

## ЭПИТЕЛИАЛЬНО-СТРОМАЛЬНЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ В ПРОТОВОКОВОЙ КАРЦИНОМЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**М. В. Мнихович<sup>1, 2</sup>**

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», г. Москва,

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова  
Минздрава России

В настоящее время большинство научных работ сосредоточено на изучении эпителиально-стромальных взаимоотношений, играющих важную роль в прогрессии эпителиальных опухолей в сторону дедифференцированного фенотипа. Эпителиально-стромальные взаимодействия в протоковом раке молочной железы обуславливают его агрессивное биологическое поведение, резистентность к химиотерапевтическому лечению и различную выживаемость в зависимости от дифференцировки опухоли. Цель нашего исследования — изучение морфологических свойств анапластических участков опухоли и окружающей стромы при протоковой карциноме молочной железы. Гетерогенность протокового рака проявляется в появлении саркомоподобного или анапластического компонента, в котором прослеживается способность эпителиальных опухолевых клеток приобретать свойство мезенхимальных клеток, не требующих стромы и обладающих агрессивным злокачественным потенциалом.

**Ключевые слова:** протоковый рак, молочная железа, анапластический рак, эпителиально-мезенхимальная трансформация.

## RELATIONSHIPS BETWEEN EPITHELIAL AND STROMAL CELLS IN DUCTAL BREAST CARCINOMA

**M. V. Mnikhovich**

*FSBSI «Research Institute of Human Morphology», Moscow,*

*SFEE HPE «The Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU) of the Ministry  
of Public Health of the Russian Federation», Moscow*

An increasing number of studies have examined the relationships between epithelial and stromal cells which play a key role in determining a dedifferentiated phenotype of epithelial tumours. The relationships between epithelial and stromal cells in ductal breast cancer are responsible for its aggressive clinical course, resistance to chemotherapy and varying survival rates depending on tumour cell differentiation. The purpose of the present study is to evaluate morphological characteristics of the discrete loci within the tumour with evidence of anaplasia and the surrounding stroma in ductal breast cancer. The study showed that heterogeneity of ductal breast cancer manifests primarily in sarcoma-like or anaplastic component, in which epithelial-mesenchymal transition occurs. Mesenchymal cells with no stroma are considered to be potential precursors for aggressive cancer.

**Key words:** ductal cancer, mammary gland, anaplastic cancer, epithelial-mesenchymal transition.

В настоящее время взгляд ученых направлен на изучение эпителиально-стромальных взаимоотношений, играющих важную роль в прогрессии эпителиальных опухолей в сторону дедифференцированного, то есть более злокачественного фенотипа [2, 6, 12], при этом рак молочной железы не является исключением.

Рак молочной железы (РМЖ) является достаточно агрессивным заболеванием [3, 4]. Несмотря на существенный прогресс, достигнутый в изучении РМЖ и развитии подходов к его комбинированному лечению, выживаемость больных остается на низком уровне, также и страдает качество жизни пациентов [2, 12].

Одной из причин является выраженная десмопластическая реакция стромы опухоли, составляющая до 70—80 % объема опухолевой ткани [1, 3], проявляющаяся в гиперэкспрессии белков внеклеточного матрикса и пролиферацией миофибробластов [7, 11]. Ряд исследований подчеркивают важную роль развитой десмопластической стромы РМЖ в «защите» от хими-

отерапии опухоли и/или увеличении риска метастазирования опухолевых клеток [5, 18].

