

Российский онкологический
научный центр
им. Н.Н. Блохина РАМН,
Москва

РОЛЬ СОВРЕМЕННОЙ ПАТОМОРФОЛОГИИ В ХАРАКТЕРИСТИКЕ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

В.Д. Ермилова, д-р мед. наук

Патолог должен быть равноправным членом команды, которая занимается проблемой РМЖ как с клинических позиций, так и в исследованиях общепатологического плана, так как только патолог может дать точную характеристику тех структур, в которых обнаруживаются та или иная реакция на биомаркеры, и разработать стандартную оценку этих реакций.

До настоящего времени роль морфолога в диагностике и характеристике рака молочной железы (РМЖ) остается ведущей. Окончательный диагноз рака выставляет патолог, либо при изучении цитологических препаратов пунктата узла в молочной железе, либо при изучении фрагмента молочной железы при так называемом срочном гистологическом исследовании. Такого рода исследование проводится в момент операции в тех случаях, когда все методы дооперационной диагностики не дали четкого ответа на вопрос, с каким видом патологии имеет дело клиницист. Надо отметить, что процент подобного рода случаев, по данным разных авторов, колеблется от 15 до 20 [21, 22]. Прежде всего, удаленный фрагмент ткани изучают макроскопически. На гистологическое исследование выбирают самые плотные участки или берут часть выявленного узлового образования. В этот момент уточняют его макроскопическую характеристику: цвет, плотность, границы и точные размеры. Последние параметры позволяют уточнить стадию заболевания по показателю Т в системе TNM. Следует подчеркнуть то обстоятельство, что в последние годы при скрининговых маммографических обследованиях женского населения в молочных железах выявляют минимальные изменения, подозрительные в отношении злокачественного роста. В таких случаях, при отправлении материала на срочное гистологическое исследование от клинициста требуется точная маркировка патологического очага во избежание неправильной трактовки патологического процесса.

После морфологической верификации диагноза РМЖ (цитологической или гистологической) проводится плановое исследование удаленного фрагмента или всей ткани молочной железы с прилежащей клетчаткой, содержащей регионарные лимфатические узлы. При морфологическом исследовании патолог должен дать детальную гистологическую характеристику опухоли и регионарных лимфатических узлов, отвечая тем самым на ряд вопросов, которые имеют важное значение для клинициста при планировании дальнейшего лечения и учитываются в прогнозе заболевания. Таким образом, патолог указывает на факторы предсказательного плана, которые используют для оценки вероятного ответа на специфическое лечение и прогностические параметры, которые определяют возможный исход заболевания.

Гистологическая характеристика РМЖ должна содержать следующие параметры: гистологическую форму рака, степень его злокачественности или дифференцировки, наличие или отсутствие круглоклеточной инфильтрации по периферии узла или в самом узле, степень распространения по прилежащей ткани с особым акцентом на наличие опухолевых элементов в кровеносных и/или лимфатических сосудах, а также в области краев резекции (при выполнении органосохраняющей операции), фоновые процессы, а именно, вариант фиброзно-кистозной болезни, фокусы рака *in situ*.

Базисом, на основе которого проводится данная работа, является Международная гистологическая классификация опухолей и опухолеподобных процессов молочной железы ВОЗ, 2-е изд. (Женева, 1981, русский вариант 1984) [17]. В литературе имеется большое число классификаций РМЖ, основные моменты которых нашли отражение в указанном издании, так как оно явля-

ется результатом многолетней работы экспертов ВОЗ по оценке различных вариантов классификационных схем данного вида рака.

В указанной классификации выделяют рак *in situ* протоковый и дольковый (составляют около 2% всех форм), инфильтративные формы этих вариантов и группа так называемых особых или редких форм РМЖ (тубулярный, папиллярный, медуллярный, слизистый и др.).

