

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГИНЕКОМАСТИИ

М. В. Мнихович^{1,2,3}, М. А. Бен Аммар³, Е. П. Куликов³, Д. А. Жаkota²

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека»,
г. Москва,

²ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н. И. Пирогова» Минздрава России, г. Москва,

³ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова», г. Рязань

В данной работе, на основании световой, электронной микроскопии и иммуногистохимического анализа, представлены патоморфологическая и молекулярно-биологическая характеристика различных форм гинекомастии.

Ключевые слова: грудная железа, гиперплазия, мужчина, гинекомастия, клиника, морфология.

PATHOMORPHOLOGICAL AND MOLECULOBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF GYNECOMASTIA

M. V. Mnihovich^{1,2,3}, M. A. Ben Ammar³, E. P. Kulikov³, D. A. Zhakota²

¹FGBNU «Scientific-Research Institute of Human Morphology»
Moscow, Russia,

²GBOU HPE «Russian National Research Medical University. Pirogov» Russian Ministry of Health,
Moscow, Russia,

³GBOU VPO «Ryazan State Medical University. Acad. Pavlov», Ryazan, Russia

This paper presented a pathological and moleculobiological profile of various forms of gynecomastia on the basis of light, electron microscopy and immunohistochemical analysis findings.

Key words: breast hyperplasia, male, gynecomastia, clinic, morphology.

По определению ВОЗ ГМ считают дисгормональный гиперпластический процесс, характеризующийся широким спектром пролиферативных и регрессивных изменений ткани молочной железы с ненормальным соотношением эпителиального и соединительно-тканного компонентов [3, 6, 13].

Патология молочных желез у мужчин встречается значительно реже, чем у женщин. Как и у женщин, патологию молочной (грудной) железы можно разделить на доброкачественную и злокачественную. Среди доброкачественных опухолей наиболее частой является гинекомастия (ГМ).

Интерес специалистов к ГМ связан с тем, что данный процесс является фоновым для последующего возникновения и развития рака грудной железы, и частота развития рака молочной железы у лиц с ГМ в 3—5 раз выше, чем в популяции в целом. К этиологическим моментам возникновения ГМ относят: состояние затяжного стресса (неудовлетворенность семейным положением, бытовые конфликты, конфликтные ситуации на работе, неблагоприятные сексуальные факторы), изменения в эндокринной системе (гиперэстрогению, что часто связано с хронической печеночной недостаточностью вследствие алкоголизма). ГМ часто сопутствует различным физиологическим расстройствам в мужском организме. Наиболее распространенными факторами риска являются период полового созревания, возрастные тестикулярные расстройства, побочное действие лекарственных препара-

ратов [7, 9, 10, 12—15]. Вероятность развития идиопатической ГМ возрастает с увеличением массы тела и толщины подкожного жирового слоя. ГМ может быть вызвана сопутствующими заболеваниями: пролактиномой гипофиза, синдромом полной и частичной нечувствительности к андрогенам, неврологическими нарушениями, ожирением, заболеваниями печени, тиротоксикозом, дефицитом 17-гидроксистероид-редуктазы, синдромом Кляйнфельтера, опухолями печени, надпочечников и яичек (клеток Сертоли и Лейдига), диабетом, трисомией 4-й хромосомы [12]. ГМ может быть опосредована мутацией гена, кодирующего ароматазу, что приводит к повышенной активности этого фермента. Имеются также сведения о том, что ГМ передается по аутосомно-доминантному принципу. К ГМ приводят кастрация и функциональный препубертатный гипогонадизм. Она развивается также при лечении высокими дозами эстрадиола, антиэстрогенами, кетоконазолом, циклоспорином А, циметидином, метотрексатом, фенотиазанами, трициклическими антидепрессантами, антиандрогенами, спиронолактоном, нейролептическими средствами [4]. ГМ встречается у 21—34 % спортсменов, употребляющих стероидные анаболики, причем вероятность развития опухоли выше при хроническом употреблении больших доз анаболиков [14].

В клинике различают 2 формы ГМ: диффузную и узловую.

Основываясь на этиологических факторах, выделяют 5 форм ГМ:

- физиологическую (ювенильную, пубертатного и старческого возраста);
- эндокринную (при гипогонадизме, гипотиреозе, опухолях яичка, надпочечников);
- не эндокринную;
- медикаментозную (при приеме эстрогенов, тестостерона, андрогенов и т.д.);
- идиопатическую.

