

## ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ В ТКАНЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ.

Пулатова Л.Т.

Научный руководитель: профессор кафедры “ Фармацевтики и химии”,

Тулкинов Х.Х.

Абдуллаев О.Б.

Alfraganus University г. Ташкент, Узбекистан.

<https://doi.org/10.5281/zenodo.17210708>

**Аннотация.** Иммуногистохимия (ИГХ) является неотъемлемым инструментом в арсенале современной патологической анатомии, играя ключевую роль в диагностике, классификации и определении прогноза заболеваний молочной железы. Данный метод, основанный на высокоспецифичной реакции антиген-антитело, позволяет визуализировать экспрессию различных белковых маркеров в срезах тканей, предоставляя ценную информацию о фенотипе клеток и биологических характеристиках патологического процесса. Настоящий обзор систематизирует и анализирует данные о профилях экспрессии ключевых белков при доброкачественных и злокачественных заболеваниях молочной железы, освещая их диагностическое и прогностическое значение.

Рассматриваются как рутинно используемые маркеры, такие как рецепторы эстрогенов и прогестерона, HER2/neu и Ki-67, так и белки, ассоциированные с клеточным циклом, апоптозом и адгезией, включая p53, Bcl-2 и E-кадгерин. Особое внимание уделяется методологическим аспектам ИГХ-исследования и его роли в молекулярной классификации рака молочной железы (РМЖ), что напрямую влияет на выбор терапевтической тактики.

**Ключевые слова:** иммуногистохимия, молочная железа, рак молочной железы, доброкачественные заболевания, белковые маркеры, ER, PR, HER2/neu, Ki-67, p53, Bcl-2, E-кадгерин, диагностика, прогноз.

## IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF PROTEIN EXPRESSION IN BREAST TISSUES IN VARIOUS DISEASES

**Abstract.** Immunohistochemistry (IHC) is an essential tool in the arsenal of modern pathological anatomy, playing a key role in the diagnosis, classification and prognosis of breast diseases. This method, based on a highly specific antigen-antibody reaction, makes it possible to visualize the expression of various protein markers in tissue sections, providing valuable information about the cell phenotype and the biological characteristics of the pathological process. This review systematizes and analyzes data on the expression profiles of key proteins in benign and malignant breast diseases, highlighting their diagnostic and prognostic significance. Both routinely used markers such as estrogen and progesterone receptors, HER2/neu and Ki-67, as well as proteins associated with the cell cycle, apoptosis and adhesion, including p53, Bcl-2 and E-cadherin, are considered. Special attention is paid to the methodological aspects of IHC research and its role in the molecular classification of breast cancer, which directly affects the choice of therapeutic tactics.

**Keywords:** immunohistochemistry, mammary gland, breast cancer, benign diseases, protein markers, ER, PR, HER2/neu, Ki-67, p53, Bcl-2, E-cadherin, diagnosis, prognosis.

## TURLI KASALLIKLARDA KO'KRAK TO'QIMALARIDA OQSIL EKSPRESSIYASINI IMMUNOHISTOKIMYOVIY O'RGANISH

**Annotatsiya.** Immunohistokimyo (IHC) zamonaviy patologik anatomiya arsenalida ajralmas vosita bo'lib, ko'krak kasalliklarini tashxislash, tasniflash va bashorat qilishda muhim rol o'ynaydi. Yuqori o'ziga xos antigen-Antikor reaksiyasiga asoslangan ushbu usul hujayralar fenotipi va patologik jarayonning biologik xususiyatlari haqida qimmatli ma'lumotlarni taqdim etib, to'qimalar bo'limlarida turli xil oqsil belgilarining ifodasini tasavvur qilish imkonini beradi. Ushbu sharh ko'krakning yaxshi va xavfli kasalliklarida asosiy oqsillarning ifoda profillari to'g'risidagi ma'lumotlarni tizimlashtiradi va tahlil qiladi, ularning diagnostik va prognostik ahamiyatini yoritadi. Estrogen va progesteron retseptorlari, HER2/neu va Ki-67 kabi muntazam ishlatiladigan markerlar va p53, Bcl-2 va e-Kaderin kabi hujayra aylanishi, apoptoz va yopishqoqlik bilan bog'liq oqsillar ko'rib chiqiladi. IHC tadqiqotining metodologik jihatlariga va uning ko'krak bezi saratonining molekulyar tasnifidagi roliga alohida e'tibor qaratiladi, bu terapevtik taktikani tanlashga bevosita ta'sir qiladi.

