

Роль морфометрических показателей внутриопухолевых микрососудов и пролиферативной активности опухолевых клеток при почечно-клеточном раке

Н.А. Горбань, О.Б. Карякин, А.М. Попов, С.В. Иванова,
А.Г. Кудайбергенова, Л.М. Кондрашова, А.Э. Бархатов
МРНЦ, Обнинск; РНЦРХТ, Санкт-Петербург

Контакты: Нина Андреевна Горбань perovanina@mail.ru

Необходимыми факторами для опухолевого роста, прогрессии и метастазирования являются пролиферация опухолевых клеток и опухолевый ангиогенез.

Цель исследования — оценка взаимоотношения показателей пролиферативной активности и морфометрических параметров внутриопухолевых микрососудов в метастатических и локализованных карциномах почки.

Материалы и методы. Исследован операционный материал, взятый от 54 пациентов (32 мужчины и 22 женщины) в возрасте от 26 до 69 лет (средний возраст $55 \pm 1,5$ года) с верифицированным диагнозом: почечно-клеточный рак (ПКР), светлоклеточный вариант.

Выводы. Прролиферативная активность и ангиоархитектоника являются важной биологической характеристикой опухоли с неодинаковой клинической значимостью при ПКР. Метастатический рак имеет более высокую пролиферативную активность и низкий уровень васкуляризации опухоли по сравнению с локализованным раком.

Ключевые слова: почечно-клеточный рак, светлоклеточный вариант, Ki-67, CD31, микрососудистая плотность, суммарный периметр сосудистой стенки, суммарная площадь сосудов, ангиоархитектоника

Role of the morphometric parameters of intratumoral microvessels and the proliferative activity of tumor cells in renal cell carcinoma

N.A. Gorban, O.B. Karyakin, A.M. Popov, S.V. Ivanova, A.G. Kudaibergenova, L.M. Kondrashova, A.E. Barkhatov
Medical Radiology Research Center, Obninsk; Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies, Saint Petersburg

Tumor cell proliferation and angiogenesis are essential factors for tumor growth, progression, and metastasis.

Objective: to assess the relationship between the values of proliferative activity and the morphometric parameters of intratumoral microvessels in metastatic and localized carcinomas of the kidney.

Materials and methods. Surgical specimens taken from 54 patients (32 men and 22 women) aged 26 to 69 years (mean age 55 ± 1.5 years) with the verified diagnosis of clear-cell renal cell carcinoma (RCC) were studied.

Conclusion. Proliferative activity and angioarchitectonics are an important biological characteristic of a tumor of unequal clinical value in RCC. Metastatic carcinoma has a higher proliferative activity and a low tumor vascularization than those of localized carcinoma.

Key words: renal cell carcinoma, clear cell variant, Ki-67, CD31, microvascular density, total vessel wall perimeter, total vessel area, angioarchitectonics

Введение

Пролиферация опухолевых клеток и опухолевый ангиогенез — необходимые факторы для опухолевого роста, прогрессии и метастазирования. Уже никто не оспаривает значение опухолевой пролиферации, для определения которой наиболее популярен антиген Ki-67, выявляющийся во всех фазах клеточного цикла. Е. Yildis и соавт. [1] показали, что уровень Ki-67 при почечно-клеточном раке (ПКР) служит прогностически значимым фактором, его высокий уровень связан с распространенной клинической стадией процесса, низкой степенью дифференцировки опухоли и плохим прогнозом.

В настоящее время важнейшая роль, которую играет ангиогенез при опухолевом росте, хорошо изучена, разработаны таргетные антиангиогенные препараты. Гипотеза, согласно которой рост опухоли зависит от ангиогенеза, была сформулирована J. Folkman следующим образом: как только появляется опухоль, каждому увеличению популяции опухолевых клеток должно предшествовать встречное возрастание количества новых капилляров [2, 3].

