

ваит целесообразность мониторинга уровня СРБ при СЭД IV типа.

Специфическое лечение СЭД сосудистого типа в настоящее время отсутствует. Кроме симптоматического лечения проводятся профилактические мероприятия и генетическое консультирование. Ведение пациентов предполагает междисциплинарный подход. Педиатры, генетики, терапевты, ортопеды, физиотерапевты, специалисты ЛФК, неврологи, кардиологи и другие специалисты подключаются на различных этапах жизни пациента и с учетом доминирующих на этот момент клинических симптомов. Пациентам и их семьям должна быть оказана психологическая помощь и поддержка. Следует избегать приема антиагрегантов, антикоагулянтов и препаратов, повышающих артериальное давление. Использование блокатора β 1-адренорецепторов целипролола, а также ингибитора ренин-ангиотензиновой системы лозартана снижает риск сосудистых осложнений при СЭД IV типа [4]. Гемостатическая терапия направлена на улучшение функционирования сосудистой стенки, возможно назначение аскорбиновой кислоты (аскорутин), этамзилата, антифибринолитиков. В случаях оказания экстренной помощи используется интенсивная гемостатическая терапия: трансфузии тромбоцитов, свежезамороженной плазмы, препаратов VII фактора, эритроцитной массы с заместительной целью.

Приведенный клинический случай является уникальным из-за несоответствия жалоб

пациента (на выраженную слабость, невозможность выполнять минимальную физическую работу во второй половине дня, появление рецидивирующей кожной сыпи, рецидивирующие кровотечения, полиартралгии) объективной, хотя и скудной симптоматике, нормальным результатам, полученным при лабораторных исследованиях, что вызывает трудности в определении тяжести заболевания, несмотря на неблагоприятный прогноз.

Заключение

Наличие семейного анамнеза СЭД, разрывов артерий или диссекции у лиц моложе 40 лет, необъяснимых перфораций сигмовидной кишки, спонтанных пневмотораксов и других симптомов из группы диагностических критериев СЭД является показанием для проведения молекулярно-генетического исследования для верификации диагноза СЭД.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. The international consortium on the Ehlers-Danlos syndromes / L. Bloom [et al.] // *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* — 2017 Mar. — Vol. 175, № 1. — P. 5–7.
2. The 2017 international classification of the Ehlers-Danlos syndromes / F. Malfait [et al.] // *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* — 2017 Mar. — Vol. 175, № 1. — P. 8–26.
3. *Адашкевич, В. П.* Классический тип синдрома Элерс-Данло у 56-летнего пациента / В. П. Адашкевич, О. В. Морозова // *Вестник ВГМУ.* — 2017. — Т. 16, № 6. — С. 107–113.
4. Сосудистый тип синдрома Элерс-Данло / М. В. Губанова, Л. А. Добрынина, Л. А. Калашникова // *Анналы неврологии.* — 2016. — Т. 10. — С. 45–51.
5. *Germain, D. P.* Ehlers-Danlos syndrome type IV. Orphanet / D. P. Germain // *J. Rare Dis.* — 2007. — Т. 2. — С. 32.

Поступила 06.02.2018

НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

УДК 618.19-006.6-07

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРА ПРОЛИФЕРАЦИИ Ki-67 КАК ПОКАЗАТЕЛЯ КАЧЕСТВА ФИКСАЦИИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Ю. В. Крылов¹, А. Ю. Крылов², А. Н. Млявый¹, В. В. Янченко³

¹Учреждение здравоохранения

«Витебское областное клиническое патологоанатомическое бюро»,
г. Витебск, Республика Беларусь

²Государственное учреждение образования

«Институт повышения квалификации и переподготовки кадров
Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь»,
г. Минск, Республика Беларусь

³Учреждение образования

«Витебский государственный медицинский университет»,
г. Витебск, Республика Беларусь

Цель: изучить возможность использования в качестве показателя некачественной фиксации при раке молочной железы особенности локализации маркера пролиферации Ki-67 в образцах опухоли с отсроченной фиксацией.

