

Крахмаль Надежда Валерьевна

**ОСОБЕННОСТИ ИНВАЗИВНОГО РОСТА
ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ,
СВЯЗЬ С ЛИМФОГЕННЫМ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ**

14.01.12 – онкология
14.03.02 – патологическая анатомия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2016

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России и Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Томский научно-исследовательский институт онкологии».

Научные руководители: доктор медицинских наук, профессор
Завьялова Марина Викторовна

доктор медицинских наук, профессор
Слонимская Елена Михайловна

Официальные оппоненты: Криворотько Петр Владимирович, доктор медицинских наук, заведующий хирургическим отделением опухолей молочной железы Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России

Надеев Александр Петрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Ведущая организация: Федеральное государственное научное учреждение «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва.

Защита состоится «__» _____ 2016 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 001.032.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Томский научно-исследовательский институт онкологии» (634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Томского научно-исследовательского института онкологии www.oncology.tomsk.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор



Фролова И.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Злокачественные новообразования на протяжении многих десятилетий являются предметом изучения различных областей медицинской науки, поскольку во многих развитых странах, в том числе и в России в структуре причин смерти населения прочно занимают 2-е место после сердечно-сосудистой патологии. Согласно прогнозам, число случаев данных заболеваний в будущем будет увеличиваться и, вероятно, рак станет основной причиной смерти как в России, так и во всем мире (Давыдов М.И., 2011; Siegel R. et al. 2014). С точки зрения репродуктивного здоровья населения вызывает беспокойство увеличение количества онкологических заболеваний у женщин, среди которых лидирующие позиции в течение многих лет уверенно удерживает рак молочной железы (РМЖ) (Пальцев М.А., 2010; Давыдов М.И., 2011; Чиссов В.И., 2012; Нелюбина Л.А., 2013; Harbeck N. et al., 2013). Неутешителен тот факт, что диагноз РМЖ устанавливается более чем 40% женщин уже на поздних стадиях заболевания, в то время как выявление данной патологии на ранних стадиях повышает вероятность практически полного излечения пациенток. Исследования показали, что 2х-летняя выживаемость больных при I стадии РМЖ составляет до 96,9% с отсутствием возникновения случаев местных рецидивов (Волченко А.А., 2012).

Большое количество работ посвящено изучению особенностей течения, клинкоморфологических параметров, закономерностей лимфогенного и гематогенного метастазирования опухоли при ее различных молекулярно-генетических типах. Одной из важных проблем современной онкологии является прогнозирование течения злокачественных новообразований с целью предсказания развития разных форм опухолевой прогрессии, в том числе лимфогенной диссеминации. В этом аспекте актуальным и, несомненно, наиболее перспективным является подход к изучению инвазивных свойств злокачественного новообразования с проецированием полученных результатов на параметры такой формы прогрессирования опухолевого процесса как лимфогенное метастазирование (Ковалев А.А., 2011).

Выделяют две основные формы инвазии: индивидуальную (одиночными клетками) и коллективную. В свою очередь, инвазия одиночными клетками может наблюдаться в двух вариантах: «мезенхимальная» и «амебоидная» (Pankova K. et al., 2010; Friedl P. et al., 2012).

Мезенхимальная инвазия, скорее всего, является следствием развития такого феномена как эпителиально-мезенхимальный переход, при котором злокачественно измененные клетки теряют эпителиальные свойства и приобретают мезенхимальный фенотип, позволяющий успешно осуществлять миграцию в окружающей строме, а также участвовать в процессах интра- и экстравазации при метастазировании. Морфологически при данном варианте инвазии опухолевые клетки характеризуются вытянутой формой, и частично могут напоминать фибробласты, по этой причине данный механизм миграции называют также фибробластоподобным. Для этого типа инвазии характерны наличие высоких сил сцепления на обоих полюсах опухолевой клетки, экспрессия интегринов (семейства $\beta 1$ и $\beta 3$), действие поверхностных протеаз для разрушения и ремоделирования окружающего внеклеточного матрикса (матриксные металлопротеиназы и урокиназный активатор плазминогена) с образованием в строме дефектов и движение по ним клеток в виде цепочек (Чикина А.С., 2014; Yilmaz M. et al., 2010; Friedl P. et al., 2012).

Амебоидный вариант инвазии одиночных опухолевых клеток является наиболее примитивным способом движения. Такой механизм, по данным литературных источников, не требует эпителиально-мезенхимального перехода. При морфологическом исследовании опухолевые клетки имеют округлую форму. В основе амебоидной инвазии лежат актино-миозиновые сокращения, для неё характерны быстрая деформируемость клеток, адаптация клеточной формы к уже сформированным структурам матрикса,

образование на поверхности множественных выступов клеточной мембраны и проникновение в сжатом состоянии через узкие пространства в строме. Перемещения осуществляются посредством быстро меняющихся циклов морфологических расширений и контракций. При этом изменения формы клеток генерируются кортикальным филаментозным актином, наблюдается относительно слабая сила взаимодействия с субстратом. Интегрины не играют существенной роли в реализации данного вида инвазии. Фокальные контакты и протеолиз отсутствуют, сохраняется быстрая и не фокализованная сборка рецепторов в местах взаимодействий клетки с внеклеточным матриксом (Ewald H.A. et al., 2013).

Данные литературы указывают на возможность перехода опухолевых клеток в рамках индивидуальной инвазии с мезенхимального на амебоидный тип миграции (мезенхимально-амебоидный переход) и наоборот (амебоидно-мезенхимальный переход). Возникновение данных изменений происходит под влиянием различных факторов микроокружения опухоли (Pankova K. et al., 2010; Spano D. et al., 2012).

Коллективная инвазия характеризуется миграцией целых клеточных групп, соединенных между собой с помощью кадхеринов и межклеточных щелевых связей. Морфологические проявления коллективной инвазии могут быть представлены крупными солидными полями опухолевых клеток, а также структурами шаровидной формы, структурами по типу многоклеточных цепочек и образованиями с просветом в центре. У движущейся клеточной группы отмечают наличие «ведущего края», который использует интегрины и протеазы для осуществления инвазии в окружающие ткани. Имеются сведения о том, что в процессе существования опухоли коллективная инвазия может переходить в инвазию одиночными клетками и наоборот (Чикина А.С., 2014; Ewald P.W., 2013; Friedl P. et al., 2012).

В настоящее время активно проводится изучение молекулярно-генетических свойств клеток, вовлеченных в процесс инвазии. Из разных параметров наибольшее значение уделяют матрикс-связывающим адгезивным рецепторам (интегрины), деградирующим матрикс протеазам (матриксные металлопротеиназы и сериновые протеазы), молекулам, способным к межклеточной адгезии и коммуникациям (E-, N-, VE-кадхерины), сигнальным белкам, контролирующим актиновый цитоскелет (RhoA, Rac1) (Friedl P., 2004).

Морфологические проявления опухолевой инвазии крайне разнообразные. В инфильтративном компоненте ткани новообразования могут наблюдаться тонкие короткие тяжи из нескольких клеток, широкие поля и даже структуры с просветом. Описанная внутриопухолевая морфологическая гетерогенность паренхиматозного компонента ткани новообразования наиболее ярко проявляется при инвазивном РМЖ (Герашенко Т.С., 2013; Denisov E.V. et al., 2015; Friedl P. et al., 2012; Pankova K. et al., 2010; Yilmaz M. et al., 2010). Анализ литературы показал, что исследование инвазивных свойств опухолей и молекулярно-генетических особенностей механизмов миграции проводятся преимущественно с использованием различных клеточных линий. Однако в доступной литературе практически отсутствует информация, касающаяся изучения инвазии *in vivo*. Скудны сведения о взаимосвязи морфологических проявлений и молекулярных характеристик клеток, вовлеченных в процесс разных вариантов инвазивного роста, с особенностями лимфогенного метастазирования при РМЖ.

Цель исследования

Изучить морфологические и молекулярные характеристики клеток, вовлеченные в процесс инвазии при раке молочной железы, и сопоставить их с параметрами лимфогенного метастазирования.

Задачи исследования

- 1 Оценить экспрессию β катенина, интегринов $\beta 1$ и $\beta 3$, виментина, матричных металлопротеиназ 2 и 9 типов, EGF, EGFR, FGFR1, RhoA, Rac1, CK14, Twist, Snail в разных структурах инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы с целью характеристики различных вариантов инвазивного роста.
- 2 Исследовать наличие фронта инвазии в разных структурах инфильтративного компонента карциномы молочной железы на основании учета особенностей экспрессии исследованных маркеров инвазивного роста, а также PЭ, PП и Ki67.
- 3 Изучить особенности морфологического строения разных типов структур инфильтративного компонента карциномы молочной железы и их связь с экспрессией маркеров инвазивного роста.
- 4 Изучить связь экспрессии маркеров инвазивного роста с возрастом, состоянием менструальной функции, размером и степенью злокачественности опухоли у больных раком молочной железы.
- 5 Сопоставить морфологические и молекулярные характеристики опухоли при различных вариантах инвазивного роста с частотой и выраженностью метастатического поражения регионарных лимфоузлов при раке молочной железы.
- 6 Разработать математическую модель для прогнозирования вероятности лимфогенного метастазирования при раке молочной железы на основе морфологических и молекулярных характеристик опухоли, ассоциированных с инвазивным ростом.

Научная новизна

Впервые обнаружено, что при раке молочной железы экспрессия маркеров, характеризующих инвазивные свойства ткани новообразования, зависит от морфологической гетерогенности опухоли. В солидных структурах чаще чем в других наблюдается экспрессия Rac1, интегрина $\beta 3$, MMP9, CK14, EGF, EGFR, виментина. Показано, что структуры, относящиеся к двум группам: первая, большинство клеток которых не имеют контакта со стромой (альвеолярные и солидные структуры), и вторая, в которых контакт со стромой сохранили все клетки (тубулярные, трабекулярные структуры, дискретные опухолевые клетки), характеризуются различной частотой выявления экспрессии Twist и интегрина $\beta 1$. Дискретные опухолевые клетки характеризуются наименьшей частотой выявления экспрессии интегрина $\beta 1$ и выраженной частотой экспрессии интегрина $\beta 3$. Впервые показано, что морфологические и экспрессионные характеристики солидных структур свидетельствуют о наличии в них наиболее выраженных признаков коллективной инвазии мезенхимального типа.

