

А.С. Шайкина¹, Б.Я. Рыжавский², С.В. Беков¹, И.Н. Буробин³, Е.Г. Кудянов³

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕЦЕПТОРОВ ЭСТРОГЕНОВ И ПРОГЕСТЕРОНА, Ki-67 В МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ В НОРМЕ, ПРИ РАКЕ И ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЯХ

Краевой клинический центр онкологии¹, 680042, ул. Воронежское шоссе, 164, тел. 8(4212)-41-60-72, e-mail: kkco@mail.ru;

Дальневосточный государственный медицинский университет², 680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, тел. 8(4212)-32-63-93, e-mail: k_gist@mail.fesmu.ru;
Бюро судебно-медицинской экспертизы Хабаровского края³, ул. Истомина, 85а, г. Хабаровск

Резюме

Представлены результаты иммуногистохимического исследования рецепторов эстрогенов (РЭ), прогестерона (ПП), Ki-67 в молочных железах в норме, а также при фиброаденомах и раке молочной железы. Описаны ее топографические различия и зависимость от характера патологического процесса.

Ключевые слова: молочная железа, иммуногистохимия, фиброаденомы, Ki-67, рецепторы к эстрогену, прогестерону.

A.S. Shaikina, B.Ya. Ryzhavskii, S.V. Bekhov,
I.N. Burobin, E.G. Kudyanov

IMMUNE HISTOCHEMICAL ANALYSIS OF ESTROGEN AND PROGESTERONE RECEPTORS, Ki-67 INTO HEALTHY BREAST, IN PATIENTS WITH BREAST CANCER AND BENIGN TUMOR

*Regional oncology center;
Far Eastern state medical university;
Forensic medicine expertise burro, Khabarovsk*

Summary

The study of immune histochemical reactions of estrogen and progesterone receptors, Ki-67 in healthy breast, in patients with breast cancer (in normal tissue) and in benign tumor are presented. Topographic and nosologic differences are described.

Key words: breast, immune histochemistry, receptors, Ki-67.

Молочная железа является органом-мишенью для целого ряда гормонов [1-3, 5, 6, 9, 10, 12]. Это важнейшая причина гендерных и возрастных особенностей ее строения, существенных перестроек в течение беременности и при лактации. Среди гормонов, являющихся регуляторами функционирования железы в норме, первостепенная роль принадлежит эстрогенам и прогестерону. Изменения их концентрации влияют на морфологические характеристики и функциональное состояние железы. Так, доказана роль гиперэстрогении в развитии мастопатии и рака железы [2]. Прогестерон и его аналоги участвуют в регуляции пролиферации и дифференцировке паренхиматозных клеток органа [2, 6, 9, 10, 12]. Эти эффекты гормонов объясняют применение методов иммуногистохимии для изучения рецепторов эстрогенов (РЭ) и прогестерона [1, 3, 4, 10] в железе при развитии в ней опухолей. Поскольку следствием действия эстрогенов и прогестерона могут являться изменения пролиферативной активности эпителиоцитов железы, повышение которой рассматривается как важный показатель злокачественности опухоли [3, 5, 10], проводится исследование пролиферативного пула ткани с применением в качестве маркера Ki-67.

Все это определяет интерес онкоморфологов к изучению РЭ, рецепторов прогестерона (ПП), Ki-67 в молочной железе. В то же время, в работах, имеющих практическую направленность, крайне редко проводится их параллельное изучение в сопоставимых условиях при патологии молочной железы и в норме. Между тем подобное исследование, по нашему мнению, могло бы способствовать более полному пониманию процессов регуляции состояния молочной железы в условиях нормы и патологии. Вышеизложенное определило цель настоящей работы.

