

Туманова У.Н.^{1,2}, Щеголев А.И.^{1,3}

Сравнительная характеристика васкуляризации гепатоцеллюлярного рака и очаговой узловой гиперплазии печени

1 - ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова» Минздрава России, г. Москва; 2 - ФГБУ «Институт хирургии им. А.В.Вишневского» Минздрава России, г. Москва; 3 - ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова» Минздрава России, г. Москва

Tumanova U.N., Shchegolev A.I.

Comparative characteristics of vascularization hepatocellular carcinoma and focal nodular hyperplasia of the liver

Резюме

Проведен сравнительный анализ степени васкуляризации ткани гепатоцеллюлярного рака (ГЦР) и очаговой узловой гиперплазии печени. На иммуногистохимических препаратах (с антителами CD34 и CD105) морфометрическими методами определяли количество и общую площадь сечения синусоидов, а также рассчитывали показатель васкуляризации ткани. Установлено большее количество сосудов и площади их сечения в более крупных ОУГ. Повышение степени злокачественности ГЦР сопровождается изменениями ее васкуляризации. Морфологические показатели васкуляризации рекомендуется использовать в качестве дополнительных критериев для дифференциальной диагностики и определения прогноза заболевания.

Ключевые слова: васкуляризация, гепатоцеллюлярный рак, очаговая узловая гиперплазия, печень

Summary

We made a comparative analysis of the degree of vascularization of tissues of hepatocellular carcinoma (HCC) and focal nodular hyperplasia of the liver. On immunohistochemical specimens (with antibodies CD34 and CD105) were determined the number and the total area of the section of the sinusoids and was calculated index of tissue vascularization by morphometric methods. It was established greater number of vessels and the area of their section is in the larger FNH. Increasing the degree of malignancy of HCC accompanied by changes in its vascularization. Morphological indices of vascularization is recommended to use as additional criteria for differential diagnosis and prognosis of the disease.

Key words: vascularity, hepatocellular carcinoma, focal nodular hyperplasia, liver

Введение

Развитие и прогрессирование новообразований печени во многом обусловлено процессами кровоснабжения и ангиогенеза. Существенными компонентами гепатоканцерогенеза являются капилляризация синусоидов и артериализация ткани, способствующие росту опухолевой ткани и развитию метастазов [1]. Кроме того, в литературе имеются указания на возможность использования морфологических показателей ангиогенеза (степени васкуляризации) для дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей печени [2]. В этой связи актуальной задачей является выяснение механизмов опухолевого ангиогенеза и разработка таргетных антиангиогенных препаратов [3].

Цель работы: сравнительный анализ степени васкуляризации ткани гепатоцеллюлярного рака (ГЦР) и очаговой узловой гиперплазии (ОУГ) печени.

Материалы и методы

В основу работы положен анализ операционного материала 34 больных в возрасте 14-72 лет, оперированных в Институте хирургии им. А.В.Вишневского по поводу гепатоцеллюлярного рака (19 пациентов) и очаговой узловой гиперплазии (15 пациентов) печени.

Полученный после резекции операционный материал подвергали комплексному макро- и микроскопическому исследованию. Гистологическое исследование проводили на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Определение степени гистологической дифференцировки ГЦР проводили согласно рекомендациям ВОЗ по Международной гистологической классификации опухолей печени [4]. У 6 пациентов был диагностирован высокодифференцированный (ВД), у 10 – умереннодифференцированный (УД) и у 3 – низкодифференцированный (НД) вариант ГЦР. Все наблюдения ОУГ

были разделены на две группы в зависимости от размеров образования: малые – диаметром до 5 см (7 больших) и средние – диаметром 5-10 см (8 пациентов).

Морфологическое исследование кровеносных сосудов в ткани новообразований проводили на гистологических препаратах путем иммуногистохимического исследования с использованием готовых к употреблению моноклональных мышиных антител к CD34 (клон QBEnd/10) и кроличьих поликлональных антител к CD105 и полимерной системы детекции производства Spring Bioscience. В качестве фонового красителя использовали гематоксилин.