Впервые показано, что экспрессия маркеров, ассоциированных с инвазивными свойствами опухоли, при инвазивной карциноме неспецифического типа имеет гетерогенный или гомогенный характер. Независимо от типа структур инфильтративного компонента экспрессия маркеров Twist, Rac1, MMP9, интегрина $\beta 1$ и $\beta 3$ гетерогенна во всех случаях. Для RhoA свойственен гомогенный тип экспрессии. Гетерогенный тип экспрессии Snail, β катенина, MMP2 и CK14 обнаруживается чаще в солидных структурах.

Впервые выявлено, что наличие фронта инвазивного клеточного роста, определяемого по отсутствию в клетках разных типов структур экспрессии Ki67, PЭ и PП, чаще регистрируется в солидных структурах.

Впервые обнаружено, что при РМЖ экспрессия маркеров, ассоциированных с инвазивным опухолевым ростом, связана в разных структурах с краудингом. В солидных структурах при наличии краудинга в виде изолированного «скучивания» клеток в сравнении со случаями одновременного сочетания «скучивания» и «наслоения» чаще обнаруживается позитивная экспрессия Twist, MMP9, FGFR1, EGF и EGFR, в

альвеолярных структурах - позитивная экспрессия β катенина, MMP9 и виментина. Отмечено, что частота выявления краудинга зависит от типа морфологических структур. В тубулярных структурах данный признак наблюдается значительно реже. Опухоли с наличием краудинга во всех типах структур инфильтративного компонента характеризуются большим уровнем пролиферативной активности, чем при его отсутствии.

Впервые показано, что при трижды негативном молекулярно-генетическом типе РМЖ доля случаев с экспрессией виментина в 2 раза выше, чем при люминальных формах. Выявлено, что для опухолей с большим количеством разных типов структур является редкостью позитивная экспрессия виментина, при этом частота выявления экспрессии данного маркера в альвеолярных и трабекулярных структурах минимальная.

Впервые выявлено, что степень злокачественности опухолей связана с экспрессией некоторых маркеров, имеющих отношение к инвазии. Новообразования с высокой степенью злокачественности характеризуются уменьшением частоты экспрессии Snail, CK14 и EGFR в дискретных группах опухолевых клеток с одновременным увеличением в них частоты экспрессии $\beta 1$ и $\beta 3$ интегринов. Увеличение степени злокачественности в тубулярных и солидных структурах оказалось ассоциировано с наибольшей частотой экспрессии интегрин $\beta 3$ и виментина, в трабекулярных – с наибольшей частотой экспрессии FGFR1, в альвеолярных структурах отмечалось уменьшение частоты экспрессии Twist и MMP9.

Впервые обнаружено, что особенности экспрессии маркеров, определяющих инвазивные свойства опухоли в разных морфологических структурах при РМЖ, связаны с лимфогенным метастазированием. Впервые установлено, что частота и выраженность лимфогенного метастазирования при раке молочной железы связаны с краудингом и ретракцией. Выраженность лимфогенного метастазирования, проявляющаяся в увеличении количества пораженных метастазами лимфатических узлов, ассоциирована с наличием в опухолевых структурах признаков краудинга, особенно по типу изолированного «скупивания» клеток. Кроме того, выявлено, что лимфогенные метастазы развиваются чаще при наличии вокруг альвеолярных и тубулярных структур ретракционной щели.

Практическая значимость

Показано, что инвазивная карцинома неспецифического типа молочной железы характеризуется определенными морфологическими особенностями, а также особенностями экспрессии маркеров, определяющих инвазивные свойства новообразования в целом.

Выявлено, что степень злокачественности опухоли ассоциирована с экспрессионными характеристиками маркеров инвазивного клеточного роста в разных типах структур инфильтративного компонента рака молочной железы.

Обнаружено, что изменение экспрессии специфических маркеров инвазивного роста при раке молочной железы, а также определенные морфологические признаки в ткани новообразования сопряжены с параметрами лимфогенной прогрессии заболевания. У пациенток с инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы регистрируется меньшее количество лимфатических узлов с метастазами при наличии позитивной экспрессии β катенина в альвеолярных структурах, EGF в солидных структурах и MMP2 в дискретных группах опухолевых клетках. Частота и выраженность лимфогенного метастазирования ассоциированы с наличием в опухолевых структурах признаков краудинга и ретракции. Выявление в структурах опухоли краудинга, в особенности краудинга по типу изолированного «скупивания» клеток, ассоциировано с увеличением количества лимфатических узлов, пораженных метастазами. При наличии вокруг альвеолярных и тубулярных структур ретракционной щели лимфогенные

метастазы у пациенток с инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы развиваются чаще.

Обнаруженные морфологические и экспрессионные особенности инвазивного клеточного роста при раке молочной железы, а также сопряженные с ними параметры лимфогенной диссеминации позволяют прогнозировать течение болезни у таких пациенток и оценить риск наличия лимфогенного метастазирования.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Экспрессия маркеров инвазии имеет гетерогенный или гомогенный характер и ассоциирована с морфологической гетерогенностью опухоли. В солидных структурах чаще, чем в других структурах инвазивного компонента, экспрессированы маркеры коллективной инвазии мезенхимального типа.
2. Экспрессия маркеров инвазивного роста связана с вариантом краудинга опухолевых клеток. При изолированном «скупивании» клеток в солидных и альвеолярных структурах по сравнению со случаями сочетания «скупивания» и «наслоения», позитивная экспрессия обнаруживается чаще. Инвазивный фронт чаще выявляется в солидных структурах, при этом в них реже наблюдается краудинг в виде «скупивания» опухолевых клеток.
3. Наличие лимфогенных метастазов ассоциировано с экспрессией маркеров мезенхимального типа инвазии в солидных, альвеолярных структурах и дискретных группах опухолевых клеток. Количество лимфоузлов с метастазами зависит от выраженности краудинга в опухоли и наличия признаков ретракции вокруг альвеолярных и тубулярных структур опухоли.

Апробация результатов исследования

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на IX конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии», 25 апреля 2014 г., Томск; на всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева, в рамках II форума молодых ученых U-NOVUS «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии», 22 мая 2015 г., Томск; на Международной конференции «Клеточные и молекулярные механизмы взаимоотношения опухоли и микроокружения», 9-12 июля 2015 г., Томск.

Внедрение результатов исследования

Выявленные морфологические и молекулярно-биологические особенности инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы, ассоциированные с различными вариантами инвазивного роста, могут использоваться как дополнительные критерии прогноза лимфогенного метастазирования. Результаты внедрены для практического применения в отделении патологической анатомии и цитологии ФГБНУ Томский НИИ онкологии и для преподавания раздела «Эпителиальные злокачественные опухоли» на кафедрах патологической анатомии и морфологии и общей патологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора в получение новых результатов исследования

Автором самостоятельно изучена и проанализирована литература по теме диссертации, выполнено морфологическое исследование операционного материала 107 пациенток с раком молочной железы, включающего препараты, окрашенные гематоксилином и эозином, из первичной опухоли, ткани молочной железы вне образования, линий резекции и всех удаленных лимфатических узлов. Проведено иммуногистохимическое исследование препаратов первичной опухоли, проанализированы данные амбулаторных карт и историй болезней пациенток, включенных в исследование. По результатам исследования создана электронная база, содержащая данные по клиническим, морфологическим, иммуногистохимическим исследованиям, проведена статистическая обработка данных.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, отражающих основные положения диссертации, из них 4 журнальных статьи в рекомендованных ВАК изданиях, 5 тезисных работ в материалах региональных и международных конференций, 1 статья в зарубежном издательстве.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 220 страницах машинописного текста, включает введение, обзор литературы, главу о материалах и методах исследования, результатах собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации. Работа иллюстрирована 101 таблицей и 33 рисунками. Список литературы содержит 265 источников, из них 25 отечественных и 240 зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы исследования

В исследование были включены 107 больных инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы T1-4N0-3M0 в возрасте от 29 до 85 лет, находившихся на лечении в отделении общей онкологии ФГБНУ Томский НИИ онкологии с 2010 по 2012 г. Предоперационного лечения больные не получали. В 52 (49%) случаях была проведена радикальная мастэктомия, в 55 (51%) – секторальная резекция молочной железы с аксиллярной лимфаденэктомией. В послеоперационном периоде 91 больной по показаниям проводилась адъювантная химиотерапия по схемам CMF, FAC, CAH. 16 больным в постменопаузе назначалась антиэстрогенная терапия тамоксифеном. 10 больным в послеоперационном периоде дополнительно назначалась дистанционная гамма-терапия в стандартном режиме на послеоперационный рубец или на зоны регионального лимфооттока. Сроки наблюдения за больными составили 3 года. Анализировались первичные документы – истории болезни и амбулаторные карты больных.

Средний возраст больных составил $57,2 \pm 11,2$ года. Большая часть была представлена пациентками старше 50 лет – их было 80 (75%). Меньшими по количеству оказались группы больных в возрасте от 35 до 50 лет - 25 (23%) и до 35 лет – 2 (2%). У 31 больной менструальная функция была сохранена (средний возраст $45,7 \pm 8,1$), у 76 определялась менопауза ($61,9 \pm 8,6$).

