

УДК 615.849.19.03:616.1

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ ДОЛЕК И ПРОТОКОВ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Ануфриева С. С.

ГБОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия Минздрава России», Челябинск, Россия (454092, Челябинск, ул. Воровского, 64)

Проведен динамический анализ особенностей экспрессии антигена Ki-67 в эпителиоцитах долек и протоков молочных желез 102 женщин с пролиферативной и непролиферативной формами фиброзно-кистозной болезни молочной железы в зависимости от типа режущего инструмента (скальпеля, высокоинтенсивного лазерного излучения (ВИЛИ)), используемого при секторальной резекции органа. В качестве количественного показателя маркера пролиферации определяли относительную площадь экспрессии антигена Ki-67 в эпителиоцитах молочной железы на момент операции и спустя 6 месяцев после вмешательства. Существенных отличий в показателях величины относительной площади экспрессии антигена Ki-67 в ядрах эпителиоцитов долек и протоков молочной железы на различных сроках наблюдения, а также зависимости величины данного показателя от вида используемого режущего инструмента и формы фиброзно-кистозной болезни молочной железы – непролиферативной и пролиферативной – выявлено не было, что свидетельствует об отсутствии канцерогенного действия ВИЛИ на ткани молочной железы.

Ключевые слова: молочная железа, эпителиоциты долек и протоков, диодный лазер, антиген Ki-67.

INFLUENCE OF HIGH-INTENSITY LASER RADIATION ON PROLIFERATIVE ACTIVITY OF MAMMARY LOBES AND DUCTS EPITHELIOCYTES

Anufrieva S. S.

GBOU VPO «Chelyabinsk State Medical Academy of the Ministry of Public Health and Social Development of Russia», Chelyabinsk, Russia (454092, Chelyabinsk, Vorovskogo St., 64).

The dynamic analysis of anti-gene Ki-67 expression features in mammary lobes and ducts epitheliocytes depending on type of the cutting tool used at a sectoral gland surgery (a scalpel or high-intensity laser radiation) was performed in 102 women with proliferative and non-proliferative forms of a fibrous and cystous mammary disease. As a quantitative marker of a proliferative activity we used the relative area of an anti-gene Ki-67 expression in mammary lobes and ducts epitheliocytes at the moment of operation treatment and six months after surgery. Our received data shown, that there are not essential differences between anti-gene Ki-67 expression in nucleus of mammary lobes and ducts epitheliocytes during of various terms of our study. It confirms the absence of cancerogenic action of the high-intensity laser radiation on the mammary gland tissue.

Keywords: mammary gland, mammary lobes and ducts epitheliocytes, diode laser, Ki-67- anti-gene.

Введение

Нарушение регуляции процессов апоптоза и пролиферации является основным механизмом опухолевой трансформации клеток [1]. Из существующих способов визуализации и оценки пролиферативной активности клеток наиболее оптимальным является иммуногистохимическое определение индекса пролиферации, сочетающее в себе высокую информативность и невысокие экономические затраты [4].

Негистоновый протеин Ki-67, отнесенный к основным маркерам пролиферации, экспрессируется всеми клетками, вышедшими из G₀-фазы клеточного цикла, что позволяет оценить «скрытый» пролиферативный потенциал изучаемого пула клеток [3].

Немногочисленные работы, посвященные изучению морфологических особенностей пролиферативных процессов в молочных железах женщин с различными формами фиброзно-кистозной болезни (ФКБ), свидетельствуют о двукратном повышении уровня экспрессии маркеров пролиферации Ki-67 и PCNA в эпителии молочной железы при пролиферативных формах ФКБ относительно непролиферативных форм заболевания [2, 3].

Риск развития рака молочной железы зависит непосредственно от выраженности пролиферации эпителиоцитов протоков и/или долек молочной железы [6]. Так, при пролиферативных локализованных формах ФКБ пациентки, как правило, подвергаются хирургическому вмешательству в объеме секторальной резекции для исключения рака молочной железы.

