

С. Е. Малыгин¹, В. Н. Богатырев², Г. П. Корженкова², Е. Н. Малыгин², В. К. Соколова²,
И. Ю. Лепина², И. П. Коваленко², Р. Ю. Рожнов¹, С. А. Тюляндин²

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ ЭСТРОГЕНОВ, ПРОГЕСТЕРОНА И HER2/neu ПОСЛЕ СТЕРЕОТАКСИЧЕСКОЙ БИОПСИИ ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹Кафедра онкологии РГМУ, Москва

²НИИ клинической онкологии ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

Малоинвазивные методы чрескожной биопсии в сочетании с методами визуализации и без таковых являются альтернативой хирургическому методу диагностики. Биопсия позволяет подтвердить диагноз, а также получить информацию об основных биологических характеристиках злокачественной опухоли (гистологический тип, степень дифференцировки или злокачественности, экспрессия рецепторов к стероидным гормонам и других биологических маркеров). С января 2001 г. по январь 2002 г. выполнено 33 стереотаксические core-needle биопсии у больных с местнораспространенным и метастатическим раком молочной железы. Материал, достаточный для определения рецепторного статуса и HER2/neu получен у 28 (84,8%) больных. Абсолютная чувствительность core-needle биопсии составила 96,9%. Полученные результаты убедительно демонстрируют высокую эффективность core-needle биопсии под контролем маммографии. При невозможности выполнения данного типа биопсии по техническим причинам перспективным, по нашему мнению, представляется использование вакуумной биопсии под контролем УЗИ или маммографии.

Ключевые слова: рак молочной железы, иммуноцитохимическое исследование, стереотаксическая биопсия.

Low invasive transcutaneous biopsy with or without imaging techniques are a good alternative to diagnostic surgery. Biopsy is done to confirm the diagnosis and to have information about main biological characteristics of the tumor (histology, differentiation, grade, hormone receptor status etc.). During January 2001 to January 2002 we performed 33 stereotaxic core-needle biopsies in patients with locally advanced and metastatic breast cancer; sufficient material to determine receptor and HER2/neu statuses was obtained from 28 (84.8%) patients. Core-needle biopsy demonstrated a 96.9% absolute sensitivity. Core-needle biopsy under mammography guidance was proven a highly efficient procedure. If this biopsy type cannot be fulfilled by technical reasons, vacuum biopsy under ultrasound or mammography guidance is the best option.

Key words: breast cancer, immunocytochemical assay, stereotaxic biopsy.

Рак молочной железы (РМЖ) — наиболее частая женская онкологическая патология в России и странах Запада [2]. При выработке плана лечения первичного и метастатического РМЖ огромное значение имеет верификация диагноза, информация о степени злокачественности опухоли, ее рецепторном статусе и экспрессии HER2/neu.

Способность отвечать на гормональное воздействие является специфическим свойством клеток органов-мишеней и зависит от присутствия в них рецепторов гормонов. Рецепторы стероидных гормонов представляют собой белки, локализующиеся в ядре клетки или ядерной мембране и содержащие высокоспецифичные участки связывания гормонов. Внедрение в клиническую практику методов определения рецепторов стероидных гормонов, таких, как рецепторы эстрогенов (РЭ) и прогестерона (РП), дает возможность выявлять опухоли, чувствительные к эндокринной терапии, и таким образом объективизировать назначение лечения [5]. Определение

рецепторов стероидных гормонов в опухолях молочной железы позволяет не только выбрать метод лечения, но и в определенной степени предсказать течение заболевания. У больных ранними формами РМЖ, опухоли которых содержат РЭ и РП, показатели выживаемости выше, чем у больных с РЭ- и РП-отрицательными опухолями [8].

В последние годы большое значение приобретает изучение влияния гиперэкспрессии трансмембранного рецептора ErbB-2 (HER2/neu), который участвует в регуляции роста РМЖ. Гиперэкспрессия HER2/neu в клетках РМЖ выявляется примерно в 20–25% случаев и ассоциируется с плохим прогнозом [6].

