УДК 616-006.04

Бриллиант А. А., Сазонов С. В., Засадкевич Ю. М.

ОСОБЕННОСТИ ВАСКУЛЯРИЗАЦИИ ТКАНИ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Российская Федерация;
ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет», г. Екатеринбург, Российская Федерация

Резюме. Исследована сосудистая сеть опухоли путем выявления в ней эндотелия капилляров. В ткани инфильтративной карциномы молочной железы количество созревающих капилляров в 5 раз больше, чем в интактной ткани молочной железы, при этом их доля не меняется с ростом пролиферативных процессов в опухоли. Доля зрелых капилляров снижается при увеличении пролиферативной активности опухоли.

Ключевые слова: рак молочной железы, васкуляризация, CD31, CD34, VEGF, VEGFR

Введение

Данные, накопленные за последнее время, убедительно показывают значимость ангиогенеза для роста подавляющего большинства злокачественных опухолей [1]. Известно, что при увеличении опухолевой массы для поддержания обмена веществ между опухолевой тканью и окружающей средой необходима дополнительная васкуляризация ткани [2].

В свою очередь, процесс опухолевого ангиогенеза становится возможен вследствие сокращения выработки клетками карциномы ингибиторов ангиогенеза и увеличения продукции цитокинов — стимуляторов ангиогенеза, являющихся факторами роста и мотогенами для эндотелиоцитов (в первую очередь, VEGF, а также FGF, EGF, TGF-a). Этот процесс сопровождается повышением секреции и активности протеаз, обеспечивающих протеолиз внеклеточного матрикса и инвазию эндотелиоцитов в ткани новообразования [3, 4].

Цель работы — изучить особенности васкуляризации инфильтративной карциномы молочной железы в разных группах пролиферативной активности.

Материал и методы

Материал для исследования поставлялся из ГБУЗ СО «Онкологический диспансер» Министерства здравоохранения Свердловской области, г. Екатеринбург и Городского Маммологического центра на базе ГАУЗ СО ГКБ № 40, г. Екатеринбург.

Материал отобранных случаев исследовался гистологическим, иммуногистохимическим, морфометрическими и статистическим методами.

Гистологический метод

Предварительно приготовлены парафиновые блоки [5]. Для этого материал прошел фиксацию в 10 % растворе нейтрального формалина в течение 1–2 суток, осуществлена его проводка по спиртам, после чего материал был залит в парафиновые блоки. Изготовление серийных срезов толщиной 4 мкм осуществляли на ротационном микротоме Microm HM340 (MICROM Labor gerate Gmbh) с системой переноса срезов. После депарафинизации производили гистологическую окраску с помощью гематоксилина Майера и эозина.

Иммуногистохимический метод

Для проведения иммуногистохимических исследований использовались стекла, покрытые полилизином — POLYSINE SLIDES (Thermo scientific, Германия). Для определения ядерного индекса пролиферации опухоли использовались антитела Mouse Anti-Human KI-67 Antigen clone MIB-1 (DAKO, Дания).

Для выявления рецепторов эндотелия капилляров использовали антитела Monoclonal Mouse Anti — Human CD31 clone JC70A , CD34 clone QBEnd 10 (DAKO, Дания). Используемые антитела к CD31 предназначены для идентификации эндотелиальных клеток в нормальной и неопластической ткани методом световой микроскопии с использованием иммуногистохимического метода, тогда как антитела к CD34 предназначены для идентификации методом световой микроскопии не только неопластических эндотелиальных клеток, но и гемопоэтических предшественников (маркер полипотентных кроветворных стволовых клеток).

Сосудистый эндотелиальный фактор роста определяли с помощью антител Monoclonal Mouse Anti — Human Vascular Endothelial Growth Factor clone VG1 (DAKO, Дания), рецепторы к фактору роста эндотелия сосудов определяли с помощью моноклональных мышиных антител NCL-L-VEGFR-3 clone KLT9 (Novocastra, Англия). Предварительная демаскировка антигенов с использованием Target Retrieval Solution проходила в барокамере «Paskal DAKO Cytomation» (Дания) при давлении 22Р и температуре 127 ºС.

Все иммуногистохимические реакции осуществлялись в автостейнере “DAKO” (Дания) с использованием буфера Dako Wash Buffer, системы визуализации Dako EnVision + Dual Link System — HRP, хромогена Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System фирмы (DAKO, Дания).