Материалы и методы

Материалом исследования явились молочные железы женщин трех групп. Первая группа — 8 женщин, погибших в результате травм, при судебно-медицинских вскрытиях которых не было обнаружено патологических изменений молочной железы, органов эндокринной и репродуктивной систем. При этом исследовался верхний наружный квадрант нормальной ткани правой молочной железы. Вторая группа — 9 женщин с диагнозом «рак молочной железы» (РМЖ). Материалом для исследования послужила нормальная ткань железы этих больных (операционный материал). Третья группа — 10 женщин, у которых в отделении амбулаторной хирургии

были диагностированы фиброаденома, локализованная мастопатия (ФА); исследовался очаг поражения. Иммуногистохимическое исследование проведено в патологоанатомическом отделении ГУЗ «Краевой клинический центр онкологии». Изучались маркеры: 1) рецепторов эстрогенов (РЭ); 2) рецепторов прогестерона (ПП); 3) Ki-67. Постановка иммуногистохимической реакции проведена с использованием общепринятой системы визуализации Histofine Simple Stain MAX PO(MULTI)NICHIREI BIOSCIENCES(JAPAN). Для оценки иммуногистохимических реакций применена полуколичественная методика — определялось количество окрашенных ядер (по 6-балльной шкале) и средняя интенсивность реакций при выявлении эстрогенов и прогестерона (по 4-балльной

Характеристика реакций на рецепторы эстрогенов, прогестерона и Ki-67 в молочной железе

Возраст, диагноз	Внутридольковые протоки			Междольковые протоки						Альвеолярные молочные ходы		
				Однорядный эпителий			Многорядный и многослойный эпителий					
	Ki-67,%	РЭ	РП	Ki-67, %	РЭ	РП	Ki-67, %	РЭ	РП	Ki-67, %	РЭ	РП
38 лет, РМЖ	2	3/1	3/2	2	3/2	4/3	0	3/1	3/3	0	1/1	2/3
45 лет, РМЖ	20	4/2	4/3	0	2/1	3/3	1	3/1	2/3	0	2/1	1/3
47 лет, РМЖ	0	3/1	3/3	0	3/1	2/3	0	2/1	1/3	0	1/1	0/0
48 лет, РМЖ	3	2/1	3/1	0	1/1	1/1	1	0/0	0/0	0	0/0	0/0
48 лет, рак Педжета	0	1/1	1/3	0	0/0	0/0	0	0/0	0/0	0	0/0	0/0
53 г., РМЖ	10	2/2	2/3	1	2/2	2/3	1	2/2	2/3	0	2/1	2/2
60 лет, РМЖ	1	2/1	2/3	0	1/2	1/2	0	2/2	2/2	0	0/0	0/0
67 лет, РМЖ	1	3/3	2/3	0	1/2	0/0	0	2/2	1/1	0	1/1	0/0
71 г., РМЖ	1	2/2	2/2	0	1/1	1/1	0	2/2	1/1	0	0/0	0/0
20 лет, фиброаденома	30	2/2	2/3	10	2/3	3/3	10	3/3	3/3	0	0/0	0/0
20 лет, фиброаденома	1	4/2	3/3	0	2/1	2/2	0	2/2	3/3	0	1/1	0/0
21 г., мастопатия + фиброаденома	8	2/2	3/3	5	1/1	1/3	5	2/1	2/3	0	0/0	0/0
34 г., фиброаденома	2	2/2	3/3	1	1/1	1/3	1	3/1	3/3	0	0/0	0/0
39 лет, мастопатия	3	3/1	3/3	0	2/2	2/3	0	3/2	3/3	0	1/1	1/2
41 год, фиброаденома	3	3/2	3/3	0	1/1	2/3	3	2/1	2/3	0	0/0	0/0
41 г., мастопатия + фиброаденома	0	0/0	0/0	10	2/1	2/3	15	3/1	3/3	0	0/0	0/0
49 лет, мастопатия	0	2/1	2/3	0	1/1	1/3	0	2/1	2/3	0	0/0	0/0
56 лет, тубулярная аденома	>30	4/3	4/3	>30	4/3	4/3	>30	4/3	4/3	0	0/0	0/0
58 лет, фиброаденома	0	1/1	2/3	0	0/0	1/2	1	1/1	1/3	0	0/0	0/0
14 лет, норма	1	0/0	2/3	0	0/0	1/2	0	0/0	2/2	0	0/0	0/0
20 лет, норма	5	0/0	3/3	1	0/0	2/2	1	0/0	2/2	0	0/0	1/2
22 г., норма	3	0/0	3/1	0	0/0	1/1	1	0/0	1/1	0	0/0	1/1
48 лет, норма	3	2/1	3/3	0	0/0	1/2	1	1/1	2/3	0	1/1	1/2
55 лет, норма	1	0/0	1/1	1	0/0	0/0	2	0/0	1/1	0	0/0	0/0
56 лет, норма	0	1/1	2/2	0	0/0	0/0	0	1/1	1/2	0	0/0	0/0
77 лет, норма	1	1/1	1/2	1	0/0	0/0	1	1/1	1/2	0	0/0	0/0
83 г., норма	0	1/1	1/2	0	0/0	0/0	0	0/0	0/0	0	0/0	0/0

Примечание. Числитель — баллы по кол-ву прореагировавших клеток; знаменатель — баллы по интенсивности реакции.

