

Festina lente

*Диференційна діагностика медулярного і
протокового інфільтративного раку
молочної залози*

2012 рік

План

Перелік скорочень	3
Вступ Актуальність теми.....	4
РОЗДІЛ 1 Огляд даних літератури	7
1.1 Молочна залоза: анатомія, гістологія, фізіологія	7
1.2 Характеристика досліджуваних видів раку молочної залози	10
1.3 Імуногістохімічний метод дослідження раку молочної залози	111
1.4 Найпоширеніші рецептори, які експресують ракові клітини молочної залози.....	12
РОЗДІЛ 2 Матеріали і методи.....	144
РОЗДІЛ 3 Результати власних досліджень.....	17
РОЗДІЛ 4 Висновки, практичні рекомендації та перспективи.....	24
Список літератури	26

Перелік скорочень

ДД – диференційна діагностика;

ІГХ – імуногістохімія;

МЗ – молочна залоза;

РМЗ – рак молочної залози;

ТЧПО - термінальна частково - протокова одиниця;

ER - рецептори до естрогену;

PgR – рецептори до прогестерону.

Вступ

Актуальність теми.

Рак молочної залози (РМЗ) займає перше місце серед всіх локалізацій злоякісних пухлин у жінок: на його долю припадає майже 30% захворюваності і 16-18% смертності від них. Щорічно цю патологію діагностують у 16 тисяч українок (Україна за показниками захворюваності на рак молочної залози посідає 5 місце в світі, що становить 64,5 на 100 тис. жіночого населення). Кожні 35—37 хвилин в нашій державі виявляється новий випадок захворювання на рак молочної залози і щогодини вмирає жінка від даної недуги. Рівень захворюваності за останні 40 років збільшився більш ніж утричі. Недоліки діагностики часом доповнюються помилками в лікуванні раку молочної залози, які в свою чергу можуть привести до підвищення смертності від цього виду онкопатології.

Серед всіх видів раку молочної залози, які зустрічаються повсякденно в практиці онкологів, значний відсоток займають протоковий інфільтративний рак (40-80 %) та медулярний рак (2-7%). Саме ці два види карциноми мають найбільше спільного в гістологічній картині, що ускладнює верифікацію остаточного діагнозу.

Враховуючи лідируюче місце новоутворень молочної залози серед онкологічних патологій у жінок, диференційна діагностика (ДД) пухлинних процесів у тканині молочної залози являє собою вельми актуальну проблему, оскільки не тільки визначає об'єм оперативного втручання, але також впливає на терапевтичні заходи, прогноз, якість життя, психічну та соціальну реабілітацію пацієнток. Необхідно вказати, що в більшості випадків ДД, як правило, не викликає суттєвих труднощів у досвідчених патоморфологів і випадки, що потребують використання додаткових діагностичних методів, зустрічаються нечасто. Разом з тим, у сумнівних ситуаціях лише

застосування імуногістохімічних маркерів, що дозволяє з більшою вірогідністю верифікувати онкологічний процес.

Патоморфологічна діагностика є невід'ємною ланкою при вивченні РМЗ як з клінічних позицій, так і в дослідженнях загальнобіологічного плану, оскільки лише патоморфолог може надати точну характеристику гістологічних структур пухлини та адекватно оцінити її біологічні властивості. Разом з тим на даний час імуногістохімічні (ІГХ) методи дослідження отримали високу оцінку та широке розповсюдження в онкологічній практиці у зв'язку з їх надзвичайною високою чутливістю та інформативністю, що разом із рутинними методами забарвлення парафінових зрізів дозволяє патоморфологам більш глибоко та достовірно інтерпретувати препарат, встановлювати тонкі відмінності між гістологічно подібними патологічними процесами та нівелювати можливість встановлення помилкового діагнозу.

Мета роботи

Розробити алгоритм диференційної діагностики між протоковим інфільтративним та медулярним раком молочної залози з урахуванням імуногістохімічних маркерів.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні **задачі дослідження:**

- опрацювати наукову літературу з даної проблеми;
- опрацювати дані патоморфологічних досліджень операційного матеріалу та дослідити структуру онкозахворювань в обласному онкологічному диспансері за останні 5 років;
- розробити алгоритм ДД критеріїв протокового інфільтративного та медулярного раку молочної залози;
- оцінити значимість експресії рецепторів естрогену, прогестерону, HER-2/неу, p53 та Ki-67 в ДД протокового інфільтративного та медулярного раку молочної залози.

Об'єкт дослідження: операційний матеріал (тканини злоякісних пухлин МЗ).

Предмет дослідження: морфологічні критерії злоякісних пухлин, гістологія пухлин МЗ, експресія раковими клітинами рецепторів естрогену, прогестерону, HER-2/неу, p53 та Ki-67.

Методи дослідження:

- загальноприйняті рутинні гістологічні методи;
- методи медичної статистики;
- імуногістологічне дослідження рецепторного апарату ракових клітин.

Наукова новизна отриманих результатів.

Робота значну увагу приділяє виявленню рецепторів до стероїдних гормонів та інших маркерів раку МЗ, які мають прогностичне значення. Отримані результати можуть бути використані в практичній медицині з метою підвищення якості лікування, враховуючи чутливість ракових клітин до фармакологічних препаратів.

Вперше в подібних дослідженнях створено алгоритм диференційно діагностичних критеріїв інфільтративного протокового та медулярного раку МЗ, оцінюючи морфологічні, гістологічні та імуногістохімічні ознаки.