Распространенность заболевания определялась согласно международной классификации по системе TNM (6 издание, принято в 2002 году, рекомендовано к использованию с 2003 года). Чаще выявлялись I (у 49 (46%) пациенток) и IIА (у 33 (31%) пациенток) стадии заболевания. Реже диагностировались IIВ (в 14 (13%) случаях), IIIА (в 9 (8%) случаях), IIIВ (в 1 (1%) случае) и IIIС (в 1 (1%) случае) стадии процесса. Преобладали опухоли размером от 2 до 5 см и менее 2 см, они выявлялись у 56 (52%) и 50 (47%) больных соответственно. Чаще опухоли располагались в наружных квадрантах молочных желез – у 52 (49%) пациенток, реже во внутренних квадрантах – у 27 (25%) больных и на границе наружных и внутренних квадрантов – у 26 (24%) пациенток. Центральная локализация процесса наблюдалась лишь в 2% случаев. Проводилось морфологическое исследование материала, удаленного во время операции.

Методы исследования

Выполнялось морфологическое исследование операционного материала. Макроскопической оценке подвергалась ткань первичной опухоли, ткань молочной железы вне новообразования (для исключения возможного скрытого мультицентрического роста) и все удаленные лимфоузлы.

Материал фиксировался в 10–12% растворе нейтрального формалина. Проводка материала и изготовление гистологических препаратов осуществлялись по стандартной

методике. Препараты окрашивались гематоксилином и эозином. Исследование выполнялось с применением светового микроскопа «Carl Zeiss Axio Lab.A1» (Германия).

Гистологический тип рака устанавливался согласно рекомендациям ВОЗ (Женева, 2012). В исследование включались только случаи с инвазивной карциномой неспецифического типа (ИКНТ). Степень злокачественности определялась по модифицированной схеме P. Scarff, H. Bloom и W. Richardson. При этом учитывалось количество тубулярных структур, число митозов и клеточный полиморфизм.

Соотношение паренхиматозного и стромального компонентов новообразования оценивалось по 3-х балльной системе. Одним баллом (слабо выраженный фиброз) оценивали случаи, когда доля паренхиматозного компонента превышала 70%, двумя баллами (умеренно выраженный фиброз) – случаи, когда доля паренхиматозного компонента составляла 10–70%, тремя баллами (резко выраженный фиброз) – случаи, в которых доля паренхиматозного компонента составляла менее 10%.

В инфильтративном компоненте выделяли альвеолярные, трабекулярные, тубулярные, солидные структуры и дискретные группы опухолевых клеток. Альвеолярными структурами называли скопления опухолевых клеток либо округлой, либо слегка неправильной округлой формы. Представительство альвеолярных структур в инфильтративном компоненте определялось по 3-х балльной системе, где 1 баллом (мало) обозначали случаи, в которых альвеолярные структуры составляли менее чем 30% от всех видов структур, 2 баллами (умеренно) – 30-70%, 3 баллами (много) – более чем 70% от всех видов структур. Кроме того, в альвеолярных структурах по 3-х балльной системе определялась выраженность полиморфизма опухолевых клеток. 1 баллом (слабо выраженный полиморфизм) обозначали случаи, в которых клетки были округлыми, средних размеров, имели округлые нормохромные ядра и умеренно выраженную цитоплазму, митозов не было. 2 баллам (умеренно выраженный полиморфизм) соответствовали случаи, в которых клетки были округлыми, средних размеров, имели округлые гиперхромные ядра, и умеренно выраженную цитоплазму, встречались митозы. 3 баллами (резко выраженный полиморфизм) обозначались случаи, в которых клетки были неправильной формы, крупных размеров, имели крупные гиперхромные ядра неправильной формы, выраженную цитоплазму, выявлялись неправильные митозы. Трабекулярными называли структуры, представляющие собой либо один ряд мелких достаточно мономорфных клеток, либо структуры, состоящие из 2–3 рядов клеток средних размеров с умеренно выраженной цитоплазмой, с округлыми нормохромными или гиперхромными ядрами. Тубулярными считали однорядные структуры с просветом, образованные достаточно мономорфными клетками с нормохромными округлыми ядрами. Солидными считали структуры, представляющие собой различные по размеру и форме поля, состоящие или из мелких клеток с умеренно выраженной цитоплазмой и мономорфными ядрами или из крупных клеток с обильной цитоплазмой и полиморфными ядрами. Группами клеток называли скопления от 1 до 4 клеток различных по своему строению. В большинстве случаев инфильтративный компонент имел смешанное строение, при котором широко варьировало сочетание разных типов перечисленных структур. В каждом случае подсчитывалось количество разных типов структур в инфильтративном компоненте, которое варьировало от одного до пяти соответственно. В каждом из пяти перечисленных типов структур инфильтративного компонента определялось наличие такого морфологического признака как краудинг. Краудингом обозначается феномен увеличения количества клеток в единице объема вследствие преобладания процессов пролиферации над процессами апоптоза клеток. Морфологически феномен краудинга в различных структурах инфильтративного компонента опухоли в гистологическом срезе определялся в виде двух вариантов - краудинг по типу изолированного «скупивания» и краудинг по типу сочетания «скупивания» и «наслоения» опухолевых клеток. Под «скупиванием» понимали более

«близкое» расположение клеток и соответственно их ядер друг к другу в структуре по сравнению с характером расположения клеток в остальных участках той же структуры опухоли. При краудинге по типу сочетания «скупивания» и «наслоения» клеток понимали более «близкое» расположение клеток в структуре в сочетании с наслоением ядер этих клеток друг на друга. Кроме того, в структурах оценивалась выраженность краудинга полуколичественным методом по 3-х балльной системе. При этом 1 баллом (слабо выраженный краудинг) обозначали случаи, в которых краудинг присутствовал менее чем в 30% определенного типа структур, 2 баллами (умеренно выраженный краудинг) – от 30 до 70% определенного типа структур, 3 баллами (резко выраженный краудинг) – более чем в 70% определенного типа структур. В стромах опухоли оценивались наличие и выраженность гиалиноза и воспалительной инфильтрации по 3-х балльной системе (1 балл – слабо выражен, 2 балла – умеренно выражен, 3 балла – резко выражен).

Оценка рецепторного (экспрессия рецепторов к эстрогенам (РЭ) и к прогестерону (РП)), HER2/neu статуса и пролиферативной активности (экспрессия Ki67) выполнялась с использованием иммуногистохимического метода исследования. Иммуногистохимическое исследование осуществлялось по стандартной методике. Применялись антитела фирмы «Дак» к рецепторам эстрогена (клон 1D5, RTU, мышинные), к рецепторам прогестерона (клон PgR636, RTU, мышинные), к онкопротеину c-erbB-2 (HER2/neu статус) (рабочее разведение 1:500, кроличьи), к Ki67 (клон MIB-1, RTU, мышинные). Оценка экспрессии рецепторов к половым гормонам проводилась количественным методом гисто-счета (Histo-Score). При этом подсчитывался процент позитивных клеток (Петров С.В., 2012). Кроме того, экспрессия РЭ и РП оценивалась в процентном содержании положительно окрашенных клеток в каждом варианте структур паренхиматозного компонента первичной опухоли инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы (в 10 полях зрения на 1000 клеток при увеличении $\times 400$), а также отмечалось наличие участков локального отсутствия экспрессии указанных маркеров в разных сегментах, а также по периферии (по фронту) разных типов структур.

HER2/neu негативными считались случаи с отсутствием окрашивания или слабым прерывистым мембранным окрашиванием. К HER2/neu позитивным относили случаи с интенсивным непрерывным мембранным окрашиванием более чем в 30% клеток. Случаи с умеренным непрерывным мембранным окрашиванием более чем в 30% клеток или интенсивным непрерывным мембранным окрашиванием менее чем в 10% клеток, требующие выявления наличия амплификации гена HER2/neu методом FISH или CISH/SISH, не включались в исследование.

Экспрессия Ki67 оценивалась в процентном содержании положительно окрашенных клеток в каждом варианте структур паренхиматозного компонента первичной опухоли инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы (в 10 полях зрения на 1000 клеток при увеличении $\times 400$). Кроме того, отмечалось наличие участков локального отсутствия экспрессии Ki67 в разных сегментах, а также по периферии (по фронту) разных типов структур опухоли.

На основании сочетания экспрессии рецепторов к эстрогенам, прогестерону, HER2/neu статуса и Ki67 определялись 5 молекулярно-генетических типа: люминальный А (позитивная экспрессия рецепторов к эстрогенам и/или к прогестерону, негативный HER2/neu статус, экспрессия Ki67 $< 20\%$), люминальный В1 (позитивная экспрессия рецепторов к эстрогенам и/или к прогестерону, негативный HER2/neu статус, экспрессия Ki67 $\geq 20\%$) и люминальный В2 (позитивная экспрессия рецепторов к эстрогенам и/или к прогестерону, позитивный HER2/neu статус при любом уровне Ki67), трижды негативный (негативная экспрессия рецепторов к эстрогенам, к прогестерону,

негативный HER2/neu статус), а также тип с гиперэкспрессией HER2/neu (негативная экспрессия рецепторов к эстрогенам, к прогестерону, позитивный HER2/neu статус).

Для оценки инвазивных свойств опухолевых клеток использовались следующие антитела: Anti-EGFR antibody [EP38Y] ab52894 Abcam (кроличьи моноклональные 1:100); Anti- β -catenin antibody [E247] ab32572 Abcam (кроличьи моноклональные 1:200); Anti-Integrin beta 3 antibody [EPR2417Y] ab75872 Abcam (кроличьи моноклональные 1:250); Anti-Integrin beta 1 antibody [4B7R] ab3167 Abcam (мышинные моноклональные 1:20); Anti-MMP2 antibody [6E3F8] ab86607 Abcam (мышинные моноклональные 1:200); Anti-MMP9 (Clone 2C3) Novocastra (мышинные 1:40); Anti-FGFR1 antibody [M5G10] ab824 Abcam (мышинные моноклональные 1:25); Anti-RhoA antibody [1B12] ab54835 Abcam (мышинные моноклональные 1:100); Anti-ETL (EGF) antibody ab12989 Abcam (кроличьи поликлональные 1:100); Anti-Rac1 antibody [O.T.127] ab33186 Abcam (мышинные моноклональные 1:200); Anti-Vimentin antibody Dako (Clone V9, RTU, мышинные моноклональные); Anti-Snail antibody Abcam (кроличьи поликлональные 1:1600); Anti-Twist antibody [Twist2C1a] – ChIP Grade ab50887 Abcam (мышинные моноклональные 1:50); Antibody Cytokeratin 14 Novocastra (Clone LL002, RTU, мышинные моноклональные).