Широко распространена характеристика сосудистого статуса опухоли по определению микрососудистой плотности (МСП). Впервые такую характеристику опухоли предложил N. Weidner для рака молочной же-

лезы [4], в дальнейшем были изучены и другие опухоли (меланомы, глиомы, рак легкого, мочевого пузыря, простаты), а также их метастазы [5–7]. Была обнаружена выраженная связь между высокой плотностью микрососудов в первичной опухоли и плохим прогнозом.

Для определения МСП используют специфические панэндотелиальные маркеры. Наиболее распространены 3 маркера, экспрессируемые эндотелием: фактор Виллебранда (FVIII), CD31, CD34. В начале 1990-х годов N. Weidner [5–7] показал, что высокая концентрация микрососудов (так называемые «горячие точки» — hot spots) в изолированных районах служит прогностическим индикатором опухолей молочной железы и простаты. МСП сравнивали с другими прогностическими показателями (стадия заболевания, наличие метастазов, рецидива или выживаемости) и использовали для планирования терапии.

По данным литературы, прогностическое значение МСП при ПКР противоречиво. Так, E. Sabo и соавт. [8] провели исследование МСП и фрактальный анализ внутриопухолевого микрососудистого русла и показали, что МСП и васкуляризация опухоли значительно выше в высокодифференцированных опухолях по сравнению с низкодифференцированными, и при высокой МСП выживаемость пациентов значительно выше. Во многих работах высокая васкуляризация опухоли была связана с хорошим прогнозом, при этом, согласно данным других исследований, высокая МСП служила фактором неблагоприятного прогноза [9].

Цель исследования: оценить взаимосвязь показателей пролиферативной активности и морфометрических параметров внутриопухолевых микрососудов в метастатических и локализованных карциномах почки.

Материалы и методы

Исследован операционный материал от 54 пациентов (32 мужчины и 22 женщины) в возрасте от 26 до 69 лет (средний возраст $55 \pm 1,5$ года) с верифицированным диагнозом ПКР, светлоклеточный вариант. Для исследования был поднят и пересмотрен весь гистологический материал, окрашенный гематоксилином и эозином, каждого пациента, выбраны 1 или 2 наиболее репрезентативных фрагмента для каждого случая. Стадирование и градирование опухоли проводили по рекомендациям ВОЗ (World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics: Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon, France: IARC Press, 2004:179–184) [10].

Парафиновые срезы из выбранных блоков депарафинизировали; после блокирования эндогенной пероксидазы в 3 % растворе перекиси водорода проводили высокотемпературную обработку (TRS, DAKO) с целью восстановления антигенной структуры клеток фиксированного в формалине и заключенного в пара-

фин материала. Инкубацию с первичными антителами к CD31 в разведении 1:100 (клон JC70A, Dako) и Ki67 в разведении 1:150 (клон MIB1, Dako) проводили при комнатной температуре в течение 60 мин. Для визуализации продуктов иммунной реакции был использован набор EnVision (Dako), в качестве хромогенного субстрата применяли раствор диаминобензидина (Dako, Liquid DAB+), ядра докрашивали гематоксилином.

Для морфометрических исследований опухоли использовали программу для компьютерного анализа изображений OpenCVTool, цифровой сканер MIRAX MIDI (Zeiss), системный блок на базе процессора Intel Core I3, с оперативной памятью 4 Гб.

Индекс Ki-67 определяли при анализе более 1000 клеток, вычисляя как соотношение количества специфически окрашенных ядер к количеству всех ядер, выраженное в процентах.

Микрососудистое русло оценивали по методике Weidner [4] — МСП с определением суммарного периметра сосудистой стенки (СПСС) и вычислением суммарной площади сосудов (СПС), приходящихся на единичное поле зрения.

Окрашенные CD31 и Ki-67 препараты сканировали в сканере гистологических препаратов, затем полученные цифровые изображения изучали при малом увеличении ($\times 5$) с целью определения равномерности распределения сосудов и Ki-67-позитивных клеток и «горячих точек» (hot spots) — мест с наиболее высокой концентрацией капилляров и Ki-67-позитивных клеток, а затем при большом увеличении ($\times 40$) проводили захват изображений в фиксированном поле зрения; далее проводили подсчет капилляров: эндотелиальных клеток, замкнутых в полости, не замкнутых в полости, а также единичных окрашенных эндотелиоцитов, причем каждый объект считался единицей измерения. Подсчет проводился в 5–10 полях зрения при увеличении $\times 200$ и поле зрения MIRAX (0,27 мм²).