В последние годы в хирургической практике активно используются физические факторы – лазерное излучение, ультразвук, электромагнитное излучение, гипертермия. Наибольшую распространенность в хирургии молочной железы получило высокоинтенсивное лазерное излучение (ВИЛИ) ближнего инфракрасного диапазона (длина волны 805–1024 нм), обеспечивающее быстрое рассечение тканей с одномоментным гемостазом, а также позволяющее осуществлять лазерную интерстициальную гипертермию опухолей [5]. Однако работ, посвященных изучению интенсивности пролиферации эпителиа долек и протоков молочной железы в тканях, подвергнутых воздействию ВИЛИ, в свете современных представлений о канцерогенезе, в доступной нам литературе не представлено, что послужило поводом к проведению данного исследования.

Цель исследования – оценить влияние высокоинтенсивного лазерного излучения ближнего инфракрасного диапазона (длина волны 805 нм) на пролиферативную активность эпителиоцитов долек и протоков молочной железы.

Материал и методы

Обследовано 102 женщины, из которых 58 пациенток составили группу сравнения, 44 – основную группу. Основная группа включала больных с фиброзно-кистозной болезнью молочных желез в возрасте от 25 до 55 лет (средний показатель – $38,4 \pm 5,2$ лет), иссечение тканей при секторальной резекции у которых выполнялась с использованием ВИЛИ, генерируемого диодным лазером Sharplan-6020, с длиной волны 805 нм. Группа сравнения включала женщин с ФКБ молочных желез в возрасте от 22 до 55 лет (средний показатель $36,9 \pm 3,5$ лет). Секторальная резекция у них осуществлялась посредством скальпеля.

Перед операцией, наряду с общепринятыми методами обследования, всем пациенткам выполнялись физикальное, ультразвуковое и маммографическое (после 40 лет) исследования.

Ультрасонографическое исследование молочных желез проводилось на аппарате Acusson «Aspen» с использованием линейного датчика с рабочей частотой 7,5–10 МГц.

Рентгеновская маммография выполнялась по общепринятой методике в стандартных укладках больной на аппарате фирмы «Siemens».

Тонкоигольная аспирационная биопсия для исключения рака молочной железы производилась также всем пациенткам, включенным в исследование, после завершения комплекса неинвазивных методов исследования.

Секторальная резекция молочной железы в основной группе больных выполнялась путем иссечения тканей органа с помощью ВИЛИ, доставляемого с помощью гибкого кварцевого световода диаметром 600 мкм. Мощность излучения при этом составляла 20 Вт, режим подачи излучения – импульсно-периодический – частота следования импульс/ пауза – 50/50 мс (данный режим рассечения тканей молочной железы был обоснован в проведенном нами ранее экспериментально-клиническом исследовании).

В группе сравнения пациенткам выполнялась секторальная резекция по общепринятой методике – с рассечением и иссечением тканей скальпелем.

Материал для первичного морфологического исследования получали с края резекции непосредственно во время оперативного вмешательства. Контрольное морфологическое исследование проводили через 6 месяцев после операции. Материалом для исследования являлись образцы тканей молочной железы, взятые из прилежащих к послеоперационному рубцу тканей путем трепанобиопсии полуавтоматической иглой «GBL» диаметром 16G под местной анестезией 0,5 % раствора новокаина. Забор материала осуществляли с использованием ультрасонографического контроля положения иглы в тканях относительно рубца.

Морфологическое исследование включало стандартное гистологическое исследование с окраской срезов гематоксилином и эозином и иммуногистохимический метод с количественным определением показателя экспрессии маркера пролиферации антигена Ki-67. В качестве количественного показателя маркера пролиферации определяли относительную площадь экспрессии антигена Ki-67 в эпителиоцитах молочной железы.

Относительная площадь экспрессии (S,%) антигена Ki-67 рассчитывалась как отношение площади иммунопозитивных ядер эпителиоцитов (S, ИГХ+ ядер) к общей площади ядер эпителиоцитов (S,ядер общая): $S = S_{\text{ИГХ+ ядер}} / S_{\text{ядер общая}} \times 100 \%$.

Постановку иммуногистохимической реакции осуществляли по стандартному протоколу с использованием моноклональных мышиных антител к Ki-67 (Dako, Clone Ki-67, 1:25).