Экспрессия перечисленных маркеров в каждом из присутствующих типов структур паренхиматозного компонента первичной опухоли инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы оценивалась по следующим параметрам: наличие или отсутствие экспрессии (1 – нет, 2 – есть); интенсивность экспрессии (1 балл – слабо выражена, 2 – балла – умеренно выражена, 3 балла – резко выражена); процент опухолевых клеток с позитивной экспрессией маркера (в 10 полях зрения на 1000 клеток при увеличении $\times 400$); наличие гетерогенности экспрессии маркера (1 – нет, 2 – есть); наличие усиления экспрессии маркера по периферии структур (по фронту) (1 – нет, 2 – есть); наличие экспрессии маркера в участках краудинга (1 – нет, 2 – есть).

В лимфатических узлах оценивалось наличие метастатического поражения, подсчитывалось количество лимфоузлов с метастазами.

Фотографирование гистологических срезов препаратов осуществлялось с использованием гистосканера MIRAX MIDI фирмы «Zeiss».

Обработка полученных данных выполнялась с использованием пакета программ «Statistica 6.0 for Windows». Применялся дисперсионный анализ, критерий χ^2 , метод логистической регрессии. Обсуждались результаты с достоверностью различий при $p < 0,05$ и с тенденцией к различиям при $p < 0,1$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Особенности экспрессии маркеров инвазии в зависимости от морфологической гетерогенности инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы

Экспрессия транскрипционного фактора Twist чаще регистрировалась в структурах, у большинства клеток которых отсутствует контакт со стромой (альвеолярные и солидные) по сравнению с теми структурами, в которых все клетки не утратили контакта со стромой (тубулярные, трабекулярные структуры и дискретные группы опухолевых клеток) (таблица 1).

Таблица 1 - Наличие экспрессии Twist в разных структурах инфильтративного компонента инвазивной карциномы неспецифического типа

Локализация экспрессии		Количество больных, абс.ч., %	
		Отсутствие экспрессии	Наличие экспрессии
Альвеолярные	1	56/68 (82%)	12/68 (18%) $p_3=0,009$ $p_5=0,003$
Тубулярные	2	34/37 (92%)	3/37 (8%)
Трабекулярные	3	66/69 (95%)	3/69 (5%)

Солидные	4	64/90 (71%)	26/90 (29%) p ₁ =0,05 p ₂ =0,005 p ₃ =0,0001 p ₅ =0,0000
Группы клеток	5	92/97 (95%)	5/97 (5%)

Подобного рода закономерность прослеживалась и в отношении экспрессии интегрин β1. Экспрессия интегрин β1 выявлялась значимо чаще в солидных структурах (35%) по сравнению с тубулярными (15%; p=0,01), трабекулярными (16%; p=0,008) структурами и дискретными группами опухолевых клеток (14%; p=0,01).

В солидных структурах чаще, чем в других структурах инфильтративного компонента отмечалась экспрессия маркеров коллективной инвазии мезенхимального типа – интегрин β3, Rac1, MMP9, CK14, EGF, EGFR и виментина. Экспрессия интегрин β3 регистрировалась чаще в солидных структурах и в дискретных группах опухолевых клеток. Реже экспрессия данного маркера выявлялась в альвеолярных, тубулярных и трабекулярных структурах опухоли (таблица 2).

Таблица 2 - Наличие экспрессии интегрин β3 в разных структурах инфильтративного компонента инвазивной карциномы неспецифического типа

Локализация экспрессии		Количество больных, абс.ч., %	
		Отсутствие экспрессии	Наличие экспрессии
Альвеолярные	1	46/57 (81%)	11/57 (19%)
Тубулярные	2	27/36 (75%)	9/36 (25%)
Трабекулярные	3	43/55 (78%)	12/55 (22%)
Солидные	4	27/95 (28%)	68/95 (72%) p ₁ =0,0000 p ₂ =0,0000 p ₃ =0,0000
Группы клеток	5	34/98 (35%)	64/98 (65%) p ₁ =0,0000 p ₂ =0,0000 p ₃ =0,0000

В солидных структурах чаще выявлялась экспрессия маркера коллективной инвазии мезенхимального типа Rac1 (67%) по сравнению с его экспрессией в альвеолярных (39%; p=0,0003), тубулярных (26%; p=0,0002), трабекулярных структурах (23%; p=0,0000) и в дискретных группах клеток (22%; p=0,0000).

Экспрессия маркера коллективной инвазии мезенхимального типа MMP9 статистически значимо чаще регистрировалась в солидных структурах (39%) при сравнении с альвеолярными (15%; p=0,001), тубулярными (21%; p=0,01), трабекулярными структурами (12%; p=0,0001), а также с дискретными группами опухолевых клеток (15%; p=0,0002). Кроме того, экспрессия CK14 чаще наблюдалась в солидных структурах (54%) по сравнению с экспрессией этого маркера в альвеолярных (20%; p=0,008) и трабекулярных структурах опухоли (27%; p=0,004).

Экспрессия маркеров коллективной инвазии мезенхимального типа EGF, EGFR и виментина определялась в солидных структурах инфильтративного компонента опухоли значимо чаще, чем в других типах структур. Так, экспрессия EGF в солидных структурах наблюдалась в 66% случаев. При этом в альвеолярных структурах экспрессия EGF выявлялась в 43% (p=0,01), в тубулярных - в 37% (p=0,001), в трабекулярных структурах - в 31% (p=0,0000), в дискретных группах опухолевых клеток - в 46% (p=0,005). Экспрессия EGFR в солидных структурах опухоли наблюдалась в 71% случаев, в

альвеолярных - в 43% ($p=0,001$), в тубулярных - в 34% ($p=0,0002$), в трабекулярных структурах - в 55% ($p=0,02$). В солидных структурах экспрессия виментина наблюдалась в 33% случаев, в альвеолярных - в 13% ($p=0,002$), в тубулярных - в 21% ($p=0,07$), а в трабекулярных структурах экспрессия виментина регистрировалась в 14% случаев ($p=0,005$).

Экспрессия маркеров инвазивного роста характеризовалась гетерогенным или гомогенным типом. Экспрессия маркеров Twist, Rac1, интегрин $\beta 1$, интегрин $\beta 3$ и MMP9 была гетерогенной во всех случаях независимо от типа структур инфильтративного компонента ткани новообразования, в то время как для RhoA был свойственен гомогенный тип экспрессии. Гетерогенная экспрессия β катенина, MMP2, EGF обнаруживалась в меньшей части случаев. Чаще гетерогенный тип экспрессии маркеров Snail, β катенина, MMP2 и СК14 выявлялся в солидных структурах (таблица 3).

Таблица 3 - Наличие гетерогенности экспрессии маркеров, характеризующих инвазивные свойства опухоли, в разных структурах инфильтративного компонента инвазивной карциномы неспецифического типа

Маркер	Количество больных, абс.ч., %				
	Альвеолярные	Тубулярные	Трабекулярны е	Солидные	Группы клеток
	1	2	3	4	5
Snail	26/53 (49%)	10/24 (42%)	20/45 (44%)	53/82 (65%) $p_1=0,03$ $p_2=0,02$ $p_3=0,03$ $p_5=0,01$	27/ 59 (46%)
Twist	12/12 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	26/26 (100%)	5/5 (100%)
Rac1	26/26 (100%)	6/6 (100%)	15/15 (100%)	63/63 (100%)	20/20 (100%)
RhoA	4/56 (7%)	3/31 (9%)	5/51 (9%)	6/68 (9%)	3/43 (7%)
интегрин $\beta 1$	15/15 (100%)	6/6 (100%)	9/9 (100%)	27/27 (100%)	4/4 (100%)
интегрин $\beta 3$	11/11 (100%)	9/9 (100%)	12/12 (100%)	68/68(100 %)	64/64(100%)
β катенин	19/36 (53%)	24/43 (56%)	32/63 (51%)	54/82 (66%) $p_5=0,001$	29/66 (44%)
MMP2	4/63 (6%)	5/38 (14%)	7/63 (11%)	12/72 (17%) $p_1=0,02$	5/42 (12%)
MMP9	8/8 (100%)	12/12 (100%)	9/9 (100%)	33/33 (100%)	14/14 (100%)
СК14	1/3 (33%)	5/13 (38%)	4/9 (44%)	42/50 (84%) $p_1=0,01$ $p_2=0,001$ $p_3=0,005$ $p_5=0,02$	20/31 (65%) $p_2=0,05$

EGF	14/16 (88%)	13/15 (87%)	18/20 (90%)	51/58 (87%)	33/37 (89%)
EGFR	8/19 (42%)	4/10 (40%)	16/30 (53%)	41/66 (62%)	21/47 (45%)
FGFR1	6/35 (17%)	3/24 (12%)	7/38 (18%)	8/36 (22%)	7/25 (28%)
виментин	7/8 (88%)	7/8 (88%)	8/8 (100%)	21/22 (95%)	0/2 (0%)

В солидных структурах инфильтративного компонента чаще выявлялся фронт инвазии, обнаруживаемый по наличию участков локального отсутствия экспрессии Ki67, РЭ или РП (рисунок 1).