Материал и методы. Материалом исследования являлись 9 образцов опухолей с диагнозом рака молочной железы, удаленных во время операции, которые были разделены на 3 части. Один кусочек являлся контролем, в двух — фиксация была отсрочена на 6 и 12 часов. Проведено стандартное иммуногистохимическое исследование HER2, ER, PR и Ki-67 реактивами фирмы «ДАКО» (Дания).

Результат. При отсроченной на 6 часов фиксации в инвазивном компоненте опухоли имело место появление Ki-67 в строме в виде мелких гранул и наличие артифициальных щелей. При отсрочке на 12 часов эти изменения были более выражены. При отсроченной фиксации во всех случаях отмечено снижение степени экспрессии HER2. Изменения количественных показателей (%) экспрессии ER и PR были менее однозначны.

Заключение. Наличие Ki-67 в строме опухоли молочной железы может являться признаком некачественной фиксации при анализе материала, поступающего на иммуногистохимическое исследование. Некачественная фиксация искажает результаты иммуногистохимического исследования операционного материала.

Ключевые слова: рак молочной железы, иммуногистохимическое исследование, отсроченная фиксация, маркер пролиферации Ki-67.

FEATURES OF EXPRESSION OF THE KI-67 PROLIFERATION MARKER AS A FIXATION QUALITY INDICATOR IN BREAST CANCER

Yu. V. Krylov¹, A. Yu. Krylov², A. N. Mlyaviy¹, U. V. Yanchenko³

¹Vitebsk Regional Clinical Pathoanatomical Bureau,
Vitebsk, Republic of Belarus

²Institute for Advanced Training and Retraining of Personnel
of the State Committee of Forensic Expertise of the Republic of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus

³Vitebsk State Medical University Vitebsk, Republic of Belarus

Objective: to study the opportunity of using the localization features of the Ki-67 proliferation marker in tumor samples with delayed fixation as an indicator of poor-quality fixation in breast cancer.

Material and methods. The material of the study was 9 tumors diagnosed with breast cancer removed during surgery which were divided into 3 parts. One piece was for control, in the two other pieces fixations were delayed for 6 and 12 hours. The standard immunohistochemical study of HER2, ER, PR and Ki-67 with DAKO reagents (Denmark) was carried out.

Result. Ki-67 appeared in the stroma in the form of small granules and artificial fissures were present in the invasive component of the tumor in the 6-hour delayed fixation. In the 12-hour delayed fixation, these changes were more pronounced. A decrease in the degree of HER2 expression was observed in all the cases of the delayed fixation. Changes in the quantitative indices (%) of ER and PR expression were less unambiguous.

Conclusion. The presence of Ki-67 in the mammary tumor stroma can be a sign of poor-quality fixation in the testing of the material received for the immunohistochemical examination. Poor-quality fixation distorts the results of the immunohistochemical study of the surgical material.

Key words: breast cancer, immunohistochemical examination, delayed fixation, Ki-67 proliferation marker.

Введение

Высокая стоимость диагностики и лечения пациенток с диагнозом: «Рак молочной железы» (РМЖ) в настоящее время существенно повышает требования к качеству проводимых иммуногистохимических (ИГХ) исследований, результаты которых позволяют онкомаммологу оценивать прогноз заболевания и выбирать тактику лечения. Отсюда весьма актуальна их стандартизация и воспроизводимость. Одним из подходов к оценке качества, предложенными нами ранее, является оценка процента тройного негативного рака молочной железы (ТНРМЖ) в различных лабораториях. Этот показатель несомненно зависит от качества фиксации. Плохо фиксированный материал может быть тройным негативным, поэтому оценка качества фиксации особенно в случаях, предполагающих ИГХ-исследование, весьма актуальна. Анализ процента ТНРМЖ в иммуногистохимических лабораториях также может быть одним из подходов к оценке качества ИГХ-исследования при РМЖ [1]. В наших

предыдущих исследованиях на материале оперативно удаленных лейомиом показана возможность оценки скорости и полноты фиксации материала путем добавления пищевого красителя (заявка на патент РБ № а20160264 от 07.07.2016 г.). Данный подход может быть использован при мониторинге полноты фиксации биопсийного материала при РМЖ [2, 3]. Вместе с тем очевидна необходимость иметь в арсенале морфолога чувствительный способ оценки качества фиксации препаратов, поступающих на гистохимическое исследование. Маркер пролиферации Ki-67 входит в обязательный набор, рекомендуемый для ИГХ-исследования РМЖ наряду с HER2, ER и PR, отсюда целесообразно выявить возможность использования его в качестве маркера некачественной фиксации.