Уровень Ki-67, МСП, СПСС и СПС сравнивали с клинико-анатомическими параметрами (Т-стадия, степень дифференцировки опухоли, наличие регионарных метастазов, рецидив заболевания), используя t-тест Стьюдента, таблицы сопряженности 2×2 (χ^2 , точный критерий Фишера). Значимым принимали уровень $p \leq 0,05$. Статистическую обработку полученных параметров проводили с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0 [11].

Результаты

На момент исследования у 23 пациентов был локализованный рак, у 31 — метастатический.

Большинство опухолей (42 из 54) имели уровень Ki-67 $< 10\%$ (минимум — 0, максимум — 49%, среднее $7,33 \pm 1,3\%$). В группе пациентов с локализованным раком почки (РП) уровень Ki-67 был $> 10\%$ только

Таблица 1. Экспрессия Ki-67 и наличие метастазов

Стадия	Ki-67 > 10%, n (%)	Ki-67 < 10%, n (%)	p
Локализованный	2 (3,7)	21 (38,9)	0,04
Метастатический	10 (18,5)	21 (38,9)	

Таблица 2. Сопоставление средних величин показателей с клиническими проявлениями заболевания

Показатель	Локализован- ный рак	Метастатичес- кий рак	p
Ki-67, % M±SE	4,2±0,7	9,3±2,0	0,04
МСП, количество/0,27 мм ² M±SE	126	92	0,05
СПС, мкм/0,27 мм ² M±SE	120971	62535	0,0001
СПСС, мкм ² /0,27 мм ² M±SE	26961	19196	0,05

Примечание. M — среднее арифметическое, SE — ошибка средних.

Таблица 3. Соотношение наличия полей зрения, уровня Ki-67 > 10% и стадии заболевания

Стадия	Имеются поля с Ki-67 > 10%, n (%)	Ki-67 только < 10%, n (%)	p
Локализованный	3 (5,6)	20 (37,0)	0,008
Метастатический	15 (27,8)	16 (29,6)	

в 2 случаях, а в группе с метастатическим процессом — у 1/3 пациентов (табл. 1). Выявилось различие между метастатическим и локализованным раком при сравнении среднего уровня Ki-67: в группе пациентов с локализованным раком средний уровень Ki-67 был значительно ниже, чем при метастатическом (табл. 2).

Распределение Ki-67-позитивных клеток в части опухолей было неравномерным, и в разных участках опухоли уровень Ki-67 составлял от 0 до 40 %, причем локализованные опухоли имели равномерное распределение Ki-67-позитивных клеток, только у 3 из них были участки, где уровень Ki-67 был более 10 %, при метастатическом раке у половины пациентов распределение Ki-67 носило неравномерный характер (табл. 3).

При анализе характера кровеносного русла в опухолях выявилось, что локализованный рак имел лучшие параметры васкуляризации, чем метастатический: МСП, СПСС и СПС были значительно выше в первом случае, особенно значимым оказалась СПС ($p = 0,0001$) (см. табл. 2). Также как и Ki-67, распределение МСП, СПСС и СПС в части опухолей носило неравномерный характер.

Провели сопоставление уровня Ki-67 и показателей ангиоархитектоники в одних и тех же полях зрения.

При неравномерном распределении Ki-67-позитивных клеток «горячие точки», так же как и опухоли с высоким уровнем Ki-67 (более 10 %), оказались плохо васкуляризированными, по сравнению с опухолями (участками опухоли при неравномерном распределении) с низким пролиферативным индексом. Так, при Ki-67 > 10 % средняя МСП составила 69, СПСС — 18 226, СПС — 61 293. При Ki-67 < 10 % средняя МСП составила 113, СПСС — 23 476, СПС — 93 364, хотя различия не достигли уровня статистической достоверности ($p = 0,07$; 0,26 и 0,12). В части метастатических опухолей имелись участки веретеноклеточного строения, которые характеризовались высоким уровнем Ki-67 и низкими показателями васкуляризации, в то время как в полях зрения с обычным строением опухоли эти показатели не отличались от показателей при локализованном раке.