Рисунок 1 – Наличие фронта инвазии в разных структурах инфильтративного компонента инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы

Не обнаружены изменения экспрессии маркеров Snail, Twist, Rac1, CK14, которые можно было бы интерпретировать как наличие фронта инвазии в разных структурах опухолевой ткани. Усиление экспрессии в одном из сегментов структур RhoA, интегрин $\beta 1$ и FGFR1 наблюдалось в большинстве случаев во всех многоклеточных структурах (более 90%) (таблица 4).

Таблица 4 - Наличие усиления экспрессии маркеров, характеризующих инвазию, по фронту в разных структурах инфильтративного компонента опухоли

Маркер	Количество больных, абс.ч., %			
	Альвеолярные структуры	Тубулярные структуры	Трабекулярные структуры	Солидные структуры
	1	2	3	4
Snail	0/53 (0%)	0/24 (0%)	0/45 (0%)	2/53 (4%)
Twist	0/12 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/26 (0%)
Rac1	0/26 (0%)	0/6 (0%)	0/15 (0%)	0/63 (0%)
RhoA	55/55 (100%)	28/30 (93%)	45/48 (94%)	64/68 (94%)
интегрин $\beta 1$	13/14 (93%)	5/6 (83%)	9/9 (100%)	26/27 (96%)
интегрин $\beta 3$	1/11 (9%)	1/9 (11%)	1/12 (8%)	14/68(21%)

β катенин	2/7 (29%)	2/9 (22%)	7/26 (27%)	21/59 (36%)
MMP2	1/4 (25%)	1/4 (25%)	1/6 (17%)	0/42 (0%) p ₁ =0,001 p ₂ =0,001 p ₃ =0,004
MMP9	0/8 (0%)	1/9 (11%)	0/9 (0%)	3/33 (9%)
CK14	0/3 (0%)	0/13 (0%)	0/9 (0%)	1/35 (3%)
EGF	4/11 (36%)	3/10 (30%)	1/10 (10%)	12/45 (27%)
EGFR	1/1 (100%)	0/10 (0%)	0/30 (0%)	8/33 (24%) p ₂ =0,04 p ₃ =0,002
FGFR1	33/35 (94%)	23/23 (100%)	37/39 (95%)	32/35 (91%)
виментин	7/7 (100%)	3/6 (50%)	2/8 (25%)	8/20 (40%) p ₁ =0,005

Установлено, что экспрессия маркеров инвазивного роста связана с вариантом краудинга. Так, в солидных структурах инфильтративного компонента опухоли при краудинге по типу изолированного «скупивания» клеток по сравнению со случаями сочетания «скупивания» и «наслоения» чаще обнаруживалась позитивная экспрессия маркеров Twist и MMP9 (рисунок 2).

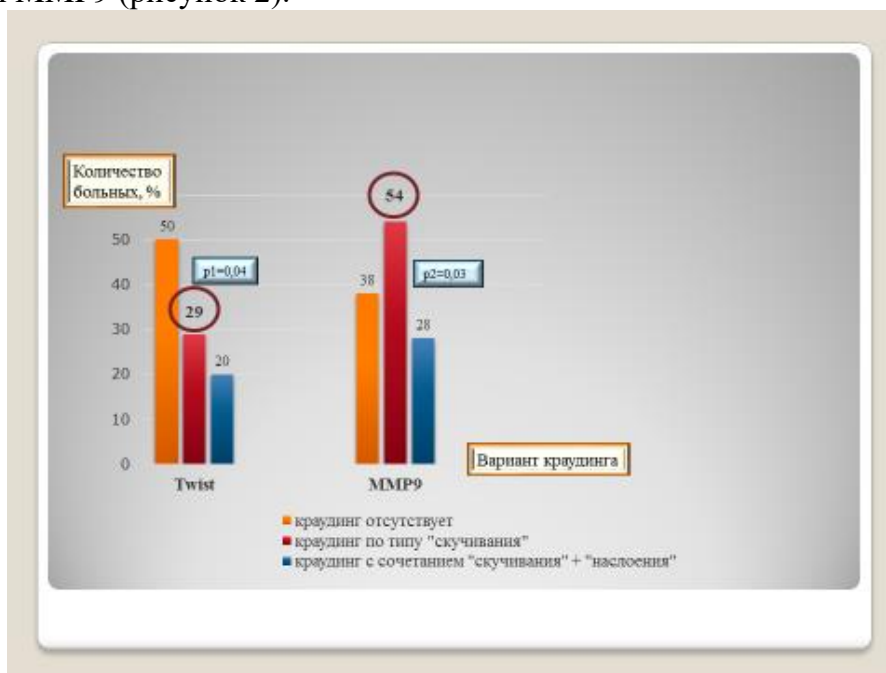


Рисунок 2 - Особенности экспрессии маркеров инвазии в зависимости от варианта краудинга в солидных структурах инфильтративного компонента инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы

В результате исследования также было обнаружено, что при краудинге по типу изолированного «скупивания» опухолевых клеток чаще, чем при сочетании «скупивания» и «наслоения» обнаруживается позитивная экспрессия FGFR1, EGF и EGFR в солидных структурах ткани новообразования (рисунок 3).

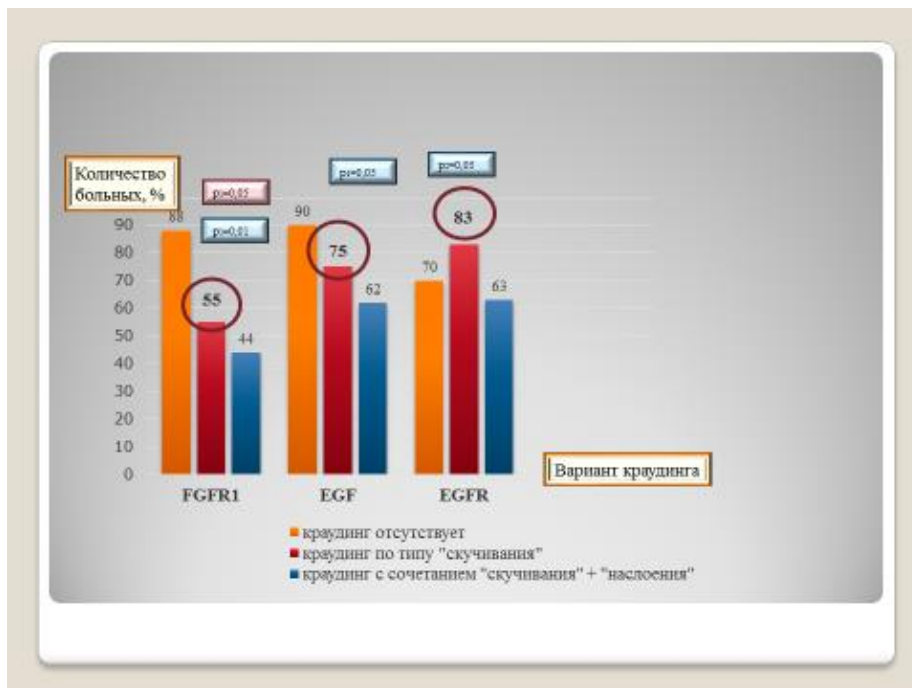


Рисунок 3 - Особенности экспрессии маркеров инвазии в зависимости от варианта краудинга в солидных структурах инфильтративного компонента инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы

Кроме того, при краудинге по типу изолированного «скупивания» опухолевых клеток по сравнению со случаями сочетания «скупивания» и «наслоения» чаще обнаруживалась позитивная экспрессия β катенина, MMP9 и виментина в альвеолярных структурах (рисунок 4).



Рисунок 4 - Особенности экспрессии маркеров инвазии в зависимости от варианта краудинга в альвеолярных структурах инфильтративного компонента инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы

Было обнаружено, что частота выявления краудинга связана с типом морфологических структур. Так, в тубулярных структурах опухоли краудинг наблюдался значимо реже (42%), чем в альвеолярных (72%; $p=0,0004$), трабекулярных (85%; $p=0,0000$) и солидных структурах (84%; $p=0,0000$).

Отмечено, что пролиферативная активность новообразования была выше при наличии краудинга во всех структурах инфильтративного компонента опухоли, чем при его отсутствии (рисунок 5).

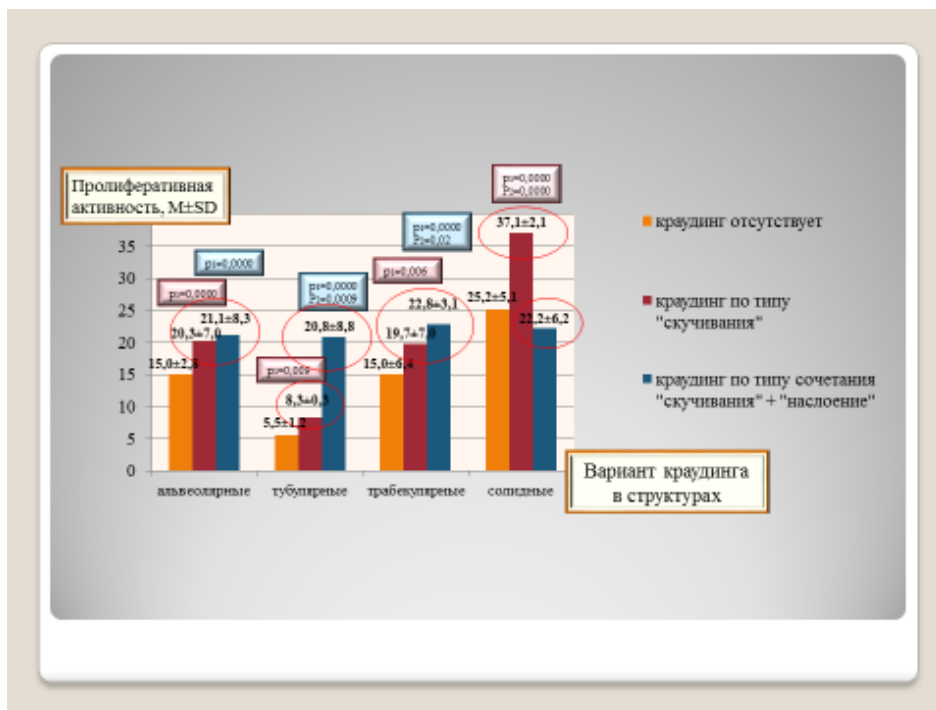


Рисунок 5 - Уровень пролиферативной активности в зависимости от варианта краудинга в разных структурах инфильтративного компонента инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы

Степень злокачественности опухоли оказалась связанной с экспрессией части маркеров, имеющих отношение к инвазии. В новообразованиях с высокой степенью злокачественности в дискретных группах опухолевых клеток отмечалось уменьшение частоты экспрессии Snail, CK14 и EGFR при одновременном увеличении частоты экспрессии интегринов $\beta 1$ и $\beta 3$ (таблица 5).