Информация, полученная в результате биопсии опухоли перед началом лечения, способна внести коррективы в план лечения. Биопсия является стандартной процедурой у больных, для которых хирургическое лечение не является методом выбора на первом этапе. Также предварительная биопсия опухоли показана пациентам, у которых предоперационная системная терапия может повысить шанс проведения органосохраняющего лечения. Сравнение результатов показывает, что наиболее качественный анализ за счет большего количества опухолевой ткани обеспечивают методы открытой биопсии, любой из которых позволяет провести как гистологическое исследование, так и исследование биологических маркеров опухоли. Однако необходимость оперативного вмешательства, которое предусматривает стерильные условия, местную анестезию, наложение швов на кожу, применение антибиотиков и, наконец, связано с риском осложнений, обусловленных травматичностью процедуры, ставит задачу оптимизировать малоинвазивные методы пункционной биопсии и методы исследования биологических маркеров опухоли.

Малоинвазивные методики получения биопсийного материала при РМЖ в настоящее время приобретают всеобщую популярность. Различные методы визуализации, такие, как УЗИ, маммография и МРТ, позволяют повысить эффективность проводимых манипуляций, хотя вопросы выбора оптимальной методики остаются в настоящее время нерешенными [7]. Другим аспектом этой проблемы является количество и качество биопсийного материала. Для разных методов определения рецепторного статуса требуется разное количество и качество биопсийного материала. Наиболее высокие требования предъявляет биохимический радиолигандный метод, который оценивает связывающую способность рецепторов в цитозолях опухолей. Требуется минимум 1 г опухолевой ткани для приготовления субстрата, в котором и проводится анализ. Материал должен быть свежим и в процессе транспортировки находиться в максимально холодной среде. Нарушение этих правил нередко приводит к ложноотрицательным результатам. К преимуществам этого метода относится возможность количественной оценки результатов. Иммуногистохимические и иммуноцитохимические методы являются полуколичественными, однако требуют значительно меньше материала, в том числе фиксированного, и позволяют выявить экспрессию биологических маркеров именно в опухолевых клетках, что невозможно при использовании биохимических методов.

Материалы и методы

С января 2001 г. в хирургическом отделении восстановительного лечения РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН совместно

с отделом лучевой диагностики, лабораторией клинической цитологии и отделением клинической фармакологии выполнены 33 стереотаксические биопсии под контролем маммографии с цитологическим и иммуноцитохимическим (ИЦХ) исследованиями экспрессии РЭ и РП, а также HER2/neu.

Задачей исследования была разработка малоинвазивного метода пункционной биопсии с определением биологических маркеров опухоли в полученном биопсийном материале.

Возраст больных, которым была выполнена биопсия, варьировал от 31 до 62 лет и составил в среднем 48,4 года. У большинства больных на момент биопсии процесс уже был верифицирован, поэтому основной целью биопсии являлось определение рецепторного статуса и экспрессии HER2/neu в клетках опухоли перед началом системной терапии.

В группе из 18 больных планировалась предоперационная химиотерапия: T2N1M0 — 10 больных, T3N1M0 — 5, T1N2M0 — 1, T2N2M0 — 2. Группу индукционной химиотерапии составили 9 больных РМЖ T4N1–2M0. У 6 больных на момент постановки диагноза были выявлены отдаленные метастазы, у 1 из них после органосохраняющего лечения развились местный рецидив и метастазы в кости скелета. Больной была выполнена биопсия рецидива, т. к. информация о рецепторном статусе опухоли отсутствовала.

Размер опухоли в молочной железе варьировал от 1,5 до 6,5 см и составил в среднем 2,4 см. Опухоли локализовались у 64,7% больных в верхненаружном квадранте молочной железы, у 12,3% — в верхневнутреннем квадранте, у 12,3% — на границе верхних квадрантов, у 8,4% — в нижних квадрантах и у 2,3% — глубоко в центральном отделе. У больных с локализацией опухоли в хвостовом отделе молочной железы и зоне инфрамаммарной складки, а также с субареолярной локализацией биопсию под контролем маммографии невозможно было выполнить по техническим причинам.

