

© Мнихович М.В., 2014

УДК: 616.33-006.6+616.345-006.6]-091.8

## ЭПИТЕЛИАЛЬНЫЙ И СТРОМАЛЬНЫЙ КОМПОНЕНТЫ ПРИ ПРОТОВОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

*М.В. Мнихович<sup>1,2</sup>*

ФГБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», г. Москва (1)  
ГБОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет  
имени Н.И. Пирогова Минздрава России, г. Москва (2)

**В настоящее время большинство научных работ сосредоточено на изучении эпителиально-стромальных взаимоотношений играющих важную роль в прогрессии эпителиальных опухолей в сторону дедифференцированного фенотипа. Цель нашего исследования – изучение морфологических свойств анапластических участков опухоли и окружающей стромы при протоковом раке молочной железы. 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. 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.**

**Ключевые слова:** протоковый рак, молочная железа, анапластический рак, эпителиально-мезенхимальный переход.

В настоящее время большинство научных работ сосредоточено на изучении эпителиально-стромальных взаимоотношений играющих важную роль в прогрессии эпителиальных опухолей в сторону дедифференцированного, т.е. более злокачественного фенотипа [2, 7, 8]. Рак молочной железы (РМЖ) – является агрессивным заболеванием [3]. Несмотря на существенный прогресс, достигнутый в изучении протокового рака молочной железы и развитии подходов к его хирургическому и комбинированному лечению, выживаемость больных остается на низком уровне [10]. Одной из причин этого является выраженная десмопластическая реакция стромы опухоли, составляющая до 70-80% объема опухолевой ткани [2, 4, 6, 11], проявляющаяся гиперэкспрессией белков внеклеточного матрикса и пролиферацией миофибробла-

стов [2, 4, 5]. Ряд исследований подчеркивают важную роль развитой десмопластической стромы РМЖ, в «защите» от химиотерапии опухоли и/или увеличении риска метастазирования опухолевых клеток [10, 17, 23].

При РМЖ, так же как и при других опухолях, значительная роль в прогрессии опухоли отводится одному из ключевых моментов – эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП) [1, 8, 21]. 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. Также, ЭМП сопровождается изменением профилей транскрипции генов, в том числе компонентов цитоскелета и внеклеточного матрикса, а также протеолитических

ферментов, участвующих в деградации последнего [11, 12, 15]. 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.) [14, 16, 20, 21, 22]. Изменение микроокружения и утрата полярности могут способствовать снижению дифференцировки опухолевых клеток [12, 18], однако полной утраты тканеспецифических свойств никогда не происходит – при потере дифференцировки эпителиальные опухоли продолжают сохранять часть признаков исходной ткани и способность к редифференцировке [9, 13]. Кроме того, в процессе утраты дифференцировки опухолевых клеток может происходить возобновление синтеза эмбриоспецифических белков, характерных для незрелых клеток [5, 13].

Цель нашего исследования – изучение морфологических свойств анапластических участков опухоли и окружающей стромы при протоковом раке молочной железы.

#### Материалы и методы

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

Материал фиксировали в 10% 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. Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование проводили на серийных парафиновых срезах толщиной 2 мкм по стандартной методике с применением следующей панели поликлональных антител: p63, гладкомышечный актин (ГМА), общий цитокератин, цитокератин 7, виментин, E-кадгерин (Dako, Lab Vision Flex). Интенсивность перокси-

дазной метки для каждого цитоплазматического маркера оценивали полуколичественным методом с учетом интенсивности окрашивания и количества антиген-позитивных клеток. Иммуногистохимическая реакция оценивалась как негативная («–» – нет реакции), слабopозитивная («+» – <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).

Силу и значимость связи между анализируемыми признаками оценивали с помощью корреляционного-регрессионного анализа. Для количественных признаков вычисляли корреляционный коэффициент Пирсона. За уровень статистической значимости принимали  $p < 0,05$ .

#### Результаты 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. Нередко в центре опухоли можно обнаружить очаги распада с формированием полостей различной формы. Микроскопически в большинстве случаев 78,8% (93/118) опухоль представлена железистыми структурами неправильной формы, выраженной десмопластической реакцией стромы, как правило, занимающей 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. 1 а,б).

