідчених патоморфологів і випадки, що потре-бують використання додаткових діагностичних методів, зустрічаються нечасто, проте в сумнів-них ситуаціях можуть застосовуватися імуногі-стохімічні маркери, що дозволяють з більшою ві-рогідністю верифікувати процес (Петров С.В., Райхлин Н.Т., 2000; Воробьева О.А., Нейштадт Э.Л., 2003).

Структурно-функціональною діючою одини-цею в тканині молочної залози є термінальна до-льково-протокова одиниця (відділ). Епітеліальна вистілка термінальних дольково-протокових від-ділів складається з 2 типів клітин: кубічного епі-телію, що вистеляє їх просвіт, та зовнішнім міо-епітеліальним шаром (Bose S. et al., 1999).

Форма міоепітеліальних клітин прямо зв'язана із функціональним станом органу (вікові інволютивні зміни, вагітність та лактація, гіпер-пластичні процеси, спровоковані іншими гормо-нальними змінами). За звичайних умов міоепіте-лій має кубічну форму та практично не відрізня-ється візуально від епітеліальних клітин. Проте, при гіперпластичних процесах проліферативні зміни у міоепітеліальних клітинах, особливо при появі дисплазії, можуть мімікрувати під РМЗ (Eusebi V. et al., 1993; Nayar R. et al., 1999). В ін-ших випадках реакція в стромі імітує саркоматоз-ну трансформацію клітин, що також ускладнює встановлення діагнозу, особливо за умови малого об'єму матеріалу (Maiorano E. et al., 1994; Simpson R. et al., 1998; Dabbs D., 2002).

**Метою** нашого дослідження була оцінка ступеня значущості імуногістохімічних (ІГХ) мар-керів, що застосовуються при ДД доброякісних та злоякісних новоутворень молочної залози з їх структуруванням у залежності від діагностичної цінності, гістологічної форми захворювання та частоти використання.

#### Матеріали та методи

В нашій роботі нами було проаналізовано рі-вень експресії маркерів, які найбільш часто реко-мендуються при проведенні ДД доброякісних та злоякісних процесів молочної залози (Raymond W.A., Leong A.S., 1991; Rasbridge S.A., 1995; Radju U., Vertes D., 1996), що включав  $\alpha$ -SMA (гладком'язовий актин, поліклон, DakoCytomation), MSA (м'язовий специфічний антиген, клон SMMS-1, DakoCytomation), колаген IV типу (клон CV-22, DakoCytomation), S-100 (поліклон, DakoCytomation), різні фракції цитокер-атинів (СК) – СК7 (маркер «простого» епітелію, клон OV-TL, 12/30, DakoCytomation), СК19 (мар-кер базального епітелію, клон b170, NovoCastra), цитокератини плоских епітеліїв (клон СК34 $\beta$ E12, DakoCytomation), панцитокератини (клон AE1/AE3, DakoCytomation), віментин (клон V9, DakoCytomation) у пацієнток різних вікових груп, які потребували проведення ДД.

У зв'язку з цим нами було досліджено біо-псійний та операційний матеріал 119 хворих, що включав 80 пацієнток із припущеним доброякіс-

ним процесом (із потребою у верифікуванні) – з попереднім гістологічним діагнозом: „фіброаде-нома”, „фіброаденоматоз”, „фіброзно-кістозна мастопатія”, „листовидна пухлина”, „внутріш-ньопротокова папілома”, 35 випадків із підозрою на РМЗ, 1 випадок міоепітеліоми, 1 випадок кар-циносаркоми, 2 саркоми у жінок у віці з 20 до 45 років в період з 2003 р. на даний час, які знаходи-лися на лікуванні в онкодиспансерах Дніпропет-ровської області (табл.1).

Таблиця 1  
Розподіл клінічного матеріалу хворих, що потре-бували верифікації діагнозу

Клінічний діагноз	n (кількість пацієнток)
Фіброаденома	12
Фіброаденоматоз	13
Фіброзно-кістозна хвороба	40
Листовидна пухлина	5
Внутрішньопротокова папілома	10
<b>80</b>	
РМЗ	35
<b>35</b>	
Карциносаркома	1
Міоепітеліальна пухлина	1
Фібросаркома	2
<b>4</b>	

Крім того, в якості контролю ми використо-вували підтверджений випадок фібросаркоми, рабдоміо- та лейоміосаркоми, синовіальної сар-коми, пухлину нервової тканини, фіброзну гістіо-цитому для оцінки рівня значущості експресії ДД маркерів.

