

## Неинвазивная карцинома молочной железы Ангиогенез и клеточная пролиферация

*Ying Cao, MD, PhD; Gladell P. Paner, MD; Leonard B. Kahn, MD; Prabha B. Rajan, MD<sup>1</sup>*

*Перевод с английского – Е.Н. Мельникова*

**Контекст** – ангиогенез и индекс клеточной пролиферации являются прогностическим фактором для инвазивной карциномы молочной железы; однако немного известно об их роли в случае неинвазивной опухоли.

**Цель** – изучить соотношение плотности микрокапилляров и индекса клеточной пролиферации с другими гистологическими параметрами (гистологический тип, ядерная дифференцировка и митотический индекс) в 65 случаях неинвазивной карциномы молочной железы.

**План исследования** – зафиксированные в формалине и залитые в парафин ткани 65 карцином *in situ* молочной железы, были окрашены с использованием иммунной метки антитела против фактора VIII-связного антигена и антигена, ассоциированного с пролиферацией MIB-1. Плотность микрокапилляров была измерена подсчетом общего числа микрокапилляров вокруг карциномы *in situ* с помощью 10-кратной, маломощной микроскопической линзы. Индекс клеточной пролиферации был вычислен путем подсчета MIB-1 – положительных ядер на 100 клеток опухоли. Для статистического анализа были использованы  $\chi^2$  тест и тест ранговой корреляции Спирмена (Spearman rank correlation test).

**Результаты** – плотность микрокапилляров и индекс клеточной пролиферации у протоковой комедо карциномы *in situ* с высоким ядерным уровнем значительно выше, чем эти же показатели у протоковой некомедо карциномы *in situ* или дольковой карциномы *in situ* ( $P < .001$ ).

**Заключение** - ангиогенез и индекс клеточной пролиферации являются активными биологическими процессами и могут быть рассмотрены как маркеры, которые позволяют разделить пациентов с неинвазивной карциномой молочной железы на две группы: с низким и высоким риском.

Маммографический скрининг привел к увеличению частоты неинвазивного РМЖ (карцинома *in situ* (CIS)) (1). Сегодня CIS составляет 40 % вновь выявленных карцином молочных желез, установленных при скрининге. Основываясь на структуре, типе роста, и клеточной характеристике можно выделить два основных типа CIS - протоковая карцинома *in situ* (DCIS) и

<sup>1</sup> Принято к публикации 8 апреля 2004г. От отделения патологии Чикагского медицинского центра Университета Loyola, Maywood, Ill (Drs Cao, Paner, and Rajan) и Еврейского медицинского центра Лонг-Айленда, Нью-Йорк (Long Island Jewish Medical Center), New Hyde Park, NY (Drs Kahn and Rajan). У авторов не было существенного финансового интереса в продуктах или компаниях описанных в этой статье.

Издано: Prabha B. Rajan, MD, Department of Pathology, Room 2218, EMS Bldg, Loyola University Medical Center, Maywood, IL 60153 (e-mail: prajan@lumc.edu).



дольковая карцинома *in situ* (LCIS). Эти два вида заболевания отличаются своим естественным ходом развития, клинической картиной и проводимым лечением. Протоковая карцинома *in situ* составляет более чем 80% всех неинвазивных карцином, которые в свою очередь могут быть подразделены на 5 структурных подтипов, включающих комедо, солидную, криброзную, папиллярную и микропапиллярную. До 50% рецидивов неинвазивного РМЖ связывается с инвазией; однако до настоящего времени не были описаны никакие патологические или молекулярные особенности, предсказывающие развитие инвазивного заболевания (2).

Ангиогенез - это процесс деления и миграции клеток эндотелия для формирования новых капилляров, которые поддерживают дальнейший рост опухоли. Многочисленные исследования показали, что количественный анализ ангиогенеза опухоли в инвазивном РМЖ, путем измерения плотности микрокапилляров, дает независимую оценку прогноза опухоли (3-6). Целый ряд исследований в последние десять лет установили значимость оценки индекса клеточной пролиферации опухоли (с антителами MIB-1 индекса метки (MIB-1 labeling index), который может использоваться вместо фактора роста, и коррелирует со множеством клинико-патологических параметров. Прогностическая ценность индекса клеточной пролиферации является важной для тех опухолей, у которых сложно предсказать клиническое течение болезни только по гистологическим параметрам. Для РМЖ индекс клеточной пролиферации является независимым «предсказателем» как общей выживаемости, так и рецидива заболевания. К тому же высокий индекс клеточной пролиферации коррелирует с неблагоприятным клиническим исходом при однофакторном или многофакторном анализе (7-10). До настоящего времени, большинство исследований ангиогенеза / плотности микрокапилляров и индекса клеточной пролиферации было сфокусировано на инвазивной карциноме, тогда как совсем немного известно, об их роли в случае неинвазивной карциномы.