Таблица 5 - Экспрессия маркеров инвазивного роста в дискретных группах опухолевых клеток в зависимости от степени злокачественности

Маркер	Наличие экспрессии	Степень злокачественности (количество больных, абс.ч., %)		
		первая	вторая	третья
		1	2	3
Snail	нет	1/6 (17%)	10/57 (18%)	7/14 (50%)
	есть	5/6 (83%)	47/57 (82%)	7/14 (50%) $p_1=0,07$ $p_2=0,007$
интегрин $\beta 1$	нет	3/3 (100%)	18/20 (90%)	3/5 (40%)
	есть	0/3 (0%)	2/20 (10%)	2/5 (60%) $p_1=0,07$ $p_2=0,01$

интегрин $\beta 3$	нет	7/11 (64%)	20/71 (28%)	7/16 (44%)
	есть	4/11 (36%)	51/71 (72%) $p_1=0,01$	9/16 (56%) $p_1=0,04$
CK14	нет	2/9 (22%)	37/58 (64%)	7/10 (70%)
	есть	7/9 (78%)	21/58 (36%) $p_1=0,01$	3/10 (30%) $p_1=0,02$
EGFR	нет	4/7 (57%)	16/57 (28%)	6/9 (67%)
	есть	3/7 (43%)	41/57 (72%)	3/9 (33%) $p_2=0,01$

В новообразованиях с высокой степенью злокачественности в тубулярных и солидных структурах отмечалось увеличение частоты экспрессии интегрин $\beta 3$ и виментина (рисунок б).



Рисунок - 6 Экспрессия маркеров инвазивного роста в тубулярных и солидных структурах в зависимости от степени злокачественности

В трабекулярных структурах инфильтративного компонента новообразований с наиболее высокой степенью злокачественности регистрировалось увеличение частоты экспрессии FGFR1. По сравнению с первой степенью злокачественности (22%) позитивная экспрессия этого маркера чаще выявлялась при второй (58%; $p=0,02$) и третьей степенях (64%; $p=0,03$). В альвеолярных структурах опухоли была обнаружена несколько иная картина. В карциномах неспецифического типа молочной железы с высокой степенью злокачественности в альвеолярных структурах отмечалось уменьшение частоты экспрессии транскрипционного фактора Twist и MMP9 (таблица 6).

Таблица 6 - Экспрессия маркеров инвазивного роста в альвеолярных структурах в зависимости от степени злокачественности

Маркер	Наличие экспрессии	Степень злокачественности (количество больных, абс.ч., %)		
		первая	вторая	третья
		1	2	3
Twist	нет	4/5 (80%)	42/53 (79%)	10/10 (100%)
	есть	1/5 (20%)	11/53 (21%)	0/10 (0%) $p_2=0,05$
MMP9	нет	4/6 (67%)	37/41 (90%)	8/10 (80%)
	есть	2/6 (33%)	4/41 (10%) $p_1=0,05$	2/10 (20%)

Особенности экспрессии маркеров инвазии в зависимости от клинических параметров пациенток с инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы

Исследование особенностей экспрессии маркеров инвазии в зависимости от клинических параметров позволило выявить следующие закономерности. Так, у пациенток в состоянии менопаузы наблюдалось уменьшение процента опухолевых клеток с позитивной экспрессией интегрин $\beta 3$ (таблица 7).

Таблица 7 - Процент экспрессии интегрин $\beta 3$ в разных структурах инфильтративного компонента опухоли в зависимости от состояния менструальной функции

Локализация экспрессии	Процент экспрессии интегрин $\beta 3$, $M \pm S.D.$	
	Менструальная функция сохранена	Менопауза
	1	2
Альвеолярные	40,6 \pm 13,7 (n=3)	3,5 \pm 1,1 (n=8) $p_1=0,0000$
Тубулярные	3,2 \pm 0,8 (n=4)	11,0 \pm 1,4 (n=5) $p_1=0,0000$
Трабекулярные	46,5 \pm 14,3 (n=2)	21,8 \pm 12,2 (n=10) $p_1=0,01$
Солидные	27,3 \pm 13,3 (n=15)	19,3 \pm 5,0 (n=53) $p_1=0,0003$
Группы клеток	14,4 \pm 9,2 (n=15)	6,6 \pm 1,5 (n=49) $p_1=0,0000$

Кроме того, обнаружено, что процент клеток с позитивной экспрессией интегрин $\beta 3$ в альвеолярных структурах был выше в возрастной группе от 35 до 50 лет по сравнению со случаями, когда возраст пациенток превышал 50 лет (40,6 \pm 13,7 и 3,5 \pm 1,1 соответственно; $p=0,0000$).

Особенности лимфогенного метастазирования в зависимости от морфологического строения и экспрессии маркеров инвазии при инвазивной карциноме неспецифического типа молочной железы

Проведенное исследование позволило выявить некоторые особенности лимфогенного метастазирования, ассоциированные с морфологическим строением инфильтративного компонента и экспрессионными параметрами опухоли.

Обнаружено, что наличие лимфогенных метастазов у больных с инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы ассоциировано со снижением частоты экспрессии Snail и интегрин $\beta 1$ в солидных структурах (рисунок 7).

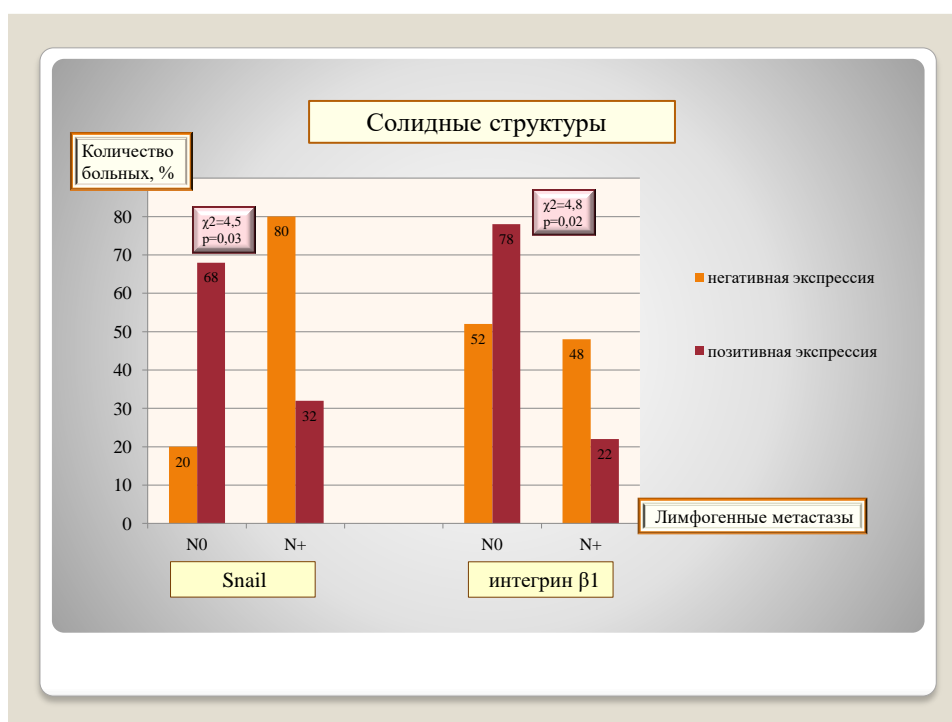


Рисунок 7 - Наличие лимфогенных метастазов в зависимости от наличия экспрессии Snail и интегрин $\beta 1$ в солидных структурах инфильтративного компонента опухоли

Выявлено, что наличие лимфогенных метастазов у больных с инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы также ассоциировано со снижением частоты экспрессии интегрин $\beta 1$ и увеличением экспрессии MMP2 в альвеолярных структурах инфильтративного компонента опухоли (рисунок 8).



Рисунок 8 - Наличие лимфогенных метастазов в зависимости от наличия экспрессии интегрин β1 и MMP2 в альвеолярных структурах инфильтративного компонента опухоли

В дискретных группах опухолевых клеток наличие лимфогенных метастазов было ассоциировано с увеличением частоты экспрессии интегрин β3, EGF и β катенина (рисунок 9).



Рисунок 9 - Наличие лимфогенных метастазов в зависимости от наличия экспрессии интегрин β3, EGF и β катенина в дискретных группах опухолевых клеток

При наличии позитивной экспрессии β катенина в альвеолярных структурах количество пораженных метастазами лимфоузлов было меньше, чем в случаях с негативной экспрессией этого маркера в указанном типе структур инфильтративного компонента новообразования ($1,6 \pm 1,0$ и $3,3 \pm 2,2$ соответственно; $F=5,4$ $p=0,02$).

Наличие в опухолевых структурах признаков краудинга, особенно по типу изолированного «скупивания» клеток, было связано с увеличением количества лимфатических узлов с метастатическим поражением (таблица 8, 9).

