

Взаимосвязь структуры микроциркуляторного русла и метастатического потенциала локализованных форм колоректального рака

А.С. Константинов^{1,3}, К.В. Шелехова^{1,2,3}

¹ ГБУЗ Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический), Санкт-Петербург, Россия

² ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ ЧОУ ВО Санкт-Петербургский медико-социальный институт, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Неметастатический колоректальный рак может рецидивировать в течение пяти лет в виде отдаленных метастазов примерно у 25% пациентов со II стадией и у 50–60% пациентов с III стадией. Очень важно определить подгруппу пациентов с самым высоким риском рецидива. Цель исследования – определить влияние плотности микрососудов (MVD) и микрососудов с нарушением перичиттарного окружения (PIM) на риск метастазирования колоректальных аденокарцином.

Материалы и методы. Проведен анализ операционного материала локализованных форм колоректального рака. Когорты включали случаи с синхронными отдаленными метастазами (n=53), метастазными метастазами (n=45) и без отдаленных метастазов (n=53). В последней группе катамнез составил от 64 до 92 месяцев. На срезах опухоли было проведено тройное иммуногистохимическое окрашивание: ERG, α -SMA, Podoplanin. В инвазивном фронте определялись области с наибольшей плотностью микрососудов, где подсчитывалось их количество на площади 1,0 мм² при $\times 400$. Подсчитывалось количество кровеносных микрососудов без экспрессии α -SMA и рассчитывался индекс незрелости микрососудов Index-V = PIM / MVD.

Результаты. Нормальные кровеносные сосуды характеризовались экспрессией ERG эндотелиоцитами и α -SMA перичитами, тогда как в составе незрелых микрососудов последние отсутствовали. Разница по MVD в группах была статистически незначимой (p=0,414), в среднем 10/мм² для неметастазирующих и 11/мм² для метастазирующих опухолей. Метастазирующие опухоли показали значительно более высокий PIM (среднее значение 8/мм² против 2/мм²) и Index-V (среднее значение 0,69 против 0,21). Оба показали положительную корреляцию с отдаленными метастазами (p<0,001).

Заключение. Полученные данные демонстрируют, что несовершенная неоваскуляризация в опухоли коррелирует с метастазированием, что приводит к худшему прогнозу. Не только плотность микрососудов, но и особенности их структуры являются важными независимыми прогностическими факторами для пациентов с колоректальным раком. Оценка ангиогенеза в опухоли с точки зрения количества и зрелости новообразованных сосудов способствует выявлению потенциала злокачественности опухоли.

Ключевые слова: ангиогенез, перичиты, плотность микрососудов, колоректальный рак, прогноз

Для корреспонденции: Алексей Сергеевич Константинов. E-mail: konstantinov2007@gmail.com

Для цитирования: Константинов А.С., Шелехова К.В. Взаимосвязь структуры микроциркуляторного русла и метастатического потенциала локализованных форм колоректального рака. Клини. эксп. морфология. 2021;10(4):35–44. DOI: 10.31088/СЕМ2021.10.4.35-44.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 01.07.2021. Получена после рецензирования 20.07.2021. Принята в печать 22.09.2021.

Correlation of microvasculature structure with metastatic potential of localized forms of colorectal cancer

A.S. Konstantinov^{1,3}, K.V. Shelekhova^{1,2,3}

¹ Saint-Petersburg Clinical Scientific and Practical Center for Specialized Types of Medical Care (Oncological), Saint-Petersburg, Russia

² S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint-Petersburg, Russia

³ Saint-Petersburg Medico-Social Institute, Saint-Petersburg, Russia

Introduction. Non-metastatic colorectal cancer can recur within five years as distant metastases in about 25% of stage II patients and 50–60% of stage III patients. It is crucial to identify the subgroup of patients with

the highest risk of recurrence. Our study aimed to determine the effect of microvascular density (MVD) and pericyte impaired microvessels (PIM) on the risk of metastasis of colorectal adenocarcinomas.

Materials and methods. We carried out a retrospective study of the surgical material for colorectal cancer without metastases in regional lymph nodes. The cohorts included cases with synchronous distant metastases (n=53), metachronous metastases (n=45), and without distant metastases (n=53). In the last group, the follow-up period was from 64 up to 92 months. We performed triple immunohistochemical staining: ERG, α -SMA, and Podoplanin. At low magnification, we determined the areas of highest microvessel density, calculated them on an area of 1.0 mm² with a magnification of x400. The number of microvessels without α -SMA expression was counted, and eventually the microvessel immaturity index Index-V = PIM / MVD was calculated.

Results. Normal blood vessels were characterized by the expression of ERG in endothelial cells and α -SMA in pericytes, while at immature tumor microvessels, the latter were absent. The difference in MVD in the groups was statistically insignificant (p=0.414), on average 10/mm² for non-metastatic tumors and 11/mm² for metastatic ones. Metastatic tumors showed significantly higher PIM (mean 8/mm² vs. 2/mm²) and Index-V (mean 0.69 vs. 0.21). Both showed a significant correlation with distant metastases (p < 0.001).

Conclusion. The data obtained demonstrate that imperfect tumor neovascularization correlates with metastasis, which leads to a worse prognosis. The density of microvessels and their structural features are important independent prognostic factors for patients with colorectal cancer. Evaluation of angiogenesis in a tumor in terms of the number and maturity of newly formed vessels enable to elucidate malignant potential of the tumor.

Keywords: angiogenesis, pericytes, microvessel density, colorectal cancer, prognosis

Corresponding author: Aleksei S. Konstantinov. E-mail: konstantinov2007@gmail.com

For citation: Konstantinov A.S., Shelekhova K.V. Correlation of microvasculature structure with metastatic potential of localized forms of colorectal cancer. Clin. exp. morphology. 2021;10(4):35–44. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.35-44 (In Russ.).

Funding. The study was carried out within the framework of state budget funding.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 01.07.2021. **Received in revised form** 20.07.2021. **Accepted** 22.09.2021.