Биопсию выполняли в отделе лучевой диагностики с использованием аппарата для маммографии «Mammomat-3000» (Siemens) со стереотаксической приставкой «Opdima» (Германия). Цифровая камера «Opdima» имеет детектор размером 49х85 мм на основе CCD-технологии, вмонтированный в кассету стандартных размеров 18х24 см, может устанавливаться в кассетодержатель или столик для биопсии. Размер пикселя данного детектора 25 нм обеспечивает высокое разрешение снимка — 20 пл/мл, что позволяет проводить точную диагностику кальцинатов на прицельных снимках с последующей стереотаксической биопсией или маркировкой. Получение цифровых изображений в реальном времени в несколько раз ускорило проведение инвазивных исследований на молочной железе, а также впервые предоставило врачу-маммологу возможность изменять характеристики изображения после съемки и сохранять их в компьютерном архиве.

Принцип действия стереотаксической приставки основан на рентгеностереометрии. Через окно в компрессионной пластине на кассету с камерой CCD производят два снимка под углами $\pm 10^\circ$ (стереопара). На мониторе выбирают размер иглы для пункции. Определяют цель биопсии, параметры по трем осям координат рассчитываются автоматически. Данные отображаются на дисплее. Пользуясь ручками настройки, производят установку всех параметров на 0 мм. Погрешность по каждому из параметров не превышает 0,1 мм.

Непосредственно пункцию выполняли при помощи пружинного пистолета для биопсии фирмы «BARD» с одноразовыми сменными иглами для core-needle биопсии 16 G с режущей поверхностью длиной 1,9 см. Программой предусмотрено безопасное расстояние 5 мм, чтобы не допустить удара иглы в столик для биопсии при использовании пистолета (предупреждение об этом выводится в диалоговое окно программы). Под местной анестезией выполняли разрез кожи и подкожной фасции размером 5 мм, вводили биопсийную иглу и делали контрольные снимки для подтверждения локализации иглы в опухолевом образовании. После подтверждения точности расположения иглы выполняли биопсию и удаляли иглу из места пункции. Визуально оценивали качество материала, который помещали в пробирку с 1,0 мл трис-НСI-буфера (pH 7,4). В зависимости от объема полученного материала выполняли 2—4 повторные биопсии. Биопсийный материал представлял собой столбик ткани длиной 1 см и диаметром около 1 мм. Размер столбика зависел от размера иглы. Все биопсии выполняли с использованием игл 16 G с режущей поверхностью 1 см. Время процедуры составляло от 45 до 50 мин при отработке методики и 15—20 мин в последней серии биопсий.

Материал передавали в лабораторию клинической цитологии, где готовили препараты для цитологического исследования и ИЦХ-исследования РЭ, РП и HER2/neu. Цитологическое исследование (окраска по Лейшману) выполняли для верификации диагноза, установки степени дифференцировки опухоли и контроля качества материала перед ИЦХ-исследованием. Экспрессию РЭ, РП и HER2/neu в опухолевых клетках оценивали с помощью пероксидазной реакции.

После обработки цитопрепаратов охлажденным (+4 °C) 1% тритоном-X-100 в течение 1—2 мин для блокирования эндогенной пероксидазы наносили по 50 мкл 3% перекиси в темноте при комнатной температуре, затем инкубировали 20 мин и отмывали дважды в PBS по 5 мин. Далее наносили по 50 мкл 1% BSA, после 20 мин инкубации наносили первичные моноклональные антитела (Estrogen Receptor/Progesterone Receptor System) и инкубировали 16—18 ч в холоде при +4 °C. Дважды отмывали в PBS по 5—10 мин. Применяли систему визуализации LSAB+Detection System (Dako Corp., Дания). Выявление пероксидазной активности проводили при помощи 3,3-диметилбензидина (DAB). Докрашивали ядра гематоксилином Эрлиха по 50 мкл 1—2 мин. Отмывали дистиллированной и проточной водой по 1—2 мин в каждой. Перед заключением в бальзам проводили через спирты и ксилол.