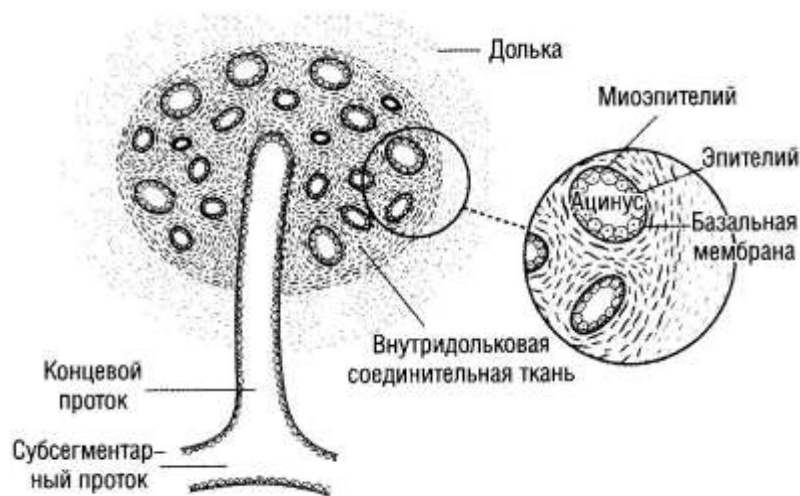
РОЗДІЛ 1

Огляд даних літератури

1.1 Молочна залоза: анатомія, гістологія, фізіологія

Молочна залоза, *glandula mammalia* (mamma) - парний орган, за своїм походженням є видозміненою шкірною потовою залозою. Закладається у зародка довжиною 8-10 см у вигляді двох поздовжніх потовщень епідермісу [1].

В центрі залози розташований сосок, оточений ареолою - відносно плоскою ділянкою пігментованої шкіри, яка містить численні виступи (горбики Монтгомері), на вершині яких відкриваються вивідні протоки сальних залоз, що змащують сосок під час грудного вигодовування. Під шкірою ареоли розміщується компактний шар циркулярних і продовгуватих м'язових волокон, які забезпечують напруження соска. Вся молочна залоза, особливо сосок, рясно інерована сенсорними нервами [2].



Мал. 1. Схематичний поділ МЗ на морфофункціональні одиниці

З періоду встановлення менструацій і до їх припинення молочна залоза являє собою альвеоларно-трубчатую структуру з добре розвинутою ложевою і опорною стромою. Залозисті структури складаються з великої кількості кінцевих альвеоларних пухирців, сполучених дрібними внутрішньочастковими протоками. Частка і дрібні термінальні поза-

внутрішньочасткові протоки утворюють морфофункціональну одиницю МЗ, яка носить назву термінальна частково - протокова одиниця (ТЧПО) (Мал.1). Остання є секреторною частиною МЗ. ТЧПО відкривається в іншу морфофункціональну одиницю органа - систему крупних вивідних протоків - субсегментарних, сегментарних і загальних; останні відкриваються на поверхні соска [3].

Кровопостачання МЗ здійснюється гілками внутрішньої грудної артерії (гг. perforantes в III-V міжребер'ях утворюють медіальні гілки молочної залози); верхньою і латеральною грудними артеріями з басейну а. axillaris, а також III-VII задніми міжреберними артеріями. Глибокі вени супроводжують однойменні артерії, поверхневі вени розміщуються під шкірою, де утворюють густу сітку. Лімфовідтік відбувається в систему підключичних, надключичних, підпахвинних, парастернальних лімфатичних вузлів через систему поверхневих та глибоких лімфатичних судин. Чутлива і симпатична інервація МЗ здійснюється передніми гілками II-VII міжреберних нервів [5].

Регуляція росту та розвитку залози відбувається завдяки складному гормональному контролю. Основна роль належить у ньому естрогенам, прогестерону і пролактину, які підпорядковуються дії гіпоталамуса (релізінг гормони) та гіпофіза (фолікулостимулюючий гормон підвищує рівень естрогенів, а лютеїнізуючий – рівень прогестерону) відповідно до циклів менструального періоду. В першій фазі пубертатного періоду, до настання менархе, на розвиток молочних залоз впливають естрогени, в другій — естрогени та прогестерон. Естрогени відповідають за зростання та розвиток протоків і сполучної тканини, прогестерон — за зростання і розвиток залозистої тканини, збільшення числа альвеол, ріст дольок. Основна роль пролактину — стимуляція секреції молока лактоцитами; під впливом пролактину збільшується число рецепторів естрогенів в молочній залозі. В регуляції розвитку молочної залози приймає участь і соматотропний гормон, подібний за фізіологічною дією до пролактину. Не аби яке значення мають

також трийодтиронін, тироксин, кортизол та інсулін в регуляції діяльності МЗ (Мал.2) [6].



Мал.2 Схема гормонального впливу на молочну залозу

Гормональному впливу підлягає паренхіма, на яку поза вагітністю безпосередньо діють естрогени, прогестерон, пролактин і соматотропний гормон, а під час вагітності — плацентарні естрогени, прогестерон, лактоген і пролактин. Ймовірно, опосередковано на тканини молочної залози діють тиреоїдні, глюкокортикоїдні гормони та інсулін. В меншому ступені гормональному впливу підлягає строма, в якій можлива гіперплазія під впливом естрогенів.

Наукові дані експериментальних досліджень показують, що як естрогени в поєднанні з гонадотропінами, так і прогестерон викликають в МЗ виражену гіперплазію клітинних елементів. Однак характер гіперплазії, обумовлений дією різних статевих стероїдних гормонів, неодинаковий. Гіперплазія, яка виникла під впливом естрогенів і ФСГ, зачіпає перш за все молочні ходи і характеризується приєднанням секреторних процесів, тоді як гіперплазія, викликана дією прогестерону відмічається проліферацією і диференціацією переважно

альвеолярного (залозистого) апарату, що може супроводжуватись збільшенням розмірів (і, можливо, кількості) дольок паренхіми.

Під впливом гормональних зрушень порушуються процеси фізіологічної еволюції та інволюції в молочних залозах, розвиваються вогнища проліферації епітелію. Накопичуючись на протязі багатьох років, дані зміни призводять до розвитку мастопатії, а в ряді випадків на їхньому фоні розвивається малігнізація [4,5].

