

МИКРООКРУЖЕНИЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ КАРЦИНОМАХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ХАРАКТЕР И ВАРИАНТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ (УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

М. В. Мнихович

*Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва,
Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова*

В данной работе проведено изучение ультраструктурных особенностей взаимодействия опухолевых клеток рака молочной железы с микроокружением. Показано, что среди клеточного микроокружения преобладали клетки гематогенного происхождения и мезенхимального (фибробласты). Полученные в работе данные об особенностях морфофункционального состояния опухолевых клеток в условиях различного микроокружения имеют значение для понимания процессов межклеточного взаимодействия и закономерностей опухолевого роста. Микроокружение опухоли имеет важное значение для регуляции состояния опухолевых клеток.

Ключевые слова: рак молочной железы, межклеточные взаимодействия, клеточное микроокружение, ультраструктура, опухоль, строма.

MICROENVIRONMENT OF TUMOUR CELLS IN BREAST CANCER: NATURE AND TYPES OF INTERACTION (ULTRASTRUCTURAL STUDY)

M. V. Mnikhovich

We studied the ultrastructural features of the interaction of tumour cells of breast cancer with their microenvironment. We demonstrated that cells of hematogenous and mesenchymal origin (fibroblasts) prevailed in cellular microenvironment. The obtained findings on the morphofunctional state of tumor cells in various microenvironments are important for understanding the processes of intercellular interactions and patterns of tumor growth. Tumour microenvironment is essential for the regulation of tumor cell condition.

Key words: breast cancer, cell-cell interactions, cellular microenvironment, ultrastructure, tumour, stroma.

К факторам стромального микроокружения относятся: неопухолевые клетки: эндотелиальные, перициты, гладкомышечные, фибробласты, миофибробласты; внеклеточные молекулы (неклассические элементы стромы): молекулы адгезии, факторы роста, гормоны, протеазы и другие ферменты, метаболиты; — внеклеточный матрикс (ВКМ): элементы соединительной ткани, включающие коллагеновые, эластические и аргирофильные волокна, а также нервы. ВКМ является своеобразным каркасом опухоли, в пределах которого осуществляется взаимодействие опухолевых и неопухолевых клеток [2, 3]. Факторы стромального микроокружения в своей совокупности являются стромой опухоли, подобной имеющейся в любом паренхиматозном органе строме. Она состоит из элементов соединительной ткани с расположенными в ней клетками и волокнами, а также проходящими кровеносными и лимфатическими сосудами [3].

В морфоанатомическом аспекте к клеткам стромы относятся и иммунокомпетентные клетки. Однако при рассмотрении микроокружения опухолевых клеток иммунокомпетентные клетки целесообразно представить отдельно, учитывая их важное значение для роста опухоли и ее прогрессии [9]. Согласно гипотезе Dvorak и соавт. (2011), можно считать, что подобно нормальным тканям опухоли состоят из двух дискретных интерактивных компартментов — паренхимы и стромы.

В новообразованиях опухолевые клетки являются паренхимой, а строма состоит из смеси неопухоле-

вых клеток и элементов соединительной ткани [5]. Формирование стромы опухоли во многом сходно с наблюдающимся при заживлении ран, но последнее обычно самолимитировано, тогда как рост опухоли и формирование стромы опухоли не ограничены во времени. Фактически, строма опухоли сравнима с «раной, которая никогда не заживает». Стромальные элементы включают кровеносные и лимфатические сосуды, а также фибробласты и клетки воспаления [2, 4, 9]. Кроме того, строма содержит различные внеклеточные макромолекулы, которые служат для обеспечения структурной поддержки, в том числе коллаген, фибронектин, фибрин, различные протеогликаны и гиалуронат [1, 6, 7]. В настоящее время стромальное микроокружение опухолевых клеток постепенно становится одним из главных объектов исследований в области онкологии и ключевой темой на многих научных форумах [10]. Liotta и Kohn (2001), вероятно, первыми в XXI в., богатом достижениями молекулярной биологии, высказали точку зрения, что злокачественность является результатом взаимодействия элементов микроокружения опухоли и организма, в котором последний участвует в индукции, селекции и экспансии неопластических клеток.