Реакцию оценивали на световом микроскопе «Standart-25» (Zeiss, Германия) объектив x40 (10, 100) и окуляры x7—10 при увеличении 400. Подсчет результатов проводили полуколичественно в цитологических препаратах, приготовленных по методике Cytospin (Shandon Co., Великобритания) в областях с максимальным окрашиванием на 300 опухолевых клеток. Рецепторный статус определяли по интенсивности окрашивания в ядрах опухолевых клеток и проценту позитивных клеток. Степень положительно окрашенных клеток оценивали по 4-балльной системе: 0 — отсутствие окрашивания, 1 — слабое, 2 — умеренное, 3 — интенсивное окрашивание; процент позитивных клеток: 1 — от 10 до 24%, 2 — от 25 до 50%, 3 — от 51 до 75%, 4 — более 75%. Выраженность экспрессии рассчитывали по следующей формуле: интенсивность окрашивания (балл) + количество положительно

окрашенных клеток (балл). Минимальное количество баллов 0, максимальное — 7. Различали следующие уровни содержания РЭ и РП: негативный рецепторный статус опухоли, слабопозитивный, умереннопозитивный и резкопозитивный.

Экспрессию HER2/neu оценивали с применением наборов МКАт Rabbit Anti-Human HER2/neu (Dako Corp., Дания), используя систему оценок, предложенную FDA (Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США). Положительную реакцию определяли как окрашивание средней интенсивности 2+ или сильной интенсивности 3+ целой клеточной мембраны более чем в 10% опухолевых клеток. Окрашивание с интенсивностью 1+ на части клеточной мембраны, а также цитоплазматическое окрашивание положительной реакцией не считали [3; 4; 9].

Результаты

В результате выполненных 33 биопсий адекватный материал получен у 28 (84,8%) больных, у 1 больной материал вообще не был получен и у 4 полученных клеток хватило лишь на ИЦХ-исследование РЭ и РП. Степень дифференцировки опухолевых клеток у большинства больных оценивалась как умеренная (2 балла). У 4 больных отмечена высокая (1) степень дифференцировки, у двух больных опухолевые клетки были низкодифференцированными (3). Результаты ИЦХ-исследования отражены в табл. 1.

На рис. 1 показана частота выявления опухолевых клеток, экспрессирующих РЭ, РП и HER2/neu. Отсутствие экспрессии РЭ, РП и HER2/neu в опухоли, т. е. менее 25% позитивных клеток независимо от степени интенсивности, наблюдалось при ИЦХ-исследовании в 53; 71 и 75% случаев соответственно. Большой процент опухолевых клеток, экспрессирующих эти маркеры, выявлен в 16; 15 и 6% случаев соответственно.

На рис. 2 представлено распределение опухолей по степени экспрессии РЭ, РП и HER2/neu, полученное в результате совокупной оценки опухолей с учетом процента позитивных клеток и интенсивности экспрессии. В итоге высокая степень позитивности была выявлена только по РП в 7% наблюдений. Необходимо отметить, что ИЦХ-исследование на РЭ было выполнено у 96,9% больных, на РП — у 87,5%, HER/neu — у 53,1%. HER2/neu определяли лишь в половине случаев, т. к. значение этому маркеру в клинической практике стали придавать лишь в последнее время.

Из осложнений можно выделить 2 случая кровотечения в момент первых двух введений иглы, которое не позволило продолжить биопсию. Несмотря на то что кровотечение не представляет опасности при такой малоинвазивной методике и останавливается местной компрессией в течение 3 мин, сформировавшаяся за это время локальная гематома в значительной степени затрудняет получение биопсийного материала хорошего качества. Ни у одной больной не отмечено реакций на местный анестетик, визуальных признаков гематомы, а также других осложнений. Рана в месте биопсии самостоятельно закрывалась на 3–и сутки. Рубец у большинства пациентов был мало заметен или не заметен вообще.

Обсуждение

Стереотаксическая core-needle биопсия с ИЦХ-исследованием экспрессии стероидных гормонов и HER2/neu показала

Таблица 1

Результаты иммуноцитохимического исследования РЭ, РП и HER2/neu в серии выполненных биопсий¹