Для виключення помилково-позитивних, та помилково-негативних результатів весь матеріал фіксувався в нейтральному 10% забуференому формаліні безпосередньо після забору. Після то-го, зрізи завтовшки 4-5 мкм наносились на адге-зивне скло. Демаскування антигенів здійснюва-лось шляхом нагрівання зрізів у цитратному бу-фері з рН=6,0 за допомогою автоклавування про-тягом 10 хв. після досягнення температури 121<sup>0</sup>С (Бондарева В.А. и соавт., 2003).

З метою візуалізації ми застосовували систе-му LSAB2 та EnVision (біотинільовані антитіла та пероксидазний комплекс), а в якості хромогену використовували DAB (діамінобензидин) з оцін-кою інтенсивності реакції під контролем мікрос-копу. Антигенні детермінанти розташовувалися на мембрані та субмембранно, після імуногісто-хімічних реакцій для відтворення структурної організації зрізи додатково забарвлювались гема-токсиліном Майєра.

Зневоднення та заключення в бальзам здійс-нювались згідно до прийнятих стандартів.

#### Результати та їх обговорення

За нашими даними, найбільш часто виникали труднощі у диференціюванні між собою різних форм аденозу, атипичних долькових гіперплазій, атипичних папілом від папілярного раку „на місці”

(Ca in situ), Ca in situ та інвазивних карцином, а також при встановленні мікроінвазії у внутрішньопротокових карциномах.

Серед 35 випадків у хворих із підозрою на РМЗ діагноз злоякісного захворювання було підтверджено у 15 випадках (42,8%), тоді як серед жінок із попередньо встановленими доброякісними процесами, що складало 80 хворих, у 12 з них (15%) було встановлено РМЗ (табл.2).

В усіх цих випадках було необхідним вивчення стану міоепітелію, оскільки при традиційному морфологічному дослідженні оцінка реакції міоепітеліальних клітин може бути ускладнена

завдяки нечіткій межі між типами клітин у тканині молочної залози (рис.1, 2).

Таблиця 2  
Розподіл діагнозів до та після проведення імуногістохімічного дослідження

Попередній клінічний діагноз	До проведення ІГХ	Після проведення ІГХ
Доброякісні новоутворення	80	68 (75%)
РМЗ	35	20 (57,2%)

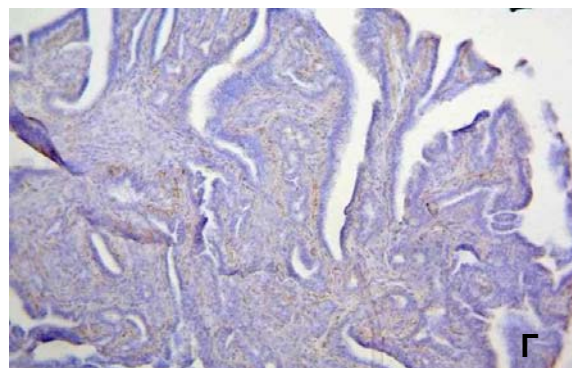
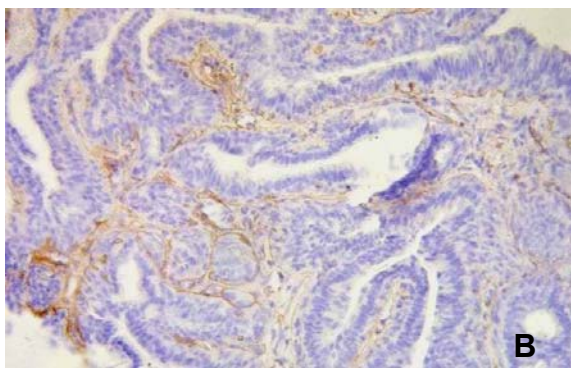
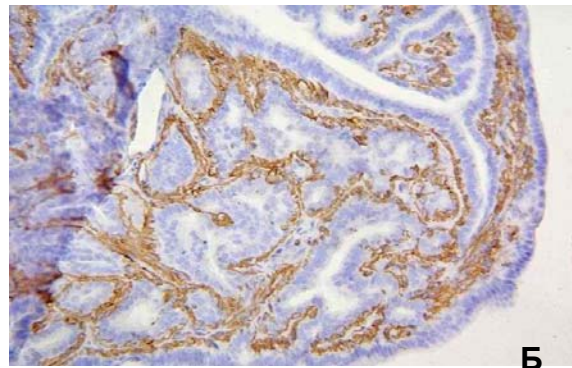
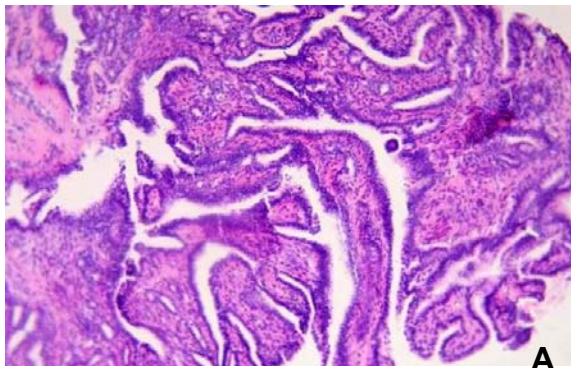