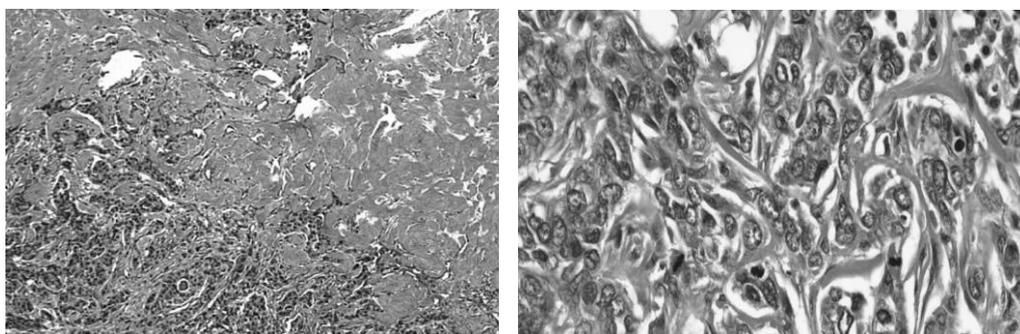


Рис. 1а,б. Светооптическая характеристика протокового рака молочной железы. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 100$

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. 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 компоненте отмечена выраженная диффузная реакция с виментином (+++) (рис. 2.), отсутствующая в железистых структурах (рис. 3).

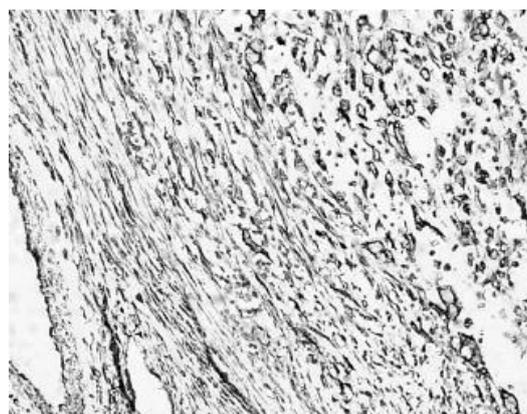


Рис. 2. Экспрессия виментина в недифференцированном компоненте. Иммуногистохимическая реакция Ув.  $\times 100$

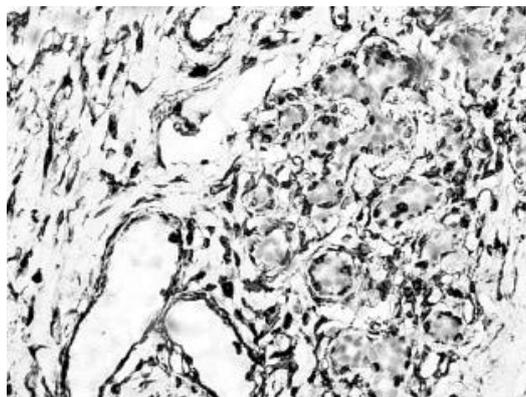


Рис. 3. Экспрессия виментина в железистом компоненте.  
Иммуногистохимическая реакция Ув.  $\times 200$

Одновременно в отдельных анапластических клетках отмечалась потеря экспрессии общего цитокератина и цитокератина 7 при сохраненной экспрессии эпителиально-мембранного антигена. Также, в ядрах анапластических клеток отмечена положительная реакция с маркером базальных стволовых клеток р63. В опухолях без анапластического компонента, процент окрашенных ядер с анти-

телами к р63 был ниже и представлен единично окрашенными ядрами по периферии железистых структур. Также 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. 4).

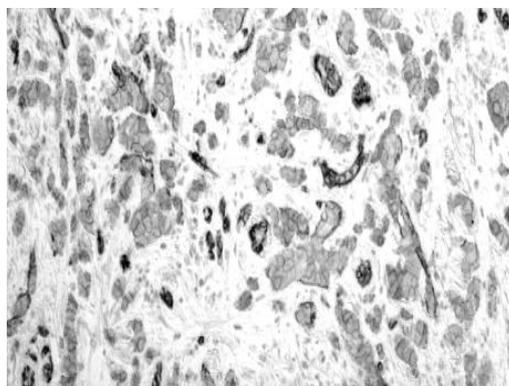


Рис. 4. Экспрессия белка Е-кадгерина в протоковом РМЖ.  
Иммуногистохимическая реакция Ув.  $\times 100$

В опухолевых клетках железистых структур РМЖ в 66,7% (62 из 93 случаев) наблюдалась умеренно-выраженная (++) цитоплазматическая экспрессия данного 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. 5).

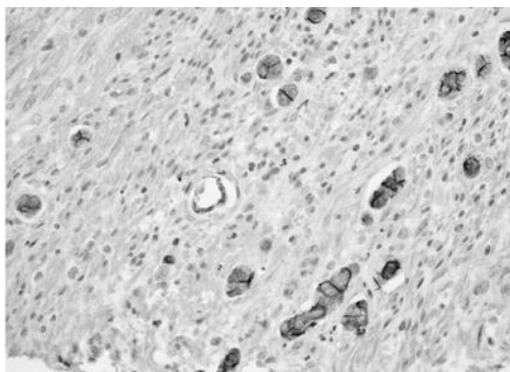


Рис. 5. Отрицательная мембранная и цитоплазматическая экспрессия белка Е-кадгерина в анапластическом протоковом РМЖ. Иммуногистохимическая реакция Ув.  $\times 200$