Введение

Согласно обобщающей работе D. Hanahan et al., рост злокачественной опухоли зависит от восьми внутренних характеристик опухолевых клеток: 1) независимость от внешних пролиферативных сигналов; 2) нечувствительность к сигналам, подавляющим рост; 3) уклонение от апоптоза; 4) безграничный репликативный потенциал; 5) устойчивый ангиогенез, 6) тканевая инвазия и метастазирование; 7) измененный клеточный метаболизм; 8) ускользание от иммунного надзора [1]. Многие исследования показали, что компоненты стромы опухоли играют важную роль на всех стадиях опухолевого роста [2]. Компоненты стромы включают внеклеточный матрикс и клеточные элементы (фибробласты, макрофаги, лимфоциты и другие воспалительные клетки), а также клетки, формирующие кровеносные и лимфатические сосуды (эндотелиальные клетки, перicyты и гладкомышечные клетки). Злокачественность является результатом сложного взаимодействия между стромой и опухолевыми клетками, при этом как опухолевые клетки, так и компоненты стромы играют активную роль в росте, инвазии и метастазировании. Сосудистая сеть, окружающая опухоль и растущая внутри нее, не только доставляет питательные вещества и кислород, необходимые для устойчивого роста, но также обеспечивает доступ клеток микроокружения, например макрофагов, способствуя ее дальнейшей прогрессии [3]. Ангиогенез

в опухолях приводит к формированию хаотичной, плохо организованной сосудистой сети с извилистыми, неправильной формы сосудами с повышенной проницаемостью, которые часто не могут поддерживать эффективный кровоток. Из-за несбалансированной экспрессии ангиогенных факторов сосуды опухоли, по-видимому, находятся в постоянном состоянии ремоделирования, которое включает одновременное образование и регресс сосудистых каналов [4]. Так же, как эндотелиальные клетки опухоли отличаются от нормального, покоящегося эндотелия, перicyты опухоли отличаются от нормальных перicyтов. Считается, что перicyты в опухолях хуже фиксированы к эндотелию новообразованных сосудов и их цитоплазматические отростки могут распространяться в периваскулярную строму (рис. 1). В ряде работ показана их меньшая распространенность в некоторых опухолях по сравнению с соответствующей нормальной тканью. Так, в карциномах поджелудочной железы отмечается достаточно плотное покрытие перicyтами, а глиобластомы и карциномы молочной железы демонстрируют резкое снижение плотности перicyтов по сравнению с соответствующими нормальными тканями [4].

Таким образом, предполагается, что опухолевые клетки могут легче проникать в незрелые бесперicyтарные микрососуды и созревание сосудов, а также их плотность могут быть полезными маркерами для оценки потенциала злокачественности опухоли. В ли-

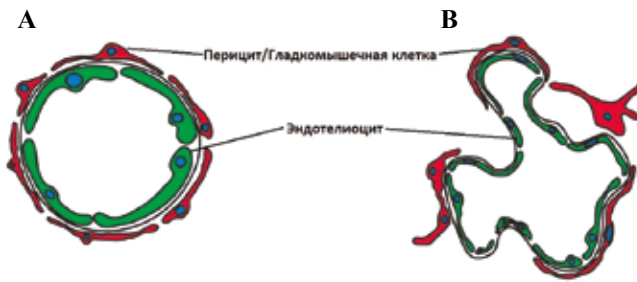


Рис. 1. Схема строения зрелого капилляра (А) и новообразованного сосуда, в процессе ангиогенеза в опухоли (В)

Fig. 1. Schematic structure of a mature capillary (A) and a newly formed vessel during angiogenesis in a tumor (B)

тературе встречается мало клинических исследований взаимосвязи между зрелостью микрососудов опухоли и клинико-патологическими переменными [5–7]. Кроме того, слабо освещена взаимосвязь между отдаленными метастазами и зрелостью микрососудов опухоли, оцениваемой путем идентификации эндотелиальных клеток и периделиальных клеток. В своей работе мы исследовали степень структурной зрелости новообразованных сосудов и их связь с количеством микрососудов, клинико-патологическими параметрами и отдаленным метастазированием при локализованных формах колоректального рака.

Материалы и методы

Когорты пациентов

На архивном материале Санкт-Петербургского клинического научно-практического центра специализированных видов медицинской помощи (онкологический) с 2012 по 2015 год проведен анализ 1350 оперatively удаленных опухолей толстой кишки. Из них было выбрано 98 случаев локализованных форм колоректального рака в соответствии со следующими критериями: 1) опухоль любой глубины инвазии, кроме Tis – интраэпителиальная инвазия или инвазия собственной пластинки слизистой оболочки, 2) отсутствие поражения регионарных лимфатических узлов и клинически выявленных синхронных отдаленных метастазов на момент операции, 3) неоадьювантное химиотерапевтическое и/или лучевое лечение не проводилось, 4) неспецифический гистологический подтип аденокарцином, в том числе опухоли, имеющие очаговую муцинозную дифференцировку (площадь внеклеточного муцина более 10%, но менее 50%), не относящиеся к муцинозным карциномам по критериям ВОЗ, 5) отсутствие первичных опухолей других локализаций.

По данным катамнеза, основанного на материалах медицинской документации и информации, полученной у пациента и/или его представителя, исследуемая выборка была разделена на две группы в зависимости от отсутствия (n=53) или наличия отдаленных метастазов (n=45), основываясь на результатах, как минимум, пятилетнего клинического наблюдения

(от 64 до 92 месяцев). В контрольную группу вошли инвазивные опухоли без поражения регионарных лимфоузлов, но с отдаленными синхронными метастазами (n=53), получившими морфологическую верификацию.