№	РЭ ⁺	ИЭ I ²	ИЭ II	ИЭ III	РП ⁺	ИЭ I	ИЭ II	ИЭ III	HER2/ neu ⁺	ИЭ I	ИЭ II	ИЭ III
1	60	60	0	0	70	70	0	0	N ³			
2	100	70	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	50	50	0	0	N				N			
4 ⁴												
5	50	50	0	0	N				N			
6	100	45	55	0	100	35	65	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	27	25	2	0	N			
9	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	47,4	0	47,4	0
11	100	100	0	0	20	20	0	0	N			
12	0	0	0	0	0	0	0	0	N			
13	30	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	60	60	0	0	0	0	0	0	N			
17	0	0	0	0	50	50	0	0	N			
18	0	0	0	0	0	0	0	0	80	40	40	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	68	40	28	0
20	68	40	28	0	0	0	0	0	N			
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	100	19	45,3	35,7	100	4	27	69	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0	N			
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	N				N			
26	45	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	50	50	0	0	0	0	0	0	N			
30	70	0	70	0	80	0	80	0	N			
31	0	0	0	0	0	0	0	0	35	35	0	0
32	55	55	0	0	N				N			
33	0	0	0	0	100	24	64	12	N			

¹ Доля клеток в процентах.² ИЭ I, II, III — интенсивность экспрессии.³ N — ИЦХ-исследование не выполнялось.⁴ Биопсия №4 не позволила получить материал, достаточный для цитологического и ИЦХ-исследований.

высокую чувствительность в серии проведенных биопсий. Основные преимущества данной методики, кроме этого, заключаются в низкой травматичности и необходимости небольшого количества материала для достаточно полной ха-

рактеристики биологических свойств опухоли. Использование стереотаксической приставки с компьютерным расчетом позволило, несмотря на некоторые ограничения по локализации опухоли, в подавляющем большинстве случаев успешно

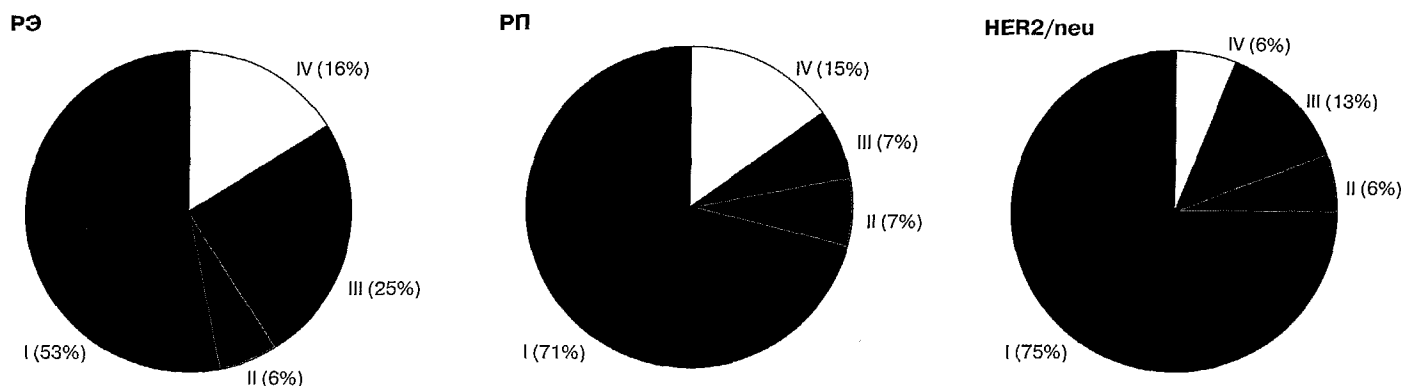


Рисунок 1. Частота выявления опухолевых клеток, экспрессирующих РЭ, РП и HER2/neu в исследуемой группе.

I — 10—24% положительных клеток; II — 25—50% положительных клеток; III — 51—75% положительных клеток; IV — >75% положительных клеток.

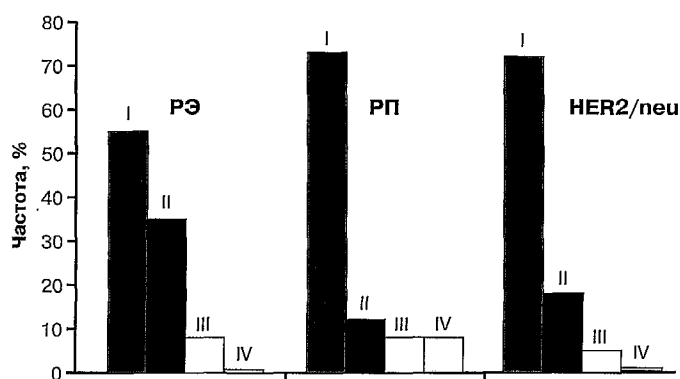


Рисунок 2. Частота негативных и положительных опухолей, определяемых в результате совокупной оценки процентного соотношения положительных клеток и интенсивности экспрессии ими РЭ, РП и HER2/neu.