Цель исследования

Изучить возможность использования в качестве показателя некачественной фиксации особенности локализации маркера пролиферации Ki-67 в образцах опухоли с отсроченной фиксацией.

Материал и методы

Для исследования использовали операционный материал пациенток, с РМЖ, полученный после удаления опухоли. Материал был разделен на три группы: 1-я группа — контроль (фиксированная в течение 1 часа после взятия); 2-я группа — опытная (фиксация через 6 часов после взятия; кусочки помещенные в марлевый мешочек и оставленный на 6 часов при комнатной температуре); 3-я группа — опытная (фиксация через 12 часов после взятия; кусочки помещенные в марлевый мешочек и оставленный на 12 часов при комнатной температуре). Для проверки различий между

двумя выборками парных измерений, не соответствующим законам нормального распределения (малая выборка), применили непараметрический метод (критерий Вилкоксона), значения показателей приводим в виде медианы и величины интерквартильного размаха (Ме (25 %; 75 %)). Различия считали достоверными при вероятности $p < 0,05$.

Гистологические варианты опухоли были представлены: инфильтративным дольковым раком — 3 случая; инфильтративной неспецифической карциномой — 6 случаев. Клинико-морфологическая характеристика представлена в таблице 1.

Таблица 1 — Клинико-морфологическая характеристика исследованного материала РМЖ

№ п/п	Возраст	Гистология	Размер	Грейд	*LVSI	Mts (N)
1.	61	Инфильтративная неспецифическая карцинома	3 см	3	+	—
2.	43	Инфильтративный дольковый рак	2 см	2	+	1+
3.	81	Инфильтративная неспецифическая карцинома	2,5 см	2	—	—
4.	60	Инфильтративный дольковый рак	2 см	3	+	2+
5.	68	Инфильтративный дольковый рак	6 см	2		—
6.	36	Инфильтративная неспецифическая карцинома	2 см	3	+	6+
7.	38	Инфильтративная неспецифическая карцинома	3 см	3	+	1+
8.	51	Инфильтративная неспецифическая карцинома	2 см	2	+	7+
9.	52	Инфильтративная неспецифическая карцинома	3 см	2	+	5+

* — lymph-vascular space invasion (LVSI)

Учитывая рекомендации по использованию в качестве положительного контроля при исследовании Ki-67 слизистой оболочки тонкой кишки [4], нами проведены исследования материала подвздошной кишки со стандартной и отсроченной на 6 и 12 часов фиксацией от умершего 66 лет с диагнозом: «Инфаркт мозга», без видимых макроскопических изменений в кишечнике. Вскрытие проведено через 4 часа после смерти.

Весь материал фиксировался в 10 % забуференном формалине, в том числе и в случаях с отсроченной фиксацией, осуществлялась проводка материала по стандартной методике. Проводились ИГХ-исследования на Ki-67, HER2, ER и PR реактивами фирмы «DAKO» (Дания). Оценка ре-

зультатов ИГХ-исследования HER2 проводилась полуколичественным методом, согласно общепринятым рекомендациям [4]. При изучении ER, PR и Ki-67 подсчитывалось количество позитивно окрашенных клеток не менее чем в трех полях зрения, высчитывали их процент.

Результаты и обсуждение

При анализе контрольного материала (подвздошная кишка) (рисунок 1) при окраске на Ki-67 видны железы с отчетливым ядерным окрашиванием.

При отсроченной на 6 часов фиксации в материале появлялись железы с признаками дисконкомплексации, наличием Ki-67 в строме (рисунок 2).