Таблица 8 - Количество лимфоузлов с метастазами в зависимости от наличия краудинга в разных структурах инфильтративного компонента опухоли

Тип структур		Количество лимфоузлов с метастазами (M±SD)	
		Краудинг отсутствует	Краудинг присутствует
		а	б
Альвеолярные	1	2,3±1,2 (n=12)	3,0±1,1 (n=20) $p_a=0,05$
Тубулярные	2	2,6±0,8 (n=10)	2,0±0,3 (n=10)
Трабекулярные	3	2,4±1,2 (n=7)	3,4±0,9 (n=28) $p_a=0,009$
Солидные	4	3,3±1,4 (n=3)	3,2±0,8 (n=28)

Таблица 9 - Количество лимфоузлов с метастазами в зависимости от типа краудинга в разных структурах инфильтративного компонента опухоли

Тип структур		Количество лимфоузлов с метастазами (M±SD)	
		Краудинг по типу «скупивания»	Краудинг по типу сочетания «скупивания» и «наслоения»
		а	б
Альвеолярные	1	3,0±1,3 (n=10)	3,1±1,9 (n=10)
Тубулярные	2	2,0±0,2 (n=10)	2,0±0,3 (n=6)
Трабекулярные	3	4,1±1,4 (n=13) $p_6=0,003$	2,8±0,8 (n=14)
Солидные	4	4,0±1,1 (n=15) $p_6=0,0000$	2,3±0,2 (n=12)

При наличии ретракционной щели вокруг альвеолярных структур инфильтративного компонента инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы лимфогенные метастазы регистрировались чаще (49%), чем при отсутствии данного морфологического признака (23%; $\chi^2=4,4$ $p=0,03$). Аналогичного рода взаимосвязь была выявлена относительно тубулярных структур (54% и 22% соответственно; $\chi^2=5,6$ $p=0,01$).

С учетом полученных данных морфологического исследования и экспрессионных характеристик ткани новообразований для больных с инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы была построена математическая модель для прогнозирования вероятности риска наличия лимфогенного метастазирования.

В качестве независимых признаков в модель вошли такие параметры как вариант краудинга в опухоли, наличие экспрессии Snail в дискретных группах опухолевых клеток, наличие экспрессии интегрин $\beta 3$ в дискретных группах опухолевых клеток, наличие экспрессии интегрин $\beta 1$ в дискретных группах опухолевых клеток, наличие фронта инвазии в опухолевых структурах, определяемого по наличию участков локального отсутствия экспрессии РЭ, РП или Ki67 по периферии структур, наличие экспрессии РП в опухоли. Расчет степени риска наличия лимфогенного метастазирования следует проводить по формуле:

$$Y = -21 - 25 \cdot X_1 + 6,4 \cdot X_2 + 6,5 \cdot X_3 + 7,3 \cdot X_4 - 34,0 \cdot X_5 + 42,4 \cdot X_6,$$

где Y – значение уравнения регрессии; -21 – значение коэффициента регрессии свободного члена; X_1 – вариант краудинга в опухоли (1 – «скупивание», 2 – «скупивание и наслаивание»), -25 – значение коэффициента регрессии этого признака; X_2 – наличие экспрессии Snail в дискретных группах опухолевых клеток (1 – нет, 2 – есть), $6,4$ – значение коэффициента регрессии этого признака; X_3 – наличие экспрессии интегрин β_3 в дискретных группах опухолевых клеток (1 – нет, 2 – есть), $6,5$ – значение коэффициента регрессии этого признака, X_4 – наличие экспрессии интегрин β_1 в дискретных группах опухолевых клеток (1 – нет, 2 – есть), $7,3$ – значение коэффициента регрессии этого признака, X_5 – наличие фронта в опухоли, определяемого по наличию участков локального отсутствия экспрессии РЭ, РП или Ki67 по периферии структур (1 – нет, 2 – есть), $-34,0$ – значение коэффициента регрессии этого признака, X_6 – наличие экспрессии РП в опухоли (1 – нет, 2 – есть), $42,4$ – значение коэффициента регрессии этого признака.

Вероятность риска наличия лимфогенных метастазов определяется по формуле: $P = e^Y / (1 + e^Y)$,

где P – значение вероятности развития признака; Y – значение уравнения регрессии; e – математическая константа, равная $2,72$.

При вероятности $P \geq 50\%$ определяется высокий риск наличия лимфогенных метастазов, при вероятности $P < 50\%$ – низкий риск наличия лимфогенных метастазов. Степень достоверности $\chi^2 = 17,6$; $p = 0,007$. Чувствительность модели составляет 100% , специфичность – 100% .

Заключение

Резюмируя полученные результаты исследования можно сделать заключение, что экспрессия изучаемых маркеров в опухолевых элементах инвазивного рака молочной железы неспецифического типа характеризуется межопухолевой и внутриопухолевой гетерогенностью. Наиболее ярко межопухолевая гетерогенность проявляется наличием заметного процента случаев с отсутствием экспрессии каждого из изучаемых маркеров. Внутриопухолевая гетерогенность характеризовалась различиями в экспрессии изучаемых маркеров в разных структурах инвазивного компонента, гетерогенностью экспрессии в пределах каждой многоклеточной структуры, а также наличием фронта инвазии в них, определяемого по экспрессии некоторых маркеров.

Изучение характера экспрессии *in vivo* показало, что диагностировать наличие и вариант коллективной или индивидуальной инвазии невозможно по любой одной из исследованных молекул, имеющих отношение к инвазивному росту. Судить об этих процессах возможно только при оценке нескольких исследуемых показателей. Совокупность результатов показывает, что в солидных структурах скорее, чем в других многоклеточных структурах, имеют место признаки коллективной инвазии мезенхимального типа. Одиночные клетки или дискретные группы опухолевых клеток характеризуются выраженной функциональной гетерогенностью. Значительная часть из них экспрессирует маркеры, связанные с мезенхимальным механизмом инвазии, и значит, имеют потенциал к нему. Другая, меньшая часть клеток, не экспрессирует многие маркеры мезенхимальной инвазии, и, по-видимому, либо имеет потенциал к индивидуальному амёбoidalному типу инвазии, либо временно или постоянно эти клетки лишены инвазивных свойств. Предложенные морфологические критерии оценки краудинга позволили обнаружить разный характер связи его «ранних» и «поздних» проявлений с экспрессией изучаемых маркеров, пролиферативной активностью опухолевых клеток, наличием инвазивного фронта и лимфогенным метастазированием. Экспрессия маркеров, имеющих отношение к инвазии, оказалось ассоциирована с возрастом и состоянием менструальной функции. Не обнаружено существенных связей между инвазивными свойствами опухоли и ее молекулярно-генетическими подтипами. Как частота лимфогенного метастазирования, так и количество пораженных

лимфатических узлов сопряжено с экспрессией некоторых маркеров ЭМП в солидных и альвеолярных структурах. На основании оценки наличия инвазивного фронта, краудинга в многоклеточных структурах и экспрессионных параметров дискретных групп опухолевых клеток построена математическая модель, позволяющая прогнозировать вероятность риска наличия лимфогенных метастазов.

ВЫВОДЫ

1. Экспрессия маркеров инвазии при раке молочной железы ассоциирована с морфологической гетерогенностью опухоли. Экспрессия транскрипционного фактора Twist и интегрин $\beta 1$ чаще регистрируется в альвеолярных и солидных структурах. В солидных структурах чаще, чем в других структурах экспрессируются маркеры коллективной инвазии мезенхимального типа Rac1, интегрин $\beta 3$, MMP9, CK14, EGF, EGFR, виментин. В альвеолярных и трабекулярных структурах минимальна частота выявления экспрессии виментина. В дискретных группах опухолевых клеток реже экспрессируется интегрин $\beta 1$, и наоборот, экспрессия интегрин $\beta 3$ регистрируется чаще.

2. Экспрессия маркеров инвазивного роста при раке молочной железы имеет гетерогенный или гомогенный характер. Экспрессия Twist, Rac1, интегрин $\beta 1$, интегрин $\beta 3$ и MMP9 гетерогенна во всех случаях независимо от типа структур, в то время как для RhoA свойственен гомогенный тип экспрессии. Гетерогенная экспрессия β катенина, MMP2, EGF обнаруживается в меньшей части случаев. Чаще гетерогенный тип экспрессии Snail, β катенина, MMP2 и CK14 выявляется в солидных структурах.

3. В солидных структурах инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы чаще выявляется фронт инвазии, обнаруживаемый по отсутствию экспрессии Ki67, РЭ или РП. Не обнаружены изменения экспрессии Snail, Twist, Rac1, CK14, которые можно было бы интерпретировать как наличие фронта инвазии в разных структурах опухолевой ткани. Усиление экспрессии в одном из участков структур RhoA, интегрин $\beta 1$ и FGFR1 наблюдается в большинстве случаев во всех многоклеточных структурах (более 90%).

4. Экспрессия маркеров инвазивного роста при раке молочной железы связана с вариантом краудинга. При изолированном «скучивании» клеток по сравнению со случаями с сочетанием «скучивания» и «наслоения», чаще обнаруживается позитивная экспрессия Twist, MMP9, FGFR1, EGF и EGFR в солидных структурах, позитивная экспрессия β катенина, MMP9 и виментина - в альвеолярных структурах. Изолированное «скучивание» опухолевых клеток реже наблюдается при наличии инвазивного фронта в солидных структурах, регистрируемого по экспрессии интегрин $\beta 3$ и β катенина. Частота выявления краудинга зависит от типа морфологических структур – реже он наблюдается в тубулярных структурах. Проллиферативная активность выше при наличии краудинга во всех структурах по сравнению с его отсутствием.