шкале). Интенсивность реакции на Ki-67 оценивалась по количеству (в %) окрашенных ядер [7].

Результаты и обсуждение

Ki-67. Определение Ki-67 в молочных железах женщин, погибших от травм (1 группа), не выявило меченых ядер в альвеолярных молочных ходах, во внутридольковых выводных протоках продукт реакции маркировал от 0 до 5% эпителиоцитов. В междольковых протоках, высланных однорядным эпителием, в 5 случаях Ki-67 не выявлялся, в 3 — реакция была положительной в 1% эпителиальных клеток (рис. 1, 2). В протоках, высланных многорядным и многослойным эпителием, продукт реакции окрашивал от 0 до 2% (таблица). В непораженных участках молочной железы больных РМЖ (2 группа), как и в предыдущей группе, Ki-67 в альвеолярных молочных ходах не был обнаружен. Во внутридольковых протоках у 2 женщин продукты реакции не выявлялись, в остальных количество прореагировавших клеток варьировало от 1 до 20%. В междольковых протоках, высланных как однорядным, так и многорядным и многослойным эпителием, в большинстве случаев меченые ядра не выявлялись, в остальных реагировали 1 или 2% от их количества (таблица).

У пациенток с ФА в очаге фиброаденомы/мастопатии (3 группа) в альвеолярных молочных ходах мы не обна-

ружили клеток, окрашенных продуктами реакции. В то же время, во внутридольковых и междольковых протоках количество прореагировавших эпителиоцитов было значительно более высоким, чем в двух предыдущих группах, достигая 10% и более (таблица).

Эти результаты можно расценивать, во-первых, как свидетельство очень низкой пролиферативной активности в альвеолярных молочных ходах — дистальных отделах выводных протоков, на которых во время беременности формируются секреторные отделы. Во-вторых, они показывают, что интенсивность клеточного деления в молочных железах в норме и непораженных участках при РМЖ, по-видимому, не имеет выраженных различий. В-третьих, патологически измененные структуры железы при фиброаденоме/мастопатии отличаются в части случаев высокими показателями выявления Ki-67 (30% и более, таблица) в различных выводных протоках.

РЭ в молочной железе женщин 1 группы (норма) были выявлены в альвеолярных молочных ходах только в одном случае. При этом интенсивность реакции и число прореагировавших клеток были минимальными (оценка — 1 балл). Во внутридольковых протоках экспрессия рецепторов имела в 4 из 8 случаев, интенсивность реакции равнялась в них 1 баллу, количество прореагировавших

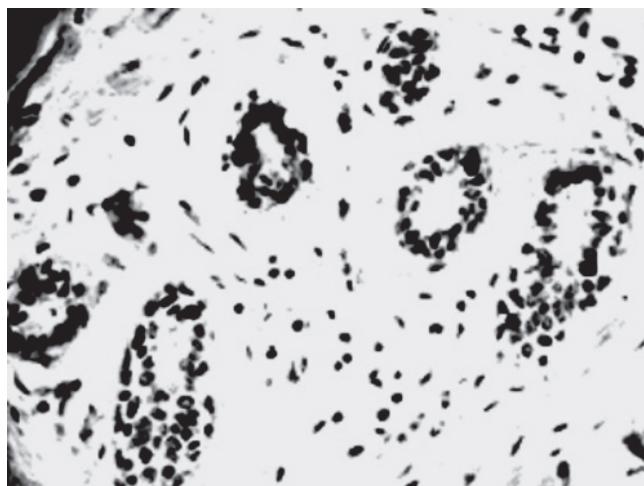


Рис. 1. Реакция на Ki-67. Молочная железа, норма. Единичные эпителиоциты с положительной реакцией в протоках. Увеличение 10×20