**Kalit so'zlar:** immunohistokimyo, sut bezi, ko'krak bezi saratoni, benign kasalliklar, oqsil belgilari, ER, PR, HER2/neu, Ki-67, p53, Bcl-2, e-Kaderin, diagnostika, prognoz.

### Введение:

Заболевания молочной железы представляют собой гетерогенную группу патологий, варьирующих от доброкачественных изменений до инвазивных злокачественных новообразований, являющихся одной из ведущих причин онкологической смертности среди женщин во всем мире (1). Традиционная гистологическая оценка, основанная на окраске гематоксилином и эозином, закладывает фундамент диагностики, однако ее возможности в определении биологического потенциала опухоли и предсказании ответа на терапию ограничены. Внедрение в клиническую практику иммуногистохимических методов произвело революцию в патологии молочной железы, позволив перейти от чисто морфологической к молекулярно-биологической характеристике заболеваний (2).

ИГХ-анализ предоставляет информацию о наличии, локализации и уровне экспрессии специфических белков, которые отражают фундаментальные биологические процессы, такие как гормональная чувствительность, пролиферативная активность, онкогенная зависимость, нарушения клеточного цикла и апоптоза. Определение экспрессии рецепторов стероидных гормонов — эстрогена (ER) и прогестерона (PR), рецептора эпидермального фактора роста человека 2-го типа (HER2/neu) и маркера пролиферации Ki-67 стало "золотым стандартом" в обследовании пациенток с раком молочной железы (3).

Эти четыре маркера легли в основу суррогатной молекулярной классификации РМЖ на люминальный А, люминальный Б, HER2-позитивный и тройной негативный подтипы, что имеет решающее значение для назначения гормональной, таргетной и химиотерапии (4).

Помимо этой стандартной панели, исследуется множество других белков, которые могут служить дополнительными диагностическими, прогностическими и предиктивными маркерами. К ним относятся, в частности, супрессор опухолевого роста p53, антиапоптотический белок Bcl-2 и молекула клеточной адгезии Е-кадгерин.

Их экспрессия может коррелировать с агрессивностью опухоли, риском метастазирования и общей выживаемостью (5, 6).

Цель данного обзора — представить систематизированный анализ данных литературы, посвященных особенностям экспрессии ключевых белковых маркеров в тканях молочной железы при различных доброкачественных и злокачественных заболеваниях, и продемонстрировать клиническую значимость иммуногистохимического исследования для современной онкологии.

### **Материалы и методы иммуногистохимического исследования**

Качество и достоверность результатов ИГХ-анализа напрямую зависят от строгого соблюдения протокола на всех этапах исследования, начиная от забора материала и заканчивая интерпретацией окрашивания.

#### **Преаналитический этап**

Ключевым фактором, влияющим на сохранность антигенов, является адекватная фиксация ткани. "Золотым стандартом" является фиксация в 10% нейтральном забуференном формалине. Важно минимизировать время холодной ишемии (период от прекращения кровоснабжения до помещения ткани в фиксатор), которое не должно превышать одного часа. Оптимальная длительность фиксации составляет от 6 до 72 часов (7). Недостаточная или чрезмерная фиксация может привести к ложноотрицательным или ложноположительным результатам, особенно для таких лабильных антигенов, как HER2/neu и рецепторы стероидных гормонов.

#### **Аналитический этап**

Процесс ИГХ-окрашивания включает несколько ключевых шагов:

1. **Депарафинизация и регидратация:** Удаление парафина из гистологических срезов и их последующее насыщение водой.
2. **Демаскировка антигена (Antigen Retrieval):** Формалиновая фиксация образует перекрестные сшивки между белками, что может маскировать антигенные эпитопы. Для их восстановления применяются методы высокотемпературной обработки в специальных буферных растворах (HIER — Heat-Induced Epitope Retrieval) или ферментативное расщепление (PIER — Proteolytic-Induced Epitope Retrieval). Выбор метода зависит от конкретного антитела (8).
3. **Инкубация с первичными антителами:** На срезы наносятся моноклональные или поликлональные антитела, специфичные к целевому белку.
4. **Система детекции:** Для визуализации реакции антиген-антитело используются различные системы. Наиболее распространены полимерные системы, в которых вторичные антитела, конъюгированные с ферментом (например, пероксидазой хрена), связаны с полимерным "каркасом". Это обеспечивает высокое усиление сигнала и минимизирует неспецифическое окрашивание (9).
5. **Хромоген и контрастирование:** Фермент катализирует реакцию с хромогеном (например, диаминобензидином, DAB), что приводит к образованию нерастворимого окрашенного осадка в месте локализации антигена. Затем ядра клеток докрашивают гематоксилином для создания контраста.

