

УДК 616-07:57.083/.089:618.19-006.86

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПЕРВИЧНОГО НЕЙРОЭНДОКРИННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹Лоскутова К.С., ¹Кириллина М.П., ¹Иннокентьева А.С.,

²Никитюк Д.Б., ²Непомнящих Л.М.

¹ФГБУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем» СО РАМН, Якутск;

²ФГБУ «НИИ региональной патологии и патоморфологии» СО РАМН,
Новосибирск, e-mail: pathol@inbox.ru

Проведен анализ результатов иммуногистохимического (ИГХ) исследования 21 случая нейроэндокринного рака молочной железы (НЭРМЖ). Показано, что НЭРМЖ выявляется в 3,4% всех случаев рака молочной железы, достоверно чаще у женщин старше 60 лет. Установлена специфичность маркеров НЭРМЖ: нейрон-специфической энтолазы (NSE) (100%) и хромогранина А (ChromA) (57%). Остальные маркеры встречались реже: Synap (23%), CD56/NCAM (38%). Выявлен низкий уровень пролиферативной активности НЭРМЖ, индекс Ki-67 составил 1–2%. Приведенные наблюдения свидетельствуют, что НЭРМЖ при различной локализации, макроскопической картине и ИГХ профиле цитокератинов и стероидных гормонов имеет четко выраженную экспрессию нейроэндокринных маркеров в различной комбинации, выявляющей гормонсекретирующие элементы и их долю в опухолевом пуле, что позволяет дифференцировать НЭРМЖ от других форм рака молочной железы, в том числе и при исследовании пункционного биоптата. Авторами показано значение иммуногистохимического метода в морфологической диагностике рака молочной железы.

Ключевые слова: нейроэндокринный рак, молочная железа, иммуногистохимия

IMMUNOHISTOCHEMICAL DIAGNOSIS OF THE PRIMARY NEUROENDOCRINE BREAST CANCER

¹Loskutova K.S., ¹Kirillina M.P., ¹Innokenteva A.S.,

²Nikityuk D.B., ²Nepomnyaschikh L.M.

¹Yakut Scientific Center of complex medical problems SD RAMS;

²Research Institute of regional pathology and pathomorphology SD RAMS,
Novosibirsk, e-mail: pathol@inboxn.ru

The analysis of results of IGH of research of 21 cases of a neuroendocrine breast cancer (NEBC) is carried out. It is shown that NEBC detected in 3,4% of all cases of breast cancer were significantly more frequently in women older than 60 years. Specificity of markers (NEBC) is established: Neuron – specific enolase (NSE) (100%) and Chromogranin A (ChromA) (57%). Other markers were less common: Synap (23%), CD56/NCAM (38%). Revealed a low level of proliferative activity NEBC, Ki-67 index was 1–2%. The given supervision testify that NEBC, at various localization, macroscopical picture and IGH profile of cytokeratins and steroid hormones, has accurately expression of neuroendocrine markers in the various combination revealing hormone secreting elements and their share in the tumoral pool that allows to differentiate NEBC from other forms of breast cancer, including researching of puncture biopsy. Authors showed value of immunohistochemical method in morphological diagnostics of the breast cancer.

Keywords: neuroendocrine cancer, breast, immunohistochemistry

Среди многообразия злокачественных опухолей выделяется группа новообразований различной локализации, способных синтезировать биогенные амины и многочисленный класс пептидных гормонов, источником которых являются клетки диффузной эндокринной системы – нейроэндокринные опухоли (НЭО). Несмотря на то, что НЭО относят к классу редких опухолей, их встречаемость ежегодно увеличивается. Проблема НЭО стоит чрезвычайно остро, о чем свидетельствует мировая статистика: за последние 30 лет частота выявления НЭО увеличилась в 5 раз [10]. Это обусловлено тем, что нейроэндокринные опухоли становятся все более распространенными из-за действительного увеличения случаев заболевания ими, а также благодаря улучшению диагностики данно-

го вида злокачественных новообразований. При этом наличие очагов с эндокринной дифференцировкой, а также обнаружение эндокринных маркеров в единичных, рассеянных опухолевых клетках не является основанием для причисления данной опухоли к НЭО. К основным типам НЭО следует отнести эпителиальные новообразования, которые происходят из клеток диффузной эндокринной системы, способных продуцировать пептидные гормоны и биологически активные амины, в которых экспрессия нейроэндокринных маркеров (НЭМ) выявляется более чем в 50% клеток всей клеточной популяции.