Статистическая обработка полученных результатов производилась на персональном компьютере «Acer» с использованием прикладной компьютерной программы BioStat 2008. Методы статистики включали расчет показателей среднего арифметического (M) и среднего отклонения (m). Оценка межгрупповых различий осуществлялась с помощью t-критерия Стьюдента, в случае малой выборки – применяли непараметрический критерий критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Стандартное гистологическое исследование операционного материала в исследуемых группах больных не выявило рака молочной железы. Распределение больных по формам ФКБ представлено в таблице 1.

Таблица 1

Распределение больных по формам фиброзно-кистозной болезни в клинических группах

Форма ФКБ	Основная группа n=44	Группа сравнения n=58
Непролиферативная форма	38 (86,4 %)	52 (89,6 %)
Пролиферативная форма без атипии эпителия	5 (11,4 %)	5 (8,6 %)
Пролиферативная форма с атипией эпителия	1 (2,2 %)	1 (1,7 %)

С учетом полученных данных распределение больных по группам исследования было скорректировано – все пациентки, имеющие пролиферативные формы ФКБ, были сгруппированы в отдельную группу, для дальнейшего изучения экспрессии маркера

пролиферации Ki-67 в качестве эталона при пролиферативных формах ФКБ. Таким образом, в основной группе больных осталось 38 пациенток, в группе сравнения – 52 женщины.

При анализе экспрессии маркера пролиферации Ki-67 в тканевых срезах из материала, полученного непосредственно во время операции, было выявлено, что показатель относительной площади экспрессии антигена Ki-67 у больных с непролиферативной формой ФКБ, прооперированных с помощью ВИЛИ, не отличается от таковой у женщин из группы сравнения, и составляет $19,25 \pm 2,68$ % и $18,43 \pm 3,29$ % соответственно ($p < 0,05$).

В группе больных с пролиферативными формами ФКБ (эталонная группа) величина относительной площади экспрессии антигена Ki-67 в эпителиоцитах протоков и долек практически в 2 раза превышала аналогичные показатели больных с непролиферативными формами ФКБ и составила $33,67 \pm 1,4$ % против $18,43 \pm 3,29$ % ($p < 0,05$).

Оценку влияния на пролиферативную активность эпителия протоков и долек молочных желез типа режущего инструмента (скальпеля и ВИЛИ) исследовали отсрочено – через 6 месяцев от момента хирургического вмешательства путем стандартного гистологического и иммуногистохимического исследований биоптатов тканей молочных желез, прилежащих к послеоперационному рубцу (рис. 1).