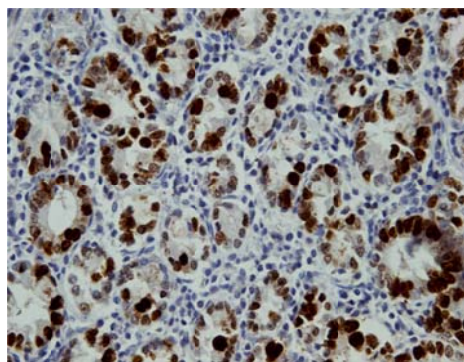


Рисунок 1 — Препарат подвздошной кишки — контроль (фиксирован в 10 % нейтральном забуференном формалине в течение 1 часа, подвздошная кишка от трупа, вскрытие через 4 часа после смерти), отчетливая ядерная экспрессия антигена Ki-67 (увеличение: x400)

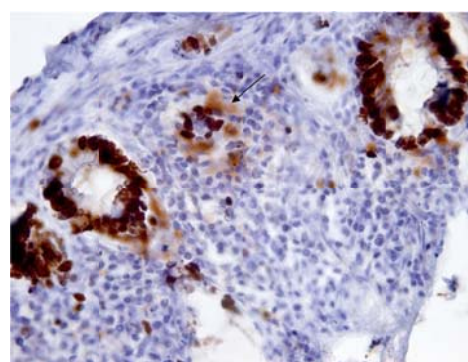


Рисунок 2 — Препарат подвздошной кишки — отсроченная на 6 часов фиксация. Дисконкомплексация желез, наличие Ki-67 в строме показано стрелкой (увеличение: x400)

При отсроченной на 12 часов фиксации по сравнению с отсроченной фиксацией на 6 часов искусственные щели, участки с дискомплексацией желез и выявление Ki-67 в строме встречались чаще (рисунок 3).

При РМЖ в контроле имело место четкое ядерное окрашивание Ki-67 клеток опухоли в коричневый цвет (рисунок 4).

При отсроченной на 6 часов фиксации в инвазивном компоненте опухоли имело место увеличение размеров опухолевых клеток, экспрессирующих Ki-67, и появления Ki-67 в строме в виде мелких гранул (рисунок 5). В отдельных полях зрения

встречались искусственные разрывы стромы.

При отсроченной на 12 часов фиксации в инвазивном компоненте опухоли имели место искусственные разрывы в строме практически во всех полях зрения, увеличение размеров опухолевых клеток, экспрессирующих Ki-67, появления «кляксовидных» фигур, окрашенных Ki-67, наличие Ki-67 в строме большинства полей зрения в виде гранул неправильной формы по сравнению с отсроченной на 6 часов фиксацией (рисунок 6).

Результаты ИГХ-исследования изучаемого материала представлены в таблице 2.

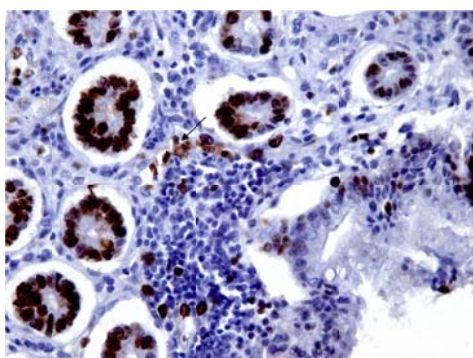


Рисунок 3 — Препарат подвздошной кишки — отсроченная на 12 часов фиксация. Наличие Ki-67 в строме показано стрелкой (увеличение: x400)

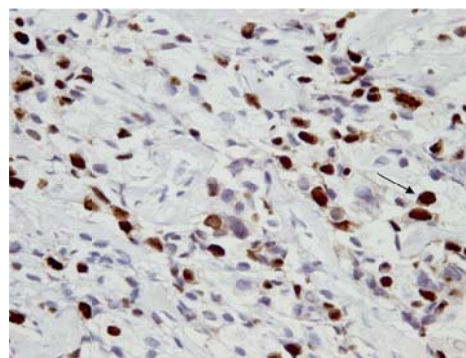


Рисунок 4 — Инвазивная неспецифическая карцинома, Грейд 2 — контроль (фиксированная в 10 % нейтральном забуференном формалине, взята в течение 1 часа после радикальной мастэктомии). Отчетливая ядерная экспрессия маркера Ki-67 клетками опухоли (увеличение: x400)