По мнению различных авторов, патология развивается в пределах протоково-дольковой единицы. Участки фиброзной ткани сочетаются с кистозными полостями; кисты выстланы атрофическим, уплотненным эпителием, или эпителием, подвергшимся апокринной метаплазии.

В соответствии с морфологическими критериями выделяют пролиферативную и непролиферативную формы дисплазии. Считается, что степень риска развития рака молочной железы нарастает в зависимости от выраженности протоковой, дольковой или внутрикистозной пролиферации. По степени пролиферативной активности эпителия различают:

- ГМ без пролиферации (риск развития рака увеличивается в 1,5 раза);
- гинекомастия с пролиферацией эпителия (риск малигнизации возрастает до 1,9);
- ГМ с атипической пролиферацией эпителия (увеличение риска в 3, а по некоторым данным — в 25 раз).

Частота развития рака на фоне пролиферативных форм ГМ зависит от длительности заболевания и периода наблюдения за больным. Причем риск перехода узловой формы в рак колеблется от 9,3 до 12,2 %. Клинически ГМ проявляется болезненным набуханием одной или обеих молочных желез, в ряде случаев с выделениями из сосков различного характера, грубой дольчатостью, тяжестью, множественными уплотнениями, носящими непостоянный характер. При узловой ГМ участки уплотнения, чаще в одной молочной железе, носят постоянный характер и имеют тенденцию к увеличению.

Основными диагностическими методами, помимо клинического, являются маммография, УЗИ и пункционная биопсия образования (с последующим цитологическим исследованием пунктата), либо открытая биопсия с последующей обязательной морфологической верификацией с применением современных методов морфологического анализа [1, 2, 8].

Дисгормональная патология грудных желез у мужчин с каждым годом привлекает к себе внимание из-за роста заболеваемости и диагностики гиперпластических и предопухолевых процессов [4].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определить патоморфологические и молекулярно-биологические характеристики различных форм гинекомастии.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Выполнен анализ биопсийного и операционного материала от 56 больных мужчин с доброкачественной

патологией грудных желез, находившихся на лечении в специализированных медицинских онкологических учреждениях г. Москвы и г. Рязани в период с 2009 по 2015 гг. Критериями включения в исследование были: возраст старше 18 лет, признаки ГМ, информированное согласие пациента на участие в исследовании и соблюдение указаний врача. Другие патологические образования зарегистрированы в 9 случаях (липома — в 6, эпидермальная киста — в 3), ввиду чего стали критериями исключения. Возраст больных находился в пределах от 3 до 80 лет.

Материал изучали с помощью световой и электронной микроскопии, а также с применением иммуногистохимических методов.

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 OsO_4 (pH 7.4), заливали в смесь аралдита и эпона. 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).

Иммуногистохимическое исследование проводили на серийных парафиновых срезах толщиной 2 мкм по стандартной методике с применением следующей панели поликлональных антител фирмы «Dako»: к рецепторам эстрогена (клон 1D5, RTU, мышинные), к рецепторам прогестерона (клон PgR636, RTU, мышинные), к онкопротеину c-erbB-2 (Her2/neu) (поликлональное, рабоче разведение 1:500, кроличьи), к Ki67 (клон MIB-1, RTU, мышинные). Исследование выполнялось по следующей схеме. Срезы депарафинировали в 3 порциях спирта (96°), затем промывали 5 мин в дистиллированной воде, помещали стекла со срезами в пластиковый держатель и погружали в 0.01 М цитратный буфер pH = 6.0, после чего осуществляли демаскировку антигенов в микроволновой печи. Демаскировку проводили в два этапа: первые 7 мин при мощности P = 60, затем 1 мин остывания при открытой дверце, далее 7 мин при мощности P = 40 (выходная мощность микроволновой печи 700 Вт). После демаскировки оставляли емкость со стеклами остывать при комнатной температуре на 20 мин и промывали в 2 порциях фосфатного буфера по 5 мин, наносили блокирующий реагент (Peroxidase Blocking Reagent, фирма «Dako») на 10 мин, после промывали в дистиллированной воде 5 мин, затем в фосфатном буфере — 5 мин. Далее наносили первые антитела и инкубировали срезы при температуре 25 °C 60 мин. После инкубации срезы промывали в фосфатном буфере и наносили биотинилированные антитела на 10 мин, затем промывали в фосфатном буфере и наносили на срезы