Исследуемые характеристики и используемые методики

В зависимости от локализации опухоли случаи были подразделены на три категории: правой половины толстой кишки (включает слепую кишку, восходящую ободочную кишку, печеночный угол и проксимальные две трети поперечной ободочной кишки), левой половины толстой кишки (включает дистальную треть поперечной ободочной кишки, селезеночный угол, нисходящую ободочную кишку и сигмовидную кишку) и прямой кишки.

Определяли степень дифференцировки в соответствии с утвержденными рекомендациями 5-го издания классификации опухолей желудочно-кишечного тракта ВОЗ [8]. В категорию low-grade включены опухоли, ранее относившиеся к высоко- и умереннодифференцированным, в категорию high-grade – низкодифференцированные опухоли. Оценку проводили по наименее дифференцированным участкам.

Стадию опухолевого процесса устанавливали в соответствии с критериями 8-й редакции классификации TNM AJCC/UICC [9]. Оценивали глубину инвазии опухоли кишечной стенки и число исследованных регионарных лимфатических узлов.

После изучения препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, из каждого случая выбирали блок опухоли с наибольшей глубиной инвазии, с которого изготавливали срезы толщиной 4 мкм для дальнейшего иммуногистохимического исследования. Проводили тройное окрашивание в автоматическом стеинере Ventana BenchMark XT (Roche, Швейцария) по соответствующим протоколам, с использованием следующих антител: ERG (EP111, 1:150, Epitomics, США) – нуклеопротеин эндотелиальных клеток кровеносных и лимфатических сосудов; α -SMA (1A4, 1:200, Dako, Дания) – α -гладкомышечный актин, белок микрофиламентов цитоскелета, выявляемый, в частности, в цитоплазме периделиальных и гладкомышечных клеток; Podoplanin (D2-40, 1:50, CellMarque, США) – трансмембранный гликопротеин, выявляющийся в эндотелии лимфатических, но не кровеносных сосудов. На постаналитическом этапе оценивали специфичность проведенного окрашивания, для чего выбирали участки нормальной ткани на удалении от опухоли. При увеличении объектива $\times 40$ оценивали окраску сосудов капиллярного типа и лимфатических сосудов. Кровеносные сосуды определялись по наличию в их просвете эритроцитов, просветы лимфатических сосудов содержали лимфоциты или были пусты. Дифференцированную окраску лимфатических капилляров, посредством Podoplanin, проводили для их исключения из подсчета. При успешном окрашивании кровеносные

капилляры отличались красным контуром по сравнению с коричневым контуром лимфатических сосудов. Далее, перемещаясь вдоль инвазивного фронта опухоли, находили участки с наиболее развитым микроциркуляторным руслом. Проводили подсчет общего числа микрососудов, исключая лимфатические, на площади в 1 мм² – плотность микрососудов (MVD). Новообразованные сосуды, лишённые контура из клеток, экспрессирующих α -SMA, отмечали как микрососуды с нарушением перичитарного окружения (PIM).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программы Statistica для Windows (версия 9).

Количественные показатели оценивали на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка (при числе исследуемых менее 50) или критерия Колмогорова–Смирнова (при числе исследуемых более 50). В случае отсутствия нормального распределения количественные данные описывали с помощью медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q1–Q3). Категориальные данные описывали с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение трех и более групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполняли с помощью

критерия Краскела–Уоллиса, апостериорные сравнения – с помощью критерия Данна с поправкой Холма.

Результаты

Средний возраст пациентов во всех группах составил около 65,9±10 лет, соотношение мужчин и женщин – 1:1,5. В группе без метастазов чаще встречались опухоли левой половины толстой кишки – 32 (6,4%). При этом среди всех опухолей правосторонней локализации 47,2% случаев было из группы с синхронными отдаленными метастазами, что можно объяснить их более поздним клиническим проявлением. Во всех группах преобладали опухоли, инвазирующие в стенку на уровне околоободочной/субсерозной/параректальной клетчатки, – pT3. Инвазия в серозную оболочку (pT4a) или в соседние органы (pT4b) достоверно чаще встречалась в группах с метастазами (p<0,001). Во всех группах абсолютное большинство опухолей характеризовалось низкой степенью гистологической злокачественности (low-grade).

Результат тройного иммуногистохимического окрашивания в норме и в опухоли представлен на рисунке 2.

При оценке микроциркуляторного русла выявлены следующие особенности. Средняя плотность микрососудов между группами значительно не отличалась

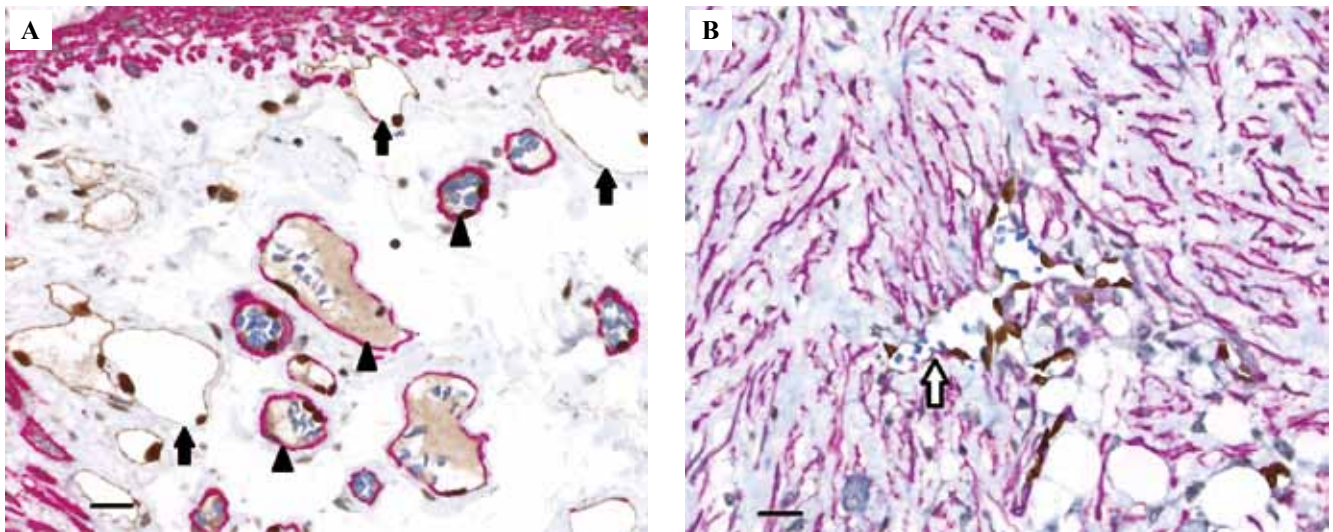


Рис. 2. Тройное иммуногистохимическое окрашивание микрососудов.