Диагностика НЭО является достаточно сложной. В 12% случаев НЭО оказываются клинически нефункционирующими, длительно существуют без ха-

бактерной симптоматики и почти в 60 % случаев выявляются на стадиях, когда уже имеются отдаленные метастазы [3, 4]. При этом гормонально обусловленные (карциноидный) синдромы встречаются исключительно редко, в основном при парадоксальном повышении уровня нейроэндокринных маркеров, таких как хромогранин А, в крови. В настоящее время дискусионными остаются вопросы о клинико-морфологических характеристиках и особенностях биологического поведения этих новообразований.

Для выявления нейроэндокринной дифференцировки опухолевых элементов применяется импрегнационный метод серебрения по Гримелиусу, в результате которого положительно окрашенными, аргирофильными, считаются только клетки с четким, зернистым, темным окрашиванием. Однако некоторые раки могут имитировать строение НЭО, при этом плотные гранулы мукопротеинов в цитоплазме трудно отличимы от нейроэндокринных гранул не только при проведении гистохимических реакций, поскольку могут давать положительную аргирофильную реакцию, но и при электронно-микроскопическом исследовании [7]. Следует отметить, что количество нейроэндокринных клеток при опухолевом росте выше, чем в норме и при гиперпластических процессах. В последние годы большое внимание уделяется различным молекулярным и клеточным маркерам, характеризующим фундаментальные биологические свойства опухоли [2, 5]. Большую значимость приобретает не морфологическое типирование, а иммуногистохимическое определение тех или иных маркеров [1, 6].

Морфофункциональный профиль молочной железы определяется наличием двух клеточных дифферонов: эпителио-клеточного и инкреторных гранулоцитов, апудоцитов (нейроэндокринных аргирофильных и хромогранин А-реактивных клеток), которые в норме располагаются между миоэпителиальными клетками и пластом эпителиальных клеток и осуществляют синтез биогенных аминов и полипептидных гормонов. Наличие различных комбинаций опухолевых производных двух дифферонов позволяет предполагать их общее происхождение из полипотентной стволовой клетки. В пользу возможности подобной двойной дифференцировки свидетельствует и наличие в опухолевых клетках НЭРМЖ рецепторов стероидных гормонов (50 % клеток в мелкоклеточных НЭРМЖ и большинство клеток при высококодифференцированных НЭРМЖ).

Классификация WHO (World Health Organization Classification of Tumors) относит к НЭРМЖ только случаи с экспрессией нейроэндокринных маркеров в более чем 50 % клеточной популяции.

Первичный нейроэндокринный рак молочной железы (НЭРМЖ) – это группа НЭО редкой локализации, не имеющая значительных морфологических отличий от опухолей APUD-системы других органов, встречается в 2–5 % всех раков молочной железы, чаще в возрасте 60–70 лет [8]. Следует отметить, что до настоящего времени не существует общего соглашения о стандартах лечения НЭРМЖ. Считается, что НЭРМЖ имеют более благоприятный прогноз, чем раки молочной железы, не содержащие апудоцитов, и при обычном лечении даже низкокодифференцированных мелкоклеточных НЭРМЖ безрецидивный период составляет 33–48 месяцев. В то же время прогноз НЭРМЖ во многом зависит от уровня дифференцировки опухоли. Если исключить мелкоклеточные раки, то почти 45 % этих опухолей хорошо дифференцированы, 40 % имеют умеренную дифференцировку и только 15 % – плохо дифференцированы. Продукция слизи, наличие рецепторов к эстрогену и прогестерону в нейроэндокринной опухоли являются благоприятным прогностическим признаком.