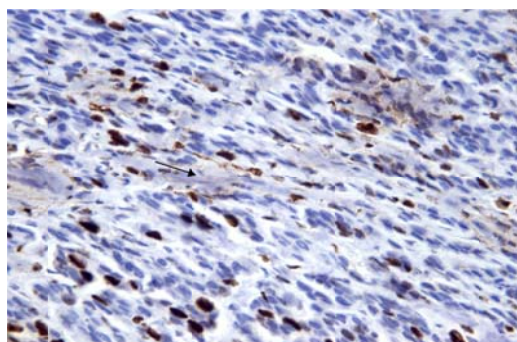


Рисунок 5 — Эта же опухоль с отсроченной на 6 часов фиксацией. Наличие Ki-67 в строме показано стрелкой (увеличение: x400)

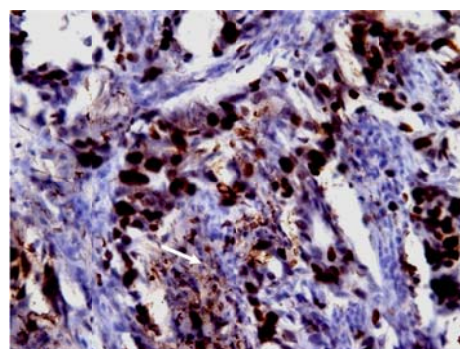


Рисунок 6 — Эта же опухоль с отсроченной на 12 часов фиксацией. Искусственные разрывы стромы. Наличие Ki-67 в строме показано стрелкой (увеличение: x400)

Таблица 2 — ИГХ-характеристика опухолей РМЖ в случаях отсроченной фиксации 6 и 12 часов

№ п/п	Контроль				6 часов				12 часов			
	Er	Pg	HER2	Ki-67	Er	Pg	HER2	Ki-67	Er	Pg	HER2	Ki-67
1.	90 %	40 %	0	16 %	80 %	30 %	0	40 %	70 %	20 %	0	40 %
2.	0 %	1 %	0	70 %	0 %	0 %	0	70 %	90 %	80 %	0	70 %
3.	80 %	80 %	2	10 %	80 %	80 %	1	10 %	80 %	80 %	1	10 %
4.	98 %	15 %	2	20 %	96 %	10 %	1	30 %	0 %	0 %	1	40 %
5.	99 %	98 %	0	2 %	95 %	95 %	0	6 %	90 %	80 %	0	6 %
6.	0 %	0 %	1	18 %	0 %	0 %	0	40 %	0 %	0 %	0	30 %
7.	97 %	97 %	1	20 %	95 %	95 %	1	40 %	95 %	95 %	0	35 %
8.	3 %	1 %	3	25 %	2 %	0 %	2	40 %	1 %	0 %	2	40 %
9.	0 %	0 %	1	30 %	0 %	0 %	1	40 %	0 %	0 %	0	50 %

Анализ данных таблицы 2, в которой представлены стандартные ИГХ-показатели, используемые при исследовании РМЖ, показал, что при отсроченной фиксации все случаи со значением 0 для HER2 при 6 и 12 часах не изменились. В трех случаях со значением HER2 +1 перешли в 0 при 12 часах отсроченной фиксации, причем один — на 6 часах. У двух женщин с HER2 +2 статус изменился на HER2 +1 при 6- и 12-часовых отсрочках фиксации. В одном наблюдении с гиперэкспрессией HER2 +3 статус снизился до +2 на 6 и 12 часах. Изменения уровня экспрессии ER и PR в процессе отсроченной фиксации были менее зна-

чимы по сравнению с контролем, за исключением двух случаев. В случае № 4 при высоких значениях ER и PR в контроле и отсроченных на 6 и 12 часов фиксации они были нулевыми. В случае № 2 при низком и отрицательном значении контроля и на 6 часах экспрессия ER и PR на 12 — составила, соответственно, 90 и 80 %.