Цель этой работы состояла в исследовании связи оценки плотности микрокапилляров и индекса клеточной пролиферации с другими гистологическими параметрами (гистологический тип, ядерная дифференциация и митотический индекс) для неинвазивной карциномы молочной железы.

## Материалы и методы

### Пациенты и ткани

Исследование включало 65 пациентов с CIS, который был диагностирован и проходил лечение период с 1978 по 1994 годы в Еврейском медицинском центре Лонг-Айленда (Нью-Йорк) (Long Island Jewish Medical Center, New Hyde Park, NY). Клинические особенности, методы лечения и его результаты были получены из историй болезни, Реестра рака (Cancer register) и служебных документов врачей.

### Иммуногистохимия

Закрепленные формалином (24-48 часов), залитые в парафин ткани были разрезаны на слои, толщиной от 3 до 5 микрон и высушены в духовом шкафу при 60°C в течение 30 минут. Затем, образцы были промыты в реагенте Tris-buffered saline (pH 7,6) и инкубированы с 1,5% лошадиной сывороткой в течение 20 минут. В течение часа все образцы были инкубированы с моноклональным антителом мыши на фоне фактора VIII-связного антигена (Dako Corporation, Carpinteria, Калифорния, США) и антигена, связанного с пролиферацией MIB-1 (Immunotech, Westbrook, Me). В качестве негативного контроля (т.е. отсутствия побочных явлений) аналогичные образцы были инкубированы с нормальным лошадиным (антилимфоцитарным) иммуноглобулином (Ig) G вместо первоначального антитела. Образцы были промыты в реагенте Tris-buffered saline в течение 10 минут и инкубированы с антимишиным меченным-пероксидазом IgG. Образцы были промыты в Tris-buffered saline и пероксидазная реакция развилась в течение 5 минут с аминоксантином тетрагидрохлорид-гидрогеном пироксид (diaminobenzidine tetrahydrochloride-hydrogen peroxide). Все образцы были контрастно окрашены гематоксилином, обезвожены и помещены под покровное стекло.



### Оценка окрашивания и количественный анализ

Плотность микрокапилляров была получена путем подсчета общего количества микрососудов, вокруг опухоли. Микрососуды были идентифицированы на основании структуры (линия люмена эндотелиальных клеток) дополненной позитивностью эндотелиальных клеток к VIII-фактору. Плотность микрососудов измерялась с помощью 10-кратного, маломощного микроскопа (Olympus microscop x 10) в области наибольшей васкуляризации. Индекс клеточной пролиферации был вычислен путем подсчета MIB-1 – положительных ядер на 100 клеток опухоли используя сетку микроскопа.

### Статистический анализ

Связь плотности микрососудов и индекса клеточной пролиферации в характеристике опухоли была проверена используя тест  $\chi^2$  и тест ранговой корреляции Спирмена (Spearman rank correlation test). При сравнении двух категорий оценка значимости составляла  $P < .05$ .