При РМЖ, так же как и при других опухолях, одному из ключевых моментов в прогрессии опухоли отводится эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) [1, 4, 14, 16]. На сегодняшний момент не подлежит сомнению тот факт, что эпителиально-мезенхимальный переход играет ключевую роль в опухолевой прогрессии и метастазировании. Запуск программы перехода дает клеткам явные преимущества, которые способствуют эффективной инвазии и метастазированию в удаленные органы и ткани. ЭМП является основным, хоть и не единственным механизмом, отвечающим за образование метастазов. Приобретая мезенхимальный фенотип, отдельные раковые клетки получают возможность проникать в окружающие ткани, а также преодолевать барьер эндотелия, поступая в кровеносные или лимфатические сосуды [14, 17]. ЭМП — это эволюционно закрепившийся процесс, связанный

с переходом от одноклеточных организмов к многоклеточным и обеспечивающий перемещение эмбриональных клеток, дающих начало новым специализированным тканям и органам. Однако при изменении условий существования тканей в постэмбриональном периоде, при воздействии повреждающих факторов, в процессе канцерогенеза возможна активация генетических программ ЭМП [14, 19].

Известно, что утрата полярности клеток в карциномах ведет к изменению их цитоскелета, при этом одним из признаков ЭМП является утрата клетками цитокератиновых промежуточных филаментов и приобретение виментиновых. ЭМП сопровождается изменением профилей транскрипции генов, в том числе компонентов цитоскелета и внеклеточного матрикса, а также протеолитических ферментов, участвующих в деградации последнего [4, 13]. Фенотипические изменения ЭМП включают снижение экспрессии белков эпителиальных маркеров (таких как E-кадгерин, десмоплакин и др.) и появление и/или усиление экспрессии белков мезенхимальных маркеров (виментин, фибронектин, гладкомышечный актин и др.) [9, 10, 15—18].

Изменение микроокружения и утрата полярности могут способствовать снижению дифференцировки опухолевых клеток [19], однако полной утраты тканеспецифических свойств никогда не происходит — при потере дифференцировки эпителиальные опухоли продолжают сохранять часть признаков исходной ткани и способность к редифференцировке [4]. Кроме того, в процессе утраты дифференцировки опухолевых клеток может происходить возобновление синтеза эмбриоспецифических белков, характерных для незрелых клеток [8, 11].

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение морфологических свойств анапластических участков опухоли и окружающей стромы при протоковой карциноме молочной железы.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Выполнен анализ операционного материала от 118 больных протоковым РМЖ, находившихся на лечении в медицинских учреждениях г. Москвы в период с 2009 по 2015 г. Возраст больных колебался от 40 до 80 лет. Средний возраст пациенток — 61 год.

Материал изучался с помощью световой и электронной микроскопии, а также с применением иммуногистохимических методик.

Материал для световой микроскопии фиксировали в 10%-м забуференном растворе формалина, затем заливали в парафин по обычной методике. Серийные парафиновые срезы толщиной 3 мкм депарафинировали по стандартной схеме, затем окрашивали гематоксилином и эозином. Для электронно-микроскопического исследования материал префиксировали в 2,5%-м растворе глутарового альдегида, постфиксировали в 1%-м растворе  $\text{OsO}_4$  (рН 7,4), заливали в смесь аралдита и эпона. Полутонкие срезы окрашивали смесью азура 2 и фук-

сина. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и изучали в трансмиссионном электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Германия).

Иммуногистохимическое исследование проводили на серийных парафиновых срезах толщиной 2 мкм по стандартной методике с применением следующей панели поликлональных антител: р63, гладкомышечный актин (ГМА), общий цитокератин, цитокератин 7, виментин, E-кадгерин (Dako, Lab Vision Flex). Интенсивность пероксидазной метки для каждого цитоплазматического оценивали полуколичественным методом с учетом интенсивности окрашивания и количества антиген-позитивных клеток. Иммуногистохимическая реакция оценивалась как негативная («—» — нет реакции), слабопозитивная («+» — <10 % окрашенных клеток), умеренная («++» — >10 % клеток средней интенсивности окраски) и выраженная («+++» — >50 % клеток высокой интенсивности окраски). Для проведения ИГХ-реакции применялась техника tissue microarrays (ТМА), сконструированная в формате multitumor arrays. Данная модель состояла из 24 образцов первичной опухоли от разных больных, при этом от одного больного использовались образцы с разной степенью дифференцировки опухолевых клеток. Таким образом, это позволило осуществить скрининг определенного молекулярного повреждения во всем разнообразии представленных опухолей с наименьшей затратой реактивов и времени. Для получения цветного изображения использовали сканер Mirax desk (Zeiss).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Макроскопически протоковый рак молочной железы имеет вид узла неправильной формы без четких границ, размерами от 2 до 10 см, на разрезе матового белесовато-серого или беловато-желтого цвета, плотноватой консистенции (рис. 1). Нередко в центре опухоли можно обнаружить очаги распада с формированием полостей различной формы.