При анализе экспрессии Ki-67 в двух наблюдениях (случаи 2 и 3) экспрессия не изменилась. Во всех остальных случаях отсроченная фиксация приводила к увеличению процента экспрессии Ki-67, начиная с 6 часов и продолжаясь на 12 часах, результаты представлены в таблице 3 и на рисунках 7 и 8.

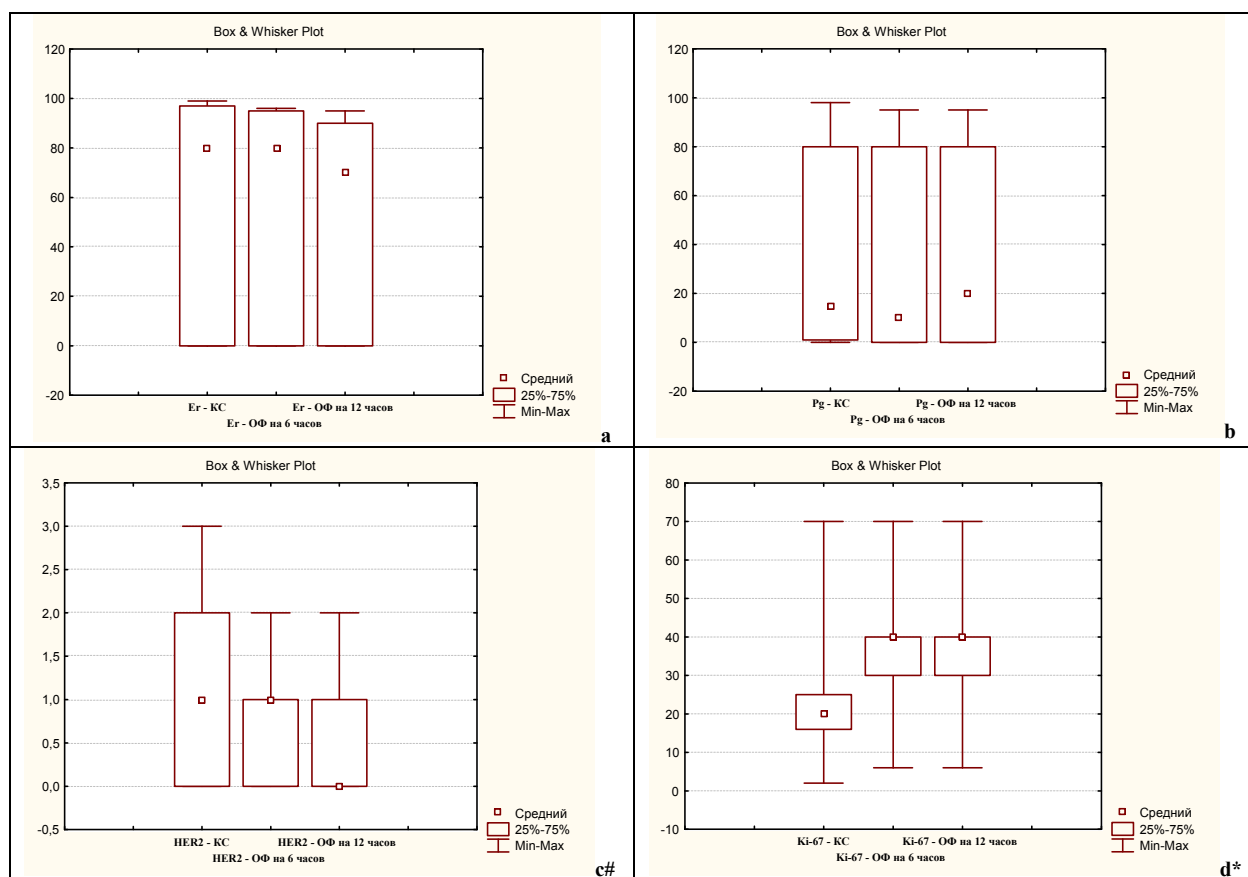


Рисунок 7 — Изменение экспрессии маркёров в зависимости от времени фиксации: а) ER; б) PR; в) HER2; д) Ki-67

