

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Е. В. Артамонова¹, Н. Н. Тупицын¹, З. Г. Кадагидзе¹, В. П. Летагин¹, В. Д. Ермилова¹,
Н. А. Огнерубов², А. В. Паниченко¹, С. Н. Рязанцева¹*

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ЭПИТЕЛИАЛЬНЫМ АНТИГЕНАМ В ДИАГНОСТИКЕ МЕТАСТАЗОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹ НИИ клинической онкологии ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

² Воронежская государственная медицинская академия, Воронеж

С помощью иммуногистохимического метода проведены исследования криостатных срезов регионарных лимфоузлов у 74 больных раком молочной железы и пунктатов костного мозга — у 10. Показано, что дополнительное иммуногистохимическое исследование регионарных лимфоузлов с моноклональными антителами к эпителиальным антигенам Egp34 и MUC1 позволяет на 10,8% увеличить выявление метастазов по сравнению с одним гистологическим исследованием. Обнаружение раковых клеток в стернальном пунктате больных может служить индикатором активности гематогенного метастазирования и требует более пристального динамического наблюдения за такими пациентками.

Ключевые слова: эпителиальные антигены, рак молочной железы, иммуногистохимия, микрометастазы.

Immunohistochemical analysis was performed in regional lymph node cryostatic sections from 74 and bone marrow needle biopsy specimens from 10 cases with breast cancer. It is demonstrated that additional immunohistochemical study of regional lymph nodes using monoclonal antibodies to epithelial antigens Egp34 and MUC1 increases by 10.8% metastasis detection as compared to histological study alone. The presence of cancer cells in sternal needle biopsy specimens may be evidence of active hematogenic metastasis and requires more careful monitoring of the patients.

Key words: epithelial antigens, breast cancer, immunohistochemistry, micrometastases.

Рак молочной железы (РМЖ) в России занимает 1-е место в структуре заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований у женщин. Прирост заболеваемости за последние 10 лет составил 34,8%, а число умерших увеличилось с 16,7 тыс. в 1991 г. до 22 тыс. в 1999 г.

Степень распространенности опухолевого процесса и в частности метастатическое поражение лимфоузлов считается наиболее значимым прогностическим фактором у больных с операбельным РМЖ. При этом состояние подмышечных лимфоузлов не только определяет прогноз после выполнения радикальной операции, но и диктует всю дальнейшую лечебную тактику у данной категории пациенток (необходимость и характер проведения адъювантной химиотерапии, интенсивность динамического наблюдения и т. д.).

Основным методом установления наличия метастазов в регионарных лимфоузлах является патоморфологическое исследование. Так, ошибки в клинической оценке состояния лимфоузлов достигают 32% [6], в 35% клинически интактных лимфоузлов при патоморфологическом исследовании были найдены метастазы [15]. Тем не менее и у этого метода существует своя разрешающая способность. Уже давно было показано, что стандартный патоморфологический анализ является неадекватным для выявления микрометастазов, а применение техники серийного секционирования позволяет существенно повысить уровень их диагностики [14]. Поскольку у каждой пациентки во время операции обычно удаляется более 10 лимфоузлов, выполнение этого исследования во всех случаях является достаточно трудоемким процессом, что снижает возможности повсеместного практического применения данной методики и делает актуальным поиск новых вариантов решения проблемы.

Получение моноклональных антител (МКА) к эпителиальным антигенам ознаменовало собой настоящий прорыв в

этой области, так как иммуногистохимическое (ИГХ) исследование позволяет четко визуализировать даже единичную опухолевую клетку в срезе лимфоузла. С помощью ИГХ-анализа удается выявить микрометастазы в 10—23% случаев РМЖ, гистологически считавшихся отрицательными [4; 5; 10; 12]. Применение МКА к антигенам, специфичным для эпителиальных тканей и опухолей, позволяет более точно оценивать степень распространенности опухолевого процесса, обнаружить раковые клетки в регионарных лимфоузлах, костном мозге и периферической крови пациенток [7; 13].

Известно, что правильная оценка степени распространенности опухолевого процесса на этапе первичного обследования является основным моментом адекватного планирования лечебных мероприятий, а обнаружение отдаленных метастазов радикально меняет тактику лечения больных. Показано, что от 25 до 35% пациенток без поражения регионарных лимфоузлов уже имеют гематогенные микрометастазы к началу лечения. Современные иммуноморфологические и иммунофлюориметрические методы с применением МКА к эпителиальным антигенам при исследовании пунктата костного мозга позволяют обнаружить даже единичные раковые клетки на несколько миллионов гемопоэтических, что значительно превышает по своим возможностям стандартные цитологическое и морфологическое исследования [9].