В 2005 г. Zigrino и соавт. опубликовали работу, в которой определили значительную роль взаимодействия опухолевых клеток с элементами стромы во время опухолевой прогрессии, сфокусировав внимание на способности клеток новообразования модифицировать стро-

му путем изменения прилегающей соединительной ткани и модулирования клеточного метаболизма хозяина. В таких условиях формируется строма, которая является «более комфортной» для реализации агрессивного потенциала опухолевых клеток. В том же году появилась работа Sivridis и соавт., в которой был предложен новый термин — «строматогенез», подразумевающий формирование в опухоли новой стромы под влиянием опухолевых клеток. Важным является тот факт, что в уникальный процесс вовлекаются перитуморальные фибробласты хозяина. Опухолевые клетки при этом индуцируют активацию фибробластов и эндотелиальных клеток, обуславливая тем самым строматогенез [5]. Активированные фибробласты стимулируют образование новых кровеносных сосудов и способствуют глубокой трансмуральной инвазии опухолевых клеток. Опухолевые клетки могут «проживать» в строме и модифицировать ее, изменять окружающую соединительную ткань и модулировать метаболизм резидентных клеток, приводя, таким образом, к формированию стромы, наиболее выгодной для их выживания [4, 9].

Изучение межклеточных взаимоотношений — одна из наиболее актуальных проблем морфологии. От ее решения зависит понимание многих вопросов, касающихся процессов роста и развития, дифференцировки, регенерации, канцерогенеза и др. В рамках проблемы межклеточных взаимоотношений особое место занимает исследование состояния опухолевых клеток в зависимости от микроокружения [2].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение ультраструктурных особенностей взаимодействия опухолевых клеток рака молочной железы с микроокружением.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучен оперативно удаленный материал от 86 женщин, по поводу рака молочной железы (РМЖ). Морфологически верифицирован — инфильтрирующий протоковый рак. Возраст больных составил от 29 до 76 лет. Материал подбирался таким образом, что пациентки не получали до операции никакого специфического лечения. Для электронно-микроскопического исследования материал префиксировали в 2,5%-м растворе глутарового альдегида, постфиксировали в 1%-м растворе OsO_4 (pH 7,4), заливали в смесь аралдита и эпоня. Полутонкие срезы окрашивали смесью азура 2 и фуксина. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и изучали в трансмиссионном электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Среди клеточного микроокружения преобладали клетки гематогенного происхождения и мезенхимального (фибробласты) (рис. 1). В опухолевом микроокружении часто встречались лимфоциты (Лф) со светлой

цитоплазмой, широкими отростками, мелкозернистым веществом на клеточных поверхностях. Лф контактируют с опухолевыми клетками отростками с исчезновением смежных цитоплазматических мембран (рис. 2). Тонкие отростки опухолевых клеток, проникая в цитоплазматический матрикс Лф, способны сохранять собственную цитоплазматическую мембрану.

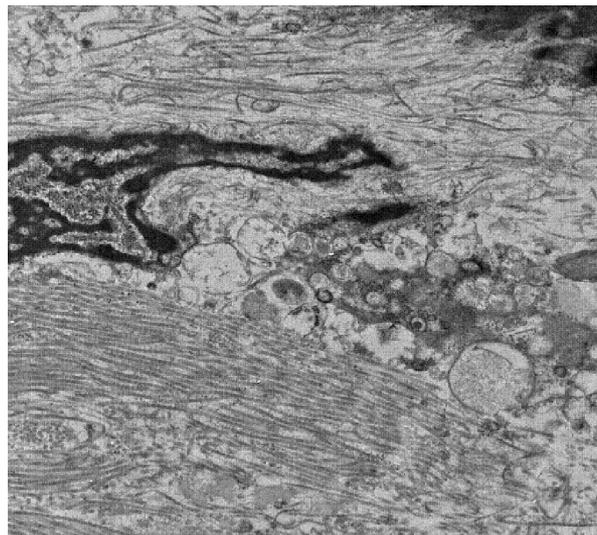


Рис. 1. Фибробласт в клеточной микроокружении. Контрастирование цитратом свинца и уранилацетатом; $\times 5000$