Ведущими экспертами был разработан минимальный набор универсальных данных, необходимых для морфологического заключения. Для диагностики НЭРМЖ во всем мире рекомендуют и традиционно используют панель антител: 3–4 маркера для гистологического типирования опухоли и 1 прогностический, характеризующий пролиферативную активность опухоли. Основными диагностическими ИГХ-маркерами, рекомендованными для практического применения, являются маркеры, ассоциированные с секреторными гранулами: хромогранин А (ChromA), который считается одним из наиболее характерных неспецифических маркеров нейроэндокринной дифференцировки, связанный с плотными эндокринными гранулами (LDCV), и синаптофизин (Synap) – маркер мелких везикул с нейротрансмиттерами (SLMV). Остальные маркеры, такие как CD56 (NCAM), PGP9,5 и NSE, обладают высокой чувствительностью, но не являются достаточно специфичными. В последнее время изучают новые антигены, которые являются эффективными нейроэндокринными маркерами: VMAT1 и VMAT2, NESP55, SV2. Кроме того, обязательно уточняется степень злокачествен-

ности с учетом пролиферативной активности опухолевых клеток (индекс Ki-67).

Цель исследования – провести анализ данных иммуногистохимических исследований НЭРМЖ, выполненных за период 2007–2011 гг. в лаборатории патоморфологии ФГБУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем» СО РАМН.

Материалы и методы исследования

За 5-летний период (2007–2011 гг.) проведено исследование 621 случая РМЖ у пациенток, которым выполняли оперативное лечение и/или диагностические пункционные биопсии в ГБУ РС (Я) «Якутский республиканский онкологический диспансер», 2-м хирургическом отделении и отделении общей рентгенодиагностики ГБУ РС (Я) «Республиканская больница № 1 – Национальный центр медицины», с цитологической, морфологической и иммуногистохимической верификацией диагноза.

Гистологическая обработка материала проводилась по общепринятым методикам. Использовали серийные срезы толщиной 3–5 м. Для морфологического анализа препараты окрашивали гематоксилином и эозином.

При иммунофенотипировании клеток первичной опухоли были использованы следующие моноклональные и поликлональные антитела: PCK (PanCytokeratin 5/6/8/18 (clone 5D3fdLP34) – панцитокератин, ЕМА (clone GP 1.4) – эпителиально-мембранный антиген, нейроэндокринные маркеры (НЭМ): CromA (LK2H10) – хромагрин А, Synap (Polyclonal) – синаптофизин, NSE 2 (Polyclonal) – нейрон-специфическая энолаза, CD56/NCAM (clone 1213C3), Ki-67(clone MB67) (фирма-производитель «Diagnostic BioSystems»), ER (clone 1D5) – антитела к рецепторам эстрогена, PgR (clone PgR 636) – антитела к рецепторам прогестерона (фирма-производитель «Dako»).

Демаскировка антигенных детерминант на депарафинированных, обезвоженных срезах проводилась под давлением в растворе Epitop Retrieval Solution (0,01 М цитратный буфер, рН 6,0) в течение 3 минут с момента закипания. Затем срезы охлаждали 30 минут и промывали в фосфатно-солевом буфере (рН = 7,4). Срезы с первичными моно- и поликлональными антителами инкубировали 40–60 минут. Иммуное окрашивание проводилось непрямой иммунопероксидазным методом. Для визуализации антигенреактивных клеток использовали тест-системы Super Sensitive Polymer – HRP Detection System (фирма-производитель «BoiGenex») и NovoLink Polymer Detection System (фирма-производитель «Novocastra»). Срезы обрабатывали хромогенным субстратом (3,3-диаминбензидин) с последующим докрасиванием гематоксилином в течение 3 минут. Антигенпозитивные клетки идентифицировали по их коричневому ядерному, мембранному и/или цитоплазматическому окрашиванию на светооптическом уровне.