Обсуждение

Ангиогенез является обязательным условием для опухолевого роста и метастазирования. Его регуляция осуществляется посредством баланса между проангиогенными и антиангиогенными факторами. Как видно из всех представленных данных, локализованный и метастатический варианты РП имеют отличные друг от друга характеристики. При метастатическом раке почки уровень пролиферации опухолевых клеток выше, чем при локализованном, несмотря на то, что уровень васкуляризации этих опухолей оказался значительно ниже. Так, хорошо васкуляризируемые опухоли с большим количеством разветвленных сосудов вопреки ожиданиям продемонстрировали более спокойное клиническое поведение: они оказались локализованными. МСП, СПС и СПСС более полно характеризуют ангиоархитектонику интратуморального микрососудистого русла с учетом уровня кровоснабжения опухолевых клеток. К тому же возникают сложности при подсчете МСП при высоко васкуляризованных опухолях, в которых обширная разветвленная сосудистая сеть создает впечатление одного, но очень разветвленного сосуда, который оплетает небольшие группы опухолевых клеток. Поэтому такие показатели, как суммарная площадь и периметр сосудов, оказываются более адекватной характеристикой

сосудистого русла, чем только МСП. При большом количестве разветвленных сосудов с большим периметром сосудистой стенки опухолевая паренхима имеет больший периметр соприкосновения с сосудистой стенкой и, соответственно, лучшие условия для обеспечения кислородом и питательными веществами, так как большое количество опухолевых клеток имеют непосредственный контакт с сосудом. N. Rioux-Leclercq и соавт. [12] выделили 2 различных сосудистых рисунка при ПКР. Один из них характеризуется низкой МСП, соответствующей небольшому количеству мелких сосудов, но с преобладанием сосудов большого диаметра. Этот вариант строения сосудистого русла связан с плохим прогнозом. По их данным, все метастатические варианты рака имели небольшую МСП, с чем согласуются и наши результаты. Второй вариант характеризуется плотной сетью опухолевых сосудов, формирующих синцитиум. Наши данные также перекликаются и с результатами S.G. Sharma и соавт. [13], которые ввели понятие микрососудистого поля и считают, что он лучший прогностический маркер при ПКР, чем МСП.

Сосудистая плотность отражает межкапиллярное расстояние и определяется ангиогенными (стимуляторами и ингибиторами) и неангиогенными (соотношение потребления кислорода и питательных веществ в опухолевых клетках) факторами. Уменьшение зависимости опухолевых клеток от сосудов связано с более высокой злокачественностью. В работе M.M. Baldewijns и соавт. [14] ПКР высокой степени злокачественности характеризуется высоким процентом пролиферирующих эндотелиальных клеток, который строго коррелирует с высоким процентом пролиферирующих опухолевых клеток, но при этом МСП значительно ниже по сравнению с раком низкой степени злокачественности. Авторы пришли к выводу, что процент пролиферации эндотелиальных клеток — лучший индикатор ангиогенеза, чем МСП. Толерантность к гипоксическим состояниям может объяснить, почему ПКР высокой степени злокачественности (по Фурману G3 и G4) имеет увеличенное межкапиллярное пространство по сравнению с карциномой низкой степени злокачественности (по Фурману G1 и G2).

В случаях опухолей с неравномерным распределением сосудов и Ki-67-позитивных клеток встает вопрос, в каких участках производить подсчет. Как правило, подсчет МСП проводят в «горячих точках», где количество сосудов максимально. Возможно, подсчет МСП в «горячих точках» имеет значение для оценки чувствительности к антиангиогенной терапии, но не для определения метастатического потенциала опухоли, хотя, как показали многие преklinические и клинические исследования, при некоторых локализациях МСП не является предиктом ответа на антиангиогенную терапию [15–18]. Нами замечено, что в опухолях, имеющих неоднородное строение, МСС, СПСС и СПС значительно ниже, а уровень Ki-67 выше в участках веретеноклеточного строения, чем обычного. Причем все эти опухоли в нашем исследовании имели метастатический характер. В участках же обычного строения эти показатели были такие же, как при локализованном раке. Для определения прогностического значения этих показателей, по всей видимости, следует учитывать результаты подсчета в «неблагоприятных» участках — «горячих точках» для Ki-67, но не для МСП, так как эти «горячие точки» не совпадают, а высокий уровень МСП является прогностически благоприятным признаком.