1.2 Характеристика досліджуваних видів раку молочної залози

Інфільтративний протоковий рак молочної залози - це найпоширеніша злоякісна пухлина молочних залоз, часто включає в себе компоненти з кількох певних типів раку молочних залоз: тубулярного, медулярного, сосочкового, слизового. Інвазивний протоковий рак нерідко включає в себе компоненти внутрішньопрокового раку. Клінічні прояви цієї форми неспецифічні. Частіше хворіють жінки у віці 45-50 років. Макроскопічно пухлина представлена щільним солідним вузлом з різними змінами на поверхні зрізу. Формування кіст може бути пов'язано з некрозом. При скіррозном варіанті пухлинний вузол дуже щільний, сірувато-білий. Крейдовидні прошарки у вузлі свідчать про некроз, наявність кальціфікатів або еластозу. Більшість таких ракових вузлів макроскопічно можна розділити на дві групи: ті які являють собою вузли зірчастої (інфільтративні) або чітко окреслені (округлі) форми. Під мікроскопом гістологічні межі новоутворення нерідко виходять за макроскопічні, особливо в інфільтративному варіанті. Визначальним фактором для оцінки прогнозу інвазивного протокового раку є тип росту «ракової» тканини і ступінь гістологічного диференціювання злоякісних клітин. Виділяють три категорії: високодиференційований (ступінь I – 1). - наявність тубулярних і протокоподібних структур більше 75%, 2). - кількість мітозів при збільшенні 400 - менше 10 в 10 полях зору, 3). - клітинний поліморфізм - клітини одного розміру і форми, дрібні, з дисперсним розподілом хроматину, без ядерець), помірнодиференційований

(ступінь II – 1). - від 10 до 75%, 2).- від 10 до 20 мітозів, 3). – деякий поліморфізм ядер, незначне збільшення клітин) та низькодиференційований (ступінь III – 1). - менше 10%, 2). - більше 20 мітозів, 3). - ядра великі, різної форми, з одним або декількома ядерцями, з грубим хроматином) [7].

Медулярний рак молочної залози: складається з низькодиференційованої паренхіми і мізерної кількості стромы з вираженою лімфоїдною інфільтрацією. Він становить 5-7% від усіх типів раку молочних залоз, частіше зустрічається у віці 45-55 років, але в 10% випадків - у більш молодих жінок. Макроскопічно представлений чітко окресленим, помірно щільним пухлинним вузлом. Вузол діаметром 2-3 см, менш щільний, ніж при інших формах раку, має ознаки фіброзу в периферійній зоні, що може імітувати капсулу. Іноді межі пухлини нечіткі, що пояснюється наявністю лімфоїдної інфільтрації. Поверхня розрізу ракового вузла дольчата або вузлова, тканина блідо-рожева або сірувата. Можуть бути вогнища некрозу, крововиливу, іноді кісти. Медулярний рак має більш кращий прогноз у порівнянні з іншими видами раку [8].

1.3 Імуногістохімічний метод дослідження раку молочної залози

Імуногістохімічне дослідження - метод мікроскопічного дослідження тканин, що забезпечує найбільш специфічне виявлення в них досліджуваних речовин і заснований на обробці зрізів маркованими специфічними антитілами до певних білків, які в даній ситуації служать антигеном. Вперше спосіб фарбування клітинних і тканинних компонентів за допомогою специфічних антитіл для мікроскопічного дослідження був запропонований А. Соонс в 1941 році. Для візуалізації взаємодії антитіл з антигеном необхідно позначити антитіла, тобто забезпечити їх міткою, яку було б видно під мікроскопом. Для цих цілей існує декілька добре відпрацьованих підходів. Способи маркування антитіл - зв'язування з однією з наступних груп речовин: а). флуоресцентні барвники (родамін, флуоресцеїн) – бачимо світіння при огляді в ультрафіолетовому світлі; б). електронно-щільні

частинки (колоїдне золото, феритин) – місця локалізації антигену бачимо під електронним мікроскопом; б). ферменти (лужна фосфатаза, пероксидаза хрому) - далі виявляються гістохімічно при огляді препарату під світловим мікроскопом. В практичній діяльності в більшості випадків використовують останній спосіб маркування препаратів, який може проводитися в один, два і навіть три етапи. Сама реакція взаємодії антигену з антитілом може проходити в двох варіантах:

- пряма: реакція специфічного зв'язування маркованих антитіл безпосередньо з речовиною, яка виявляється;
- непряма: немарковані первинні антитіла зв'язуються з потрібним антигеном (речовиною, що виявляють), а далі вже їх виявляють за допомогою вторинних мічених антитіл, при цьому первинні антитіла служать для вторинних антигенами (Мал. 3)[9].



Мал. 3. Пряма і непряма реакції виявлення антигену

1.4 Найпоширеніші рецептори, які експресують ракові клітини молочної залози

1). Рецептори до естрогену (ER) та прогестерону (PgR). В нормі в епітелії молочної залози спостерігається невисока експресія ER і PgR (7% -30% клітин в залежності від фази циклу або гормонального фону), тоді як при пухлинній трансформації значно підвищується експресія обох маркерів [10]. У стромі не відзначається їх експресія, незважаючи на те, що в фібробластах виявлено рецептори до ER і PgR [11]. Естроген-і прогестерон-рецепторний статус пухлини молочної залози визнаний одним з найбільш потужних прогностичних маркерів: у випадку естроген- або прогестерон- позитивної

пухлини, остання – є керованою і контрольованою антиестрогенними препаратами. Рецептори знаходяться в ядрі, тому клітинним елементом, зафарбованим в ІГХ реакції, є саме ядро [12].

2). HER-2/neu - епідермальний фактор росту. За останні 20 років найбільш вивченим представником в цій області є протоонкоген HER -2/neu, який локалізується в 17q - хромосомі і кодує тирозин - киназний рецептор до чинників зростання. Його підступність полягає не тільки в здатності стимулювати пухлину до самозростання, але також у залученні стромы в експресію рецепторів до самого фактору з наступною "опосередкованою" індукцією пухлинного росту (так званий "подвійний" механізм пухлинної прогресії) [13]. При позитивному HER-2/neu-статусі 5-річна виживаність становить 56%, при негативному - 73%. Також експресія HER-2/neu свідчить про резистентність пухлини до хіміотерапії, в тому числі до тамоксифену. Рецептори знаходяться на клітинній мембрані, тому клітинним елементом, зафарбованим в ІГХ реакції, є саме мембрана клітини [9].