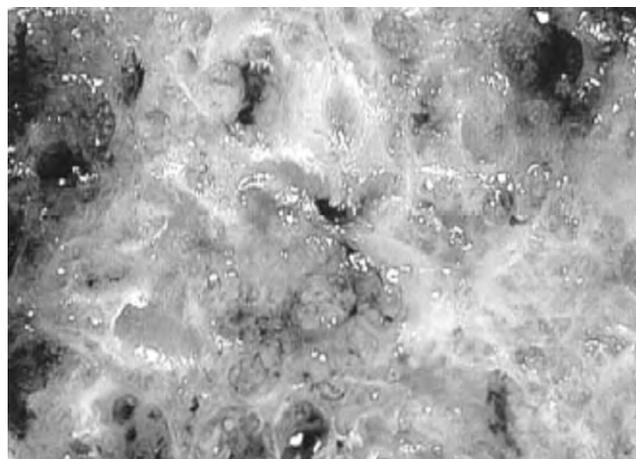


Рис. 1. Макроскопическая картина протокового рака молочной железы. Гетерогенность макроскопических проявлений

В результате цитологического исследования мазков-отпечатков с опухоли выявлены патогномичные цитологические признаки, характерные для протоковой карциномы молочной железы. Это группы мелких мноморфных клеток, часто формирующих «веерообразные» структуры вокруг тонких фиброваскулярных стержней, наличие в некоторых ядрах продольных борозд (рис. 2).

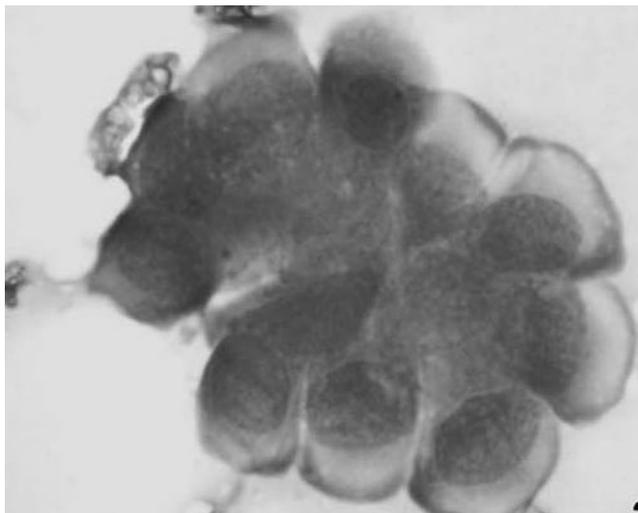
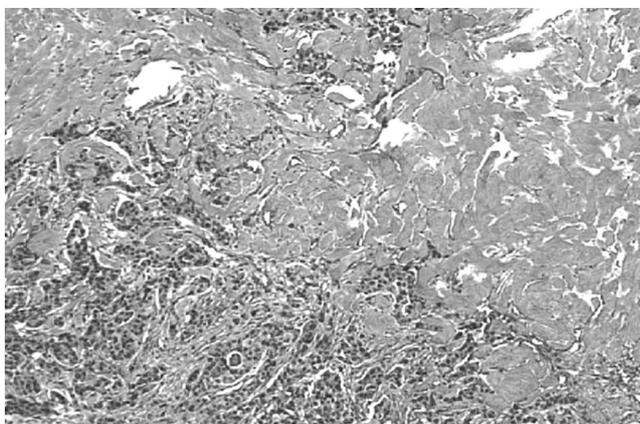