Чем вызвана необходимость выделения такого числа различных форм РМЖ? Надо сказать, что создание гистологических классификаций любых опухолей, в том числе и РМЖ, не является самоцелью онкоморфологов. В основе классификаций лежат результаты многолетних клинико-морфологических сопоставлений при раке той или иной гистоструктуры с уточнением прогноза заболевания [3, 6, 11, 17, 21, 22]. К наиболее благоприятным по течению и прогнозу относят такие раки, как тубулярный, слизистый, медуллярный, аденокистозный. Менее благоприятным прогнозом отличаются раки с метаплазией и рак Педжета. Однако следует отметить, что все указанные формы составляют не более 10–15% всех раков. Большую часть составляют так называемый протоковый инфильтративный рак и рак с преобладанием внутрипротокового компонента (около 60%) а также дольковый инфильтративный рак (около 25%), который имеет тенденцию к мультицентричному и двустороннему поражению молочных желез. Встречаются также смешанные формы различных вариантов РМЖ.

Анализ большого числа наблюдений показал, что гистоструктура РМЖ в определенной степени влияет на течение заболевания. Однако об индивидуальном прогнозе на основании гистологической формы РМЖ высказаться не представляется возможным. В связи с этим еще в 50-е годы была разработана балльная система оценки РМЖ по степени злокачественности [8], которую использовали эксперты ВОЗ, что нашло отражение в 1-м издании Международной гистологической классификации опухолей молочной железы (Женева, 1968) [16]. Данная система градации по степеням злокачественности (СЗ) опирается на степень структурного и клеточного атипизма, а также на выраженность пролиферативных процессов, определяемую по числу фигур митоза в 10 полях зрения при увеличении $\times 40$. Выделены: I-СЗ (высокодифференцированные РМЖ), при которой 5- и 10-летняя выживаемость составляет 75% и 45% соответственно. II-СЗ (умереннодифференцированные РМЖ), для нее характерна 53% и 27% выживаемость. III-СЗ (низкодифференцированные РМЖ) с выживаемостью в 31% и 18% [16].

Таким образом, СЗ более четко связана с прогностическими аспектами РМЖ, чем гистологическая форма. Особенно это касается группы больных с

опухолями небольших размеров без метастазов в лимфатических узлах. Однако следует отметить, что, по данным ряда авторов, определение СЗ страдает субъективизмом и невысокой воспроизводимостью разными патологами. Большинство протоковых и дольковых раков попадают во II-СЗ, что в определенной степени нивелирует прогностическую значимость данного параметра [2, 9, 19]. В последние годы ряд исследователей разработали модификацию данной системы в основном с уточнением ядерных характеристик клеток рака и тем самым способствовали повышению достоверности предсказания прогноза РМЖ [10]. Поэтому определение СЗ остается одним из основных параметров, который должен быть указан при характеристике РМЖ.

Следующим признаком, который желательнее отражать в протоколе ответа, является степень круглоклеточной инфильтрации, представленной преимущественно лимфоидными и плазмоклеточными элементами. До сих пор не показано достоверного влияния этого признака на прогноз заболевания, однако, считается, что инфильтрация отражает местную иммунную реакцию на рост опухоли. В настоящее время проводятся исследования, направленные на детальную характеристику состава инфильтратов, с тем, чтобы использовать полученные данные при планировании иммунотерапии.

Более значимым в прогностическом плане оказалось распространение рака за пределы основного узла. Такое распространение может быть по прилежащим протокам и долькам, а также по кровеносным и лимфатическим сосудам. Распространение по протокам особенно важно отметить в случаях, когда выполняется органосохраняющая операция. При внутрипротоковом раке и раке с преобладанием указанного компонента очень часто отмечается обширное поражение органа далеко за пределами основного узла, и неполное удаление комплексов рака является основой для его рецидивирования. В связи с чем в подобных случаях рекомендуется мастэктомия. Основой для рецидива могут быть также фокусы долькового рака *in situ*. Еще более значимым для течения заболевания является распространение процесса по сосудистым щелям, преимущественно лимфатическим. Раковые эмболы в лимфатических щелях, как правило, сочетаются с метастазами в лимфатических узлах [7, 19].

В характеристике РМЖ предлагается также учитывать степень некроза опухоли, фиброз и эластоз стромы, но все эти параметры не имеют четкого прогностического значения.