стрептавидин-биотиновый комплекс на 10 мин. После тщательной отмывки трис-буфером срезы обрабатывали хромогенным субстратом (3,3-диаминобензидином в буферном растворе). С диаминобензидином инкубировали 10 мин. Использовали систему визуализации фирмы «Dako» LSAB2 System — HRP. Срезы докрашивали гематоксилином и заключали под покровное стекло с монтирующей средой.

Интенсивность пероксидазной метки для каждого цитоплазматического антигена оценивали полуколичественным методом с учетом интенсивности окрашивания и количества антиген-позитивных клеток. Иммуногистохимическая реакция оценивалась как негативная, «?» (отсутствие реакции), слабопозитивная, «+» (<10 % окрашенных клеток), умеренная, «++» (>10 % клеток средней интенсивности окраски) и выраженная, «+++» (>50 % клеток высокой интенсивности окраски). Использование каждого вида антител сопровождалось постановкой контрольных реакций на серийных срезах.

Морфологическое исследование проводилось с помощью светового микроскопа фирмы «Carl Zeiss» «AxioStar plus». Фотографирование микропрепаратов осуществляли с использованием цифровой камеры AxioCam MRc5 с программой компьютерной обработки изображений AxioVision 4.6.3 «Carl Zeiss».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основной клинический симптом при ГМ — увеличение размеров грудной железы, значительно варьирующее во времени — от 2 мес. до 15 лет.

При макроскопической оценке интраоперационно удаленных образований на фоне дольчатой жировой ткани с широкими прослойками эластичной белесоватой ткани определяется нечетко ограниченный очаг уплотнения плотно-эластической консистенции, белесоватого волокнистого вида. Размеры узловых образований варьируют от 0,8 до 2,5 см.

При микроскопическом исследовании непролиферативная форма протоковых изменений при ГМ характеризуется одиночными и множественными кистами правильной округлой или фестончатой формы. Эпителий протоков и кист кубический или цилиндрический, уплощенный, без явлений пролиферации. Отмечается разрастание волокнистой соединительной ткани и железистых ходов среднего и малого диаметров. Просветы ходов расширены и принимают форму кист, местами содержат детрит. Протоки выстланы многослойным высоким эпителием, уплотняющимся в кистозно-трансформированных протоках. Соединительнотканная строма плотная, с небольшим количеством клеточных элементов и редко встречающимися сосудами. Соединительная ткань более рыхлая, в основном, вокруг протоков, располагается концентрически, с очагами ангиоматоза и полнокровными сосудами; среди клеточных элементов можно выявляют лимфоциты, плазматические и мононуклеары (рис. 1). Иммуногистохимичес-

кая реакция при выявлении эстрогеновых рецепторов и Ki-67 имела вид от золотисто-желтого до темно-коричневого цвета ядер, с различной интенсивностью окраски. Иммуногистохимическим исследованием установлена незначительная экспрессия Ki-67 ($17,35 \pm 2,6$) %. В более чем 50 % протоковых структур в эпителии выявлялась экспрессия эстрогеновых рецепторов (рис. 2).

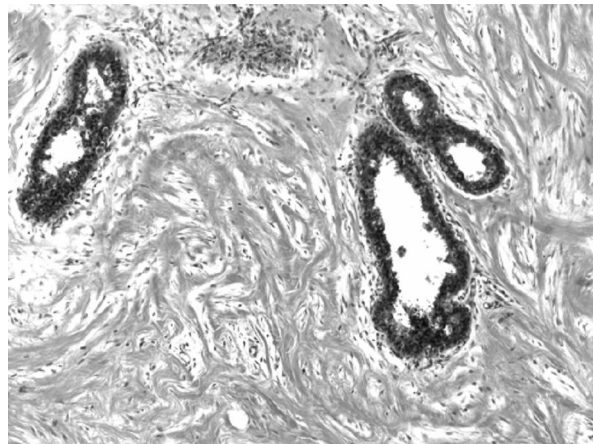


Рис. 1. Патоморфологическая картина грудной железы при непролиферативной форме гинекомастии. Окраска гематоксилином и эозином $\times 100$

