

ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫЙ МАТРИКС, АНГИОГЕНЕЗ И КЛЕТОЧНОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ ПРИ ДИСГОРМОНАЛЬНЫХ ГИПЕРПЛАЗИЯХ, ФИБРОАДЕНОМАХ И РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (СВЕТОВОЕ И ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

М.В. Мнихович, М.М. Тернов

Рязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова

В статье приводятся данные светового и электронно-микроскопического исследования экстрацеллюлярного матрикса, ангиогенеза и клеточного микроокружения при дисгормональных гиперплазиях, фиброаденомах и раке молочной железы. Показано, что экстрацеллюлярный матрикс при фиброаденомах и дисгормональных гиперплазиях отличается идентичностью изменений и отличается при раке молочной железы. Микроциркуляторному компоненту РМЖ свойственна гистофизиологическая неоднородность, которая проявляется активацией ангиогенеза, относительной дифференцировкой сосудов и регрессией отдельных звеньев микроциркуляторного русла. Процессы стромообразования при гиперплазиях и опухолях молочной железы связаны с наличием определенного количества макрофагов, лимфоцитов и плазматических клеток.

Ключевые слова: молочная железа, клеточное микроокружение, экстрацеллюлярный матрикс, ангиогенез, рак молочной железы.

Несмотря на успехи диагностики и лечения новообразований молочной железы, вопросы дифференциальной диагностики, грамотного наблюдения, комбинированного и комплексного лечения злокачественных опухолей занимают важное место [1,2,3,13].

Доброкачественные изменения молочных желез относятся к наиболее распространенным заболеваниям у женщин различных возрастных групп [3,5,6,12].

К предопухолевым (доброкачественным) заболеваниям молочных желез, прежде всего, относятся различные варианты дисплазии молочных желез (на современном языке фиброзно-кистозная болезнь - ФКБ, более известная как фиброзно-кистозная мастопатия). По определению ВОЗ (1984), ФКБ представляет собой «комплекс процессов, характеризующихся широким спектром пролиферативных и регрессивных изменений тканей молочных желез с формированием ненормальных соотношений эпителиального и соединительнотканного компонентов и образованием в молочной железе изменений фиброзного, кистозного, пролиферативного характера, которые часто, но не обязательно, сосуществуют»[3].

Рак молочной железы (РМЖ) занимает первое место в структуре онкологической заболеваемости женщин, а статистические данные свидетельствуют о неуклонном, интенсивном росте заболеваемости данной патологией [1,2,4,10].

К пониманию морфогенеза РМЖ и доброкачественных заболеваний молочной железы следует подходить с позиции рассмотрения структурно-функциональной перестройки двух филогенетически и анатомо-физиологически взаимосвязанных тканевых компонентов — паренхимы и стромы [3,4,8]. Морфологические критерии, которые традиционно рассматриваются в качестве прогностических, не всегда в полной мере позволяют характеризовать биологический потенциал опухоли. В связи с чем, ведется поиск новых, более информативных параметров. Так, в настоящее время большое внимание уделяется исследованию воспалительной инфильтрации в строме опухолевого узла.

Эпителиальные новообразования МЖ, последовательно переходя в процессе канцерогенеза от стадии к стадии, приобретают тенденцию к увеличению пролиферативной активности и темпа размножения клеток, причем характерным является некоторое отставание пролиферации в дольковом эпителии по сравнению с протоковым [11,13,15]. О росте пролиферативной активности свидетельствует более высокая активность ядрышкового организатора в РМЖ по сравнению с доброкачественными новообразованиями. Но наиболее объективной характеристикой пролиферативной активности клеток РМЖ можно считать экспрессию антигена Ki-67, которая обнаруживается в G₁-, S-, G₂- и M-фазах митотического цикла. Таким образом, популяция Ki-67-положительных клеток количественно соответствует пролиферативному пулу опухоли.

Изменения стромы в процессе опухолевой прогрессии (переход доброкачественной опухоли в злокачественную) включают уменьшение общего количества основного вещества, увеличение числа коллагеновых, эластических волокон и появление лимфоплазмочитарных инфильтратов.

Неотъемлемой частью морфогенеза РМЖ является изменение гистоархитектоники микроциркуляторного русла (МЦР). Результаты ультразвукового исследования свидетельствуют о том, что доброкачественные узловы образования МЖ в большинстве случаев отличаются от РМЖ только при размере узла не менее 1,5—2 см, а перфузия узлов мастопатии осуществляется посредством 1—2 сосудов, расположенных на одном из полюсов [1,4,5,6,7,8].