Уровень пролиферативной активности оценивали по ядерному индексу пролиферации клеток опухоли — KI-67. По процентному отношению числа окрашенных ядер клеток карциномы к неокрашенным судили о пролиферативной активности исследуемой опухоли. В каждом случае оценивали не менее 600 опухолевых клеток [6]. Все случаи в соответствии со степенью пролиферации были распределены по трем группам. Первую группу составили случаи рака молочной железы с низким уровнем пролиферации, индекс ядерной пролиферации менее 10 %, во вторую группу вошли случаи со средней пролиферативной активностью опухоли (индекс KI-67 от 10 % до 30 % включительно), в третью — случаи с высокой пролиферативной активностью опухоли (индекс KI-67 более 30 %) [7]. Оценку реакции осуществляли на роботизированном микроскопе “Zeiss ImagerM” (Германия).

Морфометрический метод

С помощью морфометрической программы AxioVision (Германия) проводили измерения диаметра, количества и площади капилляров, а также количества изучаемых клеток. Площадь поля зрения микроскопа при увеличении 40х равна 400,0 мкм^2.

Статистический метод

Для статистической обработки полученных данных, а также построения соответствующих графиков и таблиц, использовали программные продукты «Statistica 6 for Windows», «MS Excel 2007». Достоверность различий сравниваемых показателей определяли по t-критерию Стьюдента, используемого для нормального распределения данных. Различия средних величин считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Мы исследовали сосудистую сеть опухоли путем выявления в ней эндотелия капилляров (табл.1). Было обнаружено, что в группе опухолей со средней степенью пролиферации площадь капилляров, экспрессирующих рецепторы к VEGFR, в 1,4 раза ($p < 0,05$) больше площади капилляров, экспрессирующих VEGF.

Количество капилляров, выявленных с помощью иммуногистохимического исследования с экспрессией CD31, в исследуемом срезе карциномы молочной железы более чем в два раза ($p < 0,05$) превышает контрольный показатель интактной ткани (рис. 1).

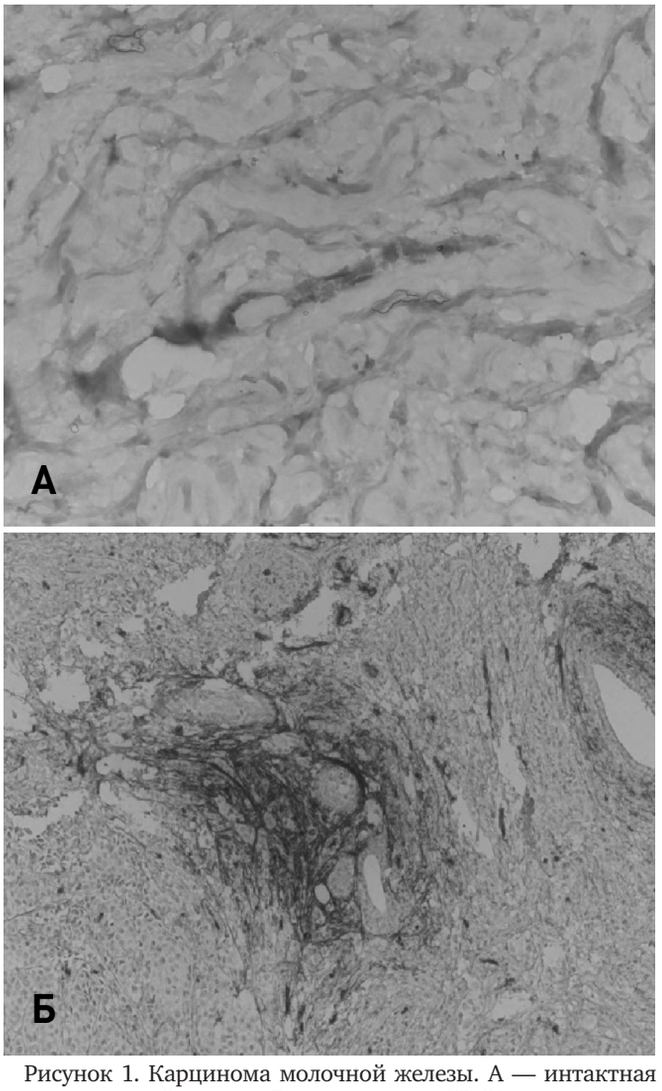


Рисунок 1. Карцинома молочной железы. А — интактная ткань молочной железы. Б — экспрессия CD-31 на эндотелии капилляров в ткани инфильтративной карциномы молочной железы. ×100

Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер — гематоксилин Майера

При проведении корреляционного анализа обнаружена сильная отрицательная корреляционная связь между площадью капилляров, экспрессирующих рецепторы CD31, и группами экспрессии белка KI-67 в опухоли ($r = –0,93$).

При исследовании экспрессии CD34 в ткани инфильтративной карциномы молочной железы обнаружено, что площадь капилляров, экспрессирующих этот рецептор, более чем в пять раз ($p < 0,05$), а диаметр капилляров в два раза ($p < 0,05$), превышают аналогичные показатели в интактной ткани (табл. 1).