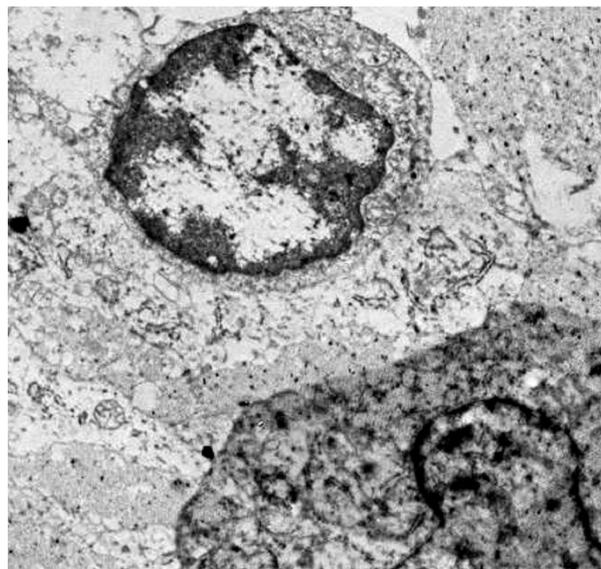


Рис. 2. Лимфоцит в опухолевом микроокружении при раке молочной железы. Контрастирование цитратом свинца и уранилацетатом; $\times 5000$

Тучные клетки (ТК), расположенные среди опухолевых клеток (рис. 3), контактируют с ними отростками и сложенными участками клеточных поверхностей. В местах контактов четкость цитоплазматических мембран взаимодействующих клеток исчезает. В цитоплазме ТК просматриваются микрофибриллы, рибосомы,

сгруппированные вокруг окруженных мембраной крупных гранул с мелкозернистым плотно упакованным содержимым, пустые гранулы, гранулы с разорванными мембранами и выброшенными в цитоплазму мелкими зернами и микровезикулами, гранулы с мелкозернистым содержимым в отростках и рядом с клеткой, гранулы с мелкозернистым содержимым и нечеткими контурами мембран (рис. 4).

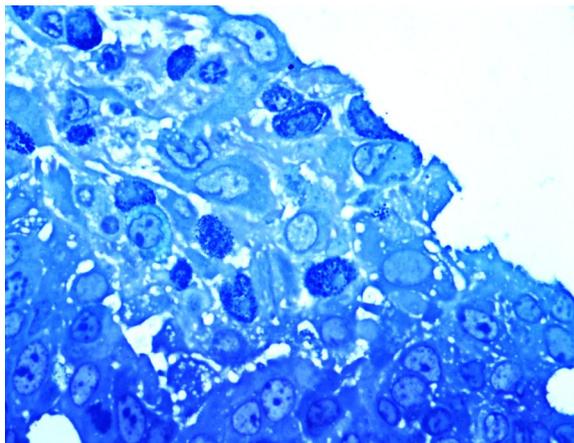


Рис. 3. Популяция тучных клеток в опухолевой ткани. Полутонкий срез. Окраска азуром и эозином. $\times 200$