Морфометрический анализ препаратов проводили при помощи системы анализа изображения на базе микроскопа «Axio Imager M1» с использованием программы AxioVision (Carl Zeiss). При большом увеличении микроскопа определяли количество (N) и общую площадь просвета (S) синусоидных сосудов в поле зрения, на основании которых рассчитывали показатель васкуляризации ткани (V), отражающий удельную площадь сечения сосудов.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного пакета «Statistica 8.0». Рассчитывали среднее значение (M), стандартное отклонение (SD), ошибку среднего (m), значимость различий (p).

Результаты и обсуждение

В результате сравнительного иммуногистохимического изучения препаратов ткани новообразований нами установлен различный уровень экспрессии CD34 и CD105 в кровеносных сосудах. При этом положительная реакция данных маркеров наблюдалась лишь в синусоидах периферических отделов узелков вблизи центрального рубца и отходящих от него фиброзных лучей, что согласуется с данными литературы [5]. При этом CD105 определялся в меньшем числе синусоидов и характеризовался более низкой интенсивностью реакции по сравнению с CD34, то есть последний маркер способствует

лучшей визуализации кровеносных сосудов.

При морфометрическом анализе иммуногистохимических препаратов установлено, что количество синусоидов с положительной экспрессией CD34 в малых ОУГ на 5,1%, меньше (p>0,05), чем в узлах диаметром 5-10 см, а суммарная площадь их просвета меньше на 7,2% (p>0,05) (табл. 1).

Наряду с этим, показатели количества и общей площади синусоидов, экспрессирующих CD105, в ОУГ размером 5-10 существенно превышают соответствующие значения в ткани малых новообразований (на 66,7% и 41,0% соответственно, p<0,05). То есть, выявленные иммуногистохимическими методами показатели васкуляризации ОУГ повышаются по мере увеличения ее в размерах.

Выраженность иммуногистохимических реакций в ткани ГЦР зависела от степени его гистологической дифференцировки. Максимальное количество синусоидных сосудов, экспрессирующих CD34, наблюдалось в наблюдениях высокодифференцированного ГЦР и превышало соответствующие значения в ткани умеренно- и низкодифференцированного ГЦР на 27,1% и 62,7% (p<0,05) (табл. 2). При этом общая площадь сечения кровеносных сосудов на препаратах высокодифференцированного ГЦР больше показателей умеренно- и низкодифференцированного рака на 11,1% (p>0,05) и 29,6% (p<0,05) соответственно.

На препаратах, окрашенных CD105, максимальное количество синусоидов отмечалось также в ткани высокодифференцированного ГЦР. В то же время наибольшие значения показателя васкуляризации выявлены в наблюдениях умереннодифференцированного рака, превышающие соответствующие показатели высоко- и низкодифференцированного ГЦР на 1,7% и 189,1% (p<0,05).

Следовательно, морфометрические показатели степени васкуляризации изученных новообразований зависят от иммуногистохимического маркера. Антитела CD34, наиболее часто используемые для оценки ангиогенеза в ткани новообразований, относятся к панэпителли-

Таблица 1. Морфометрическая характеристика ткани ОУГ разного размера (M±m)

Маркер		N	S (мм ²)	V (%)
CD34	M	29,6±3,1	2971,8±191,6	8,4±0,6
	C	31,2±2,5	3201,1±217,3	9,1±0,7
CD105	M	12,9±1,2	888,8±97,3	2,5±0,2
	C	21,5±2,1	1253,5±168,9	3,6±0,2

Примечания: M – малые (диаметром до 5 см), C – средние (диаметром 5-10 см).