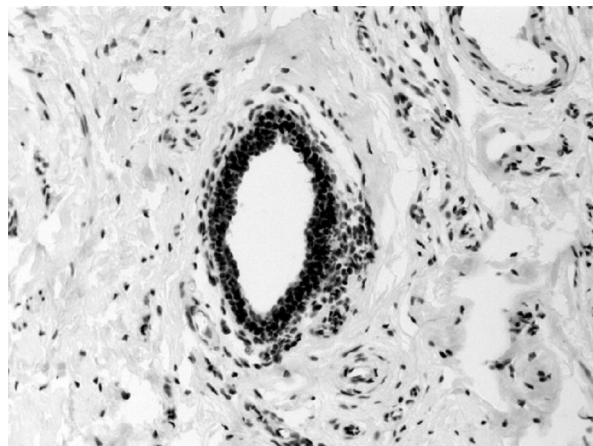


Рис. 2. Экспрессия рецепторов к эстрогену в грудной железе, больного с непролиферативной формой гинекомастии. ИГХ реакция, ДАБ, $\times 200$

При пролиферативной форме ГМ эпителий протоков образует небольшие сосочковые выросты в просвете протоков, местами переходящие в образования типа «криброзных». Отмечается слой миоэпителиальных клеток, расположенных в виде палисады. Мембраны протоков чаще плотные, с участками разрыхления. Железистые протоки обычно окружены полосками рыхлой тонковолокнистой соединительной ткани разной ширины, богатой клетками и сосудами («мантейная ткань»). Помимо околопротоковой стромы различают «опорную» (которая преобладала на препаратах), представленную тяжами толстых коллагеновых волокон (рис. 3, 4).

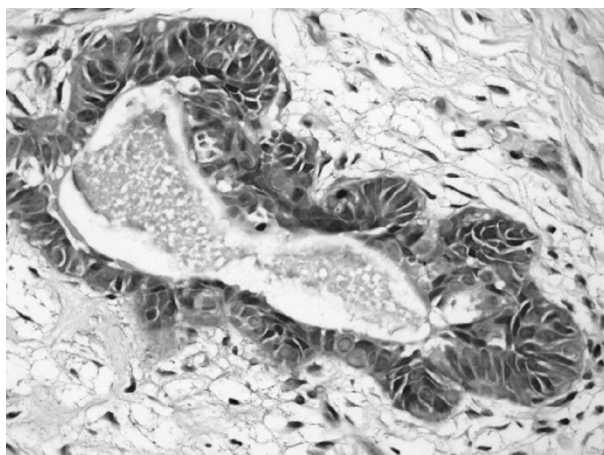


Рис. 3. Типичная патоморфологическая картина грудной железы при пролиферативной гинекомастии. Окраска гематоксилином и эозином $\times 100$

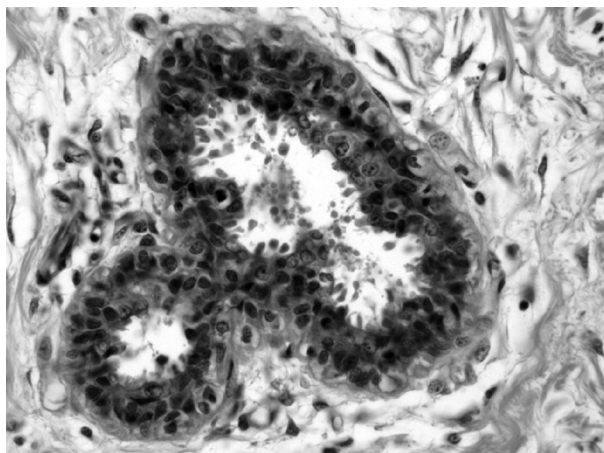


Рис. 4. Очаги пролиферации эпителия и мезоэпителия и полосы рыхлой тонковолокнистой соединительной ткани, богатые клетками и сосудами при пролиферативной форме гинекомастии. Окраска гематоксилином и эозином $\times 200$

При исследовании маркеров пролиферации установлено увеличение экспрессии Ki-67 ($24,8 \pm 3,5$) %. Уровень экспрессии эстрогеновых рецепторов незначительно увеличивается ($38,8 \pm 6,5$) %.