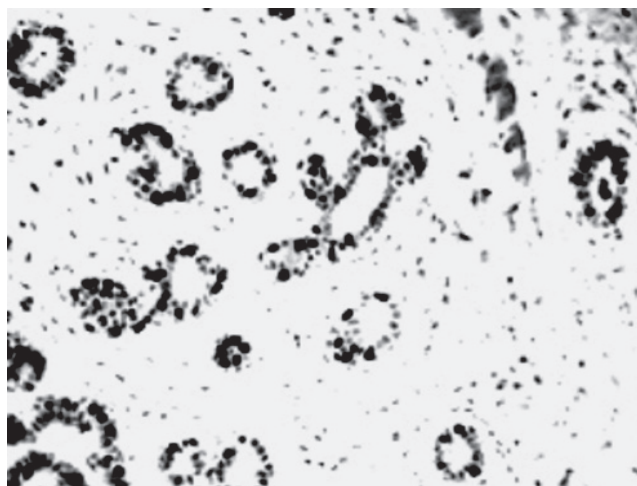


Рис. 3. Реакция на РЭ. Молочная железа, фиброаденома. Эпителиоциты с положительной реакцией в альвеолярных молочных ходах и внутридольковых протоках. Увеличение 10×20

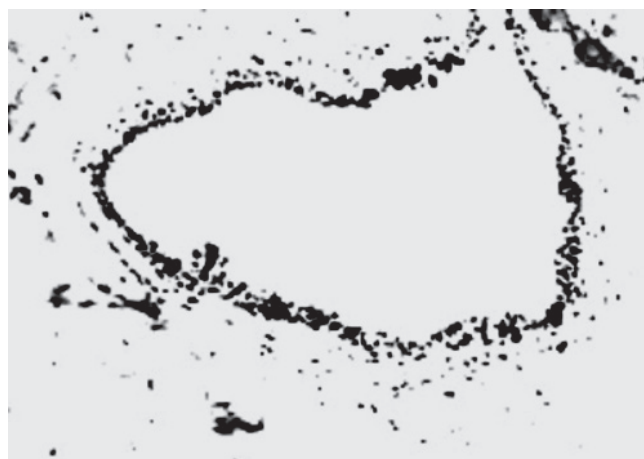


Рис. 2. Реакция на Ki-67. Молочная железа, норма. Расположенные группами эпителиоциты с положительной реакцией в междольковом протоке. Увеличение 10×20

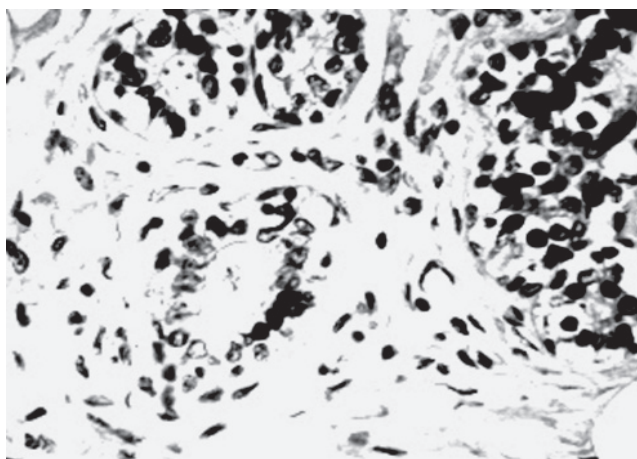


Рис. 4. Реакция на РЭ. Молочная железа, фиброаденома. Эпителиоциты с положительной реакцией в альвеолярных ходах и внутридольковых протоках. Увеличение 10×90

клеток — 1-2 баллам. В междольковых выводных протоках, выстланных однослойным эпителием, продукты реакции не выявлены ни в одном случае, в выстланных многорядным и многослойным эпителием, — в 3 случаях из 8 (таблица).

У женщин 2 группы (при РМЖ) в эпителии альвеолярных молочных ходов в 4 из 9 случаев РЭ не были выявлены, в 5 случаях реакция была оценена в 1-2 балла по количеству прореагировавших ядер и в 1 балл по интенсивности реакции. Во внутридольковых протоках положительная реакция имела во всех случаях, в междольковых — в 7 и 8 случаях (в разных протоках) из 9 (таблица).