Основным прогностическим параметром остается состояние регионарных лимфатических узлов, т.е. наличие метастазов в лимфатических узлах является на сегодняшний день главным дискриминирующим прогностическим признаком, делящим

больных на 2 группы: первая – без поражения лимфатических узлов и вторая – с метастазами в лимфатических узлах. В первой группе ведущими критериями для прогноза являются: гистологическая форма РМЖ, СЗ, распространение по органу. Во второй группе ведущим признаком оказывается количество пораженных лимфатических узлов. Рекомендуется исследовать 10 и более узлов. Однако показано, что поражение 4 и более узлов отягощает прогноз, по сравнению с поражением 1–2 лимфатических узлов. Актуальным для прогноза является также уровень пораженных лимфатических узлов: наружные и внутренние подмышечные, под- и надключичные, а также парастернальные. Как показали недавние исследования, частота поражения парастернальных лимфатических узлов при медиальной и центральной локализации опухолевого узла достигает 30%, и даже при наружной локализации РМЖ метастазы в эти группы лимфатических узлов выявлены у 3–4% больных.

Все более широко стали использовать иммуногистохимический метод для выявления микрометастазов в лимфатических узлах. Однако клиническое значение таких микрометастазов еще не определено. Остается нерешенной проблема сторожевых лимфатических узлов. Если не всегда возможно определить микрометастазы при рутинном исследовании узлов, то можно ли считать на 100%, что их нет в удаленных сторожевых лимфатических узлах, тем более при срочном гистологическом исследовании.

Немаловажное значение для клинициста имеет также гистологическая характеристика РМЖ после проведенного неоадьювантного химио- и лучевого лечения. Степень выраженности реакций опухоли на проведенное лечение может рассматриваться как предсказательный фактор для выбора последующей терапии.

В настоящее время все большее значение, особенно при планировании послеоперационного лечения, приобретают новые биологические характеристики РМЖ, получаемые с помощью иммуногистохимического метода и других молекулярно-генетических методик. Прежде всего, это касается определения рецепторного статуса РМЖ по наличию или отсутствию рецепторов эстрогена и прогестерона. Выявление последних все чаще проводится иммуногистохимическим методом в отличие от более раннего периода, когда рецепторный статус определяли биохимическим угольно-декстрановым методом. Патолог, используя иммунологический метод, более четко может определить процент положительных клеток, учитывать степень интенсивности реакции и, суммируя эти данные, дать более точную рецепторную характеристику РМЖ [4, 14, 18]. В ряде работ показана возможная корреляция рецепторного ста-

туса со СЗ РМЖ, так при ЭР+ опухолях чаще наблюдаются высокодифференцированные формы РМЖ и, напротив, низкодифференцированный рак, как правило, характеризуется отсутствием рецепторов. Однако, абсолютных данных на этот счет не получено [1, 5]. Несомненно, что рецепторный статус имеет принципиальное значение как предсказательный фактор и учитывается при назначении гормоно- или химиотерапии и в меньшей степени может быть прогностическим параметром.

Кроме выявления гормональных рецепторов, иммуногистохимический метод позволяет проводить детальное исследование РМЖ с целью выявления таких маркеров, которые отражают функциональное состояние опухолевых клеток и позволяют оценить течение, исход заболевания и вероятный ответ на лечебные воздействия. Среди этих маркеров на первом месте стоят маркеры амплификации онкогенов, прежде всего это онкоген *c-erb-B2*(HER-2/neu) и *bcl-2*, маркеры мутации генов-супрессоров (*p53*, *Rb*). Иммуногистохимический метод позволяет выявить маркеры пролиферативной активности, выраженность ангиогенеза, состояние адгезивных молекул и факторов инвазии.

Наиболее подробно изучен онкоген *c-erb-B2*, амплификация которого выявляется с помощью метода гибридизации *in situ*, а экспрессия кодируемого им белка *p185* – иммуногистохимически. Экспрессия этого белка обнаруживается в 15–30% РМЖ. Эти цифры, в определенной степени, зависят от морфологии опухоли. Так, если в общем он выявлен в 22% РМЖ независимо от гистоструктуры опухоли, то при протоковом угревидном раке он обнаружен в 33–37% случаев. Но все же отмечено, что четкой корреляции между структурой рака и экспрессией этого белка нет. Показано довольно достоверно самостоятельное значение этого маркера для прогрессии опухолевого роста. Так, амплификация этого гена указывает на укорочение безрецидивного периода у больных с метастазами в лимфатических узлах. В литературе имеются четкие данные о самостоятельном прогностическом значении сверхэкспрессии белка *p185*. Так, 5-летняя выживаемость при позитивной реакции на этот белок составляет 58%, при негативной реакции – 77%, при наличии метастазов в лимфатических узлах эти показатели составляют соответственно 31% и 61% [20].