3). P53. На даний момент описано 2 типи p53-протеїну: wt (wild type) p53 - "дикий" тип p53, присутній у всіх проліферуючих і регенеруючих тканинах і який кодує апоптозний шлях елімінації клітин. Одним з "стратегічних" рішень пухлинної тканини є мутація гена з синтезом "мутантного" типу (mt p53) білка, який "імітує" властивості "дикого" і таким чином вислизує з-під впливу системи імунного захисту. Накопичення mt p53 свідчить про агресивну поведінку РМЗ, більш короткий безметастазний і безрецидивний період, гірший прогноз і більш "жорстку" терапію [14]. Рецептори знаходяться в ядрі, тому клітинним елементом, зафарбованим в ІГХ реакції, є також ядро [12].

4). Ki-67 - маркер проліферативного потенціалу пухлини. Ступінь злоякісності і диференціювання РМЗ багато в чому визначається проліферативною активністю пухлинних клітин. Вивчення негістонового протеїну Ki-67 (маркера проліферації), експресуючогося у всіх клітинах, що

вийшли з G0-фази, є актуальною проблемою і дозволяє визначити саме "прихований" проліферуючий потенціал даної пухлини і оцінити ступінь злоякісності, а також розділити пацієнтів на групи з відносно сприятливим і несприятливим прогнозом [15]. Рецептори знаходяться в ядрі (як і у ER, PgR та P53), тому клітинним елементом, зафарбованим в ІГХ реакції, є також ядро [12].

РОЗДІЛ 2

Матеріали і методи

Для створенні таблиці диференційних морфологічних критеріїв нами були відібрані дві нозології – інфільтративний протоковий рак та медулярний рак молочної залози. Дослідження проводилось на основі сучасних даних наукової літератури, а також на секційному матеріалі та матеріалі, отриманому під час оперативних втручань на базі онкологічного диспансеру.

Першочергово було відібрано 30 показових випадків з 50 обстежених препаратів, 20 - інфільтративного протокового та 10 - медулярного раку, з біопсійного матеріалу жінок, прооперованих з приводу раку молочної залози.

Після послідовних дій (фіксація тканини залози в 10% розчині формаліну, заливка в парафін, депарафінізації та зневоднення) частина препаратів використовувалась для фарбування гематоксиліном-еозином та проведення гістологічного дослідження під світловим мікроскопом, а частина на проведення імуногістохімічного дослідження.

Схема послідовних дій, під час проведення імуногістохімічного дослідження препарату:

1. фіксація тканини залози в 10% розчині нейтрального формаліну протягом 12 годин, заливка в парафін, депарафінізації та зневоднення;
2. демаскування антитіл (кип'ятіння в цитратом буфері);

3. пригнічення ендогенної пероксидази за допомогою H_2O_2 ;
4. інкубація перший антитіл при $t\ 30^0$;
5. промивання в 3 стаканах ТВС-буфері (Тріс-НСІ буфер рН 7,4);
6. інкубація зв'язуючих антитіл;
7. промивання в 3 стаканах ТВС-буфері;
8. інкубація з стрептовідином (кон'югований з ферментом);
9. промивання в 3 стаканах ТВС-буфері;
10. виявлення ферменту діамінобензидином;
11. промити водою, дофарбовування ядер гематоксиліном, заключення в бальзам гліцерин-желатину.

З метою встановлення експресії прогностичних імуногістохімічних маркерів ми використовували спектр антитіл, який включав маркери р53 (клон DO-7 (DAKO), маркеру проліферації Ki-67 (клон M1B-1 (DAKO), HER-2/neu (DAKO, клон 8P3 (LabVision)), рецепторів стероїдних гормонів: ER (клон 1D5 (DAKO), клон 8P1 (LabVision)) та PgR (клон PgR 636 (DAKO), клон SP2 (LabVision)). Інкубацію зрізів з первинними антитілами проводили у вологих камерах при температурі 23-25°C на протязі 30 хвилин. Титр антитіл підбирався індивідуально для кожного маркера. Наступний етап імуногістохімічного дослідження проводили з використанням системи візуалізації UltraVision LP (LabVision), ідентифікація реакцій проводилась за допомогою хромогену DAB (діамінобензидин). Для диференціювання структур тканин зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра.

Показники експресії імуногістохімічних маркерів' визначали за інтенсивністю фарбування в коричневий колір специфічних структур в клітинах та за локалізацією експресії маркеру клітинною мембраною та ядром. Експресію для кожного маркеру оцінювали індивідуально не менше ніж в 10 полях зору мікроскопу з наступною градацією, а саме: негативна та позитивна експресія. Вивчення забарвлених мікропрепаратів проводилось за

допомогою світлового мікроскопу, а фотозйомка – за допомогою цифрової системи вибору зображень SEO SCAN IEX285AK-F IEE - 1394.

Оцінка препаратів стосовно експресії рецепторів до естрогену, прогестерону та HER-2/neu було боділено на 2 категорії: а). позитивні стосовно наявності рецепторів (HER-2/neu+, ER+ та PgR+ відповідно) та б). негативні (HER-2/neu-, ER- та PgR- відповідно), незалежно від кількості пофарбованих клітин, тому що під час проведення діагностування зрізів було помічено, що одна з досліджуваних пухлин негативна щодо наявності рецепторів до HER-2/neu, ER та PgR, що значно полегшувало нашу роботу.

Стандарт оцінки експресії p53 виявився складніший в порівнянні із стероїдними рецепторами і вимагав обережної інтерпретації. Ми користуємося рекомендаціями американської науково-дослідницької лабораторії. При фарбуванні менше 5% ядер, незалежно від інтенсивності, пухлина вважається p53-негативною. P53-позитивним статус буде при: 1) фарбуванні більше 50% ядер незалежно від інтенсивності, 2) інтенсивному (3+) фарбуванні більше 5% ядер, 3) помірному фарбуванні від 10% до 50% ядер.