Рис.1. Внутрішньопротокова папілома: а) забарвлення гематоксилином та еозином.  $\times 200$ ; б) наявність міоепітеліальних клітин, реакція з  $\alpha$ -SMA, імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра.  $\times 400$ ; в) цілісність базальних мембран, реакція з колагеном IV типу, імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра.  $\times 400$ ; г) наявність міоепітеліальних клітин, реакція з MSA, імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра.  $\times 200$ .

Серед пацієнок, яким було встановлено РМЗ після проведення імуногістохімічного дослідження (12 хворих із групи з попередньо доброякісними захворюваннями та 15 хворих з групи жінок, які потребували верифікації РМЗ) більшу частину складала тубулярні карциноми, як більш проблемні при верифікуванні діагнозу (рис.3). Перехресна реакція з міофібробластами стромы ускладнювала диференціальну діагностику протокового Ca in situ, при якому зустрічалась перидуктальна стромальна десмоплазія.

Цитокератини плоских епітеліїв (клон 34 $\beta$ E12) містять суміш до цитокератинів 1, 5, 10, 14 типів, та, як правило, виявлялись у протоковому та плоскому епітелії. В інтактній тканині молочної залози міоепітелії та люмінальні клітини експресували цитокератини СК34 $\beta$ E12, тоді як при атиповій протоковій гіперплазії рівень експресії СК 34 $\beta$ E12 був значно меншим.

Експресія до цитокератинів 7 у люмінальному епітелії дозволяла диференціювати проліферативні процеси епітелію молочної залози від гіперплазії міоепітелію.

Експресію маркерів щодо гістологічних форм новоутворень молочної залози пацієнок обох груп (115 хворих) наведено в таблиці 3.

Пухлини молочної залози, у яких гладком'язові клітини є джерелом новоутворень, включають у себе аденоміоепітеліоми та міоепітеліальноклітинні карциноми та зустрічаються рідко. Незважаючи на те, що більшість аденоміоепітеліом відносять до доброякісних захворювань, серед них зустрічаються варіанти з агресивним плином і трансформацією у карциноми або міоепітеліальні карциноми.

Таблиця 3

Експресія маркерів при проведенні ДД тубулярної карциноми (ТС), мікрогландулярної гіперплазії (MGA), тубулярного аденозу (ТА) та склерозуючого аденозу (SA)

Нозологічна форма	Маркери				n
	MSA	$\alpha$ -SMA	S100	Колаген IV	
Тубулярна карцинома (ТС)	-	-	-	-	27
Мікрогландулярний аденоз (MGA)	-	-	+	+	15
Тубулярний аденоз (ТА)	+	+	-	-	20
Склерозуючий аденоз (SA)	+	+	-	-	15
Фіброзно-кістозна хвороба	+	+	-	+	38