Сверхэкспрессия данного онкобелка является также и предсказательным фактором, т.е. положительная реакция сочетается с резистентностью опухоли к химиолечению, в том числе и к тамоксифену. При отсутствии реакции на Her 2/neu у больных с адьювантной терапией тамоксифеном 5-летняя выживаемость составила 75%, а при его сверхэкспрессии снизилась до 13%. В связи с этим в настоящее время

создано лекарственное средство (Herceptin), представляющее собой гомогенизированные антитела к белку p185 и предназначенные для лечения метастатического РМЖ, экспрессирующего этот белок. Так как этот препарат обладает кардиотоксичностью, понятно, что назначение его должно быть сопряжено с выявлением экспрессии онкогена c-erb-B2, которое выполняется патологом [15].

Bcl-2-онкоген определяет механизм клеточной смерти, подавляя апоптоз. Он также выявляется иммуногистохимически. Интенсивность реакции коррелирует с наличием рецепторов эстрогена, низкой СЗ. Таким образом, экспрессия bcl-2 связана с благоприятным прогнозом РМЖ. Однако появились данные о том, что высокая экспрессия этого онкогена является независимым показателем лучшей безрецидивной и общей выживаемости при РМЖ с метастазами в регионарных лимфатических узлах [13].

В отношении генов-супрессоров, к каковым относят p53, подавляющее большинство исследователей показало, что имеется корреляция между экспрессией мутантного p53 и плохим клиническим исходом. О предсказательном значении p53 свидетельствуют данные о том, что p53-статус может быть решающим, когда определяется чувствительность опухоли к лучевой и химиотерапии.

Пролиферативная активность клеточных элементов опухоли является одним из основных показателей биологического поведения опухоли. До настоящего времени показатель пролиферативной активности определяют по числу фигур митоза. Определение митотического режима может осуществляться с помощью автордиографического метода, чаще используется метод проточной цитометрии РМЖ. В ряде работ показана достоверная корреляция между показателями этого метода и митотическим режимом, выявленным при подсчете фигур митоза, а также с данными по СЗ. Однако метод проточной цитометрии не нашел широкого применения из-за сложности методики и отсутствия необходимого оборудования.

В этом отношении более доступным является метод иммуногистохимического определения пролиферативной активности с использованием маркеров пролиферации, таких как антиген Ki 67 и PSNA. Первый отражает величину пролиферативного пула. Ядерный антиген пролиферирующих клеток, по данным ряда авторов, не является абсолютным показателем пролиферации и обнаружен в ядрах клеток, не находящихся в состоянии деления. Поэтому оптимальным маркером пролиферативной активности считают реакции на антиген Ki 67. Положительная реакция четко коррелирует с СЗ и имеет обратные отношения с рецепторами эстрогена и прогестерона, а также является

предсказательным фактором для лучевой и химиотерапии.

Митотический цикл изучают также, исследуя иммуногистохимически циклины и ингибиторы циклинзависимых киназ. В митотическом цикле при действии ингибиторов циклических киназ наступает блок в G1 фазе и возникает апоптоз. При подавлении ингибиторов наступает нерегулируемое и безудержное размножение клеток, свойственное опухолевому росту. Среди ингибиторов этих киназ выделены следующие P21, P27, P57, P16, 15, 18, 19. Наиболее разработана иммуногистохимическая реакция на выявление P27, снижение его экспрессии сопровождается опухолевой прогрессией и плохим прогнозом РМЖ.

На основании теории опухолевого ангиогенеза в последние годы разрабатываются подходы к практическому использованию этой теории в онкоморфологии [12]. А именно, определяется степень развития кровеносных сосудов в опухоли, что, в свою очередь, позволяет во многих случаях предсказать риск развития рецидивов и метастазов РМЖ, а также – исход заболевания. Основное внимание уделяют исследованию количества сосудов в РМЖ. Для этого используют иммуногистохимическое их выявление с помощью антител против антигенов VIII фактора свертывания крови, СД 31, СД 34. На гистологических препаратах, окрашенных с помощью указанных антител, подсчитывают плотность сосудов в опухоли и другие параметры. В ряде работ показано, что данные параметры являются независимыми прогностическими факторами для общей и безрецидивной выживаемости. Однако в других работах эти данные не подтверждаются, что требует дальнейшего уточнения значимости данного фактора. Кроме того, проводятся иммуноморфологические исследования по выявлению ангиогенного сосудистого фактора роста и попытки воздействия на него с целью получения терапевтического эффекта при РМЖ.