### Результаты

Возраст пациентов находился в пределах от 35 до 84 лет, средний возраст составил 54 года. Все случаи были разделены на три группы: комедо DCIS, некомедо DCIS и LCIS (рисунки 1-3). Из 65 случаев, 19 – принадлежали комедо-типу с высоким ядерным уровнем DCIS; 13 – некомедо типу DCIS (большинство было с ядерным уровнем 2, но 2 случая были с ядерным уровнем 1); и остальные 33 случая были LCIS, включая 17 случаев с уровнем 1 и 16 случаев с уровнем 2. Тринадцать из 19 случаев комедо-типа DCIS, имели 10 митозов с проявлением заметного некроза при 10-кратном увеличении по сравнению с низким числом митозов и отсутствующим некрозом в некомедо-типе DCIS и LCIS (таблица 1). Большое количество микрососудов ассоциируется с комедо типом, со значением 28,9 в отличие от значения 20,5 для некомедо DCIS и 17,5 для LCIS ( $P < .001$ ; Таблица 2). Большое количество микрососудов также коррелирует с высоким ядерным уровнем 3, при среднем значении 29,8 в отличие от среднего значения 15,3 при низком ядерном уровне 1 и 24,3 при уровне 2 ( $P < .001$ ; Таблица 2). Также была отмечена существенная взаимосвязь между индексом пролиферации и комедо типом, высоким ядерным уровнем DCIS (Таблица 3). Средний индекс пролиферации при комедо типе DCIS был 19,5, который существенно выше, чем 4,3 при LCIS и 4,2 при некомедо типе DCIS ( $P = .04$ ). Кроме того, более высокий ядерный уровень соответствовал более высокому индексу пролиферации. Средний индекс пролиферации при ядерном уровне 3 был 19,5 в сравнении с 3,8 и 4,7 для уровня 1 и уровня 2 соответственно ( $P = .003$ ; Таблица 3). Более того, индекс клеточной пролиферации показывает положительную корреляцию с количеством митозов (Таблица 4). При малом числе митозов (<10) имеет место низкий индекс пролиферации, со средним значением 5,1. При большом количестве митозов (10-20) имеет место наибольший индекс пролиферации со средним значением 21,2. При высоком числе митозов ( $> 20$ ) существенно возрастает среднее значение индекса пролиферации до 48 ( $P < .001$ ).

Медиана наблюдений за пациентами составила 40 месяцев (в среднем, 52,4 месяца; в интервале от 6 до 204 месяцев). У трех пациентов был рецидив DCIS в той же молочной железе, и у трех пациентов был DCIS в контралатеральной молочной железе. Один пациент с DCIS умер от легочных метастазов.

### Комментарии

Естественная история развития карциномы молочной железы не достаточно понятна. Проблема РМЖ заключается в гетерогенной природе заболевания и для клинического использования необходимо найти наилучшие терапевтические методы. Многочисленные исследования этиологии рака выдвинули гипотезу, что инвазивный РМЖ представляет собой результат временной и



генетической последовательности нескольких морфологически определяемых стадий – прогрессия от нормального эпителия через гиперплазию, к атипичной гиперплазии, к DCIS, и, в конечном счете, к инвазивной карциноме. С точки зрения возможной прогрессии, DCIS может оставаться неизменным или он может прогрессировать и стать инвазивным раком. Однако, немного известно о путях развития и стимулирующих факторах, приводящих к процессу трансформации. К тому же, доступные стратегии лечения при неинвазивной карциноме молочной железы, включая лампэктамию с послеоперационной лучевой терапией, биопсия «сторожевого» лимфатического узла (Sentinel Lymph Node, SLN) или гормональные манипуляции могут все вместе значительно уменьшить риск рецидива рака или метастазов. В силу этого, в обязательном порядке нужно осуществлять поиск надежных маркеров, чтобы предсказать риск прогрессии опухоли в случае неинвазивной карциномы молочной железы.