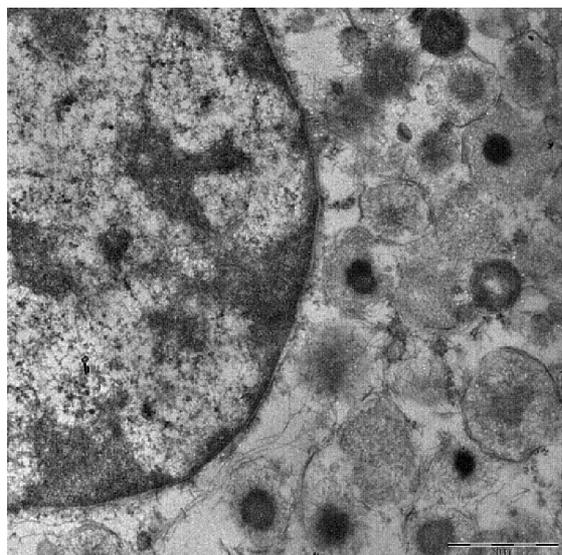


Рис. 4. Ультраструктура тучной клетки при раке молочной железы. Контрастирование цитратом свинца и уранилацетатом; $\times 5000$

Нейтрофилы (НЛ), взаимодействуя с опухолевыми клетками, короткими отростками нарушают целостность базальной мембраны опухолевых клеток. В свою очередь, тонкие отростки опухолевых клеток, меняя структуру собственной базальной мембраны, вплотную прилегают к поверхностям НЛ. В местах межклеточных контактов теряется четкость контуров смежных цитоплазматических мембран. В цитоплазме НЛ определяются небольшого размера округлые и овальные гранулы, крупные гранулы с микровезикулами и пластинчатыми структурами и маленькие плотные гранулы которые концентрируются в ци-

топлазме у мест плотных, с помощью отростков, контактов НЛ с опухолевыми клетками.

Макрофаги (МФ), локализованные среди опухолевых клеток, отличаются обилием лиосом в цитоплазме. Контакты МФ с опухолевыми клетками плотные на значительных протяжениях (рис. 5). Кроме формирования контактов МФ с опухолевыми клетками, МФ формируют ассоциативные контакты с лимфоцитами (Лф-МФ), а также более сложные контакты МФ-Лф-опухолевая клетка и Лф-МФ-опухолевая клетка (рис. 6).

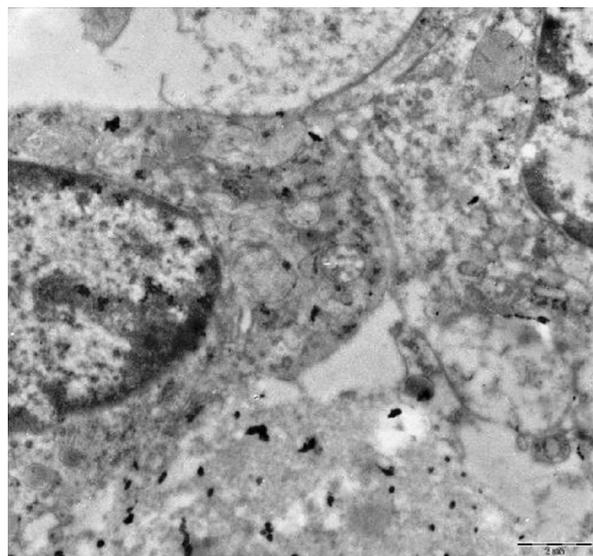


Рис. 5. Контакт макрофага с опухолевой клеткой. Контрастирование цитратом свинца и уранилацетатом; $\times 8000$

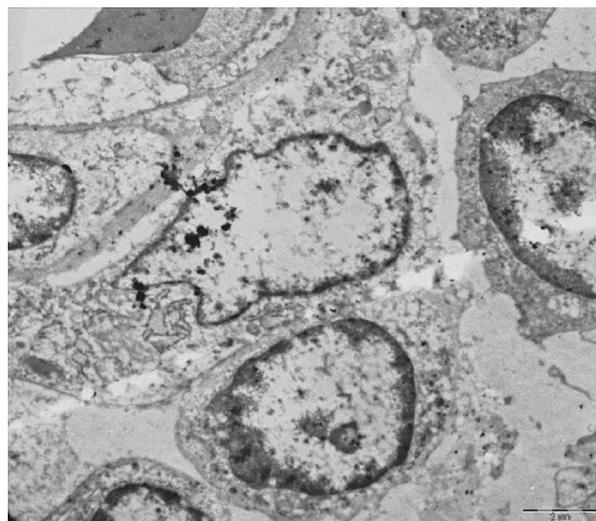


Рис. 6. Сложные комплексы макрофаг-лимфоцит-опухолевая клетка. Контрастирование цитратом свинца и уранилацетатом; $\times 5000$