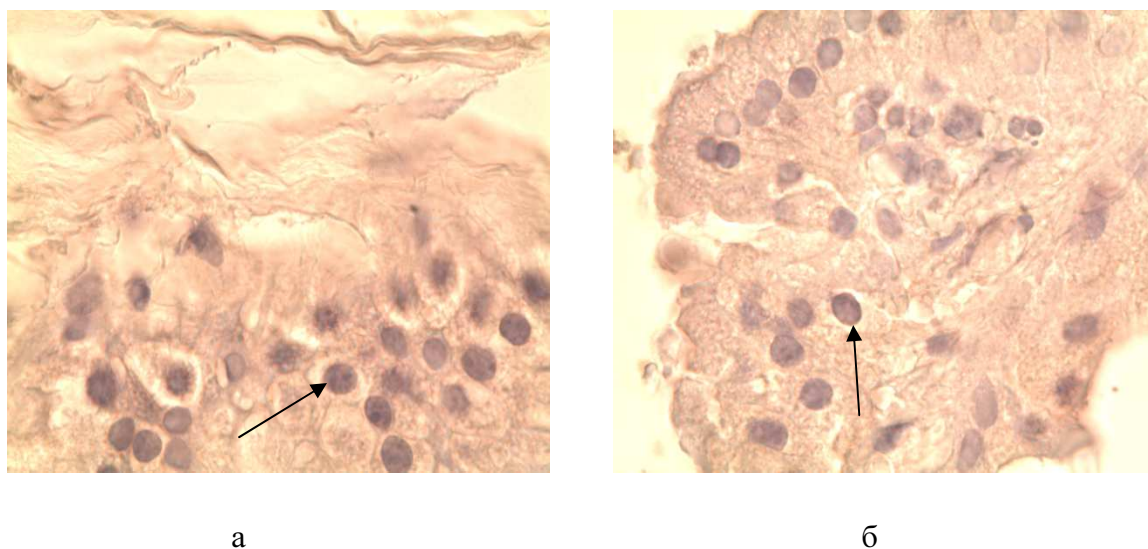


Рис. 1. Иммуногистохимическая реакция выявления ядерного антигена Ki-67 в тканях молочных желез, х 400 (а – непролиферативная форма ФКБ, микропрепарат пациентки К., основной группы до операции с использованием ВИЛИ, б – непролиферативная форма ФКБ, микропрепарат пациентки К., основной группы через 6 месяцев после операции с использованием ВИЛИ). Стрелки указывают на положительную реакцию к антигену Ki-67 в эпителии молочной железы.

Показатели относительной площади экспрессии антигена Ki-67 в ядрах эпителиоцитов долек и протоков на момент операции и спустя 6 месяцев после секторальной резекции молочной железы приведены в таблице 2.

Таблица 2

Показатели относительной площади экспрессии антигена Ki-67 в ядрах эпителиоцитов на момент операции и через 6 месяцев после секторальной резекции молочной железы

Сроки исследования	Величина относительной площади экспрессии антигена Ki-67 в ядрах эпителиоцитов, %		
	<i>Основная группа (1) n=38</i>	<i>Группа сравнения (2) n=52</i>	<i>Эталонная группа (3) (пролиферативная форма ФКБ) n=12</i>
На момент операции	19,25±2,68*	18,43±3,29*	33,67±1,4**
Через 6 месяцев после операции	20,17±3,59*	19,94±2,96*	34,22±2,57**

Примечание: * – $p_{1-2} > 0,05$, использован критерий Стьюдента, ** – $p_{1-3} < 0,05$, использован критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони.

Результаты исследования, представленные в таблице 2, свидетельствуют об отсутствии статистически значимых различий в показателях величины относительной площади экспрессии антигена Ki-67 в ядрах эпителиоцитов долек и протоков молочной железы как на момент операции, так и в отсроченные сроки наблюдения независимо от вида используемого режущего инструмента и формы фиброзно-кистозной болезни молочной железы – непролиферативной и пролиферативной ($p > 0,05$).

Таким образом, полученные в ходе исследования данные, позволяют нам сделать вывод об отсутствии влияния высокоинтенсивного лазерного излучения, генерируемого диодным лазером с длиной волны 805 нм, на пролиферативную активность эпителиоцитов долек и протоков молочной железы, т.е. ВИЛИ данного типа не обладает канцерогенным эффектом на ткани органа и может широко использоваться в хирургии молочной железы.

Список литературы

1. Ермилова В. Д. Опухоли и опухолеподобные процессы молочной железы // Руководство по патологоанатомической диагностике опухолей человека. – М., 1993. – Т. II. – С. 162-198.
2. Коган И. Ю. Гиперпластические процессы в молочных железах женщин (патогенез, диагностика, прогнозирование течения): Дисс. ... докт. мед. наук. – СПб., 2008. – 291 с.
3. Кушлинский Н. Е. Экспрессия молекулярно-биологических маркеров (Ki-67, PCNA, Vcl-2, VAX, VclX, VEGF) в опухолях молочной железы / Кушлинский Н. Е., Ориновский М. Б., Гуревич Л. Е. и др. // Бюл. Эксперим. Биологии и медицины. – 2004. – Т. 137. № 2. – С. 206-209.
4. Петров С. В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / Петров С. В., Райхлин Н. Т. – Казань: Татул, 2004.
5. Плетнев С. Д. Лазеры в клинической медицине. – М.: Медицина, 1996. – 432 с.
6. Семиглазов В. Ф. Мастопатия – угроза малигнизации? / Семиглазов В. Ф. // Terra Medica Nova. – 2005. – № 2. – С. 52-56.

Рецензенты:

Кулаев Иван Александрович – д.м.н, профессор кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО «ЧелГМА Минздравсоцразвития России», г. Челябинск.

Андриевских Игорь Аркадьевич – д.м.н., профессор, зав. кафедрой госпитальной хирургии ГБОУ ВПО «ЧелГМА Минздравсоцразвития России», г. Челябинск.