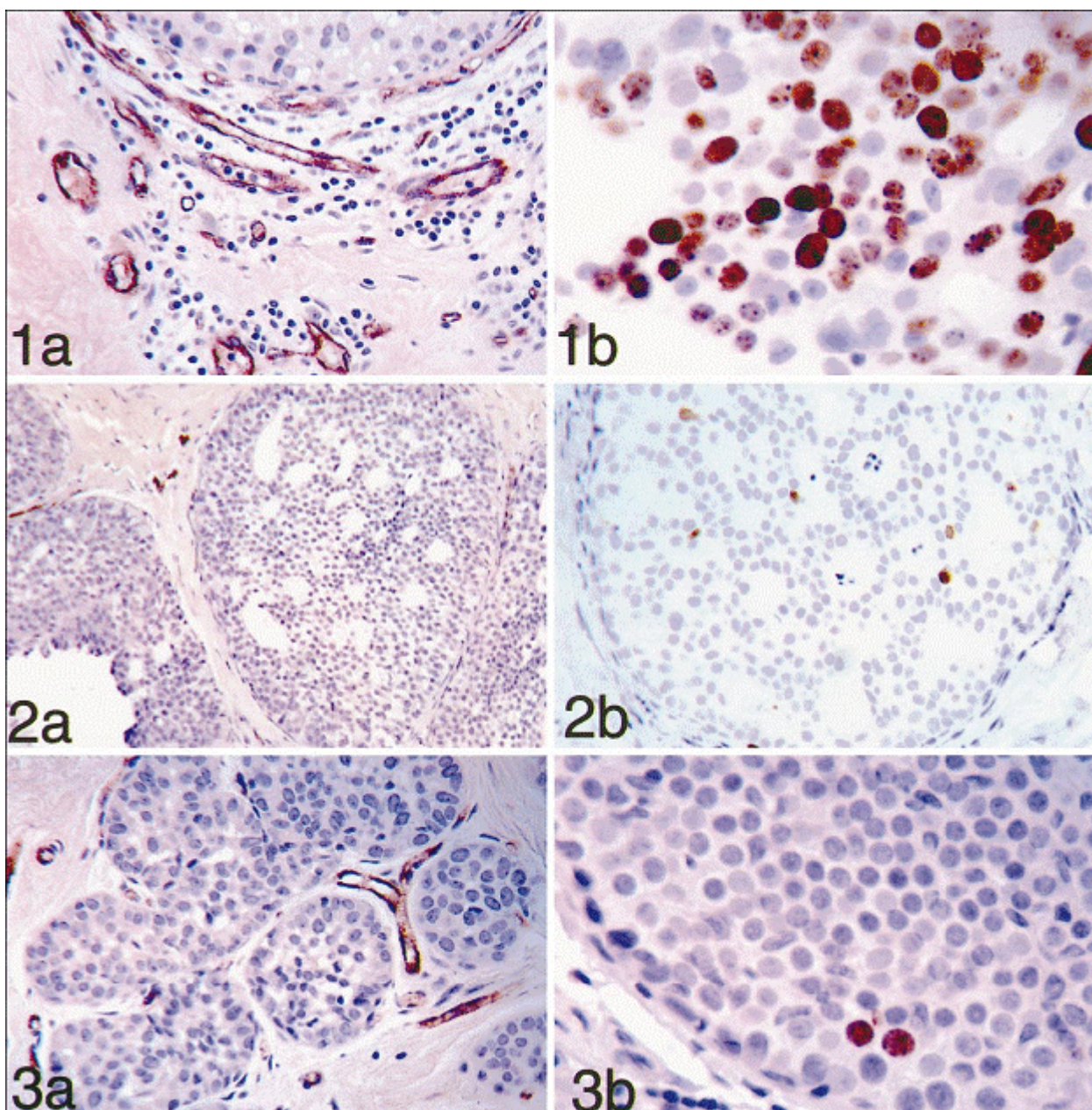
Ангиогенез является независимым биологическим процессом, продуцирующим развитие опухоли, инвазию и метастазы. Прогностическая ценность количественного анализа ангиогенеза в различных типах карцином была исследована после того, как Вейднер и его коллеги сообщили, что высокая васкуляризация ассоциируется с отдаленными метастазами. Использование плотности микрососудов в качестве оценки ангиогенеза является косвенной единицей измерения конечного результата всех вовлеченных ангиогенных факторов (11-16). Принцип метода был основан на идентификации под микроскопом наиболее сильно васкуляризованной области опухоли, и максимальная плотность микрососудов в этой горячей зоне была подсчитана и использовалась для характеристики опухоли. Многочисленные исследования показали, что плотность микрососудов при инвазивности РМЖ коррелирует с возможностью метастазов и выживаемостью пациента. Поскольку возможность опухолевых клеток индуцировать рост сосудистой сети происходит на начальной стадии клеточной трансформации, предраковые поражения молочной железы могут также стимулировать рост сосудистой сети и способствовать злокачественной трансформации.

Это исследование установило связь числа микрососудов и гистологических характеристик для неинвазивного РМЖ. Комедо-тип DCIS, который имеет высокий потенциал трансформации в инвазивный рак, значительно ассоциируется с высоким количеством микрососудов ( $P < .001$ ). Также имеется значительная корреляция между плотностью микрососудов и высоким **ядерным уровнем**. Взаимосвязь между высокой плотностью микрососудов, комедо DCIS и высоким ядерным уровнем предполагает, что перидуктальный ангиогенез увеличивается с ростом опухоли, но не способен сохранить темп наиболее быстро растущих образований.