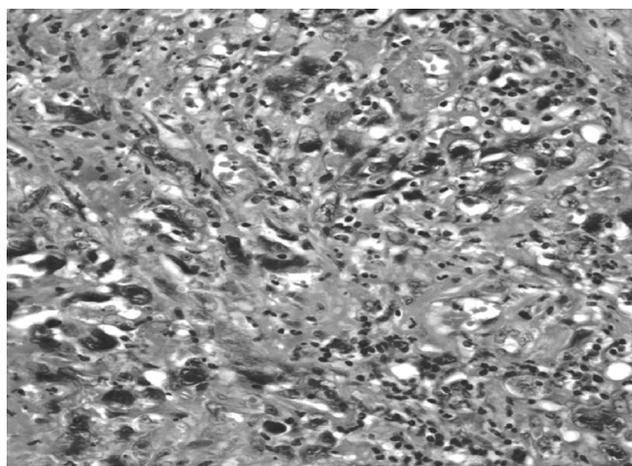
Рис. 2. Цитологическая картина протоковой карциномы молочной железы. Окраска по Паппенгейму, ув.  $\times 900$

Микроскопически в большинстве случаев, 78,8 % (93/118), опухоль представлена железистыми структурами неправильной формы, выраженной десмопластической реакцией стромы, как правило, занимающий большой процент площади опухолевой массы (от 50—80 %).

Однако в 21,2 % (25/118) случаев в классическом гистологическом варианте протокового РМЖ в опухоли наряду с железистыми структурами обнаружен анапластический (саркомо-подобный) компонент, представленный крупными полиморфными или веретенообразными клетками с гиперхромными ядрами, иногда многоядерными, с минимальным стромальным компонентом (рис. 3 а, б).



а)



б)

Рис. 3 а, б. Светооптическая характеристика протоковой карциномы молочной железы с наличием участков анапластического строения.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 100$

Объем анапластического компонента различался и составил от 5 до 20 % общей массы опухоли, но во всех случаях не являлся преобладающим.

При проведении ИГХ реакции обнаружены различия в экспрессии маркеров в железистом и анапластическом компонентах протокового РМЖ. Так, выраженная экспрессия гладкомышечного актина (+++) отмечена только в десмопластической строме, окружающей железистые структуры (рис. 4).

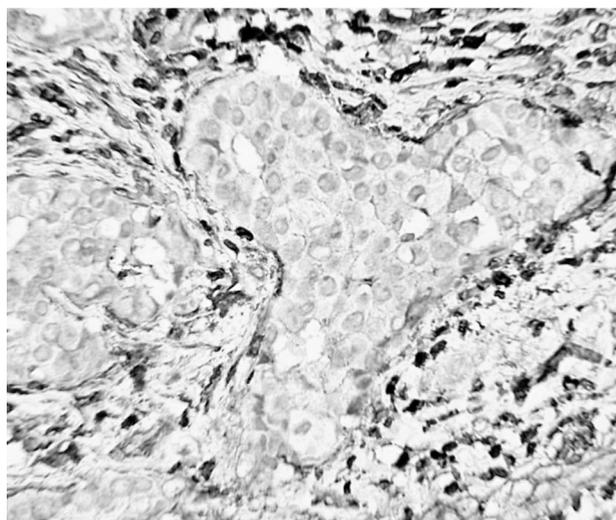


Рис. 4. Экспрессия актина в десмопластической строме протоковой карциномы МЖ. Иммуногистохимическая реакция. Ув.  $\times 100$

В опухолях с анапластическим компонентом также отмечена выраженная положительная реакция с ГМА, выявленная как в гладкомышечных волокнах, так и в единичных крупных анапластических опухолевых клетках. Помимо этого, как в строме, так и в эпителиальном анапластическом компонен-

те отмечена выраженная диффузная реакция с виментином (+++) (рис. 5), отсутствующая в железистых структурах (рис. 6).