А – ядра эндотелиальных клеток кровеносных (верхушка стрелки) и лимфатических (черные стрелки) капилляров окрашены в коричневый цвет (маркер ERG). Красный контур кровеносных сосудов связан с наличием перичитов, (маркер α -SMA). Коричневый контур лимфатических сосудов определяется цитоплазматическим окрашиванием эндотелиальных клеток (маркер Podoplanin). В – новообразованный кровеносный сосуд (белая стрелка) имеет неправильную форму, лишен перичитов и сохраняет только контур из эндотелиальных клеток, определяемый ядрами, окрашенными коричневым (маркер ERG). Обращает внимание выраженная десмопластическая строма, богатая активированными миофибробластами (маркер α -SMA). Масштабная шкала = 200 мкм

Fig. 2. Triple immunohistochemical staining of microvessels.

A – the nuclei of the endothelial cells (arrowheads) and lymphatic (black arrows) capillaries are colored brown (ERG marker). A contour of the blood vessels appears red due to presence of pericytes (α -SMA marker). The brown-colored cytoplasm of the endothelial cells of the lymphatic vessels is defined by the brown Podoplanin outline. B – newly formed misshapen blood vessels (white arrow) in the tumor stroma are devoid of pericyte and retain only the contour of their endothelial cells, detected by nuclei stained in brown (ERG marker). Noteworthy is the pronounced desmoplastic stroma rich with activated myofibroblasts (α -SMA marker). Scale bar = 200 μ m

и составила 10/мм² для группы без метастазов и 11/мм² для метастазирующих опухолей. В опухолях с метастазирующими и синхронными метастазами среди новообразованных сосудов чаще встречались капилляры без перицитарного окружения, в среднем 8/мм² и 9/мм², соответственно, по сравнению с неметастазирующими опухолями – 2/мм² (p<0,001). Обобщенные данные по результатам анализа всех показателей в исследуемых группах пациентов представлены в таблице 1.

Расчетный Index-V относится к количественным показателям, распределение которых не соответствует нормальному, различия между группами с метастазами

и без метастазов представлены на рисунке 3. Методом построения классификационных деревьев было получено пороговое значение Index-V = 0,5, принципиально значимое для оценки риска метастазирования. При Index-V меньше или равно 0,5 отношение рисков (OR) было минимальным, а при Index-V больше 0,5 составило 138,4. Это отношение показывает, во сколько раз повышается риск метастазирования по сравнению с минимальным уровнем показателя.

Как видно из таблицы 2, превышение порогового значения Index-V отмечается в 38 случаях (42,69%) в группе с метастазирующими метастазами, в 49 (55,05%)

Таблица 1 | Table 1

Показатели оцениваемых характеристик в исследуемых группах |
Values of the factors in groups

Показатель Variable	Без метастазов (n=53) Without metastases (n=53)	С метастазами (n=45) With metachronous metastases (n=45)	С синхронными метастазами (n=53) With synchronous metastases (n=53)	p*
Возраст Age				
Медиана Median	67	65	65	0,898
Q ₁ -Q ₃	60-75	58-72	59-74	
Пол Sex				
Мужской Male	21 (40)	23 (51)	23 (43)	0,391
Женский Female	32 (60)	22 (49)	30 (57)	
Локализация Localization				
Правая сторона Right-sided	11 (21)	8 (18)	17 (32)	0,493
Левая сторона Left-sided	32 (60)	21 (47)	21 (40)	
Прямая кишка Rectum	10 (19)	16 (35)	15 (28)	
Категория T T category				
1	0	0	0	<0,001
2	0	2 (4)	5 (9)	
3	49 (92)	38 (85)	29 (55)	
4a	1 (2)	1 (2)	9 (17)	
4b	3 (6)	4 (9)	10 (19)	
Степень гистологической злокачественности Grade				
Low-grade	47 (89)	42 (93)	44 (83)	0,872
High-grade	6 (11)	3 (7)	9 (17)	
MVD				
Медиана Median	9	11	10	0,414
Q ₁ -Q ₃	7-11	8-13	8-12	
PIM				
Медиана Median	2	7	8	<0,001
Q ₁ -Q ₃	1-3	5-10	6-10	
Index-V				
Медиана Median	0,18	0,72	0,8	<0,001
Q ₁ -Q ₃	0,09-0,33	0,6-0,86	0,68-0,91	

*линейный тест χ^2 для оценки статистической значимости.

MVD – плотность микрососудов, PIM – микрососуды без перицитов, Index-V – соотношение бесперичитарных сосудов к общему числу микрососудов

* χ^2 linear test for trend.