При иммунофенотипировании опухолевых клеток результаты реакций оценивали полуколичественным методом, с учетом уровня диссоциации в количестве окрашенных клеток и интенсивности окрашивания по каждому маркеру отдельно от 1 до

3 баллов. Определение уровня пролиферативной активности опухолевых клеток проводили на основе индекса Ki-67 (низкая – до 2, средняя – до 20 и высокая – более 20) как частоты окрашенных ядер при анализе 2000 опухолевых клеток в областях наибольшей пролиферативной активности.

Результаты всех исследований были занесены в специально созданную базу данных. Статистический анализ данных проводили на персональном компьютере с помощью пакета программ «Статистика для Windows» (StatSoft Inc., 1996, Version 5,0).

Результаты исследования и их обсуждение

Проведен анализ антигенных характеристик в опухолях 21 пациенток с первичным НЭРМЖ (T2-4N0-1M0-1), что составило 3,4% от общего числа исследований РМЖ. Средний возраст обследованных составлял $68,1 \pm 6,9$ лет, из них 16 (72,2%) были старше 60 лет. Локальная стадия НЭРМЖ (T1-3N0M0) установлена в 7 случаях (33,3%), локорегиональная стадия (T1-3N1-2M0) в 7 случаях (33,3%). Первичная опухоль чаще локализовалась в правой молочной железе (15 больных; 71,4%), чем в левой железе (6 больных; 28,6%). Количество диагностированных случаев НЭРМЖ увеличилось в 2011 г. в сравнении с 2007 г. в 8 раз.

Экспрессия NSE была выявлена в 100% наблюдений, при этом в 16 случаях (76,2%) отмечен высокий уровень содержания антигена (2–3 балла).

Остальные маркеры встречались значительно реже: Synap – в 7 случаях (23,8%), ChromA – в 12 случаях (57,1%), CD56/NCAM – в 8 случаях (38,1%). При этом наличие только NSE было установлено в 6 случаях (28,6%). В остальных наблюдениях имелась коэкспрессия NSE с одним НЭМ в 4 случаях (19%), с двумя НЭМ – в 5 случаях (23,8%), и в 6 случаях выявлена коэкспрессия всех четырех НЭМ (28,6%). Все исследованные НЭРМЖ характеризовались низкой степенью пролиферативной активности: индекс Ki-67 составил 1–2%.

При исследовании эпителиальных маркеров PCK и ЕМА установлено, что экспрессия PCK в большинстве случаев отсутствовала или была слабо выражена (14 случаев; 66,7%) и определялась в виде мозаичной и «dot-like» реакции. В то же время ЕМА регистрировалась чаще (16 случаев; 76,2%) и была более выраженной и мономорфной.

Исследование рецепторов стероидных гормонов ER и PgR показало, что в 12 случаях (57,1%) опухолевые клетки имели рецепторы обоих гормонов.

Приводим описание двух собственных наблюдений.

Пациентка Д., 54 года. Опухоль диаметром 3,5 см в виде четко ограниченного узла округлой формы, плотно-эластичной консистенции, локализовалась в нижнем внутреннем квадранте левой молочной железы. Проведена диагностическая пункционная биопсия. При гистологическом исследовании опухоль была представлена полями солидного роста лимфоцитоподобных, относительно мономорфных клеток с гиперхромными ядрами с различным содержанием хроматина, узкой цитоплазмой. Клеточные поля были пронизаны тонкостенными синусоидными сосудами с образованием перичитарных структур типа псевдорозеток. При проведении ИГХ исследования опухолевые клетки экспрессировали виментин (Vim), эпителиально-мембранный антиген (EMA), с гиперэкспрессией маркера нейроэктодермальной ткани (S100), нейронспецифической энolahзы (NSE) при негативной реакции к панцитокератину (PanCK). В цитоплазме опухолевых клеток выявлена экспрессия нейроэндокринных маркеров: хромагранина (ChromA) и синаптофизина (Synap) в виде пылевидного и мелкозернистого цитоплазматического окрашивания во всех опухолевых клетках. Поставленный патоморфологический диагноз «Нейроэндокринный мелкоклеточный рак молочной железы (ICD-O codes 8041/3)» был подтвержден при морфологическом и повторном ИГХ исследовании удаленной молочной железы. При этом установлено отсутствие в опухолевых клетках рецепторов стероидных гормонов – эстрогена (ER) и прогестерона (PgR).