5. Степень злокачественности опухоли при инвазивной карциноме неспецифического типа молочной железы связана с экспрессией части маркеров, имеющих отношение к инвазии. В дискретных группах опухолевых клеток в новообразованиях с высокой степенью злокачественности отмечается уменьшение частоты экспрессии Snail, CK14 и EGFR при увеличении частоты экспрессии $\beta 1$ и $\beta 3$ интегрин; в тубулярных и солидных структурах увеличивается частота экспрессии интегрин $\beta 3$ и виментина, в трабекулярных – FGFR1; в альвеолярных наблюдается уменьшение частоты экспрессии Twist и MMP9. У пациенток в состоянии менопаузы, а также в возрасте старше 50 лет наблюдается уменьшение процента опухолевых клеток, экспрессирующих интегрин $\beta 3$.

6. Наличие лимфогенных метастазов при раке молочной железы ассоциировано со снижением частоты экспрессии Snail, интегрин $\beta 1$ в солидных структурах, снижением частоты экспрессии интегрин $\beta 1$ и увеличением экспрессии MMP2 в альвеолярных

структурах, увеличением частоты экспрессии интегрин $\beta 3$, EGF, β катенина в дискретных группах клеток. Количество лимфатических узлов с метастазами больше при негативной экспрессии β катенина в альвеолярных структурах. Наличие в опухолевых структурах признаков краудинга, особенно изолированного «скупивания» клеток, связано с увеличением количества пораженных лимфатических узлов. Лимфогенные метастазы развиваются чаще при наличии ретракционной щели вокруг альвеолярных и тубулярных структур.

7. Разработана математическая модель для прогнозирования вероятности риска наличия лимфогенного метастазирования у больных с инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы, включающая морфологические (вариант краудинга в опухоли, наличие фронта инвазии в опухолевых структурах) и молекулярные (наличие экспрессии РП в опухоли, наличие экспрессии Snail, интегрин $\beta 1$ и интегрин $\beta 3$ в дискретных группах опухолевых клеток) параметры. Степень достоверности $\chi^2 = 17,6$; $p = 0,007$. Чувствительность - 100%, специфичность - 100%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При гистологическом исследовании биопсийного материала у больных с инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы следует учитывать внутриопухолевую морфологическую гетерогенность. Особое внимание необходимо уделять определению и оценке краудинга в разных структурах инфильтративного компонента новообразования, а также выявлению феномена ретракции. Выполнение иммуногистохимического исследования с использованием маркеров инвазивного клеточного роста (Snail, интегринов $\beta 1$ и $\beta 3$) следует проводить в разных структурах инфильтративного компонента опухоли. При изучении экспрессии Ki67, рецепторов к эстрогенам и прогестерону важно обращать внимание на наличие участков локального отсутствия экспрессии перечисленных маркеров по фронту в разных структурах паренхиматозного компонента опухоли молочной железы.

Обнаруженные морфологические и экспрессионные особенности опухоли, ассоциированные с инвазивными свойствами при раке молочной железы, а также сопряженные с ними параметры лимфогенной диссеминации процесса позволяют оценить риск наличия лимфогенного метастазирования.

Прогнозирование вероятности риска наличия лимфогенного метастазирования у больных с инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы с отсутствием неоадьювантной терапии рекомендуется выполнять по формуле:

$$Y = -21 - 25 \cdot X_1 + 6,4 \cdot X_2 + 6,5 \cdot X_3 + 7,3 \cdot X_4 - 34,0 \cdot X_5 + 42,4 \cdot X_6,$$

где Y – значение уравнения регрессии; -21 – значение коэффициента регрессии свободного члена; X_1 – вариант краудинга в опухоли (1 – «скупивание», 2 – «скупивание и наложение»), -25 – значение коэффициента регрессии этого признака; X_2 – наличие экспрессии Snail в дискретных группах опухолевых клеток (1 – нет, 2 – есть), $6,4$ – значение коэффициента регрессии этого признака; X_3 – наличие экспрессии интегрин $\beta 3$ в дискретных группах опухолевых клеток (1 – нет, 2 – есть), $6,5$ – значение коэффициента регрессии этого признака, X_4 – наличие экспрессии интегрин $\beta 1$ в дискретных группах опухолевых клеток (1 – нет, 2 – есть), $7,3$ – значение коэффициента регрессии этого признака, X_5 – наличие фронта в опухоли, оцениваемого по исчезновению экспрессии РЭ, РП или Ki67 по периферии структур (1 – нет, 2 – есть), $-34,0$ – значение коэффициента регрессии этого признака, X_6 – наличие экспрессии РП в опухоли (1 – нет, 2 – есть), $42,4$ – значение коэффициента регрессии этого признака. Вероятность риска наличия лимфогенных метастазов определяется по формуле $P = e^Y / (1 + e^Y)$, где P – значение вероятности развития признака; Y – значение уравнения регрессии; e – математическая константа, равная 2,72. При вероятности $P \geq 50\%$ определяется высокий риск наличия лимфогенных метастазов, при вероятности $P < 50\%$ – низкий риск

наличия лимфогенных метастазов. Степень достоверности $\chi^2 = 17,6$; $p = 0,007$. Чувствительность модели составляет 100%, специфичность - 100%.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Крахмаль Н.В. Морфологические проявления инвазии при люминальном А типе рака молочной железы [Текст] / Н.В. Крахмаль, К.Ю. Христенко, Е.А. Фесик, Н.С. Телегина, С.В. Вторушин, Е.В. Денисов, О.Ю. Васильева // Сибирский онкологический журнал. – 2014. – Т. 1(61). – Приложение 1. Материалы конференции. – С. 71.
2. Крахмаль Н.В. Современные представления о билатеральном раке молочной железы [Текст] / Е.А. Фесик, М.В. Завьялова, В.М. Перельмутер, Е.М. Слонимская, С.В. Вторушин, Н.В. Крахмаль // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – Т. 13, № 5. – С. 160–168.
3. Крахмаль Н.В. Особенности лимфогенного метастазирования при билатеральном раке молочных желез [Текст] / Е.А. Фесик, Н.В. Крахмаль, М.В. Завьялова, Е.М. Слонимская, С.В. Вторушин, В.М. Перельмутер // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – Т. 13, № 6. – С. 20–26.
4. Крахмаль Н.В. Особенности рецепторного статуса опухоли при синхронном и метасинхронном билатеральном раке молочных желез [Текст] / Е.А. Фесик, Н.В. Крахмаль, Н.С. Телегина, М.В. Завьялова, С.В. Вторушин, В.М. Перельмутер, Е.М. Слонимская // Уральский медицинский журнал. – 2014. – № 08 (122). – С. 40–42.
5. Крахмаль Н.В. Особенности пролиферативной активности в ткани новообразования в зависимости от морфологических проявлений инвазии при раке молочной железы [Текст] / К.Ю. Христенко, Н.В. Крахмаль // Сибирский онкологический журнал. – 2015. – Т.1 – Приложение 1. Материалы конференции. – С. 51.
6. Krakhmal N. CD68 expression in inflammatory cell infiltration of nonspecific invasive breast cancer (тезисы на английском языке) [Текст] / Krakhmal N., Zavyalova M., Buldakov M., Telegina N., Vtorushin S., Cherdyntseva N., Kzhyshkowska J. // Abstracts of the EMBO WORKSHOP «Cellular and molecular mechanism of tumour microenvironment crosstalk» (9-12 July 2015). – Tomsk, Russia. – 2015. – Vol. 13(1). - P. 70.
7. Krakhmal N. Intratumor morphological heterogeneity in breast cancer and distant metastasis: Expression analysis of genes involved in cell motility and pre-metastatic niche formation (тезисы на английском языке) [Текст] / Krakhmal N., Denisov E., Gerashchenko T., Pautova D., Zavyalova M., Litviakov N., Slonimskaya E., Cherdyntseva N., Perelmutter V. // Abstracts of the EMBO WORKSHOP «Cellular and molecular mechanism of tumour microenvironment crosstalk» (9-12 July 2015). – Tomsk, Russia. – 2015. – Vol. 13(1). - P. 13.
8. Krakhmal N.V. CD68+, but not stabilin-1+ associated macrophages in ductal tumor structures negatively correlate with the lymphatic metastasis in human breast cancer (статья на английском языке) [Текст] / Krakhmal N., Buldakov M., Zavyalova M., Telegina N., Vtorushin S., Mitrofanova I., Riabov V., Yin S., Song B., Cherdyntseva N., Kzhyshkowska J. // Immunobiology. 2015.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2015.09.011>.
9. Крахмаль Н.В. Инвазия опухолевых эпителиальных клеток: механизмы и проявления [Текст] / Н.В. Крахмаль, М.В. Завьялова, Е.В. Денисов, В.М. Перельмутер, С.В. Вторушин // Acta Naturae. – 2015. – Т. 7, № 52(25). – С. 18–31.

10. Крахмаль Н.В. Клинико-морфологическая характеристика билатерального рака молочных желез [Текст] / Е.А. Фесик, Н.В. Крахмаль, М.В. Завьялова, Е.М. Слонимская, С.В. Вторушин, В.М. Перельмутер, Л.Н. Бондарь, О.Е. Савельева // Сибирский онкологический журнал. – 2015. – № 6. – С. 26-32.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

абс. ч. – абсолютное число

ИКНТ – инвазивная карцинома неспецифического типа

РМЖ – рак молочной железы

РП – рецепторы прогестерона

РЭ – рецепторы эстрогенов

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

СК14 (Cytokeratin 14) – цитокератин 14

EGF (epidermal growth factor) – эпидермальный фактор роста

EGFR (epidermal growth factor receptor) - рецептор эпидермального фактора роста 1

FGFR1 (growth factor fibroblast receptor 1) - рецептор фактора роста фибробластов 1

ММР – матриксная металлопротеиназа

Vimentin - виментин

F – критерий Фишера

M – среднее значение показателя

S.D. – стандартное отклонение

p – критерий значимости различий