В 3 группе (ФА) в альвеолярных молочных ходах РЭ обнаружены в 2 случаях, во внутридольковых и междольковых, выстланных однослойным эпителием протоках, — в 9 случаях из 10, в выстланных многорядным/многослойным эпителием, — во всех случаях (рис. 3, 4).

Таким образом, во всех группах минимальное количество РЭ, оцененное как по количеству прореагировавших клеток, так и по интенсивности реакции, характеризовало альвеолярные молочные ходы. Во внутридольковых и междольковых выводных протоках как число, так и интенсивность реакции на РЭ в 1 группе были ниже, чем во

2 и 3 группах. Особый интерес представляют различия между 1 и 2 группами, поскольку в обеих изучалась нормальная ткань молочной железы. Показатели реакции на ЭР во 2 и 3 группах при этом были близкими (таблица).

РП. В 1 группе (норма) РП выявлялись с минимальной частотой и интенсивностью в альвеолярных молочных ходах и междольковых протоках, выстланных однорядным эпителием, максимальные показатели экспрессии характеризовали внутридольковые протоки (таблица).

Во 2 группе (РМЖ) характер реакции был сходен с таковым в 1 группе: минимальный уровень реакции в альвеолярных молочных ходах, максимальный — во внутридольковых протоках.

В 3 группе (ФА) минимальный уровень реакции на РП был присущ альвеолярным молочным ходам. Во внутридольковых и междольковых протоках интенсивность и частота экспрессии РП не имели значительных отличий и при этом были большими, чем в 1 и 2 группах (рис. 5, таблица).

Таким образом, в работе сопоставлены результаты иммуноцитохимических реакций на Ki-67, РЭ, РП, характеризующих важные механизмы регуляции морфофункционального состояния молочной железы. Они,

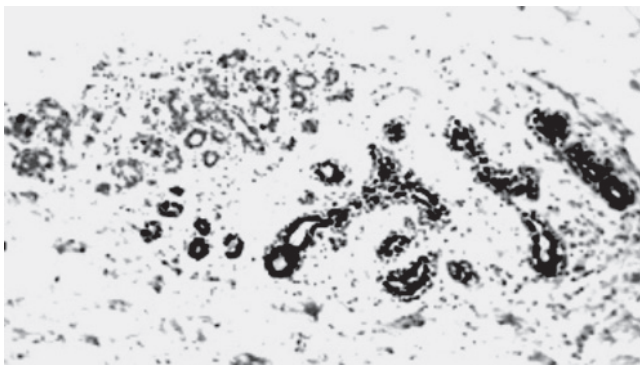


Рис. 5. Реакция на РП. Молочная железа, фиброаденома. Характер реакции значительно различается в соседних участках поля зрения. Увеличение 10×20

в частности, показали, что минимальный уровень экспрессии Ki-67, РЭ, РП характерен для альвеолярных молочных ходов, дающих начало во время беременности секреторным отделам. Можно предположить, что для процессов пролиферации, синтеза РЭ и РП в их эпителиоцитах необходим высокий уровень эстрогенов, прогестерона, а также секреции плацентарного лактогена, которые достигаются во время беременности [5]. Это предположение находит подтверждение в наших предыдущих исследованиях, показавших, что при фиброаденоме у беременных женщин показатели экспрессии Ki-67 значительно более высокие [8], чем при фиброаденоме вне беременности, установленные в настоящей работе.

Приведенные данные свидетельствуют также о значительной вариабельности экспрессии исследованных маркеров в молочных железах женщин, не имевших патологии органа. Они могут обуславливаться различиями возраста, фазы менструального цикла (у женщин репродуктивного возраста) и другими причинами. В то же время, на изученном нами материале влияние возраста на результаты иммуногистохимических реакций четко не прослеживалось (таблица). Оценивая полученные результаты, мы отмечали, что даже в различных участках одного среза, а иногда в одном поле зрения (рис. 5), характер реакции может значительно варьировать, свидетельствуя, что кроме уровня гормонов на экспрессию Ki-67, РЭ и РП влияют также факторы микроокружения. В связи с этим логично считать, что их исследование в небольшом объеме материала не всегда в полной мере отражает состояние соответствующих показателей во всей железе. Поэтому для более объективной оценки характера реакций в железе, прежде всего в норме, необходимо изучение исследованных маркеров на значительно большем, чем в настоящем исследовании, материале.