Проліферативна активність в пухлинах молочної залози у відповідності до рекомендацій Fitzgibbons et al. (2000) оцінювалася по градаціях ($\geq 1\%$, $\geq 10\%$, $\geq 20\%$ пухлинних клітин), у зв'язку з чим експресія Ki-67 більш ніж в 20% пухлинних клітин розглядалася як позитивна (Ki-67+) та як вкрай несприятлива, а менше 20% - негативна (Ki-67-).

РОЗДІЛ 3

Результати власних досліджень

Збираючи дані для аналізу в обласному онкологічному диспансері за період з 2005 до 2010 року було зроблено висновок про стабільно високий рівень захворюваності на РМЗ серед жіночого населення області. Рак молочної залози у Сумській області, як в Україні і більшості країн світу, прогресує і нині посідає перше місце в структурі захворюваності і смертності від злоякісних новоутворень у жінок (26-28% від усіх випадків раку). Щорічно на обліку з приводу РМЗ знаходяться від 3336 (2005р.) до 3789 жінок (2010р.), тобто відмічається зростання цього показника (Діаграма 1) [8].



Діаграма 1 – захворюваність на рак МЗ

Гістологічна характеристика медулярного раку молочної залози.

Досліджуючи препарати медулярного раку виявлено 5 основних характеристик даної нозології:

1) синцитіальні структури відзначають в більш ніж в 75% площі пухлинного зрізу. Пухлинні клітини формують пласти, звичайно в чотири-

п'ять і більше шарів клітин, розділених невеликою кількістю сполучної тканини. Можливі фокуси некрозу і плоско клітинної метаплазії;

2) пухлинні клітини не формують залози і трубочки навіть у невеликій кількості;

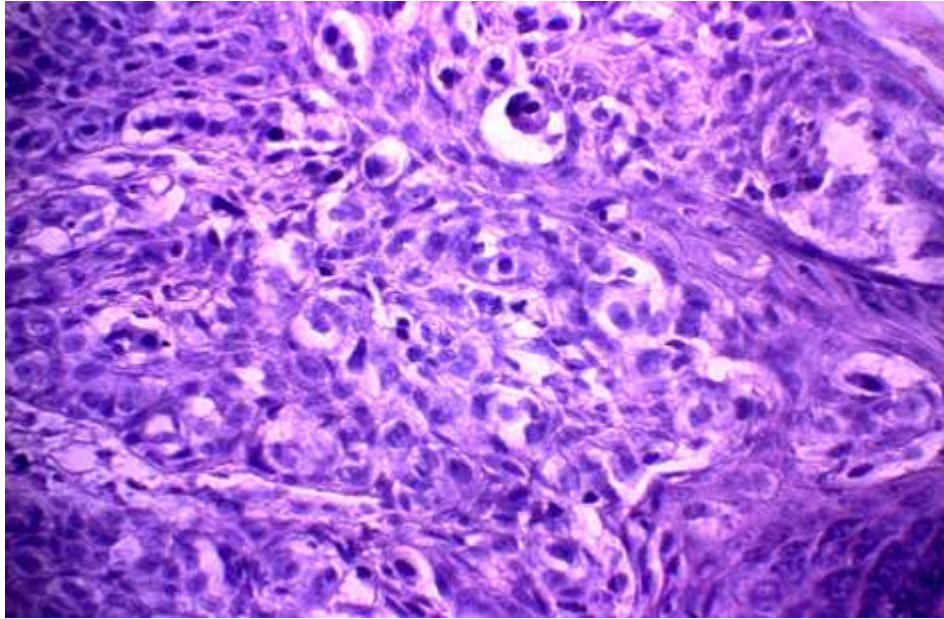
3) звертає увагу виражена лімфоплазмозитарна інфільтрація стромы. Щільність цього інфільтрату змінюється від випадку до випадку, при цьому мононуклеарні клітини можуть бути поодинокими або настільки численними, що повністю приховують клітини пухлини. Можливі лімфоїдні фолікули і/або епітелеоїдні гранульоми;

4) клітини пухлини зазвичай округлої форми з оптично порожньою цитоплазмою і пухирчастим ядром, що містить одне або кілька ядерць. Ядерний поліморфізм може бути помірним або вираженим, що відповідає помірному або низькому рівню гістологічної диференційовки (G2 або G3). Мітози численні, також можливі атипові гігантські клітини (Мал. 4);

5) повна гістологічна картина пухлини найкраще представлена у її вивченні на малому збільшенні мікроскопа. Краї пухлини можуть бути здавлені за рахунок фіброзу периферійної тканини.

Крім цих типових морфологічних ознак медулярного РМЗ в пухлині часто присутній компонент внутрішньопротокового раку, який розташований в оточуючій пухлину, не пов'язаний з пухлинною масою, тканині.

Ці діагностичні ознаки, особливо стан країв, іноді важко оцінити на практиці, що може привести до гіподіагностиці медулярної карциноми. Синцитіальний вид росту пухлинних клітин, відсутність трубчастих утворень, лімфоплазмозитарна інфільтрація, рідкість (менше 25% випадків) некрозів в пухлині є явними і характерними рисами медулярної карциноми.