Анализ данных по группам пролиферации показал, что с увеличением пролиферативных процессов в опухоли уменьшается площадь зрелых форм капилляров. Если в первой группе пролиферативной активности доля незрелых капилляров составляет лишь пятую часть, то во второй группе половина капилляров являются созревающими, а в третьей практически все капилляры находятся в состоянии ангиогенеза (рис. 2).

Заключение

В ткани инфильтративной карциномы молочной железы количество созревающих капилляров в 5 раз больше, чем в интактной ткани молочной железы, при этом их доля не меняется с ростом пролиферативных процессов в опухоли. Доля зрелых капилляров снижается при увеличении пролиферативной активности опухоли.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что при быстром росте опухоли образуется большее число капилляров, не успевающих приобрести иммуногистохимические характеристики зрелых.

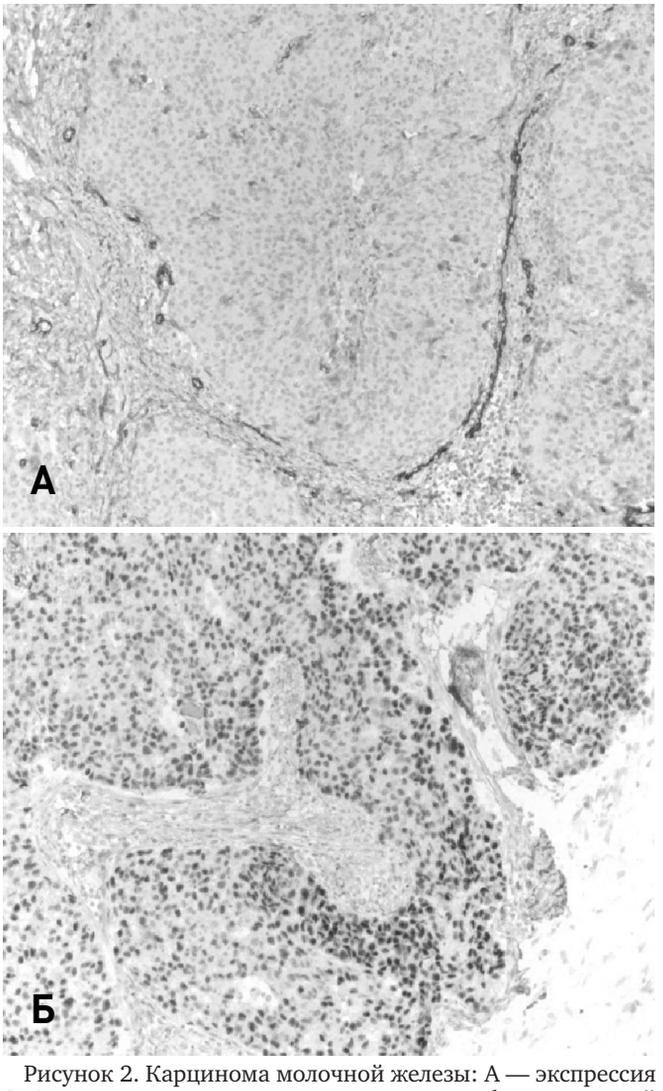


Рисунок 2. Карцинома молочной железы: А — экспрессия CD34 на эндотелии капилляров в ткани инфильтративной карциномы молочной железы. Б — высокая пролиферативная активность клеток опухоли. ×100

Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер — гематоксилин Майера.

ЛИТЕРАТУРА

1. Folkman J., Mendelsohn J., Howley P.M. et al. The Molecular Basis of Cancer.-W. B. Saunders.-1995.-p.p.206-232.

2. Foidart J.M., Colin C., Denoo X. et al. Estradiol and progesterone regulate the proliferation of human breast epithelial cells.-Fertil Steril.-1998.-p.p.963-969.

3. Сазонов С.В., Бриллиант А.А. Рецепторы клеток карциномы молочной железы и уровень ее пролиферации. LAP.-2014.-116 с.

4. Thor A.D., Liu S., Moore D.H. et al. Comparison of mitotic index, in vitro bromodeoxyuridine labeling, and MIB-1 assays to quantitate proliferation in breast cancer.-J Clin Oncol.-1999.-17.-p.p.470-477

5. Калантарли С.С., Мацко Д.Е. К вопросу об определении KI-67 в биологических тканях, залитых в парафин (на примере рака молочной железы).-Вестник Санкт-Петербургского университета.-Серия 11.-Медици-

на.-2012.-№ 1.-с.с.182-186.
6. Jalava P., Kuopio T. et al. Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index.- Histopathology.-2006.- 48(6).-p.p.674-82.
7. Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Процесс ангиогенеза и пролиферативная активность инфильтративной карциномы молочной железы. Ангиология и сосудистая хирургия.-2012.- т.18.- приложение.- с.34.