Для РМЖ характерно увеличение числа кровеносных сосудов, которые локализуются преимущественно в периферической зоне опухоли и имеют радиальное направление по отношению к опухолевому узлу. Определяются также гистотопографическая отдаленность гемомикроциркуляторных единиц, полное отсутствие анастомозирования и сопровождения одних сосудов другими, уменьшение числа капилляров.

Цель исследования заключалась в выяснении особенностей экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ), ангиогенеза и клеточного микроокружения при дисгормональных гиперплазиях и раке молочной железы

Материалы и методы

Исследованию подвергнуты молочные железы целиком и их части удаленные по поводу операций при дисгормональных заболеваниях и при раке молочной железы (87 случаев) диффузная кистозная мастопатия (КМ) – 22 случая,

узловая КМ – 14 случаев, фиброаденома МЖ – 21 случай, склерозирующий аденоз – 3 случая и первично выявленный РМЖ – 27 случаев, а также секционных наблюдений (8 случаев) – диффузной кистозной мастопатией (4 случая), фиброаденомой молочных желез (2 случая) и РМЖ (2 случая). Возраст больных колебался от 21 до 79 лет.

Материал для световой микроскопии фиксировали в 10% нейтральном растворе забуференного формалина. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилин — эозином, по Ван Гизону, на эластические волокна по Вейгерту. Аргирофильные волокна выявляли импрегнацией серебром по Футу. С помощью реакции Фельгена и по Браше изучали ДНК. Использовалась импрегнация сосудов и стромы по Бильшевскому-Гросс. Для выявления гликозамиингликанов использовали PAS – реакцию, тучноклеточные популяции изучали, при помощи окраски препаратов по методу Шубича.

В 12 наблюдениях проводилось электронно-микроскопическое исследование. Для электронно-микроскопического исследования кусочки паренхимы молочной железы префиксировали в 2,5 % растворе глутарового альдегида, рН 7,3 - 7,4 в течение 4 часов. Постфиксацию проводили в 1% растворе OsO₄ на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4). Дегидратацию материала проводили в батарее с возрастающей концентрации этанола и ацетона. Образцы заключали в заливочную среду, состоящую из смеси аралдита, аралдита М и эпона- 812. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по E. S. Reynolds и просматривали в электронном микроскопе.

Результаты и их обсуждение

В результате проведенного исследования установлено, что ЭЦМ стромы РМЖ содержит большое количество тонких аргирофильных фибрилл, встречаются также толстые коллагеновые фибриллы, сконцентрированные в периваскулярной ткани и в очагах десмопластической реакции. При электронной микроскопии в ЭЦМ стромы РМЖ обнаруживаются тонкие микрофибриллы диаметром от 30 до 50 нм и более толстые, диаметром до 100 нм с поперечно исчерченностью или реже без не, располагающихся в виде пучков вблизи фибробластов и миоэпителиоцитов.

К цитоплазме раковых клеток довольно часто прилежат базальные мембраны (рис. 1.). В некоторых участках стромы РМЖ встречается зебровидный коллаген, а также микрофибриллы коллагена в виде электронно-плотного стержня с поперечно расположенными структурами (рис.2).

Периваскулярная ткань при РМЖ в большинстве случаев, напоминала соединительную, содержащую рыхлые коллагеновые волокна с фрагментами растущих сосудов, участками некроза и клетками, которые можно расценить как фибробласты и макрофаги. В эпителиальном компоненте инвазивной протоковой и дольковой карциномы эндотелиальный пласт имеет расположение по типу нагромождения друг на друга. Большое активное ядро и сочетание с развитым гранулярным эндоплазматическим ретикулумом, с немногочисленными свободными полисомами, характерные признаки для секретирующих клеток. Вероятно, данные клетки в опухолевом материале нарабатывают компоненты экстрацеллюлярного матрикса. В исследованном материале раков молочной железы, обращает на себя внимание отсутствие перицитов. Опухолевые клетки контактируют с эндотелиальными по средствам отростков последних, опухолевые клетки располагались близко к эндотелию, который был окружен электронноплотным материалом.

Поскольку морфология перицитов в интенсивно пролиферирующих тканях может быть весьма разнообразной, вплоть до морфологии типичных недифференцированных форм, а РМЖ достаточно полиморфен, трудно найти морфологические критерии, которые с уверенностью могли бы диагностировать перицитарные клетки. Оформленная базальная пластинка в сосудах опухолевой ткани молочной железы так же отсутствует.