Наша работа посвящена ИГХ-изучению регионарных лимфоузлов и костного мозга больных РМЖ с помощью МКА к эпителиальным антигенам (Egr34, MUC1, PЭА), а также сравнению результатов иммунологического обнаружения опухолевых клеток с данными обычного патоморфологического и цитологического исследований.

Материалы и методы

ИГХ-изучение криостатных срезов регионарных лимфоузлов проведено нами у 74 больных РМЖ в возрасте от 30 до 80 лет. Всего исследовано 285 лимфоузлов.

Величина первичной опухоли соответствовала индексу T1 по Международной классификации TNM у 10,8% больных, T2 — у 62,2%, T3 — у 13,5% и T4 — у 13,5% соответственно. При гистологическом исследовании метастазы в регионарные лимфоузлы выявлены у 35 из 74 пациенток (47,3% N+).

Для выявления раковых клеток в срезах лимфоузлов использовали МКА HEA-125 к общеэпителиальному антигену Egr34 [8], МКА HEA-19 к РЭА (детерминанта, отсутствующая на лейкоцитах, [11]), любезно предоставленные G. Moldenhauer (Heidelberg, Germany), и МКА ICO-25 к антигену MUC1 [2].

Иммунофенотипирование метастазов в регионарные лимфоузлы проводили с помощью непрямой реакции иммунофлюоресценции (РИФ) на криостатных срезах [3]. Специфические реакции учитывали на микроскопе «Leitz Orthoplan» (Германия).

Исследование костного мозга выполнили у 10 больных гистологически верифицированным РМЖ. Стадия T3N1 выявлена у 4 пациенток, стадия T4N1 — у 3 и стадия T4N2 — у 3. У всех 10 больных по данным обследования, включающего обязательную сцинтиграфию костей, отдаленные метастазы отсутствовали (M0). Стерильная пункция выполнялась до начала специфического лечения. Иммунологические исследования

проводили на стандартных мазках костного мозга и цитоцентрифужных препаратах, подсчитывая количество антигенпозитивных опухолевых клеток на 100 000 костномозговых.

Результаты и обсуждение

Egr34 — это поверхностный низкомолекулярный гликопротеин, который является основной составной частью плазматических мембран клеток эпителиального происхождения. Ранее [1] нами было показано, что Egr34 выявляется при РМЖ в 100% случаев, причем подавляющее большинство опухолей (98,1%) характеризуется мономорфной экспрессией антигена. Все неэпителиальные клетки (в том числе и лимфоциты, и макрофаги) являются антигеннегативными.

При морфологическом исследовании регионарных лимфоузлов метастазы найдены у 35 из 74 больных (47,3%). Применение МКА HEA-125 к Egr34 позволило увеличить частоту выявления метастазов у 40 из 74 больных (54,1%), в том числе в 5 случаях, гистологически считавшихся отрицательными (табл. 1).

MUC1 также в большинстве случаев (93,2%) экспрессируется клетками первичной опухоли при РМЖ, однако гораздо реже, чем для Egr34, отмечается мономорфный тип реакции (41,7% больных).

Иммунологическое исследование лимфоузлов с помощью МКА ICO-25 выполнено нами у 72 пациенток (табл. 1), метастазы выявлены в 55,6% случаев. Следует отметить, что антиген MUC1 локализуется и в цитоплазме, и на мембране, свечение в РИФ, как правило, оказывается очень ярким, что позволяет четко увидеть даже единственную раковую клетку на темном фоне лимфоузла.

По сравнению с Egr34 и MUC1 РЭА наиболее редко [1] экспрессируется первичной опухолью при РМЖ (38,5% случаев). Мономорфный тип реакции для него не характерен (13,5% больных).

Для исследования регионарных лимфоузлов МКА HEA-19 к РЭА использованы нами у 49 пациенток. Опухолевые

Т а б л и ц а 1

Частота обнаружения метастазов РМЖ в регионарные лимфоузлы морфологическим и иммуногистохимическим методами

Метод исследования	Метастазы в лимфоузлы, число больных (%)		Всего больных
	выявлены	отсутствуют	
HEA-125	40 (54,1)	34 (45,9)	74
ICO-25	40 (55,6)	32 (44,4)	72
HEA-19	7 (14,3)	42 (85,7)	49
ИГХ ¹	43 (58,1)	31 (41,9)	74
Гистология	35 (47,3)	39 (52,7)	74

¹ Суммарно по трем МКА.