Пациентка В., 68 лет. Опухоль размерами 4,0×3,0×2,5 см, каменистой плотности, с нечеткой, фестончатой границей, локализовалась в верхне-наружном квадранте правой молочной железы. При гистологическом исследовании опухоль представлена полями гиперхромных, округлых клеток небольших размеров, с узкой цитоплазмой, разделенных между собой прослойками фиброзной ткани, растущих в виде солидных клеточных комплексов округлой и неправильной формы, с розеткоподобными структурами. В периферических отделах имеется инфильтрирующий рост в виде трабекул и тяжей, местами напоминающими скirr. ИГХ исследование выявило гиперэкспрессию всеми опухолевыми клетками следующих антител: Vim, EMA, S100, NSE, а также примерно в 10% клеток PanCK. Выявлена цитоплазматическая экспрессия большинством клеток

опухоли только синаптофизина (Synap) при негативной реакции на хромагранин А (ChromA). В отличие от первого случая, большинство опухолевых клеток были ER- и PgR-позитивными. Патоморфологический диагноз «Нейроэндокринный мелкоклеточный рак молочной железы (ICD-O codes 8041/3)».

Заклучение

В результате проведенного морфологического и иммуногистохимического исследования установлено увеличение частоты диагностики НЭРМЖ за 5 лет наблюдения в 8 раз, что находится в соответствии с современными данными литературы [8, 9]. НЭРМЖ встречается в 3,4% всех раков молочной железы и достоверно чаще у женщин в возрасте старше 60 лет. Анализ полученных данных свидетельствует, что НЭРМЖ при различной локализации, макроскопической картине и ИГХ профиле панцитокератинов и стероидных гормонов имеет четко выраженную экспрессию нейроэктодермальных и нейроэндокринных маркеров в различной комбинации, с высокой специфичностью NSE (100%) и ChromA (57,1%).

Таким образом, рак молочной железы является гетерогенным заболеванием, которое существенно различается по клиническому течению, морфологическому и молекулярному строению опухолевых элементов, что требует различных подходов к его диагностике с оптимизацией клинико-морфологического исследования и проведением иммуногистохимической верификации. НЭРМЖ образуют редкую и гетерогенную группу опухолей. ИГХ исследование выявляет гормонсекретирующие элементы и их долю в опухолевом пуле и позволяет дифференцировать НЭРМЖ от других форм рака молочной железы, в том числе и при исследовании пункционного биоптата.

Список литературы

1. Кириллина М.П., Лоскутова К.С., Лушников Е.Л., Непомнящих Л.М. Иммуногистохимическое исследование маркера апоптоза P53 как прогностического фактора при раке молочной железы // Якутский медицинский журнал. – 2013. – № 2. – С. 55–58.
2. Кириллина М.П., Лоскутова К.С., Лушников Е.Л., Непомнящих Л.М. Особенности экспрессии молекулярно-биологических маркеров при раке молочной железы в условиях республики Саха (Якутия) // Бюл. экспер. биол. – 2014. – Т. 157, № 5. – С. 642–647.
3. Комов Д.В., Кушлинский Н.Е., Поликарпова С.Б. и др. Клинико-морфологические параллели нейроэндокринных опухолей органов брюшной полости и забрюшинного пространства // Современные технологии в медицине. – 2010. – № 2. – С. 27–31.