* — достоверное отличие между экспрессией Ki-67 в контрольной серии (КС) и сериями отсроченной фиксации (ОФ) на 6 и 12 часов, $p=0,018$; # - статистически значимое отличие между экспрессией HER2 контрольной серии и отсроченной фиксации на 12 часов, $p = 0,023$

Таблица 3 — ИГХ-динамика изменения полей зрения с выходом в строму маркёра пролиферации Ki-67 в препаратах РМЖ в случаях отсроченной на 6 и 12 часов фиксации и обнаружения артифициальных изменений, щелей

№ п/п	Контроль		6 часов		12 часов	
	% ПЗ с Ki-67 в строме	% ПЗ с АИ	% ПЗ с Ki-67 в строме	% ПЗ с АИ	% ПЗ с Ki-67 в строме	% ПЗ с АИ
1.	0	0	10	30	20	100
2.	5	0	30	40	50	100
3.	0	20	20	50	20	100
4.	0	0	30	40	40	100
5.	0	0	30	40	40	100
6.	0	0	30	50	30	100
7.	0	0	30	40	30	100
8.	0	30	20	60	40	100
9.	5	0	20	50	50	100

Примечание. Результаты округлены для удобства восприятия таблицы

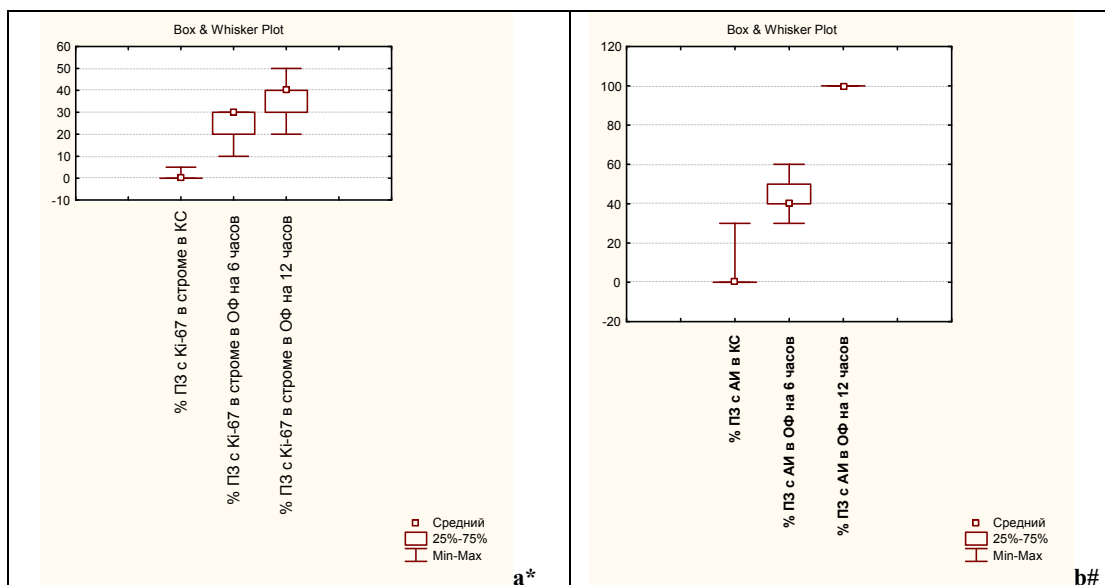


Рисунок 8 — Изменение полей зрения с выходом в строму маркёра пролиферации Ki-67 в препаратах РМЖ и искусственные изменения в зависимости от времени фиксации: а) с выходом в строму маркёра пролиферации Ki-67; б) с искусственными щелями

* — достоверное отличие между выходом в строму Ki-67 в контрольной серии (КС) и сериями отсроченной фиксации на 6 и 12 часов, $p = 0,007$; # — статистически значимое отличие между количеством полей зрения с искусственными щелями контрольной серии и серий с отсроченной фиксацией на 6 и 12 часов, $p=0,007$

Таким образом, во всех случаях с отсроченной фиксацией имеет место снижение экспрессии HER2. Изменения экспрессии ER, PR и Ki-67 были менее однозначны, что требует дальнейшего изучения.