Индекс MIB-1 является эффективным и доступным методом для оценки опухолевой пролиферации в случае инвазивной карциномы молочной железы (17-19). Гонзалес-Вела и др. (10) описывают, что индекс MIB-1 хорошо коррелирует с известными методами (например, оценка клеток, находящихся в S-фазе с помощью цитометрии) при оценке пролиферации опухоли и с параметрами агрессивного фенотипа опухоли. Подобным образом, Иммамура и коллеги (18) обнаружили, что MIB-1, определяющий пролиферативную активность является значительным прогностическим фактором инвазивной протоковой карциномы молочной железы. Однако для предсказания трансформации неинвазивной опухоли в злокачественную, эффективность индекса MIB-1 не была установлена. Наше исследование показывает, что при неинвазивной карциноме молочной железы существует значительная связь между индексом пролиферации и комедо-типом с высоким ядерным уровнем CIS. Индекс пролиферации MIB-1 у комедо-типа DCIS значительно выше, чем у LCIS и некомедо-типа DCIS ( $P = .04$ ). К тому же, при более высоком ядерном уровне имеет место более высокий индекс пролиферации. Индекс MIB-1 у опухоли высокого уровня был в 4 – 5 больше раз, чем для опухоли с низким ядерным уровнем. Кроме того, индекс пролиферации показывает позитивную корреляцию с числом митозов.

В итоге, данное исследование показало, что плотность микрососудов и индекс клеточной пролиферации являются активными биологическими процессами и могут быть рассмотрены как маркеры, позволяющие разделить рак *in situ* на две группы: с высоким и низким риском. CIS с высоким риском имеет потенциал более агрессивного поведения. В дальнейшем, будут рассмотрены вопросы выбора методов адьювантной терапии с использованием антиангиогенных веществ и/или лучевой терапии у пациентов с высоким риском CIS.





**Рисунок 1** а) протоковая комедо карцинома in situ (DCIS). Увеличенная плотность сосудов подкрашена сильной цитоплазматической экспрессией фактора VIII в васкулярных эндотелиальных клетках (исходное увеличение  $\times 100$ ),

б) комедо тип DCIS. Клетки протоков показывают одновременно и сильную и умеренную ядерную реактивность с антителом MIB-1 (исходное увеличение  $\times 400$ )

**Рисунок 2** а) криброзный некомедо тип протоковой карциномы in situ (DCIS). Некоторые области вокруг некомедо-DCIS показывают только редкую васкулярную пролиферацию (фактор VIII иммуногистохимии, исходное увеличение  $\times 40$ ).

б) криброзный некомедо тип DCIS. Только редкие клетки протоков показывают ядерную реактивность MIB-1 (исходное увеличение  $\times 100$ ).

**Рисунок 3** а) дольковая карцинома in situ. Имеется существенное уменьшение плотности сосудов (фактор VIII иммуногистохимии, исходное увеличение  $\times 200$ ).

б) дольковая карцинома in situ. Только редкие клетки показывают ядерную реактивность MIB-1 (исходное увеличение  $\times 400$ ).

Таблица 1. Гистологические характеристики 65 исследуемых случаев\*

Гистологический тип	Ядерный уровень			Количество митозов/10 при большом поле зрения микроскопа			Некрозы		
	1	2	3	<10	10-20	>20	нет	фокальные	заметные
LCIS	17	16	0	33	0	0	18	15	0
Comedo DCIS	0	0	19	6	11	2	0	6	13
Noncomedo DCIS	2	11	0	13	0	0	7	6	0

Таблица 2. Связь между числом микрососудов и гистологическими параметрами\*\*

Переменные	Количество случаев	Число микрососудов В среднем значении ± стандартные отклонения	P
Гистологический тип			
LCIS	33	17,5 ± 10,0	
Noncomedo DCIS	13	20,5 ± 11,1	
Comedo DCIS	19	28,9 ± 7,3	< .001
Ядерный уровень			
1	19	15,3 ± 6,6	
2	26	24,3 ± 11,4	
3	20	29,8 ± 8,2	< .001

Таблица 3. Связь между индексом пролиферации и гистологическими параметрами\*\*

Переменные	Количество случаев	Индекс пролиферации В среднем значении ± стандартные отклонения	P
Гистологический тип			
LCIS	33	4,3 ± 2,1	
Noncomedo DCIS	13	4,2 ± 2,3	
Comedo DCIS	19	19,5 ± 5,5	.04
Ядерный уровень			
1	19	3,8 ± 2,3	
2	26	4,7 ± 2,3	
3	20	19,5 ± 8,3	.003