MVD – microvascular density, PIM – pericyte impaired microvessels, Index-V – the ratio of pericyte impaired vessels to the total number of microvessels

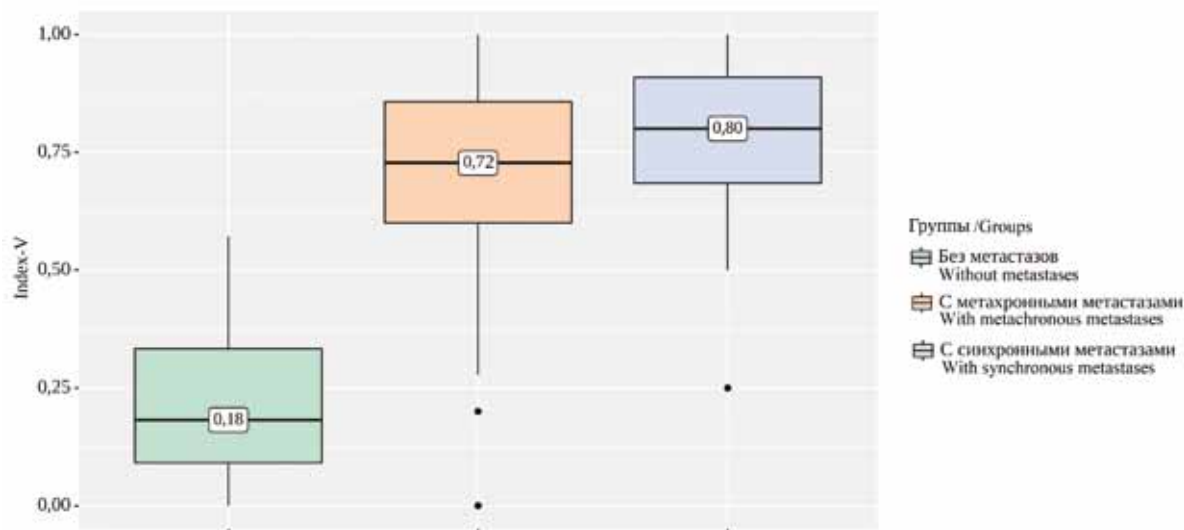


Рис. 3. Значения Index-V в группах без метастазов и с отдаленными синхронными и метастазами
Fig. 3. Value of Index-V in groups without metastases and with distant synchronous and metachronous metastases

Таблица 2 | Table 2

Распределение случаев в группах без метастазов и с метастазами при различных значениях Index-V |
Distribution of cases in groups without metastases and with metastases at different values of Index-V

Показатель Variable	Значения показателя Value	Без метастазов Without metastases		С метастазами метастазами With metachronous metastases		С синхронными метастазами With synchronous metastases		Всего Total
		абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%	
Index-V (p<0,001)	Index-V≤0,5	51	82,25	7	11,29	4	6,45	62
	Index-V>0,5	2	2,24	38	42,69	49	55,05	89
	Всего Total	53	35,1	45	29,8	53	35,1	151

случаях с синхронными метастазами по сравнению лишь с двумя случаями (2,24%) без метастазов.

С использованием коэффициента корреляции Спирмена (ρ) была установлена положительная взаимосвязь между MVD и PIM (рис. 4). В группе без метастазов $\rho=0,294$ ($p=0,033$), в группе с метастазами отдаленными метастазами $\rho=0,701$ ($p<0,05$) и в группе с синхронными отдаленными метастазами $\rho=0,901$ ($p<0,001$). Следует отметить усиление взаимосвязи между этими показателями в группах с отдаленными метастазами, что отражается приближением показателя коэффициента к 1,0.

Достоверная корреляция между степенью гистологической злокачественности и плотностью микрососудов или числом сосудов без перипититарного окружения не была установлена ни в одной из исследуемых групп. Таким образом, уровень незрелости микрососудов опухоли не коррелировал со степенью дифференцировки опухоли.

Обсуждение

Вопрос лимфогенной и гематогенной диссеминации является предметом давних исследований и, вероятно, сильно зависит от происхождения и локализа-

ции первичной опухоли [10]. Поток интерстициальной жидкости к лимфатическим сосудам и промежутки в эндотелиальной выстилке лимфатических капилляров облегчают доступ и проникновение опухолевыми клеткам. Кроме того, лимфатические сосуды лишены гладкомышечных клеток и перипитов, которые в противном случае могли бы препятствовать проникновению в сосуды [11, 12]. В отличие от лимфатических кровеносные сосуды любого размера обычно состоят из нескольких слоев клеток. В сосудах калибра венул, вен, артериол и артерий они называются гладкомышечными клетками, поскольку характеризуются высоким уровнем экспрессии α -SMA и могут образовывать до нескольких слоев сократительных клеток, встроенных во внеклеточный матрикс, богатый эластином и фибриллярным коллагеном. В капиллярном звене клетки аблюминального слоя называются перипитами и характеризуются низким уровнем α -SMA, но сильной экспрессией хондроитинсульфатного протеогликана NG2 [13]. Во время патофизиологических процессов (воспаление, фиброз, опухолевый рост) перипиты активируются комбинацией факторов роста (PDGF- β , VEGF α и TGF β -1) и демонстрируют измененные профили маркеров, в частности повышение экспрессии

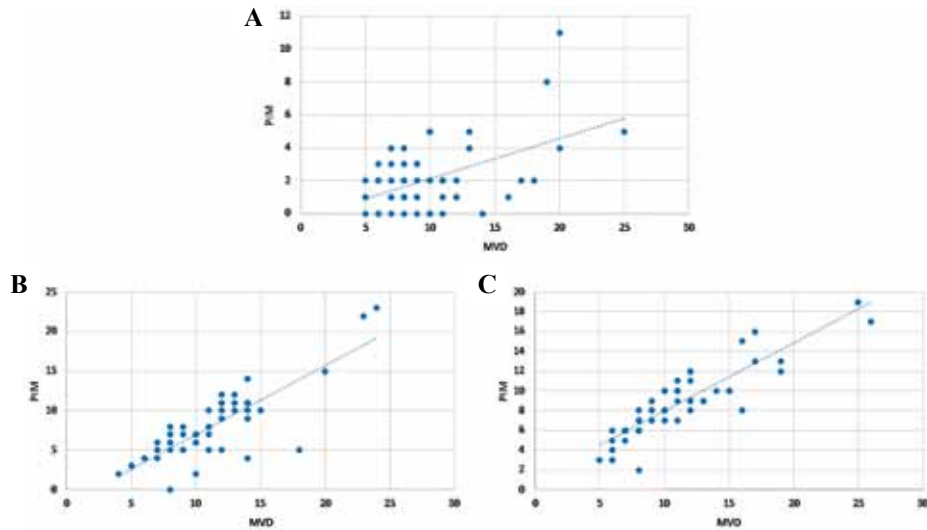


Рис. 4. Корреляция между MVD и PIM.