Нами были проведен пересмотр микропрепаратов 32 случаев ТНРМЖ, диагностированных в отделении онкоморфологии УЗ «Витебское областное клиническое патологоанатомическое бюро» в 2016 г. В двух наблюдениях были обнаружены изменения, описанные нами на 6 часах отсроченной фиксации.

В исследовании Конышева К.В. (2017 г.) 25 случаев первичной опухоли РМЖ с неопределенным уровнем HER2 (+2) проведено сопоставление с результатами ИГХ-исследования их метастазов. При этом в 20 исследованиях уровень экспрессии в метастазах понизился и составил 0 и 1+ [5]. В этом плане, учитывая полученные данные, можно предположить, что лимфоузлы, обладающие капсулой, фиксировались до поступления на морфологическое исследование не разрезанными, что, к сожалению, нередко встречается в повседневной практике. Поэтому снижение уровня экспрессии HER2 в метастазах по сравнению с первичной опухолью, по-видимому, обусловлено несвоевременной недостаточной фиксацией, как и в нашем экспериментальном материале.

Заключение

Экспериментально подтверждено наше предположение о том, что некачественная фиксация

при РМЖ искажает результаты ИГХ-исследования. При отсроченной на 12 часов фиксации во всех случаях отмечено достоверное ($p = 0,023$) снижение степени экспрессии HER2. Изменения количественных показателей (%) экспрессии ER, PR были менее однозначны. Экспрессия Ki-67 при отсроченной на 6 и 12 часов фиксации достоверно увеличивается ($p = 0,18$). При отсроченной на 6 часов фиксации в инвазивном компоненте опухоли имело место появление Ki-67 в строме в виде мелких гранул и наличие искусственных щелей. При отсроченной на 12 часов фиксации эти изменения были более выражены ($p = 0,007$). Наличие Ki-67 в строме опухоли молочной железы может являться признаком некачественной фиксации при анализе материала, поступающего на иммуногистохимическое исследование.

Данные о выявлении некачественной фиксации путем оценки особенности локализации Ki-67 в материале, несомненно, обладают научной новизной. Однако, учитывая, что этот маркер используется в повседневной практике исследования РМЖ, а результаты ИГХ-исследования операционного материала имеют важное значение для выбора противоопухолевой лекарственной терапии, мы решили не подавать заявку на патент и сделать эти результаты наших исследований по оценке Ki-67 в биопсийном материале общедоступными.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Крылов, А. Ю. Оценка качества иммуногистохимического исследования при раке молочной железы / А. Ю. Крылов // Клиническая и экспериментальная морфология. — 2017. — № 1(21). — С. 24–28.
2. Оценка скорости и качества фиксации биопсийного материала при раке молочной железы / А. Ю. Крылов [и др.] // Рецензируемый научно-практический журнал «Охрана материнства и детства». — 2016. — № 2(28). — С. 13–15.
3. Оценка скорости и полноты фиксации биопсийного материала добавлением в формалин пищевого красителя / А. Ю. Крылов [и др.] // Журнал «Судебная экспертиза Беларуси». — 2017. — № 1 (4). — С. 52–54.
4. Рак молочной железы. Практическое руководство для врачей / Ю.Ю. Андреева [и др.]; под ред. Г. А. Франк, Л. Э. Завалишиной, К. М. Пожарисского. — М.: Практическая медицина, 2014. — 176 с.
5. Амплификация гена *erbB2* в клетках первичной опухоли и экспрессия белка HER2/neu в ткани регионарных метастазов при раке молочной железы / К. В. Коньшев // Материалы V съезда Российского общества патологоанатомов. — Челябинск, 2017. — С. 155–156.

Поступила 06.07.2017