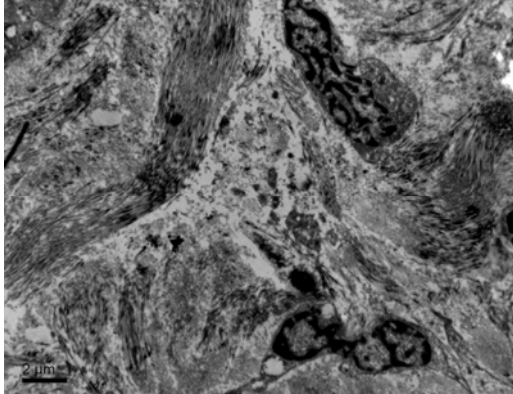


Рис. 1. Тонкие микрофибриллы в строме рака молочной железы, расположенные вблизи фибробластов и макрофагов. Контрастирование цитратом свинца; X5500

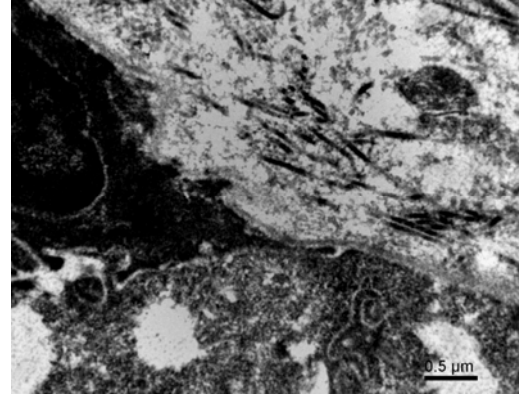


Рис. 2. Зебровидный коллаген и микрофибриллы экстрацеллюлярного матрикса при раке молочной железы. Контрастирование цитратом свинца; X 8500

Выраженность клеточной инфильтрации при РМЖ достаточно высокая, при чем выше она по периферии опухоли. Среди клеток стромы инвазивной карциномы МЖ выявлены фибробласты, моноциты, лимфоциты, фиброциты и миофибробластоподобные коллагенообразующие клетки. Фиброциты располагались среди большого количества коллагеновых и эластических волокон, что являлось характерным расположением фиброцитов только в строме РМЖ. Миофибробластоподобные клетки располагались большими группками, имели между собой клеточные контакты. Отмечалась плазмотизация стромы. Большое количество основного вещества, состоящего из кислых гликозаминогликанов, макрофаги, богатые фаголизосомами, фрагменты эластических волокон - характерные признаки стромы РМЖ.

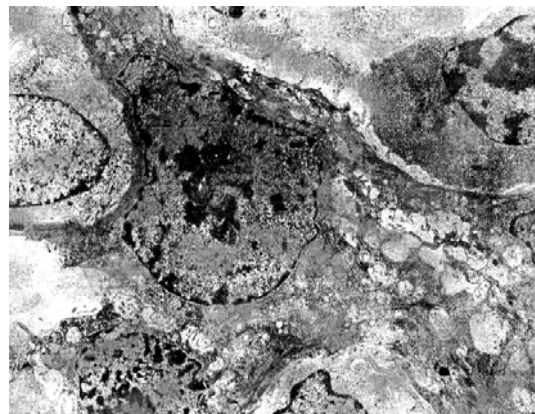
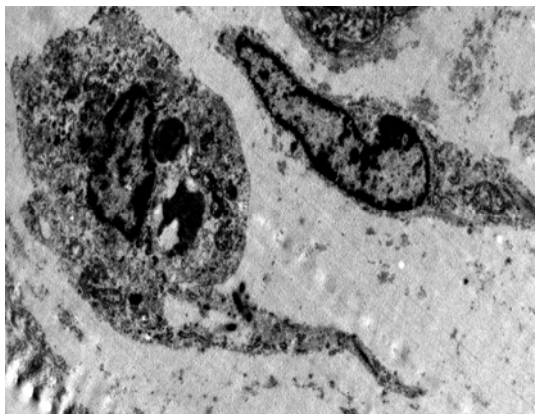


Рис. 3. Фибробласты и фрагменты макрофагов в строме фиброаденомы. Контрастирование цитратом свинца; 4500

Рис. 4. Лимфоэпителиальный симбиоз в стромальном компоненте фиброаденомы. Контрастирование цитратом свинца; X 3500

Экстрацеллюлярный матрикс при фиброаденомах МЖ представлен полями гиперэласто́за, гиалино́за и скоплением толстых фрагментированных коллагеновых фибрилл. При электронной микроскопии ЭЦМ фиброаденом МЖ выявляются скопления фрагментированных эластических волокон, тонкие и толстые коллагеновые микрофибриллы с поперечной исчерченностью и без нее, утолщение базальной мембраны, а также аморфный гранулированный материал и зебровидный коллаген, который располагается в основном вблизи базальных мембран протоков и деформированных сосудов.