Таблица 2

Сопоставление морфологического и иммуногистохимического методов исследования регионарных лимфоузлов

Морфологический	Иммуногистохимический		Всего больных
	есть метастазы	нет метастазов	
Есть метастазы	34	1	35
Нет метастазов	9	30	39
Всего	43	31	74

клетки выявлены лишь в 14,3% случаев (7 из 49), а 85,7% реакций (42 из 49, в том числе и 18 случаев с гистологически выявляемыми метастазами) были отрицательными.

Ретроспективный анализ иммунофенотипа первичной опухоли показал, что МКА HEA-19 выявляли метастазы в регионарных лимфоузлах только при наличии РЭА на клетках первичной опухоли (4 из 7 мономорфно и 3 из 7 мозаично экспрессировали данный антиген). При этом в 1 наблюдении МКА HEA-19 обнаружили раковые клетки при отрицательном результате гистологического исследования. Напротив, изучение 18 случаев с выявленными метастазами в регионарные лимфоузлы (N+), когда реакция с МКА HEA-19 была отрицательной, продемонстрировало, что первичная опухоль всегда была антигеннегативной. Таким образом, МКА HEA-19 целесообразно включать в панель антител для исследования регионарных лимфоузлов только в случае РЭА-положительной первичной опухоли.

В целом частота обнаружения метастазов в регионарные лимфоузлы методом ИГХ по совокупному показателю, достигнутому на основании применения трех МКА, составила 43 из 74 случаев (58,1%) и была на 10,8% выше, чем при гистологическом исследовании — 35 из 74 (47,3%). Таким образом, исследование гистологических срезов с помощью МКА к эпителиальным антигенам позволяет увеличить частоту обнаружения метастазов РМЖ в регионарные лимфоузлы. Нельзя исключить, что само по себе увеличение количества

срезов, просматриваемых при ИГХ-исследовании (3 среза), по сравнению с одним при гистологическом исследовании могло сказаться на увеличении частоты диагностики метастазов, а изучение серийных срезов приведет к повышению диагностической чувствительности гистологического метода. Однако высокая трудоемкость данной методики, а также простота и доступность ИГХ-исследования, позволяющего четко увидеть даже единичную опухолевую клетку в срезе лимфоузла, свидетельствует о целесообразности сочетанного (морфологического и иммунологического) изучения регионарных лимфоузлов.

При сопоставлении двух методов исследования регионарных лимфоузлов по каждому больному можно заметить, что в одном случае с морфологически определяемыми метастазами ИГХ-метод дал отрицательный результат (табл. 2).

Это свидетельствует о необходимости дальнейшего совершенствования данного метода и комплексного подхода к исследуемой проблеме. Проведение широкомасштабных исследований в этой области позволит окончательно определить прогностическую роль ИГХ-выявления микрометастазов РМЖ в регионарные лимфоузлы, их влияние на общую и безрецидивную выживаемость больных, а также необходимость коррекции тактики послеоперационного ведения пациентов с морфологически не определяемыми метастазами.

Мы провели также ИГХ-исследование костного мозга у 10 больных с гистологически верифицированным местнораспространенным РМЖ, у которых по данным комплексного обследования отдаленные метастазы отсутствовали. Результаты представлены в табл. 3.

Как видно из этой таблицы, при использовании совокупного показателя, включающего данные по всем трем МКА, частота выявления опухолевых клеток в костном мозге больных местнораспространенным РМЖ достигала 60%. Количество антигенположительных клеток значительно варьировало (от 10 до 500 на 100 000 костномозговых), ярко светящиеся клетки были хорошо видны на фоне темного препарата. Еще у 2 пациенток обнаружено по 2—3 антигенположительные клетки — результат не учитывали и считали отрицательным. При дальнейшем наблюдении из 6 больных с иммунологически определяемыми микрометастазами у 5 в течение полутора лет после выполнения радикальной операции диагностированы

Таблица 3

Частота выявления опухолевых клеток в костном мозге больных РМЖ

МКА	Номер исследования										Число положительных реакций (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
HEA-125	+	+	+	—	+	+	—	—	—	—	5 из 10 (50)
HEA-19	—	+	+	—	+	—	*	—	—	—	3 из 9 (33)
ICO-25	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	6 из 10 (60)
Итого	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	6 из 10 (60)
* Исследование не оценено.											