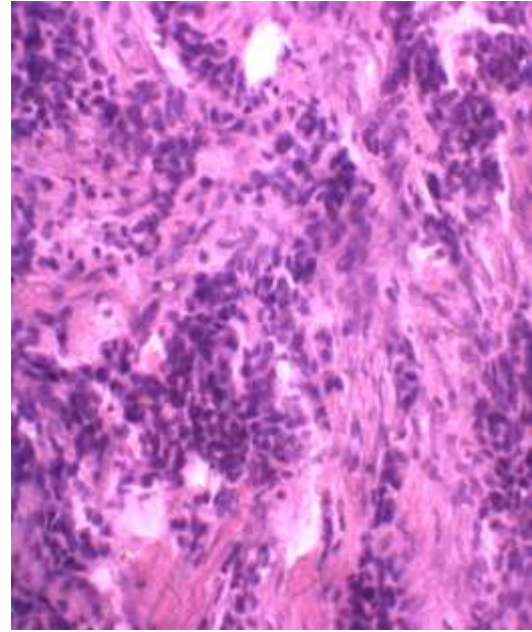
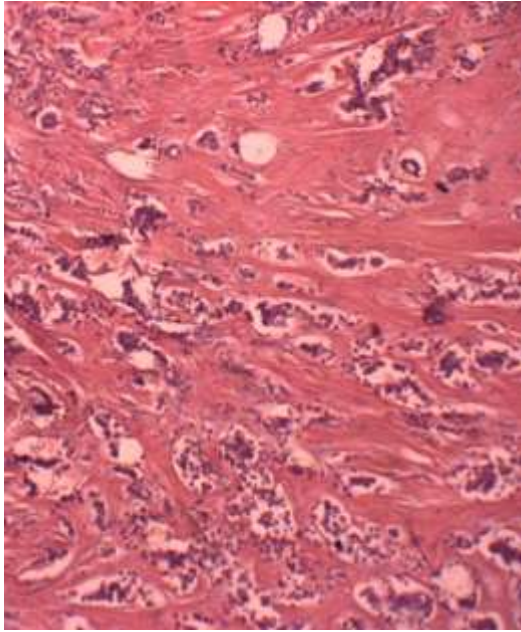


Мал. 4 Медулярний рак молочної залози

Забарвлення гематоксилін-еозин x 100

Гістологічна характеристика інфільтративного протокового раку молочної залози.

Досліджуючи препарати протокового раку також виявлені певні характерні особливості даної нозології. Гістологічна будова інвазивного протокового раку часто повторює попередню будова протоків. У випадках високого гістологічного диференціювання пухлинні клітини утворюють переважно залозисті, тубулярні структури. Помірно диференційована протокова карцинома молочної залози характеризується формуванням альвеолярних структур, тяжів, трабекул. У деяких випадках переважає фіброзна строма, а пухлинні клітини представлені окремими клітинами або ланцюжками клітин (Мал. 5).



Мал. 5 Інфільтративний протоковий рак молочної залози

Забарвлення гематоксилін-еозин x 100

У міру зниження диференціювання раку об'ємне включення стромы зменшується, ракові клітини формують солідні поля. Іноді переважають відносно відокремлені залозисті комплекси.

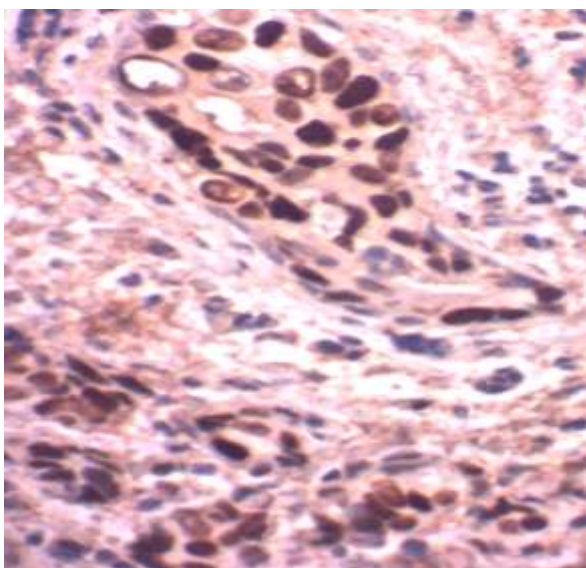
Пухлинні клітини протокового раку більші, ніж клітини часточкового раку, з вираженою цитоплазмою. Клітинний поліморфізм виражений різною мірою, залежно від рівня гістологічного диференціювання.

Діагноз «інвазивний протоковий рак молочної залози» правомірний, коли більш ніж 50% площі пухлини тубулярної, залозистої або протокової будову. Якщо в пухлині характерний протоковий компонент займає 49% і менше, а інша площа пухлини - інші форми раку, то слід використовувати термін «рак змішаного типу».

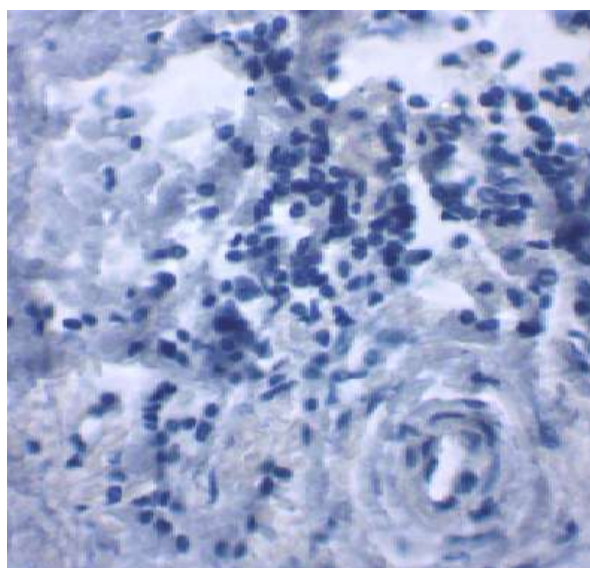
Експресія рецепторів досліджуваними пухлинами.

При дослідженні рецепторного статусу пухлин стосовно експресії рецепторів до стероїдних гормонів, було помічено, що 100% зрізів медулярного раку МЗ естроген- та прогестероннегативні. Стосовно протокового раку, то результати виявилися наступними: 50% (10 випадків)

були ER+, а 50% (10 випадків) були ER- (Мал. 6), 30% (6 випадків) - PgR+, а 70% (14 випадків)- PgR+ (Мал. 7).