В настоящее время все шире внедряются в практику характеристики, связанные с определением взаимоотношения раковых клеток между собой и с окружающей тканью. С этой целью исследуют адгезивные свойства клеток с помощью антител против адгезивных молекул, к которым относятся кадхерин, катенины и протеогликан СД44. Кадхерины – кальцийзависимые белки, осуществляющие связь между клетками. Они подразделяются на эпителиальные (Е-кадхерины), нервные (N) и плацентарные (P). Внутриклеточно они взаимодействуют с несколькими белками – катенинами, среди них различают альфа-, бета-, гамма-варианты и белок p120. Взаимодействие кадхеринов и катенинов определяет структуру и функции клеток: полярность, дифференцировку, рост, смерть.

Снижение Е-кадхерина в клетках РМЖ сопровождается понижением дифференцировки, нарастанием инвазивного роста и повышением метастатического потенциала, т.е. свидетельствует о неблагоприятном прогнозе. Наоборот, высокая экспрессия Р-кадхерина в РМЖ резко ухудшает течение и исход заболевания. Считают, что Р-кадхерины являются более информативными и независимыми маркерами клинического исхода заболевания, чем изменения в экспрессии Е-кадхерина или катенинов.

Другой аспект этой проблемы – выработка опухлевыми клетками протеолитических ферментов (протеаз), которые приводят к деградации клеточного матрикса, что лежит в основе инвазивного роста и метастазирования. Среди таких протеаз наиболее изучены металлопротеиназы и катепсин D. Повышенное содержание этих ферментов отмечено в клетках РМЖ и служит независимым показателем агрессивности опухоли, не связанным со стадией заболевания, гормональным рецепторным статусом и гистологической формой РМЖ.

Обращают на себя внимание последние исследования, посвященные изучению цитокинов, регулирующих подвижность клеток. Их называют мотогенами. Среди них выделяют так называемый рассеивающий фактор (Met). Активация рецепторов этого фактора в клетках РМЖ приводит к снижению 5-летней выживаемости с 96% до 80%. Однако изучение рассмотренных выше прогностических маркеров находится в самом начале и требуется дополнительное накопление фактов по данному разделу.

Обобщая изложенные в этом разделе материалы, следует сказать, что существует большое число иммуноморфологических маркеров прогноза РМЖ, однако, необходима дальнейшая работа по стандартизации всех этапов исследований и разработка количественных оценок тех или иных реакций.

Таким образом, в протоколе исследования РМЖ должны быть отражены следующие патогистологические параметры, влияющие на окончательный выбор лечения: максимальный размер узла, гистологический вариант рака и его СЗ, распространенность рака по органу, наличие фокусов рака *in situ* в окружающей опухоль ткани молочной железы, количество исследованных лимфатических узлов и число лимфатических узлов, содержащих метастазы, гормональный рецепторный статус опухоли. Перечисленные ранее реакции на биологические маркеры могут быть учтены в клинической оценке, однако, отсутствие стандартных подходов к учету реакций пока что ограничивают их использование, и этот вопрос решается в каждом конкретном случае отдельно.

Итак, онкоморфология играет решающую роль в диагностике РМЖ и его характеристике. Патолог должен быть равноправным членом команды, которая занимается проблемой РМЖ как с клинических позиций, так и в исследованиях общепатологического плана, так как только патолог может дать точную характеристику тех структур, в которых обнаруживается та или иная реакция на биомаркеры, и разработать стандартную оценку этих реакций.