Плазмоциты (Пл), в местах плотных контактов с отростками опухолевых клеток теряют четкость цитоплазматических мембран. В прилежащем к контактному зонам цитоплазматическом матриксе Пл исчезают органеллы и включения. За просветленными участками следуют

зоны расширенных канальцев ГЭР с полисомальными розетками вокруг отдельных канальцев. Канальцы ГЭР заполнены зернистым материалом, зернистым материалом с микровезикулами. Кроме системы ГЭР, в цитоплазме Пл просматриваются структуры ПК, электронно-плотные округлые включения, тончайшие микрофибриллы и полисомальные розетки в пространствах свободных от канальцев, крупные вакуоли с везикулами, аморфными серыми массами, плотными включениями, раздутые митохондрии с фрагментами крист. Между прилегающими друг к другу Пл имеются узкие межклеточные щели с микровезикулами. Микровезикулы концентрируются и у внутренних оболочек цитоплазматических мембран плазматических клеток (рис. 7).

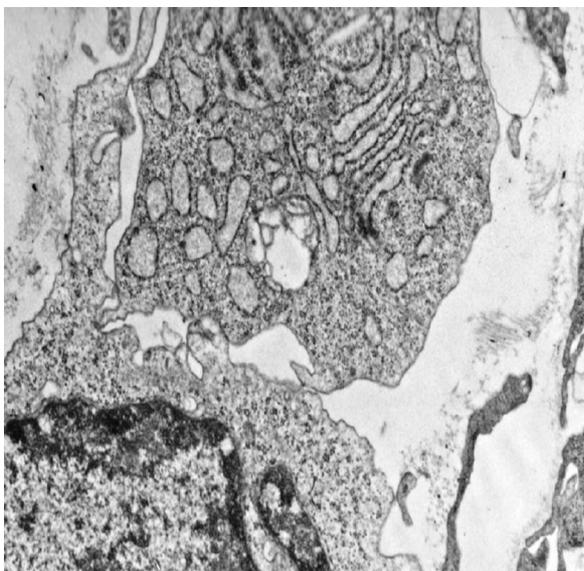


Рис. 7. Расширение ГЭС плазмочита. Контрастирование цитратом свинца и уранилацетатом; $\times 8000$

Пл формируют контакты с фибробластами (Фб), вклиниваясь своими отростками между отростками Фб (рис. 8). Фибробласты, контактирующие с Пл, имеют по два-три широких отростка, светлые округлые, овальные ядра с узкой полоской хроматина вдоль внутренней оболочки ядерной мембраны, содержат в цитоплазме типичный набор органелл и плотные включения округлой, овальной формы. Вокруг включений группируются, выстраиваются в цепочки везикулы. Они же встречаются в межклеточных пространствах.

Следует отметить, что в цитоплазматическом матриксе не всегда прослеживается избытие канальцев ГЭР. Видимые узкие профили канальцев содержат мельчайшую, неплотно упакованную зернистость. В цитоплазме Фб просматриваются микрофибриллы, зоны микрофибрилл, ориентированных друг относительно друга хаотично. Между Фб и Пл можно видеть узкие прослойки коллагеновых волокон на фоне мелкозернистого межклеточного материала. Фб с выраженной коллагенообразовательной активностью, располагаются группами, контактируют отростками, клеточными поверхностями

с сохранением контуров цитоплазматических мембран, взаимодействуют между собой.