метастазы в кости (в том числе у одной еще в процессе проведения послеоперационной химиотерапии). Таким образом, результаты нашего исследования свидетельствуют о возможной корреляции между обнаружением опухолевых клеток в стернальном пунктате и дальнейшим выявлением прогрессирования болезни, когда иммунодетекция микрометастазов является своего рода предвестником клинической манифестации метастазирования в кости.

Заключение

Дополнительное ИГХ-исследование регионарных лимфоузлов с МКА к Egp34 и MUC1 позволяет на 10,8% увеличить выявление метастазов по сравнению с одним гистологическим исследованием. Включение в панель для изучения лимфоузлов МКА к РЭА целесообразно только в случае РЭА-положительной первичной опухоли. Обнаружение раковых клеток в стернальном пунктате больных РМЖ может служить индикатором активности гематогенного метастазирования и требует более пристального динамического наблюдения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Артамонова Е. В., Тулицын Н. Н., Кадагидзе З. Г. и др. Роль эпителиальных антигенов в диагностике и стадировании рака молочной железы // *Арх. пат.* — 2002. — Т. 64, №6. — С. 13—15.
2. Иванов П. К. Терапевтические моноклональные антитела // *Рос. биотер. журн.* — 2002. — Т. 1, №2. — С. 48—54.
3. Тулицын Н. Н., Кадагидзе З. Г., Блохина Н. Г. и др. Экспрессия лейкоцитарных и родственных им антигенов на клетках рака молочной железы человека // *Экспер. онкол.* — 1990. — Т. 12, №2. — С. 54—58.
4. Byrne G., Horgan P., England P. et al. A preliminary report on the usefulness of monoclonal antibodies to CA-15-3 and MCA in the detection of micrometastases in axillary lymph nodes draining primary breast cancer // *Eur. J. Surg.* — 1992. — Vol. 28. — P. 658—660.
5. Elson C., Kulfe D., Johnson W. Immunohistochemical detection and significance of axillary lymph node micrometastases in breast carcinoma // *Annal. Quant. Cytol. Histol.* — 1993. — Vol. 15, N. 3. — P. 171—178.
6. Fisher E. R., Gregorio E. M., Redmond C. et al. Pathologic finding from the National Surgical Adjuvant Breast Project // *Am. J. Clin. Pathol.* — 1987. — Vol. 65. — P. 1554—1559.
7. Harbeck N., Untch M., Pache L. et al. Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up // *Br. J. Cancer.* — 1994. — Vol. 69. — P. 566—571.
8. Mamburg F., Moldenhauer G., Hammerling G. et al. Immunohistochemical study of the expression of a M. m. 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues // *Cancer Res.* — 1987. — Vol. 47, N. 11. — P. 2883—2891.
9. Mansi J. L., Easton D., Berger U. et al. Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: prognostic significance after 6 years' follow-up // *Eur. J. Cancer.* — 1991. — Vol. 27, N. 12. — P. 1552—1555.
10. McGuckin M. A., Cummings M. C., Walsh M. D. et al. Occult axillary node metastases in breast cancer: their detection and prognostic significance // *Br. J. Cancer.* — 1996. — Vol. 73, N. 1. — P. 88—95.
11. Moller P., Mamburg F., Moldenhauer G. Epithelial membrane markers. Review, presentation of own monoclonal antibodies and perspectives of application in histopathology // *Verh. Dtsch. Ges. Path.* — 1987. — Vol. 70. — P. 116—126.
12. Nasser I., Bosari S., Saganich R. Occult axillary lymph node metastases in «node-negative» breast carcinoma // *Hum. Pathol.* — 1993. — Vol. 24, N. 9. — P. 950—957.
13. Saccani J., Grassi C., Fontanesi M. Demonstration of mucinous-like carcinoma-associated antigen in bone marrow and lymph node biopsies from patients with breast carcinoma // *Int. J. Biol. Markers.* — 1991. — Vol. 6, N. 3. — P. 167—172.
14. Saphir O., Amromin G. Obscure axillary lymph node metastases in carcinoma of the breast // *Cancer.* — 1948. — Vol. 1. — P. 238—241.
15. Smart C. R., Myers M. H., Gloeckler L. A. Implication from SEER data on breast cancer management // *Cancer.* — 1978. — Vol. 41. — P. 787—793.

Поступила 18.02.2003