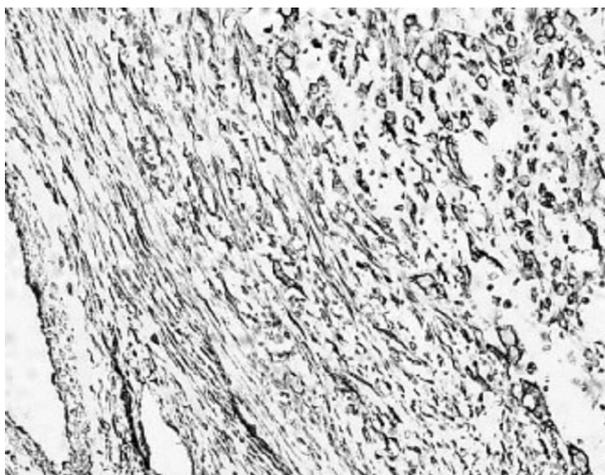


Рис. 5. Экспрессия виментина в недифференцированном компоненте. Иммуногистохимическая реакция. Ув.  $\times 100$

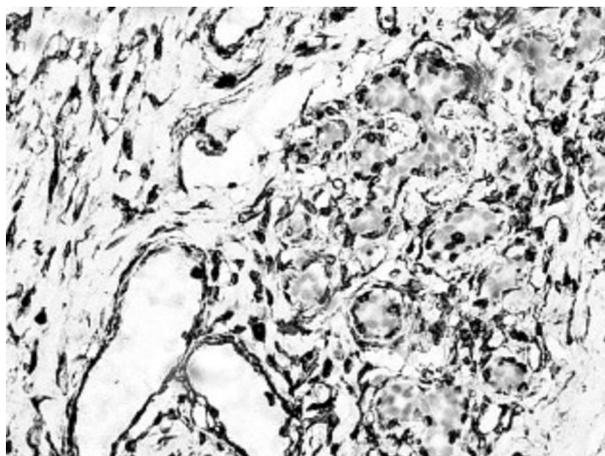


Рис. 6. Экспрессия виментина в железистом компоненте. Иммуногистохимическая реакция. Ув.  $\times 200$

Одновременно в отдельных анапластических клетках отмечалась потеря экспрессии общего цитокератина 7 при сохраненной экспрессии эпителиально-мембранного антигена.

В ядрах анапластических клеток отмечена положительная реакция с маркером базальных стволовых клеток р63. В опухолях без анапластического компонента процент окрашенных ядер с антителами к р63 был ниже и представлен единично окрашенными ядрами по периферии железистых структур. При раке молочной железы происходила редукция экспрессии белка Е-кадгерина и изменение полярности его экспрессии, а именно исчезновение мембранного окрашивания и появление цитоплазматического с разной степенью интенсивности (рис. 7).

В опухолевых клетках железистых структур РМЖ в 66,7 % (62 из 93 случаев) наблюдалось умеренно-выраженная (++) цитоплазматическая экспрессия дан-

ного белка; в 30,1 % (28/93) — выраженная цитоплазматическая (+++). Мембранная реакция наблюдалась только в 3,2 % (3/93) случаев. В анапластическом компоненте во всех случаях отмечена отрицательная как мембранная, так и цитоплазматическая экспрессия белка Е-кадгерина (рис. 8).

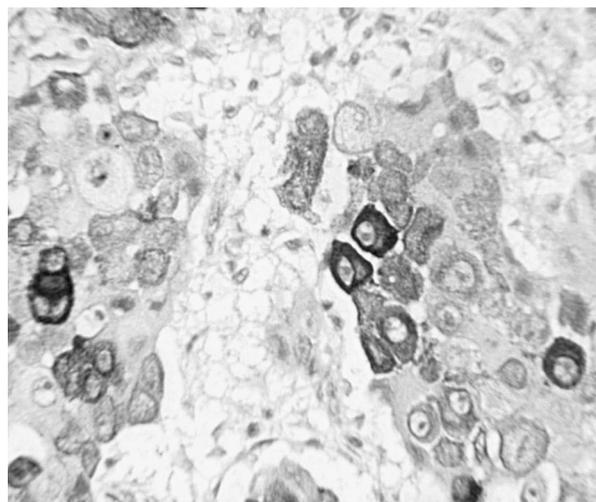


Рис. 7. Экспрессия белка Е-кадгерина в протоковом РМЖ. Иммуногистохимическая реакция. Ув.  $\times 100$