4. Любимова Н.В., Кожарская Г.В., Портной С.М., Кушлинский Н.Е. Биохимические маркеры костного метаболизма при раке молочной железы // Бюл. экспер. биол. – 2014. – Т. 157, № 6. – С. 740–744.

5. Тодоров С.С., Кит О.И., Босенко Е.С. и др. Морфоиммуногистохимическая характеристика синхронного билатерального рака молочной железы // Бюл. экспер. биол. – 2014. – Т. 157, № 5. – С. 663–666.

6. Peraldi R., Versini S., Peres C., Pages A. Les tumeurs neuroendocrines de la glande mammaire: Bilan actuel a propos d'un cas // Arch. Anat. et Cytol. Pathol. – 1991. – № 4. – P. 151–157.

7. Silva E.G. Tumors of diffuse endocrine system, histochemical and electronoptic aids and pitfalls in diagnosis // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. – 1984. – Vol. 21, № 1. – P. 19–49.

8. Soga J., Osaka M., Yakuwa Y. Gut-endocrinomas (carcinoids and related endocrine variants) of the breast: an analysis of 310 reported cases // Int. Surg. – 2001. – Vol. 86, № 1. – P. 26–32.

9. Wang J., Wei B., Albarracin C.T. et al. Invasive neuroendocrine carcinoma of the breast: a population-based study from the surveillance, epidemiology and end results (SEER) database // BMC Cancer. – 2014. – Vol. 14. – P. 147–156.

10. Yao J.C., Hassan M., Phan A. et al. One hundred years after «carcinoid»: epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35 825 cases in the United States // J. Clin. Oncol. – 2008. – Vol. 26, № 18. – P. 3063–3072.

References

1. Kirillina M.P., Loskutova K.S., Lushnikova E.L., Nepomnyashchikh L.M. *Yakutskiy meditsinskiy zhurnal – Yakut medical journal*, 2013, no 2, pp. 55–58.

2. Kirillina M.P., Loskutova K.S., Lushnikova E.L., Nepomnyashchikh L.M. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny – Bulletin of experimental biology and medicine*, 2014, vol. 157, no. 5, pp. 642–647.

3. Komov D.V., Kushlinskiy N.E., Polikarpova S.B. et al. *Sovremennye tekhnologii v meditsine – Modern technology in medicine*, 2010, no. 2, pp. 27–31.

4. Lyubimova N.V., Kozharskaya G.V., Portnoy S.M., Kushlinskiy N.E. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny – Bulletin of experimental biology and medicine*, 2014, vol. 157, no. 6, pp. 740–744.

5. Todorov S.S., Kit O.I., Bosenko E.S. et al. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny – Bulletin of experimental biology and medicine*, 2014, vol. 157, no. 5, pp. 663–666.

6. Peraldi R., Versini S., Peres C., Pages A. *Arch. Anat. et Cytol. Pathol.*, 1991, no. 4, pp. 151–157.

7. Silva E.G. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 1984, vol. 21, no. 1, pp. 19–49.

8. Soga J., Osaka M., Yakuwa Y. *Int. Surg.*, 2001, vol. 86, no. 1, pp. 26–32.

9. Wang J., Wei B., Albarracin C.T. et al. *BMC Cancer*, 2014, vol. 14, pp. 147–156.

10. Yao J.C., Hassan M., Phan A. et al. *J. Clin. Oncol.*, 2008, vol. 26, no. 18, pp. 3063–3072.

Рецензенты:

Авдалян А.М., д.м.н., заведующий лабораторией молекулярной диагностики Алтайского филиала ФГБУ Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина РАМН, г. Барнаул;

Горчаков В.Н., д.м.н., профессор, заведующий лабораторией функциональной морфологии лимфатической системы, ФГБУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, г. Новосибирск.

Работа поступила в редакцию 07.07.2014.