А – группа без метастазов. В – группа с метастазами. С – группа с синхронными метастазами

Fig. 4. Correlation between MVD and PIM.

A – group without metastases. B – group with metachronous distant metastases. C – group with synchronous distant metastases

α -SMA, что характеризует их трансдифференцировку в миофибробласты. Также отделение перицитов от внеклеточного матрикса приводит к увеличению проницаемости сосудов, что способствует миграции воспалительных клеток, росту и метастазированию опухоли [14]. Тем не менее существуют и другие гипотезы о клеточном происхождении миофибробластов, включая резидентные фибробласты, фиброциты, эпителиальные клетки (вследствие эпителиально-мезенхимального перехода), клетки костного мозга, эндотелиальные клетки. Степень вклада перицитов в модуляцию воспалительных клеток при фиброзе и трансдифференцировку в фибробласты или миофибробласты при канцерогенезе все еще остается в значительной степени неясной.

Периваскулярные стромальные клетки, или перициты, известны давно (впервые описаны Карлом Эбертом в 1871 году), они обнаруживаются в норме на наружной стороне кровеносных (не лимфатических) капилляров, где обеспечивают механическую и физиологическую паракринную поддержку покоящихся эндотелиальных клеток [14]. Перициты представляют собой вид специализированных мезенхимальных клеток (в настоящий момент считаются онтогенетически связанными с сосудистыми гладкомышечными клетками), погруженных в базальную мембрану кровеносных сосудов, с большим числом первичных и вторичных отростков, муфтообразно охватывающих сосудистую трубку (рис. 5).

Пока не существует универсального маркера, который бы мог идентифицировать все перициты, и их обычно выявляют с помощью молекулярных маркеров, таких как α -SMA, десмин или высокомолекулярный меланоассоциированный антиген (HMW-MAA) [15, 16]. Н. Kurz et al. сообщают, что перициты экспрессируют десмин, но

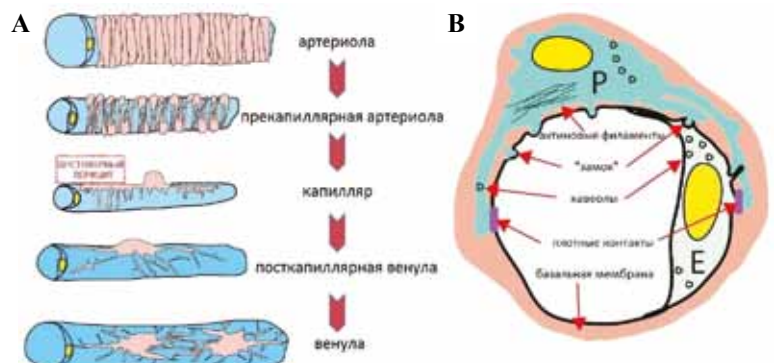


Рис. 5. Схема строения сосудистой стенки.

А – континуум цитоархитектуры перицитов от артериол к венуле. В – ультраструктурные характеристики перицитов и перицитэндотелиальных взаимодействий. Перицит зрелого капилляра (P) имеет общую базальную мембрану с эндотелиальной клеткой (E), и они образуют многочисленные прямые контакты разного типа: схематически изображены плотные контакты и соединения типа «замок» (по А. Armulik, G. Genové и С. Betsholtz, 2011)

Fig. 5. Schematic structure of the vascular wall.

A – a continuum of mural cell cyto-architecture from arterioles to the venule. B – ultrastructural characteristics of pericytes and pericyte-endothelial interactions. The mature capillary pericyte (P) share basal membrane with endothelial cell (E) and make numerous direct contacts of different types: schematically depicted are peg-socket contacts and adhesion plaques (adopted from A. Armulik, G. Genové, C. Betsholtz, 2011)

не α -SMA, на ранних стадиях прорастания капилляров при анализе ангиогенеза опухоли хориоаллантоисной мембраны у птиц [17]. Зависимость экспрессии α -SMA от степени зрелости новообразованных сосудов была также подтверждена нами на примере окрашивания грануляционной ткани. Так, продемонстрировано, что почти все новообразованные капилляры, представленные простыми трубками, сформированными 1–2 эндотелиальными клетками на поперечном срезе, не имели окружения, экспрессировавшего α -SMA, тогда как к периферии разрастаний, по мере их усложнения и ветвления, почти все сосудистые структуры давали положительную экспрессию α -SMA. Эти выводы согласуются с предыдущими работами. Требуются дополнительные исследования для выявления специфических маркеров перicyтов в опухолевом ангиогенезе человека.

Соотношение эндотелиальных клеток к перicyтам варьирует в разных органах от 1:1 в головном мозге до 10:1 в скелетных мышцах, в среднем перicyты покрывают от 70 до 10% аблюминальной поверхности эндотелия [14]. Установлена секреция перicyтами антипролиферативных факторов, к примеру ангиопоэтин-1 (Ang-1) через рецептор Tie2 на эндотелиальных клетках обеспечивает их стабилизацию. Некоторые перicyты могут продуцировать небольшое количество сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) для обеспечения трофической функции в гомеостазе эндотелия [1]. Перicyты наряду с эндотелиальными клетками участвуют в синтезе базальной мембраны сосудов, обеспечивающей сопротивление гидростатическому давлению кровотока.