#### **Постаналитический этап: Интерпретация и оценка**

Оценка результатов ИГХ-окрашивания требует высокой квалификации патолога и знания стандартизированных систем подсчета.



• **ER и PR:** Оценивается процент окрашенных ядер опухолевых клеток и интенсивность окрашивания. Наиболее распространена система **Allred score**, которая суммирует балл за долю позитивных клеток (0-5) и балл за интенсивность (0-3). Общий счет от 3 до 8 считается положительным результатом. Согласно современным рекомендациям, опухоли с экспрессией ER и/или PR в  $\geq 1\%$  ядер считаются гормон-позитивными (10).

• **HER2/neu:** Оценка проводится согласно рекомендациям Американского общества клинической онкологии и Коллегии американских патологов (ASCO/CAP). Анализируется полнота и интенсивность мембранного окрашивания:

◦ **0 и 1+:** Негативный результат.

◦ **3+:** (сильное полное мембранное окрашивание  $>10\%$  опухолевых клеток) — Позитивный результат.

◦ **2+:** (слабое или умеренное полное мембранное окрашивание  $>10\%$  или сильное полное окрашивание  $\leq 10\%$ ) — Эквивокальный (неопределенный) результат, требующий дополнительного исследования методом гибридизации *in situ* (FISH или CISH) для оценки амплификации гена *ERBB2* (11).

• **Ki-67:** Оценивается как процент опухолевых клеток с ядерным окрашиванием от общего числа подсчитанных опухолевых клеток (обычно не менее 500-1000 клеток в зонах наибольшей активности). Пороговые значения для разделения на низкий и высокий уровни пролиферации все еще являются предметом дискуссий, но чаще всего используются значения в диапазоне 14-20% (12).

• **p53, Bcl-2, Е-кадгерин:** Для этих маркеров также оценивается процент позитивных клеток и интенсивность окрашивания (ядерное для p53, цитоплазматическое для Bcl-2, мембранное для Е-кадгерина). Клинически значимые пороговые значения могут варьироваться в зависимости от конкретного исследования.

#### **Экспрессия белков при доброкачественных заболеваниях молочной железы**

Иммуногистохимическое исследование при доброкачественных процессах применяется реже, чем при раке, но может быть крайне полезным в дифференциальной диагностике сложных случаев.

#### **Непролиферативные изменения (фиброзно-кистозные изменения, аденоз)**

В нормальной ткани молочной железы и при непролиферативных изменениях эпителиальные клетки протоков и долек обычно демонстрируют положительную, но гетерогенную экспрессию **ER** и **PR**. Экспрессия **HER2/neu** отсутствует (счет 0 или 1+).

Пролиферативная активность, измеряемая по **Ki-67**, как правило, очень низкая, составляя менее 5% (13). Экспрессия **Bcl-2** часто присутствует в гормон-чувствительных эпителиальных клетках, что отражает его роль в выживании клеток. Мутантный **p53** не определяется, а **Е-кадгерин** демонстрирует выраженное мембранное окрашивание, подчеркивая сохранную межклеточную адгезию.

#### **Пролиферативные заболевания без атипии (протоковая гиперплазия, фиброаденома)**

При протоковой гиперплазии сохраняется мозаичный, "беспорядочный" паттерн экспрессии **ER** и **PR**, что отражает гетерогенность клеточной популяции. Индекс **Ki-67** может быть несколько повышен по сравнению с нормальной тканью, но редко превышает 10-15%.

**Фиброаденома**, наиболее частая доброкачественная опухоль молочной железы, характеризуется пролиферацией как эпителиального, так и стромального компонентов.

Эпителиальные клетки фиброаденом, как правило, позитивны к **ER** и **PR**. Индекс пролиферации **Ki-67** в эпителиальном компоненте обычно низкий. Важно отметить, что в стромальном компоненте фиброаденом также может наблюдаться экспрессия **PR** (14). Это может быть полезно при дифференциальной диагностике с листовидной опухолью.