I — негативные опухоли; II — слабоположительные опухоли; III — умеренно положительные опухоли; IV — высокоположительные опухоли.

выполнить пункцию. В сравнении с биопсиями под контролем УЗИ при маммографическом исследовании происходит жесткая фиксация молочной железы и опухолевого образования, что и обеспечивает в итоге такую высокую степень успеха.

Результаты исследования позволяют не только выявить экспрессию того или иного маркера в клетках рака молочной железы, но и оценить ее степень. Полученная картина отражает гетерогенность исследованных опухолей и сравнительно небольшой процент опухолей с высокой степенью экспрессии биологических маркеров. Этим отчасти объясняется нередко слабый ответ опухоли на проводимую гормонотерапию. Наши данные об экспрессии маркеров не отражают частоту экспрессии этих маркеров в клетках рака молочной железы в целом, т. к. большинство больных, включенных в группу исследования, имели местнораспространенный или метастатический РМЖ и, таким образом, изначально плохой прогноз.

Исследование экспрессии рецепторов стероидных гормонов с использованием моноклональных антител в настоящее время является стандартом, принятым в клинической практике. Несмотря на то что наиболее популярным иммунохимическим методом является иммуногистохимическое исследование, в ряде работ продемонстрирована корреляция его

результатов и результатов ИЦХ-исследования [4]. Иммунохимическое исследование экспрессии HER2/neu позволяет выявить пациентов, которым показано более дорогостоящее исследование методом FISH (флюоресцентная гибридизация in situ) и в перспективе лечение герцептином.

Выводы

Стереотаксическая core-needle биопсия опухоли при РМЖ под контролем маммографии с иммуноцитохимическим исследованием экспрессии рецепторов стероидных гормонов и HER2/neu является эффективной комплексной методикой, позволяющей получить достоверную информацию для диагностики РМЖ и оценить основные характеристики опухоли у больных, получающих системную терапию на первом этапе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барышников А. Ю., Лукашина М. И., Глухова Е. И. и др. Экспрессия Ki-67, Cerb-b2 и рецепторов к эстрогену при пролиферативном протоковом раке молочной железы // Мат. III съезда имун. и аллергол. СНГ, г. Сочи, 16—20 сент. 2000 г. — С. 438.
2. Иванов В. Г. Эпидемиологические факторы риска, ранняя диагностика рака молочной железы // Прак. онкология. — 2002. — Т. 3, №1. — С. 1—5.
3. Лукашина М. И. Экспрессия биологических маркеров в клетках рака молочной железы: Дис... канд. мед. наук. — М., 2003. — 158 с.
4. Лукашина М. И., Жукова Л. Г., Глухова Е. И. и др. Сравнение иммуноцитохимического и иммуногистохимического методов определения биомаркеров при раке молочной железы // Клин. лаб. диагност. — 2002. — №8. — С. 37—41.
5. Бассалык Л. С. (ред.) Рецепторы стероидных гормонов. — М., 1987. — С. 18—24.
6. Hayes D. F., Yamauchi H., Broadwater G. et al. Circulating HER-2/erbB-2/c-neu (HER-2) extracellular domain as a prognostic factor in patients with metastatic breast cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 8662 // Clin Cancer Res. — 2001. — Vol. 7. — P. 2703—2711.
7. Liberman L. Clinical management issues in percutaneous core breast biopsy // Radiol. Clin. N. Amer. — 2000. — Vol. 38. — P. 245—251.
8. McGuire W. L. Hormone receptors: their role in predicting prognosis and response to endocrine therapy // Semin. Oncol. — 1978. — Vol. 5. — P. 428—433.
9. Sauer T., Beraki E., Jebson P. W. et al. Assessing estrogen and progesterone receptor status in fine needle aspirates from breast cancers // Acta Cytol. — 1998. — Vol. 20. — P. 122—126.

Поступила 29.05.03