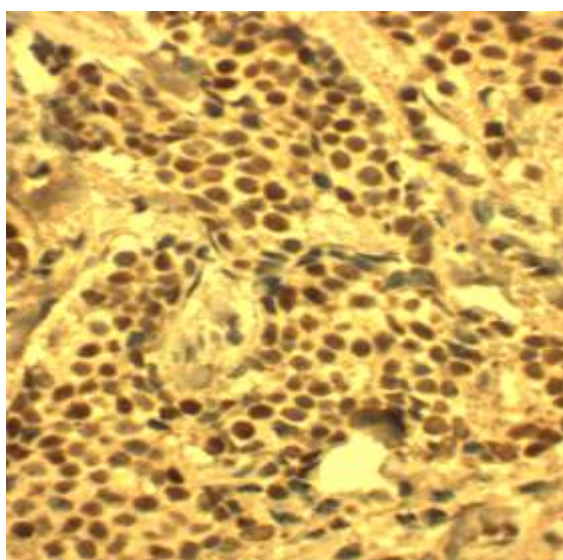


А

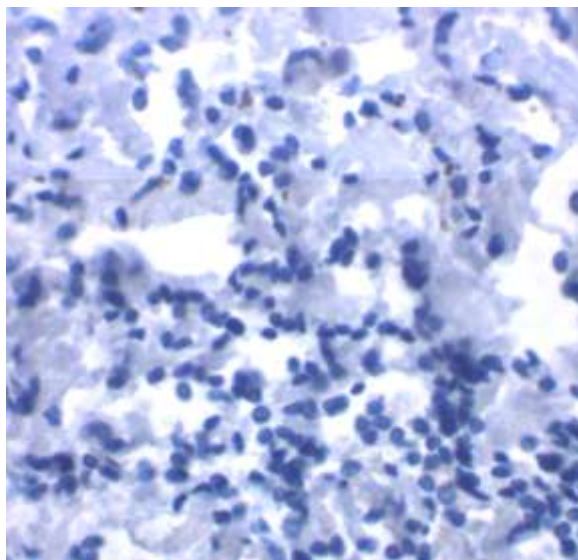


Б

Мал. 6 Прогестеронрецепторний статус пухлин А - PgR+ та Б – PgR-



А

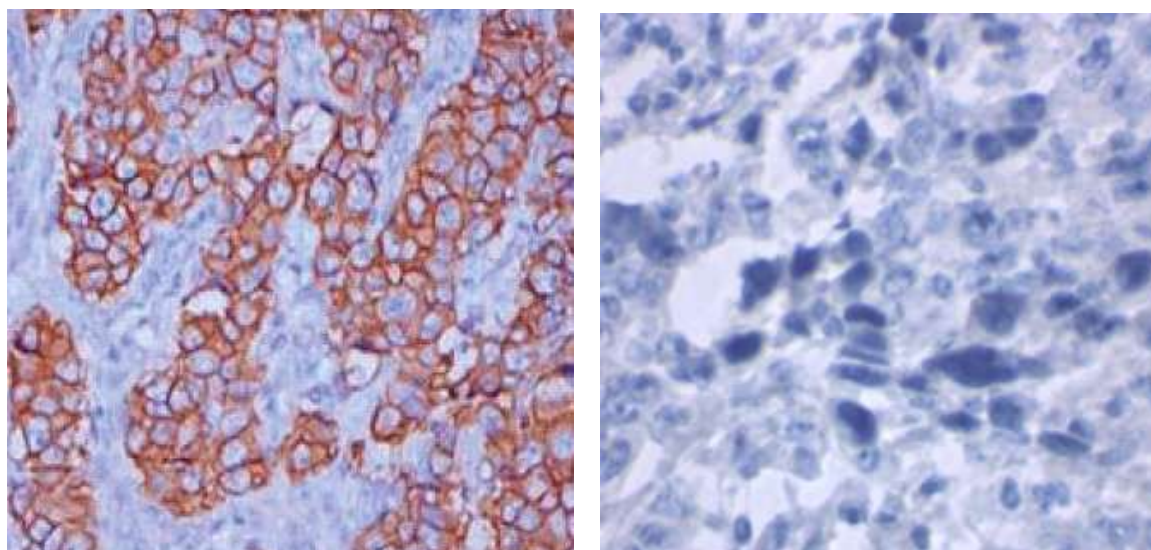


Б

Мал. 7 Естрогенрецепторний статус пухлин А - ER+ та Б – ER-

При дослідженні рецепторного статусу пухлин стосовно експресії рецепторів до HER-2/neu, виявлена схожа закономірність у медулярного рака МЗ (всі 100% зрізів були HER-2/neu-), а стосовно протокового, то результати

виявилися наступними: 35% (7 випадків) були HER-2/neu-, а 65% (13 випадків) - HER-2/neu+ (Мал.8).



А

Б

Мал.8 А - HER-2/neu+ та Б - HER-2/neu- раку МЗ

Статус пухлин, щодо рецепторів до P53 та Кі-67 у двох групах виявився наступним: 1) у медулярного раку МЗ: а). P53+ статус мали 80% (8 випадків) пухлин, а P53- статус – 20% (2 випадків); б). Кі-67-позитивними виявилось 90% (9 випадків), а Кі-67-негативними – 10% (1 випадків) пухлин. 2) у інфільтративного протокового раку МЗ: а). P53+ пухлини склали 30% (6 випадків), а P53- знайдено у 70% (14 випадків); б). 70% (14 випадків) виявилися Кі-67 позитивними, а 30% (6 випадків) – Кі-67 негативними.

Аналізуючи дані, отримані під час морфологічної, гістологічної та імуногістохімічної діагностиці, можна прийти до висновку, що інфільтративний протоковий рак та медулярний рак молочної залози це зовсім дві різні пухлини (хоча існує думка, що медулярний рак є різновидом прояву інфільтративного протокового раку). Про це свідчить різна консистенція пухлинного вузла; обмеженість росту пухлини та однорідно

Таблиця 1. Диференційно діагностичні критерії медулярного та інфільтративного протокового раку молочної залози

Характеристики	Інфільтративний протоковий рак	Медулярний рак
Консистенція пухлинного вузла	Різна, частіше щільна	М'яка
Форма вузла	Зірчаста, іноді округла	Округла
Межі пухлини	Нечіткі	Чіткі, окреслені
Вторинні зміни	Часто	Рідко
Ступінь диференціювання клітин	Різний, від низького до високо-диференційованого	Низькодиференційований
Лімфоплазмоцитарна інфільтрація	+-	+
Наявність строми	+-	-
Формують клітинами залоз і трубочок	+-	-
Експресія рецепторів до стероїдних гормонів	50%	-
Експресія рецепторів до HER-2/neu	65%	-
Експресія рецептора P53	30%	80%
Експресія рецептора Ki-67	70%	90%

Примітка: «+» - вказана ознака присутня у вказаному виді раку, «-» - вказана ознака відсутня.