В опухолевом микроокружении присутствует много растворимых факторов роста и хемокинов, стимулирующих эндотелиальные клетки и ассоциированные с ними перicyты к пролиферации и неоваскуляризации, что является необходимым условием роста опухоли. Без васкуляризации опухоль не может увеличиться более 100–200 мкм в диаметре, несмотря на все генетические аномалии, это зона максимального расстояния диффузии кислорода, необходимого для жизнедеятельности любой животной клетки. Ангиогенез обеспечивает не только постоянный рост опухоли, но также возможность проникать в сосудистое русло, что является основой метастазирования, одного из биологических проявлений злокачественности и наивысшего выражения ее автономности [18]. Опухоли отличаются практически перманентной активацией ангиогенеза, молекулярный базис для его запуска заключается в преобладании воздействия ангиогенных факторов и/или потере ингибиторов ангиогенеза. К таким известным стимуляторам эндотелиального роста относятся метаболический стресс (например, низкий pO_2 , низкий pH или гипогликемия), механический стресс (например, давление от пролиферирующих клеток), иммунный воспалительный ответ или генетические мутации, активирующие продукцию проангиогенных факторов (например, VEGF), ангиопоэтины (Ang) [18].

Новообразованные сосуды опухоли характеризуются структурными и функциональными aberrациями: отличаются неравномерным распределением, избыточным ветвлением и извитостью, имеют неравномерные просветы, что сопровождается нарушением ламинарного тока крови, могут утрачивать периваскулярные клетки и иметь неравномерную эндотелиальную выстилку, прерывающуюся базальную мембрану, что сопровождается повышенной проницаемостью. Последнее приводит к повышению интерстициального давления, сдавлению самих сосудов и, как следствие, снижению оксигенации ткани. В ответ на гипоксию клетки микроокружения, в частности клетки воспалительного инфильтрата (например, макрофаги M2-типа) и клетки опухоли, продуцируют множество проангиогенных цитокинов (VEGF и FGF-2) через активацию HIF-1 α , фактора транскрипции, чувствительного к кислороду. Эти факторы создают так называемый ангиогенный градиент, стимулируя пролиферацию эндотелия и направляя рост новых сосудов к опухоли [19]. В то же время VEGF негативно воздействует на функционирование перicyтов и созревание сосудов [14]. В ряде исследований карцином мочевого пузыря, поджелудочной железы и толстой кишки было показано, что неполное развитие перicyтарного слоя в опухолевых сосудах коррелирует с плохим прогнозом и повышает частоту метастазирования [20, 21]. Недавнее исследование V.G. Cooke et al. частично помогает в понимании этой закономерности. На моделях опухолей мышей с генетическим и фармакологически индуцированным дефицитом перicyтов авторы установили угнетение роста первичных опухолей, но последнее ассоциировалось с гипоксией, что привело к активации эпителиально-мезенхимального перехода опухолевых клеток за счет активации c-Met рецепторов (рецепторов к гепатоцитарному фактору роста HGF) на мембранах эпителиальных клеток [22]. Результаты клинических наблюдений пациентов с карциномами молочной железы, в которых отмечался низкий процент сосудов, покрытых перicyтами, также показали прямую связь с развитием метастазов и более низкую общую выживаемость [22].

В своем исследовании мы оценивали взаимосвязь степени зрелости микрососудов, а также выраженности ангиогенеза в колоректальных аденокарциномах с их биологическим поведением. Незрелые сосуды определялись как микрососуды с нарушением перicyтарного окружения, лишенные экспрессии α -SMA. Не была установлена взаимосвязь между степенью гистологической злокачественности и метастатическим потенциалом опухоли, плотностью микрососудов и долей бесперicyтарных сосудов в сосудистом ложе. Таким образом, «гистологическая злокачественность» колоректальных аденокарцином не связана с признаком злокачественности опухолей – метастазированием и не может считаться независимым фактором прогноза для данного типа опухолей. При равной плотности

микрососудов в неметастазирующих и метастазирующих опухолях (средняя MVD 10/мм² и 11/мм², соответственно) в последних чаще встречались незрелые сосуды ($p < 0,001$), что позволяет предположить прямую взаимосвязь перичитарного окружения с проницаемостью сосудистой стенки для опухолевых клеток. При оценке взаимосвязи MVD и PIM обнаружено усиление корреляции в метастазирующих опухолях ($p < 0,001$). Это наблюдение указывает на факт, что при большей активности ангиогенеза наблюдалось большее число сосудов с нарушением перичитарного окружения, и эта взаимосвязь была сильнее выражена при высоком метастатическом потенциале опухоли. Вероятно, усиленная стимуляция пролиферации эндотелиальных клеток в опухолевом микроокружении приводит к замедлению их созревания и, как следствие, недостаточной экспрессии цитокинов, необходимых для привлечения перичитарных клеток, обеспечивающих стабилизацию новообразованных сосудов. Данное наблюдение расходится с выводами Y. Yonemura et al., установивших прямо пропорциональную связь повышения плотности микрососудов с увеличением процента зрелых микрососудов в опухоли [21]. Это, возможно, связано с оценкой сосудистого русла по всему объему опухоли, в центральных и периферических отделах, тогда как мы проводили подсчеты только в инвазивном фронте, где, как известно, протекают наиболее активное взаимодействие опухоли и организма «хозяина», в том числе идут процессы неоваскуляризации. В то же время наши результаты согласуются с данными, полученными P. Vermeulen et al., установивших прямую корреляцию между количеством незрелых сосудов и плотностью микрососудов в метастазах колоректальных аденокарцином в печени [23].

Заключение

Результаты проведенного исследования демонстрируют, что несовершенный ангиогенез коррелирует с появлением отдаленных метастазов у пациентов с локализованным колоректальным раком. Оценка микрососудистого русла опухоли на предмет его созревания, а также количества новообразованных сосудов может быть использована для прогнозирования злокачественного потенциала опухолей данной локализации и планирования ведения пациентов.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.С. Константинов, К.В. Шелехова.

Сбор и обработка материала – А.С. Константинов.

Написание текста – А.С. Константинов.