#### **Пролиферативные заболевания с атипией (атипическая протоковая и дольковая гиперплазия)**

Атипические гиперплазии являются морфологическими и молекулярными предшественниками рака *in situ*. При **атипической протоковой гиперплазии (ADH)** наблюдается тенденция к появлению более гомогенной и диффузной экспрессии **ER** по сравнению с обычной гиперплазией. Это приближает ее иммунофенотип к низкодифференцированному протоковому раку *in situ* (Low-grade DCIS).

Основной задачей ИГХ при дифференциальной диагностике сложных пролиферативных поражений является использование панели цитокератинов (например, CK5/6, CK14) и p63 для подтверждения гетерогенности клеточной популяции (при доброкачественной гиперплазии) или выявления моноклональной, неопластической популяции (при ADH и DCIS).

#### **Экспрессия белков при злокачественных заболеваниях молочной железы**

При раке молочной железы ИГХ-исследование является обязательным и определяет как прогноз, так и тактику лечения.

#### **Протоковый рак *in situ* (DCIS)**

DCIS представляет собой пролиферацию злокачественных эпителиальных клеток внутри протоков без инвазии в строму. Иммунофенотип DCIS весьма вариабелен.

- **Low-grade DCIS** (низкой степени злокачественности) почти всегда характеризуется сильной и диффузной экспрессией **ER** и **PR**, отсутствием экспрессии **HER2/neu** и низким индексом **Ki-67** (15).

- **High-grade DCIS** (высокой степени злокачественности) чаще бывает **ER-негативным**, может гиперэкспрессировать **HER2/neu** (около 30-40% случаев) и имеет высокий **Ki-67**. Также в нем часто обнаруживается aberrантная экспрессия **p53**, свидетельствующая о мутации гена *TP53* (16).

#### **Инвазивный рак молочной железы**

Профили экспрессии ключевых маркеров лежат в основе суррогатной молекулярной классификации инвазивного РМЖ.

- **Люминальный А подтип (ER+, PR $\geq$ 20%, HER2-, Ki-67 низкий <14-20%)**: Наиболее распространенный и прогностически благоприятный подтип. Опухоли этого типа хорошо отвечают на гормональную терапию. Они часто экспрессируют **Bcl-2** и редко имеют мутации **p53** (17).

- **Люминальный Б подтип (ER+, HER2- с PR<20% или высоким Ki-67; либо ER+, HER2+)**: Этот подтип характеризуется более высокой пролиферативной активностью и/или наличием гиперэкспрессии **HER2**. Он имеет менее благоприятный прогноз, чем люминальный А, и часто требует назначения химиотерапии в дополнение к гормональной и/или таргетной терапии (18).

- **HER2-позитивный подтип (ER-, PR-, HER2+)**: Составляет около 15-20% случаев РМЖ. Характеризуется агрессивным течением, но является мишенью для

высокоэффективной анти-HER2 таргетной терапии (трастузумаб, пертузумаб и др.). Часто ассоциирован с высоким Ki-67 и экспрессией мутантного p53 (19).

• **Тройной негативный (базально-подобный) рак (ER-, PR-, HER2-):** Наиболее агрессивный подтип, для которого отсутствуют специфические мишени (гормоны, HER2). Характеризуется высоким Ki-67, частыми мутациями p53. Единственным стандартным методом системного лечения является химиотерапия. В последние годы для подгруппы тройного негативного РМЖ с экспрессией PD-L1 показала эффективность иммунотерапия (20).

#### Сравнительная характеристика инвазивного протокового и долькового рака

**Инвазивный протоковый рак (IDC),** наиболее частый гистологический тип, может иметь любой из вышеописанных иммунофенотипов.

**Инвазивный дольковый (лобулярный) рак (ILC)** имеет характерный молекулярный профиль. Подавляющее большинство ILC относятся к **люминальному А** подтипу (сильно ER-позитивны, HER2-негативны, с низким Ki-67). Ключевой молекулярной особенностью ILC является инактивация гена *CDH1*, что приводит к **потере экспрессии белка Е-кадгерина**. ИГХ-детекция отсутствия мембранного окрашивания Е-кадгерина является важным диагностическим маркером, помогающим отличить дольковый рак от протокового (6).