Авторская справка
Бриллиант Александр Александрович
к. б. н.
alex_brilliant@mail.ru

Сазонов Сергей Владимирович
д. м. н., профессор, зав. лабораторией патоморфологии; зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии
prof-ssazonov@yandex.ru

Засадкевич Юлия Михайловна
yulkat@bk.ru

ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»
Российская Федерация, 620000, г. Екатеринбург, ул. Вилонова, 76 а

ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет»
620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3

Brilliant A. A., Sazonov S. V., Zasadkevich Y. M.

FEATURES OF BREAST CANCER TISSUE VASCULARIZATION

GAHO SR Institute of Medical Cell Technologies;
GBEO HPE Ural State Medical University,
Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. The vascular network by identification of capillary endothelium was studied. In breast cancer tissue the number of ripening capillaries in 5 times higher than in intact tissue, at the same time their proportion does not change during the increase of cancer proliferation. The proportion of mature capillaries decreases with the increase of proliferative activity of the tumor.

Key words: breast cancer, vascularization, CD31, CD34, VEGF, VEGFR

REFERENCES

1. Folkman J., Mendelsohn J., Howley P.M. et al. The Molecular Basis of Cancer.-W. B. Saunders.-1995.-p.p.206-232.
2. Foidart J.M., Colin C., Denoo X. et al. Estradiol and progesterone regulate the proliferation of human breast epithelial cells.-Fertil Steril.-1998.-p.p.963-969.
3. Sazonov S.V., Brilliant A.A. Receptors of breast carcinoma cells and level of its proliferation.. LAP.-2014.-116 p.
4. Thor A.D., Liu S., Moore D.H. et al. Comparison of mitotic index, in vitro bromodeoxyuridine labeling, and MIB-1 assays to quantitate proliferation in breast cancer.-J Clin Oncol.-1999.-17.-p.p.470-477.
5. Kaantarli S.S., Matsko D.E. To issue of Ki-67 detection in paraffin embedded biological tissues (shown at breast cancer).-Vestnik of St. Petersburg University.-Vol.11.-Medicine.-2012.-N1.-p.p.182-186
6. Jalava P., Kuopio T. et al. Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index.-Histopathology.-2006.- 48(6).-p.p.674-82.
7. Brilliant A.A., Sazonov S.V. Angiogenesis and proliferative activity of infiltrative breast carcinoma. Angiology and vascular surgery.-2012.-V.18.-attachment.-p.34.

Authors
Brilliant Aleksandr A.
Institute of Medical Cell Technologies
PhD, senior reseacher
alex_brilliant@mail.ru

Sazonov Sergey V.
Institute of Medical Cell Technologies
Ural State Medical University
PhD, MD, Professor, the Head of the department of histology, cytology and embryology of Ural State Medical University and the laboratory of pathomorphology of Institute of Medical Cell Technologies
prof-ssazonov@yandex.ru

Zasadkevich Yulia M.
Institute of Medical Cell Technologies
Ural State Medical University

PhD student, researcher
yulkat@bk.ru

Government Autonomic Healthcare Organization of Sverdlovsk Region «Institute of Medical Cell Technologies»
Russian Federation, 620000, Vilonova St., 76 a, Yekaterinburg

Government Budget Educational Organization «Ural State Medical University» of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Department of histology, cytology and embryology
Russian Federation, 620028 Repina St., 3, Yekaterinburg

Таблица 1

Связь васкуляризации тканей инфильтративной карциномы молочной железы с уровнем пролиферативной активности

Группа экспрессии KI- 67	Среднее значение площади васкуляризации, мкм^2	
Интактная молочная железа	CD 31	798 ± 203 p (CD31-CD34) <0,05
	CD 34	61 ± 5 p(CD31-CD34) <0,05
	VEGF, VEGFR	Не обнаружено
1 группа — случаи с низкой степенью пролиферации (мене 10 %)	CD 31	1638 ± 604 p(1-2)<0,05
	CD 34	328,2 ± 134,7 p(1-2)>0,05
	VEGF	Не обнаружено
	VEGFR	Не обнаружено
2 группа — случаи со средней степенью пролиферации (более 10 % но менее 30 % включительно)	CD 31	627,1 ± 88,1 p(2-3)<0,05
	CD 34	395,4 ± 82,1 p(2-3)>0,05
	VEGF	387,7 ± 46,73
	VEGFR	542,3 ± 3,24
3 группа — случаи с высокой степенью пролиферации (более 30 %)	CD 31	267,2 ± 23 p(1-3)<0,05
	CD 34	264,2 ± 25,4 p(1-3)>0,05
	VEGF	Не обнаружено
	VEGFR	Не обнаружено