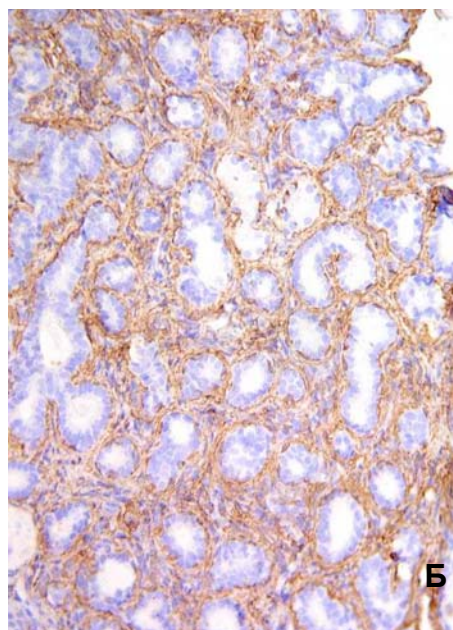
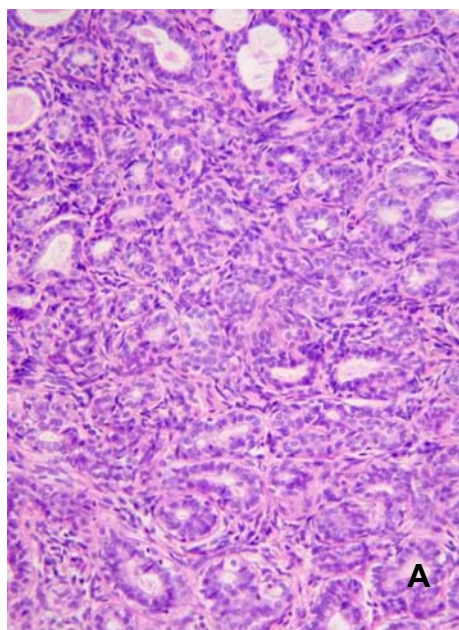


Рис.2. Мікрогландулярний аденоз: а) забарвлення гематоксиліном та еозином, необхідно проводити ДД з тубулярною карциною.  $\times 200$ ; б) наявність міоепітеліальних клітин, реакція з  $\alpha$ -SMA, імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра.  $\times 400$ .

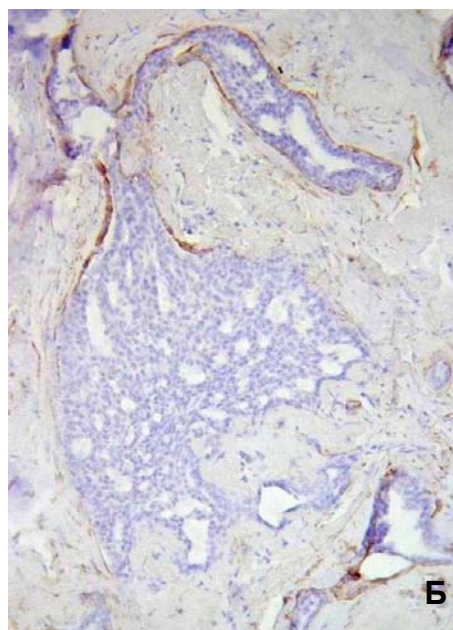
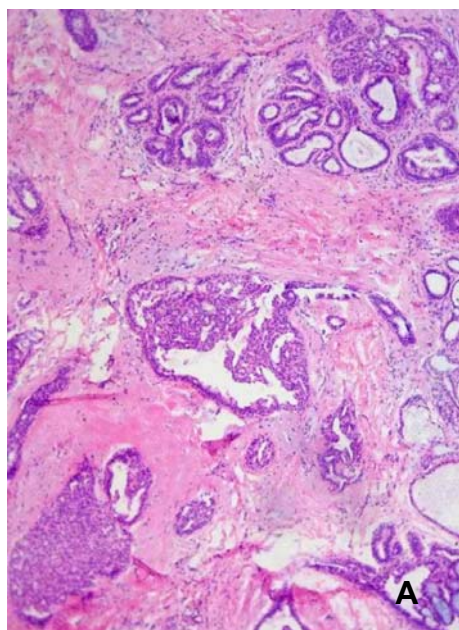


Рис.3. Мікроінвазивна протокова аденокарцинома: а) забарвлення гематоксиліном та еозином, з попереднім діагнозом проліферативна форма фіброзно-кістозної хвороби.  $\times 200$ ; б) осередки деструкції базальної мембрани та втрати міоепітелію, реакція з  $\alpha$ -SMA, імуногістохімічний метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра.  $\times 400$ .