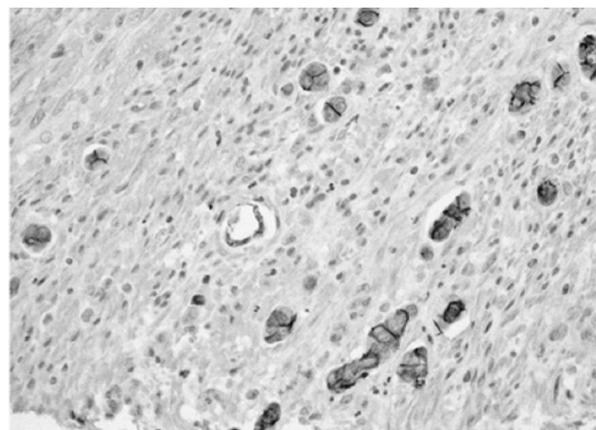


Рис. 8. Отрицательная мембранная и цитоплазматическая экспрессия белка Е-кадгерина в анапластическом компоненте протоковой карциномы МЖ. Иммуногистохимическая реакция. Ув.  $\times 200$

При электронно-микроскопическом исследовании материала клетки протоковой карциномы в анапластическом компоненте имели следующее строение: в цитоплазме многих опухолевых клеток содержались тонкие фибриллы, множественные вакуоли, мелкие везикулы. Встречалось много фибробластоподобных клеток. В строме обнаруживались беспорядочно расположенные тонкие коллагеновые волокна.

К клеточной мембране изнутри примыкает такое же тонкозернисто-волоконистое вещество, распространяющееся и вглубь цитоплазмы, между свободными рибосомами и цистернами цитоплазмы. Имея в виду связь рибосомного аппарата с синтезом белка,

можно представить себе, что эта ультраструктурная картина являются морфологическим выражением синтеза протофибрилл коллагена и их выведения за пределы клетки. Волокнистое вещество открывается как в цистернах цитоплазмы, так и между ними (рис. 9).

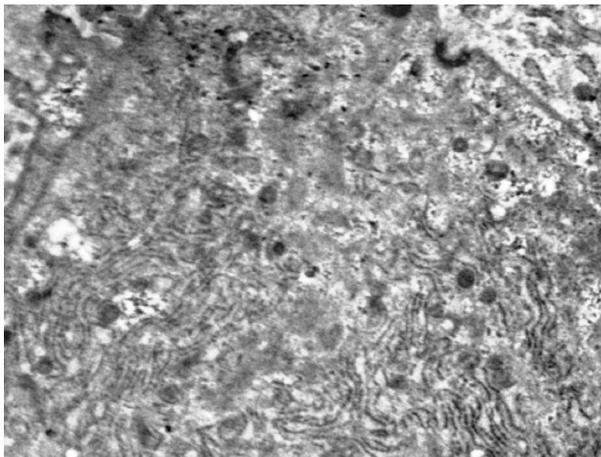


Рис. 9. Протофибриллы коллагена в цитоплазме опухолевой клетки протоковой карциномы МЖ. Электронограмма. Ув.  $\times 25000$

Следы волокнистого вещества открываются также и в пузырьках аппарата Гольджи, который может располагаться в непосредственной близости к клеточной мембране. Некоторые картины расположения цитоплазматических цистерн позволяют предполагать, что цистерны — цитоплазмы совместно с пузырьками аппарата Гольджи являются органом выведения волокнистого вещества из клетки. Также встречаются крупные светлые опухолевые клетки вытянутой формы, в цитоплазме которых определялось, кроме обычных органелл, большое количество миофибрилл. В отдельных участках можно видеть точечные зоны уплотнения. Клеточная мембрана в части клеток образовывала субплазмалеммальные уплотнения и базальную мембрану. Встречались пиноцитозные пузырьки (рис. 10).