Почему при низкой васкуляризации опухоли уровень пролиферативной активности и метастатический потенциал оказались выше, остается не совсем понятным. Возможно, при высокой пролиферативной активности масса опухолевых клеток увеличивается значительно быстрее, чем идет процесс ангиогенеза, и новые сосуды просто не успевают вырасти, а гипоксия индуцирует генетическую нестабильность опухолевых клеток и способствует селекции клеток, обладающих высоким метастатическим потенциалом [11].

Выводы

Пролиферативная активность и ангиоархитектоника являются важными биологическими характеристиками опухоли с неодинаковой клинической значимостью при ПКР. Метастатический рак имеет более высокую пролиферативную активность и низкий уровень васкуляризации опухоли по сравнению с локализованным раком.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yildiz E., Gokce G., Kilcarslan H. et al. Prognostic value of the expression of Ki-67, CD44 and vascular endothelial growth factor, and microvessel invasion, in renal cell carcinoma. *BJU Int* 2004;93(7):1087–93.
2. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182–86.
3. Folkman J. Angiogenesis in Cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995(1):27–31.
4. Weidner N., Semple J.P., Welch W.R., Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis — correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl Med* 1991;324:1–8.
5. Weidner N., Folkman J., Pozza F. et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1875–87.
6. Weidner N., Carroll P.R., Blumenfeld W., Folkman J. Tumor angiogenesis correlate with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993;143:401–9.
7. Weidner N. Intratumoral microvessel density as prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 1995;147(1): 9–19.

8. Sabo E., Boltenko A., Sova Y. et al. Microscopic analysis and significance of vascular architectural complexity in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7(3):533–7.
9. Yoshino S., Kato M., Okada K. Clinical significance of angiogenesis, proliferation and apoptosis in renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 2000;20(1C):591–4.
10. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics: Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon, France: IARC Press, 2004.
11. Боровиков В.П., Боровиков И.П. Статистический анализ и обработка данных в среде Windows. М., 1998. 592 с.
12. Rioux-Leclercq N., Epstein J.I., Bansard J.Y. et al. Clinical significance of cell proliferation, microvessel density, and CD44 adhesion molecule expression in renal cell carcinoma. *Hum Pathol* 2001;32(11):1209–15.
13. Sharma S.G., Aggarwal N., Gupta S.D. et al. Angiogenesis in renal cell carcinoma: correlation of microvessel density and microvessel area with other prognostic factors. *Int Urol Nephrol* 2011;43(1):125–9.
14. Baldewijns M.M., Thijssen V.L., Van den Eynden G.G. et al. High-grade clear cell renal cell carcinoma has a higher angiogenic activity than low-grade renal cell carcinoma based on histomorphological quantification and qRT-PCR mRNA expression profile. *Br J Cancer* 2007;96(12):1888–95.
15. Hlatky L., Hahnfeldt P., Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:883–93.
16. Beecken W.D., Fernandez A., Jousen A.M. et al. Effect of antiangiogenic therapy on slowly growing, poorly vascularized tumors in mice. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(5):382–7.
17. Dahut W.L., Lakhani N.J., Gulley J.L. et al. Phase I clinical trial of oral 2-methoxyestradiol, an antiangiogenic and apoptotic agent, in patients with solid tumors. *Cancer Biology and Therapy* 2006;5(1):22–7.
18. Wédam S.B., Low J.A., Yang S.X. et al. Antiangiogenic and antitumor effects of bevacizumab in patients with inflammatory and locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(5):769–77.