ГМ с атипической внутрипротоковой пролиферацией в протоках и кистах характеризуется развитием микрососочков, клеточных мостиков, солидных и криброзных структур, образованных мономорфными клетками с овальным или округлым, часто гиперхромным ядром. При иммуногистохимическом исследовании определяется некоторое снижение показателей экспрессии Ki-67 ($13,39 \pm 8,4$) %. Экспрессия эстрогеновых рецепторов в участках ГМ с атипической протоковой гиперплазией носит очаговый характер и определяется лишь в части эпителиальных клеток внутрипротоковых пролифератов ($25,88 \pm 2,84$) % (рис. 5, 6).

При ультраструктурном анализе, нами установлено, что стенки протоков образованы эпителиальными

клетками, расположенными в несколько слоев. Верхний слой состоит из эпителиальных высокодифференцированных клеток и клеток, вступивших на путь специфической дифференцировки.

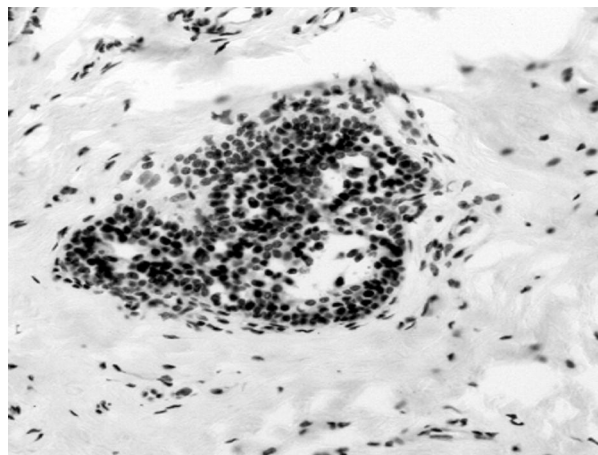


Рис. 5. Экспрессия рецепторов к эстрогену в грудной железе, больного с пролиферативной формой гинекомастии. ИГХ реакция, ДАБ, $\times 200$



Рис. 6. Типичная патоморфологическая картина грудной железы при гинекомастии с атипической внутрипротоковой пролиферацией. Окраска гематоксилином и эозином $\times 100$

В большинстве клеток, располагающихся в наружных слоях эпителиального пласта, граничащего с просветом протока, видна дифференцировка цитоплазмы на апикальную и базальную части. На люминальных поверхностях клеток имеются многочисленные мелкие цитоплазматические выросты, в цитоплазме — небольшое количество специфических гранул, содержащих электронноплотный секрет и казеиновые тельца. Цитоплазма клеток содержит также некоторое количество канальцев и профилей гранулярного эндоплазматического ретикулула, значительное количество рибосом. В непосредственной близости от ядра много митохондрий со светлым зернистым матриксом, частично редуцированными кристами. В части клеток отмечается появление тонофибрилл в виде нежно-воло-

нистых пучков или хаотично расположенных с войлокоподобной сетчатостью. В отдельных клетках видны внутриклеточные каналцы. Плотные межклеточные контакты и соединения типа десмосом наблюдаются преимущественно между наиболее дифференцированными клетками, в основном, в верхних слоях эпителиального пласта. Характерно наличие темных и светлых дифференцированных клеток. Стромальные элементы малочисленны, определяются поля коллагена и наличие свободнележащих стромальных клеток фибробластов и макрофагов (рис. 7, 8).

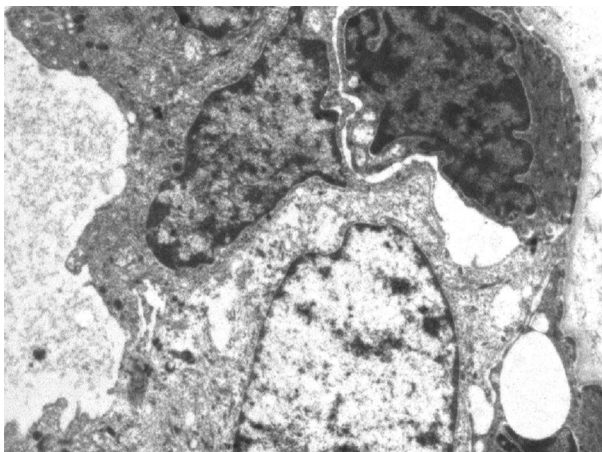


Рис. 7. Ультраструктура грудной железы при гинекомастии. Контрастирование цитратом свинца, $\times 8500$