Таблица 2. Морфометрические характеристика ткани ГЦР разной степени дифференцировки (M±m)

Маркер		N	S (мм ²)	V (%)
CD34	ВД	24,4±1,9	4232,4±330,5	12,0±0,9
	УД	19,2±1,7	3811,2±310,5	10,8±0,7
	НД	15,0±1,2	3264,5±279,7	9,3±0,6
CD105	ВД	16,8±1,3	2320,1±192,3	6,6±0,5
	УД	15±1,3	2359,8±198,7	6,7±0,5
	НД	9,0±0,9	816,3±68,5	2,3±0,2

Примечания: ВД – высокодифференцированный, УД - умереннодифференцированный, НД – низкодифференцированный.

альным маркерам, поскольку реагируют с большинством эндотелиальных клеток. Наилучшая выявляемость сосудов отмечается при изучении препаратов злокачественных опухолей [6]. Видимо, поэтому подсчет количества и определение суммарной площади микрососудов на иммуногистохимических препаратах проводят методом «горячей точки», то есть в местах максимального числа окрашенных сосудов.

Антитела CD105 (эндоглин) экспрессируются в активированных эндотелиальных клетках, окрашивая тем самым только новообразованные сосуды. Так, плотность микрососудов на препаратах гепатоцеллюлярного рака с реакцией на CD105 была в 2,5 раза меньше по сравнению с таковой при окраске CD34 [7].

Нами также установлено большее количество CD105 положительных сосудов в ткани высокодифференцированного ГЦР и минимальное их количество на препаратах низкодифференцированного рака, что, видимо, отражает выраженность процессов неоангиогенеза в процессе опухолевой прогрессии. То есть выраженный ангиогенез характерен для ранних стадий развития опухоли, а в дальнейшем он снижается. Вследствие этого в новообразованиях ГЦР на более поздних стадиях развития отмечаются меньшие значения внутриопухолевой плотности микрососудов [8].

Более того, высокие значения плотности микрососудов сочетались с ранним развитием рецидивов после резекции ГЦР [9]. В двух независимых исследованиях больных, перенесших резекцию печени по поводу ГЦР размером не более 5 см, было установлено, что большие значения плотности CD34 положительных сосудов ассоциируются с меньшим периодом безрецидивного течения [10]. Трехлетняя выживаемость больных с ГЦР размером менее 5 см также зависела от степени васкуляризации [11].

Следует также добавить, что вышеуказанные изменения степени васкуляризации опухолей печени существенным образом определяют их компьютерно-томографическую семиотику. Так, повышение плотности узла ГЦР при компьютерной томографии с использованием контрастного вещества коррелирует с количеством микрососудов в его ткани, определяемым на иммуно-

стохимических препаратах [12, 13]. При этом изменения степени васкуляризации в процессе опухолевой прогрессии ГЦР сопровождаются изменениями и компьютерно-томографическими характеристиками [14, 15]. Аналогичные взаимосвязи морфологических данных и компьютерно-томографических картин наблюдались нами при изучении ОУГ [16].

Заключение

Таким образом, изменения васкуляризации играют важную роль в развитии и прогрессировании опухолей печени. И наоборот, степень васкуляризации является показателем состояния и степени развития опухолевого узла той или иной нозологии при СКТ- и морфологическом исследовании. Морфологическими показателями выраженности процессов ангиогенеза являются количество и удельная площадь сечения синусоидных сосудов, выявляемых иммуногистохимическими методами. Степень васкуляризации может явиться дополнительным диагностическим критерием опухолевых поражений печени, а также фактором прогноза заболевания и назначения дополнительных лечебных мероприятий. ■

Туманова У.Н., младший научный сотрудник отдела лучевых методов диагностики и лечения ФГБУ «Институт хирургии имени А.В.Вишневского» Минздрава России; младший научный сотрудник ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова» Минздрава России, г. Москва; Щегалев А.И., д.м.н., профессор, заведующий 2-м патологоанатомическим отделением ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова» Минздрава России; профессор кафедры патологической анатомии и клинической патологической анатомии лечебного факультета ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова» Минздрава России, г. Москва; Автор, ответственный за переписку - Туманова Ульяна Николаевна, 117997, г. Москва, ул. Большая Серпуховская, д. 27. Институт хирургии имени А.В.Вишневского, отдел лучевых методов диагностики и лечения, Тел. 8-(495)-237-37-62, E-mail: u.n.tumanova@gmail.com