\* LCIS означает дольковую карциному in situ; DSIC – протоковая карцинома in situ; HPF – большое поле зрения микроскопа

\*\* LCIS означает дольковую карциному in situ; DSIC – протоковая карцинома in situ

\*\* LCIS означает дольковую карциному in situ; DSIC – протоковая карцинома in situ



**Таблица 4. Связь индекса пролиферации и числа митозов\***

Число митозов / 10 при большом поле зрения микроскопа	В среднем значении ± стандартные отклонения	Количество случаев	P
< 10	5,1 ± 3,99	52	
10-20	21,2 ± 8,85	11	
> 20	48,05 ± 14,5	2	< .001

**Список литературы:**

1. Ernster VL, Barclay J, Kerlikowske K. Incidence of and treatment for ductal carcinoma in situ of the breast. *JAMA*. 1996;275:913–918.
2. Teo NB, Shoker BS, Jarvis C, Martin L, Sloane JP, Holcombe C. Vascular density and phenotype around ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast. *Br J Cancer*. 2002;86:905–911.
3. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991;324:1–8.
4. Offersen BV, Borre M, Overgaard J. Quantification of angiogenesis as a prognostic marker in human carcinomas: a critical evaluation of histopathological methods for estimation of vascular density. *Eur J Cancer*. 2003;39:881–890.
5. Bosari S, Lee AK, DeLellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman LM. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol*. 1992;23:755–761.
6. Toi M, Kashitani J, Tominaga T. Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. *Int J Cancer*. 1993;55:371–374.
7. Jansen RL. MIB-1 labeling index is an independent prognostic marker in primary breast cancer. *Br J Cancer*. 1998;78:460.
8. Scholzen T. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182:311.
9. Jones S, Clark G, Koleszar S, et al. Low proliferative rate of invasive node-negative breast cancer predicts for a favorable outcome: a prospective evaluation of 669 patients. *Breast Cancer*. 2001;1:310–314.
10. Gonzalez-Vela MC, Garijo MF, Fernandez F, Val-Bernal JF. MIB1 proliferation index in breast infiltrating carcinoma: comparison with other proliferative markers and association with new biological prognostic factors. *Histol Histopathol*. 2001;16:399–406.
11. Obermair A, Kurtz C, Czerwenka K, et al. Microvessel density and vessel invasion in lymph-node negative breast cancer: effect on recurrence free survival. *Int J Cancer*. 1995;62:126–131.
12. Bevilacqua P, Barbareschi M, Verderio P, et al. Prognostic value of intratumoral microvessel density, a measure of tumour angiogenesis, in node negative breast carcinoma: results of a multiparametric study. *Breast Cancer Res Treat*. 1995;36:205–217.
13. Costello P, McCann A, Carney DN, Dervan PA. Prognostic significance of microvessel density in lymph node negative breast carcinoma. *Hum Pathol*. 1995;26:1196–2000.
14. Ogawa Y, Chung YS, Nakata ST, et al. Microvessel quantitation in invasive breast cancer by staining for factor-VIII-related antigen. *Br J Cancer*. 1995;71:1297–1301.

\* HPF означает большое поле зрения микроскопа



15. Goulding H, Abdul Rashid NF, Robertson JF, et al. Assessment of angiogenesis in breast carcinoma: an important factor in prognosis? *Hum Pathol.* 1995; 26:1196–1200.
16. Zolota V, Gerecosta A, Melachrinou M, Kominea A, Aletra C, Scopa CD. Microvessel density, proliferation activity, p53 and bcl-2 expression in in situ ductal carcinoma of the breast. *Anticancer Res.* 1999;19:3269–3274.
17. Aranda FI, Laforga JB. Cellular proliferation in breast ductal infiltrating carcinoma: correlation with clinical and histopathological variables. *Pathol Res Pract.* 1997;193:683–688.
18. Imamura H, Haga S, Shimizu T, Watanabe O, Kajiwara T, Aiba M. Prognostic significance of MIB1-determined proliferative activities in intraductal components and invasive foci associated with invasive ductal breast carcinoma. *Br J. Cancer.* 1999;79:172–178.
19. Barbareschi M, Girlando S, Mauri FM, et al. Quantitative growth fraction evaluation with MIB1 and Ki67 antibodies in breast carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 1994;102:171–175.