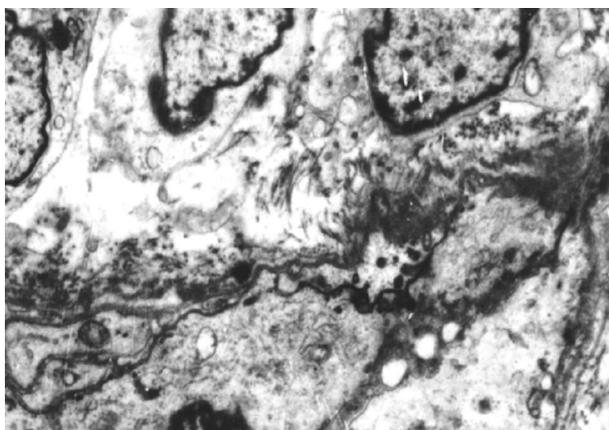


Рис. 10. Крупные светлые опухолевые клетки вытянутой формы, в цитоплазме которых отмечается большое количество миофибрилл. Электронограмма. Ув.  $\times 15000$

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Классический вариант протокового РМЖ по своей гистологической структуре — как правило, неоднородная опухоль, которая представлена полями различной дифференцировки от высокой до низкой, включая анапластический компонент. В исследуемой серии анапластический компонент присутствовал в 21,2 % (25/118) случаев. По нашему убеждению, его необходимо выделять даже при минимальном его объеме от общей массы опухоли, поскольку опухоли с анапластическим компонентом имеют не только различия в гистологическом строении, но и в злокачественном потенциале, а также по экспрессии эпителиальных, миоэпителиальных и мезенхимальных иммуно-гистохимических маркеров. Гистологически десмоплазия стромы, которая характерна для протокового

РМЖ, полностью отсутствует в анапластических участках. Опухолевые клетки, плотно располагаясь друг к другу, как бы создают «стромальный каркас» из самих себя. Кроме того, выявленная в анапластических клетках диффузная экспрессия с виментином, гладкомышечным актином и рб3 подтверждает, что в процессе потери дифференцировки опухолевые клетки приобретают миоэпителиальный и/или мезенхимальный фенотип. Данный факт, вероятно, связан с эпителиально-мезенхимальным переходом в опухоли, основными критериями которого являются утрата эпителиальной полярности, разделение на отдельные клетки и дисперсия при приобретении клеточной подвижности. При этом происходит разрушение плотных адгезионных контактов (редукция и изменение полярности экспрессии E-кадгерина) и реорганизация комплексов, обеспечивающих прикрепление клетки к субстрату. Однако частично сохраненная экспрессия цитokerатинов и эпителиально-мембранного антигена свидетельствует о сохранении цитокератиновых рецепторов и возможной обратной трансформации при изменении микроокружения. По данным некоторых авторов показано, что ингибирование трансформирующего фактора роста- $\beta$  в раке приводит к обратному мезенхимально-эпителиальному переходу и потере мезенхимального и восстановлению эпителиального фенотипа [9, 10, 13, 16, 17].

Таким образом, возрастающий интерес исследователей к эпителиально-стромальным взаимодействиям в протоковом РМЖ обусловлен его агрессивным биологическим поведением, резистентностью к химиотерапевтическому лечению и различной выживаемостью в зависимости от дифференцировки опухоли. Гетерогенность протокового рака проявляется в появлении анапластического (саркомоподобного) компонента, в котором прослеживается способность эпителиальных опухолевых клеток приобретать свойство мезенхимальных клеток, не требующих стромы и обладающих агрессивным злокачественным потенциалом, влияющим на выживаемость больных.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Василенко И. В. Морфологические особенности зоны паренхиматозно-стромальных контактов в раке

легкого с эпителиально-мезенхимальной трансформацией / И. В. Василенко, Р. Б. Кондратюк, Б. Б. Брук // Клинич. и эксперим. морфология. — 2013. — № 4. — С. 18—21.