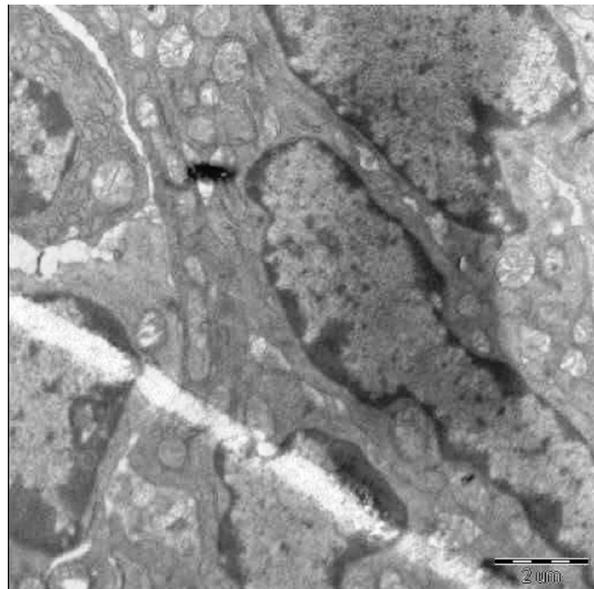


Рис. 8. Фибробласт контактирует с опухолевой клеткой. Контрастирование цитратом свинца; $\times 5000$

Среди Фб, отличающихся обилием канальцев ГЭР, микровезикул по всей цитоплазме и микровезикул у поверхностей цитоплазматических мембран отростков, локализованы нейтрофильные и базофильные лейкоциты. Микровезикулы отходят непосредственно от канальцев эндоплазматического ретикулума, выстраиваются в цепочки и открываются во внеклеточные пространства, наработанные субстанции выбрасываются из открывающихся в межклеточные пространства широких канальцев эндоплазматического ретикулума (рис. 9).

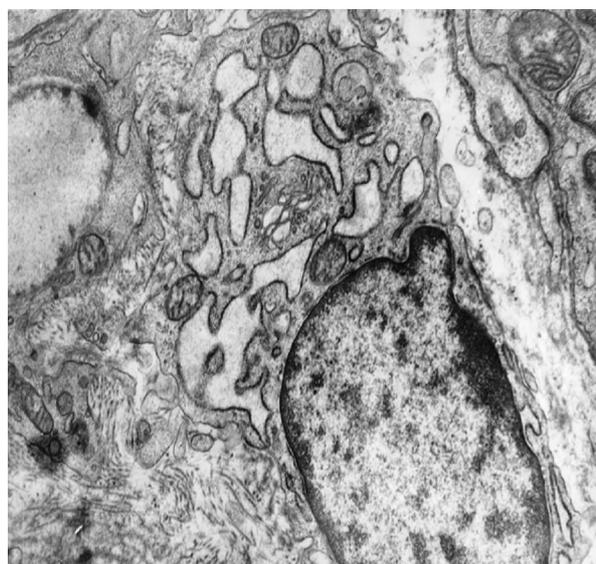


Рис. 9. Функционально активный фибробласт в опухолевом микроокружении. Контрастирование цитратом свинца и уранилацетатом; $\times 5000$

Контакты Фб формируют с помощью отростков. Между клеточными поверхностями с четкими мембранами остаются узкие щели, заполненные зернистым межклеточным матриксом и микровезикулами. В цитоплазме — тончайшие короткие волокна, мельчайшая зернистость. Подобные по строению короткие волокнистые структуры выбрасываются из открывающихся в межклеточные пространства широких канальцев эндоплазматического ретикулума (рис. 10).