висока мітотична активність і низькодиференційованість ракових клітин при медулярному раці, неоднорідність кордонів росту і різна ступінь злоякісності ракових клітин при протоковому раку МЗ; наявність експресії рецепторів стероїдних гормонів та рецепторів HER-2/neu, малий відсоток експресії рецепторів Ki-67 та P53 при інфільтративному раку МЗ, натомість медулярний рак 100% не експресує рецепторів до EG, PgR та HER-2/neu і має великий відсоток експресії рецепторів P53 та Ki-67.

Загальну таблицю диференційно діагностичних критеріїв наведено на таблиці, де враховано інтраопераційні, морфологічні, гістологічні та імуногістохімічні ознаки діагностики (Таблиця 1).

РОЗДІЛ 4

Висновки, практичні рекомендації та перспективи.

1. Опрацьовано і проаналізовано значний масив наукових літературних даних показав, що між інфільтративним протоковим та медулярним раком молочної залози є багато спільного, що ускладнює диференційну діагностику в практичній медицині.
2. Патогістологічне дослідження операційного біопсійного матеріалу за останні 5 років виявив, що серед злоякісних пухлин молочної залози протоковий інфільтративний рак зустрічається в 77%, а медулярний рак – 3,5%;
3. Розроблений алгоритм диференційної діагностики протокового інфільтративного та медулярного раку молочної залози дозволяє з високою вірогідністю робити кваліфіковане гістологічне заключення;
4. Проведена оцінка значимості експресії рецепторів естрогену, прогестерону, HER-2/neu, p53 та Ki-67 в допоможе диференційювати протоковий інфільтративний та медулярний рак молочної залози.

Практичні рекомендації.

У роботі запропоновані морфологічні критерії діагностики двох форм раку молочної залози, що може бути використано у практичній роботі лікарів-

патологоанатомів для вдосконалення диференційної діагностики досліджуваних форм патологій, а також в хірургії, онкології та мамології для цілеспрямованого їх лікування.

Перспективи подальших досліджень.

При дослідженні імуногістологічного статусу деяких препаратів нами виявлена така особливість: вони були ER-, PR-, HER-2neu-, P53- та Ki-67- в обох типах раку, що спонукає нас на пошук нових методів діагностики як у виявленні інших рецепторів (напр.. до цитокератину, E цикліну, E-кадгерину), що згідно літературним даним може мати різний ступінь експресії у досліджуваних пухлинах, так і залученні генетичних методів, тому що ці дві форми патології можуть мати пошкодження генетичного матеріалу, враховуючи ту обставину, що вони експресують білки, які як відомо кодуються на генетичному рівні.

Також перспективним є дослідження того факту, що медулярний рак частіше експресує прогностично несприятливий білки, хоча метастатичний потенціал цієї пухлини нижчий, а прогностичний кращий за інфільтративний протоковий рак молочної залози.

Список літератури

1. Нейштадт Э.Л. Патология молочной железы / Нейштадт Э.Л., Воробьева О.А.- СПб:Фолиант. - 2003. - 207с.
2. Патогистологическая диагностика преопухолевых процессов и опухолей молочной железы / [Автандилов Г.Г., Перов Ю.Л., Григорьева С.Г., Зайратьянц О.В.]- Арх. Патологии. – 2001 – №2 – С. 26-30.
3. Вояченко Н.Н. Внутрипротоковый рак молочной железы / Вояченко Н.Н. - Арх. патологии 2000; 62(2): 22–5.
4. Пальцев М.А. Патологическая анатомия / Пальцев М.А., Аничков Н.М. – учебник. В 2-х т. Т. 2. Ч. II. – М.: Медицина, 2001.- 680 с.: ил: [2] л. ил.- (Учеб. лит. Для студ. мед. вузов). С. 147-175
5. Чайка В.К. Современные представления о доброкачественной гиперплазии молочных желез / [Чайка В.К., Яковец Ю.И., Ласачко С.А.] // Вісник проблем біології і медицини. - 1999. - №1. - С.1 1-18.
6. Тарутинов В.И. Молочная железа: рак и предраковые заболевания / Тарутинов В.И. – К: Полиграфист.- 2006.- 415с.
7. Зотов А.С. Мастопатии и рак молочной железы / Белик Е.О., Зотов А.С. - М: Медпресс-информ. - 2005. - 111с.
8. Романюк А.М. Морфологічні та епідеміологічні особливості раку молочної залози у С. / [Романюк А.М., Конанихін В.І., Андрущенко В.В., Лукаш В.А.] // Вісник СумДУ.-2004. -№2. С. 78-82
9. Петров С.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека.- Казань, 2004.- 452 с.
10. Increased estrogen receptor betacx expression during mammary carcinogenesis / Esslimani-Sahla M. et al. // Clin. Cancer. Res.- 2005.- Vol.11, №9.- P.3170-3174.

11. Hansen R.K., Bissell M.J. Tissue architecture and breast cancer: the role of ex-tracellular matrix and steroid hormones // *Endocrine-Related Cancer*.- 2000.- №7. P.95–113.
12. Семиглазов В.Ф. Значение прогностических и предсказывающих факторов при выборе лечения у больных метастатическим раком молочной железы // *Практ. онкология*.- 2000.- №.2.- С.26-30.
13. Moghal N., Sternberg P.W. Multiple positive and negative regulators of signaling by the EGF-receptor// *Current Opinion on Cell Biology*. – 1999. – Vol.11. – P.190-196.
14. Accumulation of mutant p53 is associated with increased proliferation and poor clinical outcome in node negative breast cancer / Allred D.C. et al. // *J. Natl. Cancer Inst.*- 1993.- Vol.85.- P.200–206.
15. Keshgegian A.A., Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma: mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1 // *Am. J. Clin. Pathol.*- 1995.- Vol.104.- P.42–49.