Литература:

1. Yang Z.F., Poon R.T. Vascular changes in hepatocellular carcinoma. *Anat Rec.* 2008; 291 (6): 721-734.
2. Tótrai P., Somorbecz A., Batmunkh E., et al. Agrin and CD34 Immunohisto-chemistry for the Discrimination of Benign Versus Malignant Hepatocellular Lesions. *Am J Surg Pathol.* 2009; 33 (6): 874-885.
3. Zhu A.X., Duda D.G., Sahani D.V., Jain R.K. HCC and angiogenesis: possible targets and future directions. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011; 8 (5): 292-301.
4. Theise N.D., Curado M.P., Franceschi S. et al. Hepatocellular carcinoma. In: Bosman F.T., Carneiro F., Hruban R.H., Theise N.D., editors. *WHO classification of tumours of the digestive system.* Lyon: IARC; 2010. p. 205-216.
5. Ruck P., Xiao J.C., Kaiserling E. Immunoreactivity of sinusoids in hepatocellular carcinoma. An immunohistochemical study using lectin UEA-1 and antibodies against endothelial markers, including CD34. *Arch Pathol Lab Med.* 1995; 119 (2): 173-8.
6. Coston W.M., Loera S., Lau S.K., et al. Distinction of hepatocellular carcinoma from benign hepatic mimickers using Glypican-3 and CD34 immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol.* 2008; 32 (3): 433-444.
7. Ho J.W., Poon R.T., Sun C.K., Xue W.C., Fan S.T. Clinicopathological and prognosis implications of endoglin (CD105) expression in hepatocellular carcinoma and its adjacent non-tumorous liver. *World J Gastroenterol.* 2005; 11 (2): 176-181.
8. El-Assal O.N., Yamanoi A., Soda Y. et al. Clinical significance of microvessel density and vascular

- endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirrhotic liver. *Hepatology*. 1998; 27 (6): 1554-1562.
9. Ker C.G., Chen H.Y., Juan C.C. et al. Role of angiogenesis in hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*. 1999; 46 (26): 646-650.
 10. Sun H.C., Tang Z.Y., Li X.M., Zhou Y.N., Sun B.R., Ma Z.C. Microvessel density of hepatocellular carcinoma: its relationship with prognosis. *Cancer Res. Clin. Oncol*. 1999; 125 (7): 419-426.
 11. Poon R.T., Ng I.O., Lau C. et al. Tumor microvessel density as a predictor of recurrence after resection of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *J Clin Oncol*. 2002; 20 (7): 1775-1785.
 12. Chen W.X., Min P.Q., Song B., Xiao B.L., Liu Y., Ge Y.H. Singlelevel dynamic spiral CT of hepatocellular carcinoma: correlation between imaging features and density of tumor microvessels. *World J Gastroenterol*. 2004; 10 (1): 67-72.
 13. Туманова У.Н., Кармазановский Г.Г., Щеголев А.И. Денситометрические характеристики гепатоцеллюлярного рака при спиральной компьютерной томографии. *Медицинская визуализация*. 2012; 6: 42-50.
 14. Kitao A., Zen Y., Matsui O., Gabata T., Nakanuma Y. Hepatocarcinogenesis: multistep changes of drainage vessels at CT during arterial portography and hepatic arteriography – radiologic-pathologic correlation. *Radiology*. 2009; 252 (2): 605-614.
 15. Туманова У.Н., Дубова Е.А., Кармазановский Г.Г., Щеголев А.И. Компьютерно-томографическая оценка кровоснабжения гепатоцеллюлярного рака печени. *Анналы хирургической гепатологии*. 2013; 4: 53-60.
 16. Туманова У.Н., Дубова Е.А., Кармазановский Г.Г., Щеголев А.И. Компьютерно-томографические и морфологические сопоставления степени васкуляризации очаговой узловой гиперплазии печени. *Молекулярная медицина*. 2013; 4: 31-36.