### Заключение

Классический вариант протокового РМЖ по своей гистологической структуре, как правило, неоднородная опухоль, представленная 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 иммуногистохимических 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 р63 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 Е-кадгерина) и реорганизация комплексов, обеспечивающих прикрепление клетки к субстрату. Однако частично сохранившаяся экспрессия цитокератинов и эпителиально-мембранного антигена свидетельствует о сохранении цитокартиновых рецепторов и возможной обратной трансформации при изменении микроокружения. По данным некоторых авторов показано, что ингибирование трансформирующего фактора роста –  $\beta$  в раке может приводить к обратному мезенхимально-эпителиальному переходу и потере мезенхимального и восстановлению эпителиального фенотипа [4, 6, 8, 12].

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. Гетеро-

генность 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, влияющем 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. 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.
3. Вторушин С.В. Клинико-морфологические особенности мультицентрического роста и рецидивирования при раке молочной железы: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / С.В. Вторушин. – Томск, 2011.
4. Мнихович М.В. Межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия в опухолях: современное состояние проблемы / М.В. Мнихович // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2013. – №3. – С. 161-171.
5. Прогностическая значимость степени гистологической злокачественности протоковой аденокарциномы поджелудочной железы / Е.М. Филиппова [и др.] // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2013. – №4. – С. 117-127.
6. Ahmed N. Epithelial-mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm / N. Ahmed, E.W. Thompson, M.A. Quinn // J Cell Physiol. – 2007. – Vol. 213, № 3. – P. 581-588.
7. Alguacil G. The histologic spectrum, prognosis, and histogenesis of the sarcomatoid carcinoma of the breast / G. Alguacil, L. Weiland // Cancer. – 1977. – Vol. 39. – P. 1181-1189.
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. Anchorage of microtubule minus ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts / W. Meng [et al.] // Cell. – 2008. – Vol. 135. – P. 948-959.
10. Dabbs David J. Breast Pathology / David J. Dabbs. – London: Elsevier, 2012.
11. Detektion of Luse bodies in sklerosing adenosus of breast: an ultrastruktural study / M. Mnikhovich [et al.] // Virchows Arch. – 2011. – Vol. 459 (Suppl. 1). – P. 329.
12. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators Snail, SIP1, and Twist in gastric cancer / E. Rostivatz [et al.] // Am J Pathol. – 2012. – Vol. 161. – P. 1881-1891.
13. 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.
14. 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.
15. Hay E.D. An overview of epithelial-mesenchymal transformation / E.D. Hay // Acta Anat (Basel). – 2005. – Vol. 154, № 1. – P. 8-20.
16. 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.
17. Mnikhovich M. Capabilities of immunohistochemical method in predicting the course of mammary gland cancer / M. Mnikhovich, M.A. Ben Ammar, L. Kakfursky // Virchows Arch. – 2015. – Vol. 467 (Suppl. 1). – S1-340-341.

18. 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.
19. N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of Twist1 / N.R. Alexander [et al.] // Cancer Res. – 2006. – Vol. 66, №7. – P. 3365-3369.
20. Park B.-K. Akt1 Induces Extracellular Matrix Invasion and Matrix Metalloproteinase-2 Activity in Mouse Mammary Epithelial Cells / B.-K. Park, X. Zeng, R.I. Glazer // Cancer Res. – 2001. – Vol. 62. – P. 7647-7653.
21. Pathogenetic regularities of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer carcinomas / T. Vorozbieva, M. Mnichovich [et al.] // Virchows Arch. – 2015. – Vol. 467 (Suppl. 1). – S1-527.
22. Peinado H. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions / H. Peinado, M. Quintanilla, A. Cano // J Biol Chem. – 2003. – Vol. 278, №23. – P. 21113-21123.
23. 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.
24. 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.

#### EPITHELIAL AND STROMAL COMPONENTS IN DUCTAL BREAST CANCER

*M.V. Mnichovich*

Currently, most of the scientific work is focused on the study of epithelial-stromal relations play an important role in the progression of epithelial tumors towards dedifferentiated phenotype. The aim of our research – the study of morphological properties of anaplastic tumor sites and surrounding stroma of ductal breast cancer. Epithelial-stromal interactions in ductal breast cancer cause its aggressive biological behavior, resistance to chemotherapy and varying depending on the survival of tumor differentiation. Heterogeneity is manifested in the ductal carcinoma anaplastic appearance (sarcomatoid) component, which traced the ability of epithelial tumor cells acquire the properties of mesenchymal cells do not require the stroma and have an aggressive malignant potential impact on survival of patients.

*Keywords: ductal carcinoma, breast, anaplastic cancer, epithelial-mesenchymal transition.*

Мнихович М.В. – 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