#### Сводная таблица экспрессии маркеров при различных заболеваниях молочной железы.

Заболевание	ER/PR	HER2/neu	Ki-67	p53	Е-кадгерин
Норма / Непролиферативные	+/- (гетерогенно)	-	<5%	- (дикий тип)	+++ (мембранно)
Фиброаденома	+ (эпителий)	-	<5%	-	+++
Протоковая гиперплазия	+/- (мозаично)	-	<10%	-	+++
Low-grade DCIS	+++ (диффузно)	-	Низкий	-	+++
High-grade DCIS	-/+	+/-	Высокий	+	+++
				(мутантный)	
Люминальный А РМЖ	+++	-	Низкий	-	+++ (IDC), - (ILC)
Люминальный Б РМЖ	+	-/+	Высокий	-/+	+++ (IDC), - (ILC)
HER2-позитивный РМЖ	-	+++	Высокий	+	+++
Тройной негативный РМЖ	-	-	Высокий	+	+++

#### Клиническое и прогностическое значение

• **ER и PR:** Являются одновременно прогностическими и предиктивными маркерами. Положительный статус ассоциирован с более благоприятным прогнозом и является предиктором ответа на эндокринную терапию (тамоксифен, ингибиторы ароматазы) (2).

• **HER2/neu:** Гиперэкспрессия/амплификация гена является маркером неблагоприятного прогноза, ассоциированным с агрессивным течением болезни. Однако, что еще более важно, это мощный предиктивный маркер ответа на анти-HER2 таргетную терапию, которая кардинально улучшила выживаемость этих пациенток (19).



• **Ki-67:** Высокий уровень этого маркера пролиферации коррелирует с более высокой степенью злокачественности опухоли, быстрым ростом и неблагоприятным прогнозом.

Он также может служить предиктором ответа на химиотерапию, поскольку химиотерапевтические агенты наиболее эффективны в отношении быстро делящихся клеток (12). В люминальных опухолях высокий Ki-67 является одним из критериев для назначения химиотерапии.

• **p53:** Накопление мутантного белка p53, выявляемое с помощью ИГХ, ассоциировано с высокой степенью злокачественности, тройным негативным и HER2-позитивным фенотипами и плохим прогнозом. Это маркер геномной нестабильности (5).

• **Bcl-2:** Экспрессия этого антиапоптотического белка чаще встречается в гормон-позитивных, низкодифференцированных опухолях с низкой пролиферативной активностью. В целом, его экспрессия ассоциирована с более благоприятным прогнозом и ответом на гормонотерапию (21).

• **Е-кадгерин:** Потеря экспрессии является ключевым диагностическим признаком инвазивного долькового рака и его предшественника — долькового рака *in situ*. Эта потеря нарушает межклеточную адгезию, что способствует характерному дискогезивному, инфильтративному росту этих опухолей (6).

#### **Заключение:**

Иммуногистохимическое исследование произвело переворот в понимании биологии заболеваний молочной железы и стало неотъемлемой частью рутинной диагностики, особенно при злокачественных новообразованиях. Анализ экспрессии белков-регуляторов ключевых клеточных процессов позволяет не только уточнить гистологический диагноз, но и провести молекулярную классификацию опухолей, определить их биологическую агрессивность и, что самое важное, персонализировать лечебную тактику. Стандартизация преаналитических и аналитических этапов, а также внедрение общепринятых систем оценки обеспечивают высокую воспроизводимость и клиническую значимость результатов. Дальнейшее изучение новых белковых маркеров и их комбинаций, несомненно, приведет к еще большей детализации классификаций и разработке новых подходов к таргетной терапии, открывая новые горизонты в лечении пациенток с заболеваниями молочной железы.

#### **Список литературы**

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-249.
2. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17(5):1474-81.
3. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(16):2784-95.
4. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St

- Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013;24(9):2206-23.
5. Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat.* 2002;19(6):607-14.
  6. Gamallo C, Palacios J, Suarez A, Pizarro A, Argibay S, Calvo de Mora J, et al. Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma. *Am J Pathol.* 1993;142(4):987-93.
  7. Portier BP, Wang Z, Downs-Kelly E, Rowe JJ, Symmans WF, Pusztai L, et al. Delay to formalin fixation alters morphology and immunohistochemical results for breast carcinoma. *J Clin Pathol.* 2013;66(11):1010-2.
  8. Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem.* 1991;39(6):741-8.
  9. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol.* 2005;42(4):405-26.
  10. Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL, et al. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2020;38(12):1346-1366.