У нашому дослідженні міоепітелій цих пухлин експресував широкий спектр антитіл, що входили в коктейль панцитокератинів AE1/AE3, також пухлинні клітини були, як правило, позитивні до S100 та гладком'язових маркерів MSA та  $\alpha$ -SMA. Таке поєднання експресії як цитокератинів, так і маркерів гладком'язової тканини дозволяло диференціювати ці пухлини від карциносарком, при яких експресувалися тільки цитокератини та віментин.

При порівнянні експресії маркерів у випадках міоепітеліом, сарком, карциносарком молочної залози з іншими саркомами, з якими їх доцільно диференціювати (віментин-позитивні(+)  
фібросаркоми, позитивні до гладком'язових маркерів рабдоміо- та лейоміосаркоми, CK7+ та CK19+ синовіальні саркоми, S100+ та віментин+ пухлини нервової тканини, віментин+ фіброзні гістіоцитоми) ми встановили спектр та рівень експресії ДД маркерів (табл.4).

Таблиця 4

Диференційна діагностика пухлин із міоепітелію та інших м'якотканинних новоутворень

Нозологічна форма	Маркери			
	S100	MSA	CK 7	CK 19
Міоепітеліальна пухлина	+	+	+	-
Карциносаркома	-	-	+/-	-
Фібросаркома	-	-	-	-
Лейоміосаркома Рабдоміосаркома	-	+	-	-
Пухлини нервової тканини	+/-	-	-	-
Синовіальна саркома	-	-	+	+
Злоякісна фіброзна гістіоцитома	-	-	-	-

Таким чином, зазначений спектр антитіл дозволяє проводити ДД доброякісних та злоякісних пухлин молочної залози, різних форм пухлин з м'яких тканин, що не тільки вирішує об'єм хірургічного втручання, але й сприяє визначенню прогнозу, якості життя та виживання пацієток з пухлинами МЗ.

**Висновки**

1. Відзначені відмінності в рівні експресії маркерів між гіперпластичними та диспластичними процесами у тканині молочної залози свідчать про їх безперечне діагностичне значення.

2. Найбільш проблемними у відношенні ДД серед новоутворень молочної залози з епітеліальним походженням є тубулярна карцинома, тубулярний аденоз, мікрогландулярний аденоз, склерозуючий аденоз, які мають наступний фенотип:

- тубулярна карцинома (TC): MSA<sup>+</sup>,  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>, S100<sup>+</sup> та колаген IV<sup>+</sup>;
- мікрогландулярний аденоз (MGA): MSA<sup>-</sup>,  $\alpha$ -SMA<sup>-</sup>, S100<sup>+</sup> та колаген IV<sup>+</sup>;

- тубулярний аденоз (TA): MSA<sup>+</sup>,  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>, S100<sup>+</sup> та колаген IV<sup>+</sup>;

- склерозуючий аденоз (SA): MSA<sup>+</sup>,  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>, S100<sup>+</sup> та колаген IV<sup>+</sup>;

3. Рівень експресії CK34 $\beta$ E12 та CK7 дозволяє провести ДД між суто доброякісними гіперпластичними процесами у тканині молочної залози та атиповою протоковою гіперплазією.

4. При проведенні ДД між пухлинами з міоепітелію та іншими новоутвореннями м'якотканинного походження найбільше значення мають маркери S100, MSA, CK 7 та CK 19.

5. Запропоновані ДД маркери дозволяють індивідуалізувати підходи в лікуванні пацієток із новоутвореннями молочної залози з оптимізацією тактики ведення хворих.

**Перспективи подальших розробок** пов'язані з впровадженням ДД маркерів у патоморфологічну та онкологічну практику, як факторів, що відображають біологічні властивості та малігнізацію новоутворень молочної залози.

**Літературні джерела**

Бондарева В.А., Тетерядченко Т.Е., Бойко Л.А. Методы оптимизации демаскировки (эпитопного возврата) при иммуногистохимическом исследовании рака молочной железы // Вісн. проблем біол. та мед.- 2003.- Вип.4.- С.9-11.