2. *Вторушин С. В.* Клинико-морфологические особенности мультицентрического роста и рецидивирования при раке молочной железы: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. — Томск, 2011.

3. Взаимосвязь морфологической гетерогенности инфильтрирующего протокового рака молочной железы с различными формами опухолевой прогрессии / В. М. Перельмутер [и др.] // Сиб. онкол. журн. — 2007. — № 3. — С. 58—64.

4. *Мнихович М. В.* Межклеточные и клеточно-матричные взаимодействия в опухолях: современное состояние проблемы / М. В. Мнихович // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. — 2013. — № 3. — С. 161—171.

5. *Перельмутер В. М., Завьялова М. В., Вторушин С. В., Слонимская Е. М., Савенкова О. В.* Взаимосвязь морфологической гетерогенности инфильтрирующего протокового рака молочной железы с различными формами опухолевой прогрессии // Сибирский онкологический журнал. — 2007. — № 3. — С. 58—64.

6. *Alguacil G., Weiland L.* The histologic spectrum, prognosis, and histogenesis of the sarcomatoid carcinoma of the breast // *Cancer*. — 1977. — Vol. 39. — P. 1181—1189.

7. Capabilities of immunohistochemical method in predicting the course of mammary gland cancer / Mníchovich M., Ben Ammar M. A. Kakfursky L. // *Virchows Arch*. — 2015. — Vol. 467 (Suppl I). — P. 1340—1341

8. American Society of Clinical Oncology 2007 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer / L. Harris, et al. // *J. Clin. Oncol.* — 2007. — Vol. 25, № 33. — P. 5287—5312.

9. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells / E. Batlle, et al. // *Nat Cell Biol.* — 2000. — Vol. 2, № 2. — P. 84—89.

10. E-cadherin is a tumor/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers / G. Berx [et al.] // *EMBO J.* — 1995. — Vol. 14. — P. 6107—6115.

11. Mammalian diaphanous-related formin Dial controls the organization of E-cadherin-mediated cell-cell junctions /

L. Carramusa [et al.] // *J Cell Sci.* — 2007. — Vol. 120. — P. 3870—3882.

12. *Dabbs David J.* Brest Pathology / David J. Dabbs. — London: Elsevier, 2012.

13. Multiple ways of silencing E-cadherin gene expression in lobular carcinoma of the breast / S. Droufakou [et al.] // *Int J Cancer*. — 2001. — Vol. 92. — P. 404—408.

14. *Hay E. D.* An overview of epithelio-mesenchymal transformation / E. D. Hay // *Acta Anat (Basel)*. — 2005. — Vol. 154, № 1 — P. 8—20.

15. Detektion of Luse bodies in sklerosizing adenosin of breast: an ultrastruktural study / M. Mníchovich [et al.] // *Virchows Arch*. — 2011. — Vol. 459 (Suppl. 1). — P. 329.

16. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators Snail, SIP1, and Twist in gastric cancer / E. Rosivatz [et al.] // *Am J Pathol.* — 2012. — Vol. 161. — P. 1881—1891.

17. *Vorozbieva T., Mníchovich M., Ben Ammar M. A. Kakfursky L.* Pathogenetic regularities of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer carcinomas // *Virchows Arch*. — 2015. — Vol. 467 (Suppl I). — P. 1—527.

18. The presence of alveolar structures in invasive ductal NOS breast carcinoma is associated with lymph node metastasis / M. V. Zavyalova [et al.] // *Diagnostic Cytopathology*. — URL: DOI: 10.1002/dc.21852.

19. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition / B. P. Zhou [et al.] // *Nat Cell Biol.* — 2004. — Vol. 6, № 10. — P. 931—940.

## Контактная информация

**Мнихович Максим Валерьевич** — к. м. н., ведущий научный сотрудник центральной патологоанатомической лаборатории Научно-исследовательского института морфологии человека, доцент кафедры патологической анатомии и клинической патологической анатомии № 2 ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова» Минздрава России, Российская Федерация, Москва, e-mail: mnichmaxim@yandex.ru