Тем не менее, несмотря на сравнительно небольшие группы, изучавшиеся в работе, удалось показать ряд межгрупповых различий реакций на Ki-67, РЭ, РП: 1) в нормальной молочной железе, 2) в не пораженном опухолевым процессом участке при РМЖ, 3) в патологическом очаге железы при фиброаденоме и мастопатии. Их анализ, по нашему мнению, может быть полезным для более полного

понимания механизмов регуляции изменений в молочной железе, обусловленных возрастом, фазой менструального цикла, а также при развитии в ней некоторых патологических процессов.

Л и т е р а т у р а

1. Габуния М.С., Лобова Т.А., Егорова Л.Г. Состояние молочных желез при заместительной гормональной терапии // *Акушерство и гинекология*. - 2001. - №2. - С. 50-53.
2. Кира Е.Ф., Бескровный С.В., Ильин А.Б. и др. Влияние препаратов гестагенного ряда на морфофункциональное состояние молочных желез // *Журнал акушерства и женских болезней*. - 2000. - Т. 49, №2. - С. 75-84.
3. Коган И.Ю. Молекулярно-биологические маркеры пролиферации и апоптоза в эпителии молочной железы // *Молекулярная медицина*. - 2008. - №1. - С. 23-27.
4. Невожай В.И, Мюллер Е.С. Иммуногистохимическое исследование рецепторов стероидных гормонов при раке молочной железы // *Тихоокеанский мед. журнал*. - 2007. - №4. - С. 79-80.
5. Розен В.Б. Основы эндокринологии. - М.: Изд-во Моск. ун-та, 1994. - 383 с.
6. Федосов А.В., Семейкин А.В. Прогестины: молекулярные механизмы контроля пролиферации и апоптоза клеток чувствительных тканей // *Вопросы онкологии*. - 2003. - Т. 49, №1. - С. 9-20.
7. Франк Г.А., Завалишина Л.Э. Методы иммуногистохимии и гибридизации in situ в онкоморфологии. - М.: Моск. науч.-исслед. ин-т онкологии им. П.А. Герцена, 2009. - С. 7-10.
8. Шайкина А.С., Рыжавский Б.Я., Беков С.В. и др. Иммуногистохимический анализ рецепторов эстрогенов и прогестерона, Ki-67 в молочной железе в норме, при раке и доброкачественных опухолях // *Дальнев. мед. журнал*. - 2010. - №2. - С. 102-105.
9. Aupperlee M.D., Haslam S.Z. Differential hormonal regulation and function of progesterone receptor isoforms in normal adult mouse mammary gland // *Endocrinology*. - 2007. - Vol. 148, №5. - P. 2290-2300.
10. Branchini G., Schneider L., Cericatto R. et al. Progesterone receptors A and B and estrogen receptor alpha expression in normal breast tissue and fibroadenomas // *Endocrine*. - 2009. - Vol. 35, №3. - P. 459-466.
11. Catalog «Products&Services», Dako, 2007. - P. 85.
12. Hallberg G., Persson I., Naessen T. et al. Effects of pre- and postmenopausal use of exogenous hormones on receptor content in normal human breast tissue: a randomized study // *Gynecol. Endocrinol.* - 2008. - Vol. 24. - P. 475-480.

Координаты для связи с авторами: Шайкина Александра Сергеевна — врач-патологоанатом Краевого клинического центра онкологии, тел.: 8(4212)-41-06-29; Рыжавский Борис Яковлевич — зав. кафедрой гистологии ДВГМУ, тел.: 8(4212)-32-63-93; Беков Сергей Викторович — зав. патолого-анатомическим отделением ККЦО, тел.: 8(4212)-41-06-29; Буробин Игорь Николаевич — врач-судмедэксперт, тел.: 8(4212)-45-74-70; Кудянов Евгений Геннадьевич — врач-судмедэксперт, тел.: 8(4212)-45-74-70.