Воробьева О.А., Нейштадт Э.Л. Патология молочной железы.- Санкт-Петербург, 2003.- 208 с.

Петров С.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека.- Казань, 2000.- 288 с.

Шпонька И.С., Бондарева В.А., Гриценко П.А. Роль тканевых маркеров в оценке биологических свойств и прогнозе рака молочной железы

// Межд. мед. журн.- 2005.- Т.11, №2.- С.97-104.

Antibodies to novel myoepithelium-associated proteins distinguish benign lesions and carcinoma in situ from invasive carcinoma of the breast / Wang N., Wan B., Skelly M. et al. // Appl. Immunohistochem.- 1997.- №5.- P.141-151.

Bose S., DeRosa C., Ozzello L. Immunostaining of type IV collagen and smooth muscle actin as an aid in the diagnosis of breast lesions // Breast J.- 1999.- №5.- P.194-201.

Dabbs D. Diagnostic immunohistochemistry.- Churchill Livingstone, 2002.- 676 p.

Immunoreactivity of ductal cells with putative myoepithelial markers. A potential pitfall in breast

carcinoma / Nayar R., Brelund C., Badrossian U. et al. // *Ann. Diagn. Pathol.*- 1999.- №3.- P.165-173.

Infiltrating myoepithelioma of the breast / Maiorano E., Rocco R., Virgintino D. et al. // *Appl. Immunohistochem.*- 1994.- P.130-136.

Lee K., Chan J., Gwe E. Tubular adenosis of the breast: a distinct benign lesion mimicking invasive carcinoma // *Am. J. Surg. Pathol.*- 1996.- №20.- P.46-54.

Malignant adenomyoepithelioma of the breast with mixed osteogenic, spindle cell and carcinomatous differentiation / Simpson R., Cope N., Scalova A. et al. // *Am. J. Surg. Pathol.*- 1998.- №22.- P.631-636.

Microglandular adenosis, apocrine adenosis and

tubular carcinoma of the breast: an immunohistochemical comparison / Eusebi V., Foschini M., Betts C. et al. // *Am. J. Surg. Pathol.*- 1993.- №17.- P.99-109.

Radju U., Vertes D. Breast papillomas with atypical hyperplasia // *Hum. Pathol.*- 1996.- №27.- P.1231-1238.

Rasbridge S. Carcinoma in situ involving sclerosing adenosis: a mimic of invasive breast carcinoma // *Histopathology.*- 1995.- №27.- P.269-273.

Raymond W., Leong A. Assessment of invasion in breast lesions using antibodies to basement membrane components and myoepithelial cells // *Pathology.*- 1991.- №36.- P.291-297.

**Бондарева В.А. Значение иммуноморфологических методов в диагностическом алгоритме при дифференцировании доброкачественных и злокачественных новообразований молочной железы.**

**Резюме.** Рост заболеваемости и высокая смертность среди больных раком молочной железы (РМЖ) обуславливает необходимость поиска эффективных методов диагностики и лечения злокачественных новообразований, а также изучение факторов, определяющих течение заболевания и его прогноз. В работе был проанализирован уровень экспрессии спектра маркеров, которые наиболее часто используются при проведении дифференциальной диагностики (ДД) доброкачественных и злокачественных процессов молочной железы, который включал  $\alpha$ -SMA, MSA, коллаген IV типа, S-100, разные фракции цитокератинов – CK7, CK19, цитокератины плоских эпителиев, панцитокератины и виментин у пациенток разных возрастных групп, которые нуждались в верификации диагноза, с целью оценки степени значимости и диагностической ценности указанных маркеров. Нами было получено, что среди 35 случаев у пациентов с подозрением на РМЖ диагноз злокачественного новообразования был подтвержден в 15 случаях (42,8%), тогда как среди женщин с предварительно доброкачественными процессами (80 больных), у 12 из них (15%) был установлен РМЖ. Также нами были установлены иммуногистохимические профили наиболее сложных в отношении ДД форм новообразований молочной железы, что не только решает объем хирургического вмешательства, но и способствует определению прогноза, качества жизни и выживаемости пациенток.

**Ключевые слова:** доброкачественные и злокачественные новообразования молочной железы, диагностические маркеры, иммуногистохимический метод, дифференциальная диагностика.