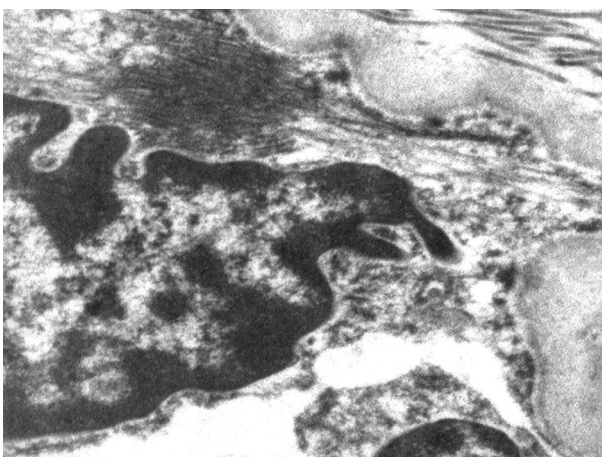


Рис. 8. Ультраструктура грудной железы при гинекомастии. Контрастирование цитратом свинца, $\times 10000$

Темные клетки встречались не везде, очагово. Мнения о природе этих клеток противоречивы. Некоторые исследователи считают, что их возросшая плотность является результатом высокого уровня содержания рибосом вследствие эстрогенной стимуляции, другие — что варьирование плотности клеток молочной железы выявляет четкие типы клеток с различными функциями, или — что разница цитоплазматической плотности отражает различия в функциональном состоянии клетки. Другой находкой было присутствие пучков толстых филаментов в цитоплазме некоторых эпителиаль-

ных клеток. Крайне высокая плотность, волнистое распределение, ориентация в связи с десмосомами отличает их от филаментов в миоэпителиоцитах. Такая морфология является полной характеристикой тонофиламентов. Существует мнение, что тонофиламенты являются патогномоничным признаком злокачественных опухолей. Изобилие этих филаментов в случае гинекомастии и их ассоциация с темными гранулами, сходными с кератогиалиновыми гранулами эпидермальных клеток, являются свидетельством чешуйчатой метаплазии. Хотя этот эффект эстрогенов не был описан для молочной железы, другие железистые эпителиальные клетки подвергались чешуйчатой метаплазии после воздействия эстрогенов. В строме обнаруживали аккумуляцию аморфного, умеренно плотного вещества вокруг протоков и вблизи кровеносных сосудов. Оно соответствовало рыхлой околопротоковой строме, обнаруженной при световой микроскопии. Считается, что это является результатом возросшего накопления мукополисахаридов под воздействием эстрогенной стимуляции. Стромальные клетки преимущественно были представлены фиброцитами. Выраженность эндоплазматической сети, рибосом и комплекса Гольджи являлось признаком возросшей функциональной активности. Подобные миофибробласты были описаны при различных состояниях, включая рак молочной железы у женщин и рак грудной железы у мужчин [1, 5]. Некоторые считают, что они представляют собой фибробласты, которые, возможно, под воздействием гормональной стимуляции, приобрели особенности гладкомышечных клеток. В нескольких случаях в строме были обнаружены перicyты. Из всего вышеперечисленного вытекает тот факт, что ультраструктурные особенности протоковых клеток в большинстве случаев очень сходны с доброкачественными гиперпластическими состояниями в женской молочной железе, строма при этом составляет главный компонент гинекомастии, и ее ультраструктурные особенности отражают морфологическое проявление эстрогенной стимуляции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ГМ — доброкачественное поражение грудной железы, наблюдаемая у мужчин в пубертатном, постпубертатном периодах и в андропauзе. При изучении рецепторов эстрогенов при пролиферативной форме заболевания (без атипии) их количество ($38,01 \pm 7,2$) % превосходит таковое при непролиферативной форме ($34,08 \pm 8,72$) % и при атипической гиперплазии эпителия ($25,88 \pm 2,84$) %. Показатель пролиферации Ki-67 при пролиферативной форме заболевания (без атипии) составляет ($24,8 \pm 3,5$) %, при непролиферативной форме — ($17,35 \pm 2,6$) % и при атипической гиперплазии эпителия — ($13,39 \pm 8,4$) %. При ГМ установлена пролиферация ER+клеток и увеличение доли клеток, одновременно экспрессирующих ER и фактор пролиферации Ki67, особенно выражено это при пролиферативных формах ГМ.