Литература

1. Вишнякова В.В., Ермилова В.Д., Муравьева Н.И., Бассалык Л.С. О связи между рецепторами эстрогена и клинкоморфологической характеристикой первичного рака молочной железы // *Арх. пат.* – 1981. – Вып. 7. – С. 20-23.
2. Ермилова В.Д. Международная гистологическая классификация рака молочной железы ВОЗ (1968) и ее прогностическое значение // *Арх. пат.* – 1980. – Вып. 4. – С. 13-19.
3. Ермилова В.Д. Опухоли и опухолеподобные процессы молочной железы // *Руководство по патологоанатомической диагностике опухолей человека.* – М., 1993. – Т. II. – С. 162-198.
4. Ермилова В.Д., Литвинова Л.В., Бассалык Л.С., Кузьмина З.В. Сравнительное иммуногистохимическое и биохимическое изучение рецепторов эстрогена в раке молочной железы // *Арх. пат.* – 1989. – Вып. 2. – С. 60-63.
5. Зубрихина Г.Н., Ермилова В.Д., Кузьмина З.В., Бассалык Л.С. Взаимоотношения между рецепторами стероидных гормонов, плоидностью опухоли, показателями клеточной пролиферации при различных гистологических вариантах рака молочной железы // *Арх. пат.* – 1989. – Вып. 3. – С. 10-16.
6. Теплоухова И.М., Ермилова В.Д. Возможные подходы к прогнозированию при раке молочной железы // *Вестн. ВОИЦ АМН СССР.* – 1991. – Вып. 1. – С. 53-57.
7. Badve S.A., Hern R.P., Ward A.M. et al. Prediction of local recurrence of ductal carcinoma *in situ* of the breast using five histological classifications, a comparative study with long follow-up // *Human. Pathol.* – 1998. – Vol. 29. – P. 915-923.
8. Bloom H.J.G., Richardson W.W. Histological grading and prognosis in breast cancer // *Brit. J. Cancer.* – 1957. – Vol. 11. – P. 359-377.
9. Burke H.B. Histological grade as a prognostic factor in breast carcinoma // *Cancer (Philad).* – 1997. – Vol. 80. – P. 1703-1707.
10. Le Doussal V., Tubiana-Hulin M., Fridman S. et al. Prognostic value of histologic grade nuclear component of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas // *Cancer (Philad.).* – 1989. – Vol. 64. – P. 1914-1921.
11. Elston C.W., Ellis J.O., Goulding H., Pinder S.E. Role of pathology in the prognosis and management of breast cancer // *Systemic Pathology / C.W. Elston, J.O. Ellis., eds. The breast. 3-ed.* – London: Churchill Livingstone, 1998. – P. 385-433.
12. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth // *Semin. Cancer Biol.* 1992. – Vol. 3. – P. 65-71.

13. Gasparini G., Barbaresch M., Doglioni C. et al. Expression of bcl-2 protein predicts efficacy of adjuvant treatments in operable node positive breast cancer // *Clin. Cancer Res.* – 1995. – Vol. 1. – P. 189-198.
14. Guerst-Moespot J., Leake R., Benroad Th.J., Sweep C.J. Twenty years of experience with the steroid receptor .External Quality Assessment Program // *Int. J. Oncol.* – 2000. Vol. 17. – P. 13-22.
15. Harbeck N., Dettman P., Thosson C et al. Prognostic impact of tumor biological factors in survival in node-negative breast cancer // *Anticancer Res.* – 1998. – Val. 18. – P. 2187-2198.
16. *Histological Typing of Breast Tumours WHO. 1-st ed.* – Geneva, 1968.
17. *Histological Typing of Breast Tumours WHO, 2-d ed.* – Geneva, 1981.
18. Leake R., Barnes D., Pinder S. et al. Immunohistochemical detection of steroid receptors in breast cancer // *J. Clin. Pathol.* – 2000. – Vol. 53. – P. 634-635.
19. Nime F.A., Rosen P.P., Thalor H. et al. Prognostic significance of tumor emboli in intramammary lymphatics in patients with mammary carcinoma // *Amer. J. Surg. Pathol.* – 1977. – Vol. 1. – P. 25-30.
20. Revillion F., Bonnetere J., Peyrat J.P. C-erb-B2 oncogene in human breast cancer and its significance // *Europ. J. Cancer.* – 1998. Vol. 34. – P. 808.
21. Rosen P.P. *Rosens Breast Pathology.* – Philadelphia: Lipplincot-Raven, 1997.
22. Rosen P.P., Oberman H.A. *Tumors of the mammary gland. Atlas of Tumor Pathol.* – Bethesda: AFIP, 1993.