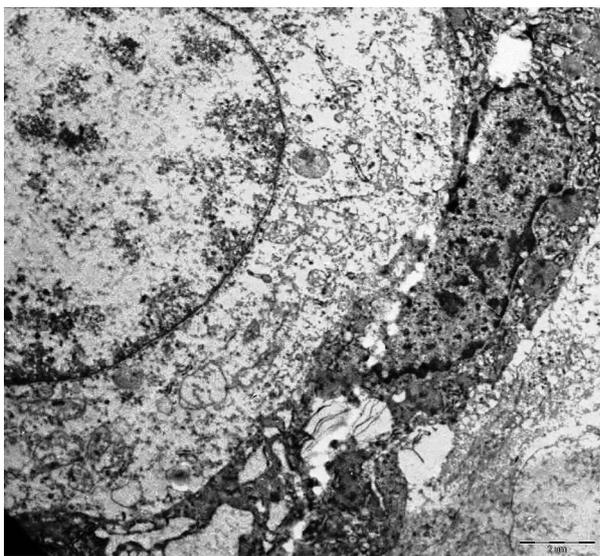


Рис. 10. Фибробласт в опухолевом микроокружении. Контрастирование цитратом свинца; х 2500

Расположенные среди опухолевых клеток Лф, нейтрофильные и базофильные лейкоциты, Мф, Пл и ТК формируют разнообразные клеточные ассоциации. Контакты между клетками осуществляются с помощью цитоплазматических отростков и короткими, плотно прилегающими фрагментами смежных цитоплазматических мембран. В данной структурно-функциональной единице тонкий отросток опухолевой клетки устремлен к поверхности Мф, а Лф, лежащий между атипичным эпителиоцитом и Мф, с первым контактирует коротким отростком, со вторым отростками, глубоко внедряющимися в цитоплазматический матрикс Мф. Цитоплазматическая мембрана Мф в месте контакта с глубоко внедрившимся в цитоплазму отростком Лф исчезает. В цитоплазме Мф, вблизи верхушки отростка Лф, просматриваются мельчайшие везикулы и расходящиеся веерообразно тончайшие микрофибриллы. В подобном случае межклеточный матрикс, вокруг опухолевых клеток и в узких межклеточных щелях, значительно просветлен.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в работе данные об особенностях морфофункционального состояния опухолевых клеток в условиях различного микроокружения имеют значение для понимания процессов межклеточного взаимодействия и закономерностей опухолевого роста. Микроокружение имеет важное значение для регуляции состояния опухолевых клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берштейн Л. М. Гормональный канцерогенез. — СПб.: Наука, 2000. — 199 с.
2. Мнихович М. В. Экстрацеллюлярный матрикс, ангиогенез и клеточное микроокружение при дисгормональных гиперплазиях, фиброаденомах и раке молочной железы (световое и электронно-микроскопическое исследование) Российский медико-биологический вестник им. акад. И. П. Павлова. — 2010. — № 1. — С. 30—37
3. Коган И. Ю., Мясникова М. О. // Журн. акушерских и женских болезней. — 2007. — Т. 56 (Спец. вып.). — С. 159.
4. Крючков А. Н. Роль структурных изменений фибробластов в патогенезе фиброза в ткани рака молочной железы / А. Н. Крючков // Тез. конф. «Новые методы и разработки в онкоморфологии» / под ред. Н. Н. Петровичева, Е. А. Мороз, Д. Л. Ротина. — М., 2005. — С. 93—95.
5. Шварцбург П. М. // Вопросы онкологии. — 2006. — Т. 52. — № 2. — С. 137—144.
6. Яглова Н. В. Яглов В. В. // Клиническая и экспериментальная морфология. — 2012. — № 2. — С. 36—40.
7. Bozzuto G., Ruggieri P., Molinari A. // Ann. Ist. Super Sanita. — 2010. — Vol. 46, № 1. — P. 66 — 80.
8. Dabbs David J. // Brest Pathology. — 2012. — P. 1—800;
9. Ervasti J. M., Campbell K. P. // Journal of Cell Biology. — 1993. — Vol. 122. — P. 809—823. (40)
10. Mnikhovich M., Kakturskiy L. // Virchows Archiv — Vol. 461, Supplement 1, September 2012. — P. 243—244.

Контактная информация

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