Редактирование – К.В. Шелехова.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment –

A.S. Konstantinov, K.V. Shelekhova.

Collected the data and performed the analysis – A.S. Konstantinov.

Wrote the paper – A.S. Konstantinov.

Edited the manuscript – K.V. Shelekhova.

Литература/References

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
2. Joyce JA. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2005;7(6):513–20. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.05.024.
3. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: Obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. 2006;124(2):263–6. DOI: 10.1016/j.cell.2006.01.007.
4. Raza A, Franklin MJ, Dudek AZ. Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am J Hematol*. 2010;85(8):593–8. DOI: 10.1002/ajh.21745.
5. Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, Augustin HG. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: Implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res*. 2000;60(5):1388–93. PMID: 10728704.
6. Kinouchi T, Mano M, Matsuoka I, Kodama S, Aoki T, Okamoto M et al. Immature tumor angiogenesis in high-grade and high-stage renal cell carcinoma. *Urology*. 2003;62(4):765–70. DOI: 10.1016/s0090-4295(03)00512-0.
7. Gesundheit B, Klement G, Senger C, Kerbel R, Kieran M, Baruchel S et al. Differences in vasculature between pilocytic and anaplastic astrocytomas of childhood. *Med Pediatr Oncol*. 2003;41(6):516–26. DOI: 10.1002/mpo.10308.
8. WHO Classification of tumours editorial board. *Digestive system tumours. WHO Classification of tumours*. 5th ed. V. 1. IARC Press: Lyon, 2019. 635 p.
9. JD Brierley, MK Gospodarowicz, C Wittekind (eds.). *TNM Classification of malignant tumours*. 8th ed. Wiley-Blackwell: Oxford, 2017. 272 p.
10. Wong SY, Hynes RO. Lymphatic or hematogenous dissemination: How does a metastatic tumor cell decide? *Cell Cycle*. 2006;5(8):812–7. DOI: 10.4161/cc.5.8.2646.
11. Mäkinen T, Norrmén C, Petrova TV. Molecular mechanisms of lymphatic vascular development. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(15):1915–29. DOI: 10.1007/s00018-007-7040-z.
12. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(6):464–78. DOI: 10.1038/nrm2183.
13. Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol*. 2005;7(4):452–64. DOI: 10.1215/S1152851705000232.
14. Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: Developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*. 2011;21(2):193–215. DOI: 10.1016/j.devcel.2011.07.001.
15. Nehals V, Denzer K, Drenckhahn D. Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ. *Cell Tissue Res*. 1992;270(3):469–74. DOI: 10.1007/BF00645048.
16. Schlingemann RO, Rietveld FJ, de Waal RM, Ferrone S, Ruiter DJ. Expression of the high molecular weight melanoma-associated antigen by pericytes during angiogenesis in tumors and in healing wounds. *Am J Pathol*. 1990;136(6):1393–405. PMID: 1694058.
17. Kurz H, Lauer D, Papoutsis M, Christ B, Wilting J. Pericytes in experimental MDA-MB231 tumor angiogenesis. *Histochem Cell Biol*. 2002;117(6):527–34. DOI: 10.1007/s00418-002-0388-0.

18. Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. *Annu Rev Pathol.* 2007;2:251–75. DOI: 10.1146/annurev.pathol.2.010506.134925.
19. Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: Cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* 2001;11(11):S37–43. DOI: 10.1016/s0962-8924(01)02122-5.
20. O’Keeffe MB, Devlin AH, Burns AJ, Gardiner TA, Logan ID, Hirst DG et al. Investigation of pericytes, hypoxia, and vascularity in bladder tumors: Association with clinical outcomes. *Oncol Res.* 2008;17(3):93–101. DOI: 10.3727/096504008785055530.
21. Yonenaga Y, Mori A, Onodera H, Yasuda S, Oe H, Fujimoto A et al. Absence of smooth muscle actin-positive pericyte coverage of tumor vessels correlates with hematogenous metastasis and prognosis of colorectal cancer patients. *Oncology.* 2005;69(2):159–66. DOI: 10.1159/000087840.
22. Cooke VG, LeBleu VS, Keskin D, Khan Z, O’Connell JT, Teng Y et al. Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis mediated by met signaling pathway. *Cancer Cell.* 2012;21(1):66–81. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.11.024.
23. Vermeulen PB, Colpaert C, Salgado R, Royers R, Hellemans H, van den Heuvel E et al. Liver metastasis from colorectal adenocarcinomas grow in three patterns with different angiogenesis and desmoplasia. *J Pathol.* 2001;195(3):336–42. DOI: 10.1002/path.966.

Информация об авторах

Алексей Сергеевич Константинов – врач-патологоанатом Санкт-Петербургского клинического научно-практического центра специализированных видов медицинской помощи (онкологического), ассистент кафедры патологической анатомии факультета дополнительного профессионального образования Санкт-Петербургского медико-социального института.

Ксения Владимировна Шелехова – доктор медицинских наук, заведующая патологоанатомическим отделением Санкт-Петербургского клинического научно-практического центра специализированных видов медицинской помощи (онкологического), старший преподаватель кафедры патологической анатомии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, заведующая кафедрой патологической анатомии факультета дополнительного профессионального образования Санкт-Петербургского медико-социального института.

Author information

Aleksei S. Konstantinov – Pathologist, Pathology Department, Saint-Petersburg Clinical Scientific and Practical Center of Specialized Types of Medical Care (Oncological); Assistant of the Pathology Department, Saint-Petersburg Medico-Social Institute.

<https://orcid.org/0000-0002-1410-4308>

Ksenya V. Shelekhova – Dr. Sci. (Med.), Head of the Pathology Department, Saint-Petersburg Clinical Scientific and Practical Center of Specialized Types of Medical Care (Oncological); Senior Lecturer, Department of Pathology, S.M. Kirov Military Medical Academy; Head of the Department of Pathology, Saint-Petersburg Medico-Social Institute.

<https://orcid.org/0000-0002-2113-0053>