При электронной микроскопии показано, что ультраструктурные особенности протоковых клеток у мужчин в большинстве случаев очень сходны с доброкачественными гиперпластическими состояниями в женской молочной железе, строма при этом составляет главный компонент ГМ, и ее ультраструктурные особенности отражают морфологическое проявление эстрогенной стимуляции.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Акимов О. В.* Дольковый инфильтративный рак молочной железы у мужчины / О. В. Акимов // Редкие наблюдения в медицинской практике. — СПб, 1996. — С. 49—52.
2. *Акимов О. В.* Внутрипротоковая папиллома с малигнизацией в мужской молочной железе / О. В. Акимов // Редкие наблюдения в медицинской практике. — СПб, 1996. — С. 53—55.
3. *Жижина С. А.* Гинекомастия и экскреция эстрогенов у больных токсическим зобом: автореф. дис. ... канд. мед. наук / С. А. Жижина. — М., 1969. — С. 3—11.
4. *Мнихович М. В.* Способ моделирования гинекомастии в эксперименте. Публикация патента: 27.07.2008. Бюллетень №21.
5. *Мнихович М. В.* Эпителиальный и стромальный компоненты при протоковом раке молочной железы / М. В. Мнихович // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И. П. Павлова. — 2015. — № 3. — С. 99—105.
6. *Нейштадт Э. Л.* Патология молочной железы / Э. Л. Нейштадт, О. А. Воробьева. — СПб: Фолиант, 2003. — С. 176—179.
7. Особенности маскулинизирующей маммопластики при трансформации пола / В. Н. Фесенко, В. В. Михайличенко, В. П. Александров, В. А. Семенов // Андрология и генитальная хирургия. — 2002. — № 4. — С. 58—60.
8. *Островская И. М.* Рак молочной железы у мужчин / И. М. Островская, Л. Д. Островцев, О. Ю. Ефимова. — М.: Медицина, 1988. — 143 с.

9. An unusual case of Cushing's syndrome due to ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia / S. Rapetti [et al.] // *Chir. Ital.* — 2003. — Vol. 55, № 2. — P. 235—241.

10. *Braunstein G. D.* Aromatase and gynecomastia / G. D. Braunstein // *Endocr. Relat. Cancer.* — 1999. — Vol. 6, № 2. — P. 315—324.

11. Causes of gynaecomastia in young adult males and factors associated with idiopathic gynaecomastia / H. Ersoz [et al.] // *Int. J. Androl.* — 2002. — Vol. 25, № 5. — P. 312—316.

12. Influence of age on the clinical presentation of prolactinomas in male patients / E. Delgrange, D. Mailer, J. Donckier, J. Toumiaire // *Gerontology.* — 1999. — Vol. 45, № 3. — P. 160—164.

13. *Mathur R.* Gynecomastia: pathomechanisms and treatment strategies / R. Mathur, G. D. Braunstein // *Horm. Res.* — 1997. — Vol. 48, № 3. — P. 95—102.

14. *Rogers S.* Expression of cathepsin D and estrogen receptor in male breast carcinoma / S. Rogers, C. A. Day, S. B. Fox // *Hum. Pathol.* — 1993. — Vol. 24, № 2. — P. 148—151.

15. *Sher E. S.* Evaluation of boys with marked breast development at puberty / E. S. Sher, C. J. Migeon, G. D. Berkovitz // *Clin. Pediatr. (Phila).* — 1998. — Vol. 37, № 6. — P. 367—371.

Контактная информация

Мнихович Максим Валерьевич — к. м. н., вед. науч. сотрудник центральной патологоанатомической лаборатории Научно-исследовательского института морфологии человека, доц. кафедры патологической анатомии и клинической патологической анатомии педиатрического факультета ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, г. Москва. e-mail:mnichmaxim@yandex.ru