Клеточный состав фиброаденом в основном представлен фибробластами различной степени дифференцировки, моноцитами, лимфоцитами и макрофагами. Коллагеновые микрофибриллы с поперечной исчерченностью формируют подобие ложа, в которых располагаются различное количество клеточных элементов. Некоторые клеточные элементы, такие как фибробласты, формируют с макрофагами и лимфоцитами контакты в виде плотных щелевых. Макрофаги и лимфоциты также формировали между собой контакты посредством нескольких точечных контактов, образованных пальцевидными выпячиваниями цитоплазмы лимфоцитов в сторону макрофагов. Цитоплазма макрофагов представлена умеренно-развитой эндоплазматической сетью, фагосомами, секреторными гранулами и митохондриями. Фибробласты между собой осуществляли комплексобразование посредством плотного щелевого контакта цитоплазмы в которой отмечалась развитая эндоплазматическая сеть с расширенными цистернами и небольшое количество секреторных гранул и митохондрий. Среди клеток стромы и эпителиального пласта контактов не обнаруживалось, но обнаруживалась миграция лимфоцитов в эпителиальный пласт, где лимфоциты, в некоторых случаях, формировали лимфоэпителиальный симбиоз (рис.4). Здесь же можно видеть суженные («удушенные») сосуды с утолщенными склерозированными стенками. Встречались сосуды с резко утолщенной интимой, в отдельных сосудах превалировало отложение гиалина и белковоподобных масс во внутренней оболочке, гистохимически выявлялись гипертрофия и гиперплазия эластики. При окраске по Ван-Гизону удалось выявить значительное утолщение мышечного слоя и отметить последующее склерозирование (рис. 5). В капиллярах обнаруживались разрастания аргирофильных волокон, утолщение базальной мембраны.

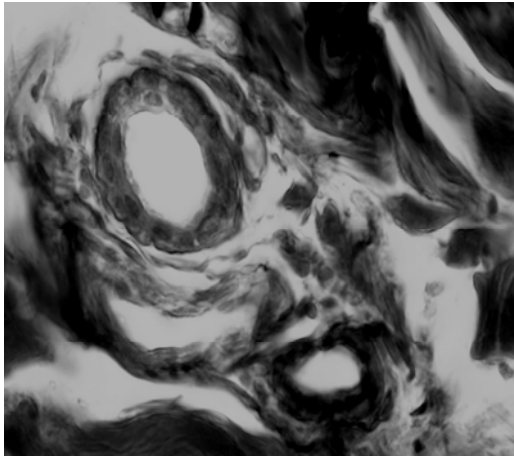


Рис. 5. Сосуды в строме фиброаденомы с явлениями гиперэластоза и склерозированием стенки в строме фиброаденомы. Окр. пикрофуксином по Ван Гизону: X 240

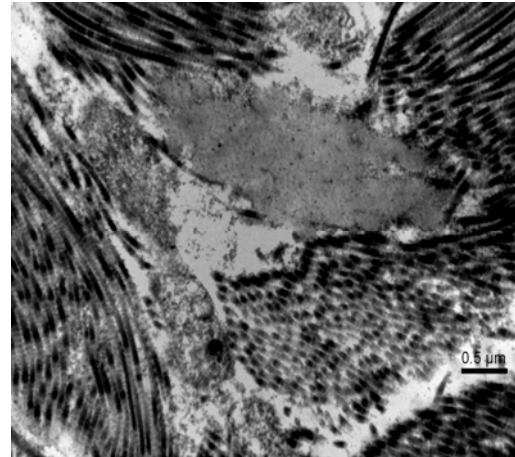


Рис. 6. Различные формы микрофибриллов и остатки дегенеративно измененных эластических волокон в строме молочной железы при диффузной кистозной мастопатии. Контрастирование цитратом свинца; X 8500

Изменения стромы при диффузных и узловых мастопатиях имеют стереотипные характеристики ЭЦМ и клеточного микроокружения. При гистологическом исследовании отмечены характерные изменения: разрастания плотной волокнистой соединительной ткани, атрофия дольковых структур с кистозным расширением просветов протоков, многорядность эпителия мелких протоков с апокринизацией клеток кист и протоков, утолщение и некоторая деформация базальной мембраны. Строма представлена плотной соединительной тканью, с очагами гиперэластоза и гиалиноза, среди волокон которой имеются как собственно соединительнотканые клетки, так и клетки гематогенного происхождения, а также элементы МЦР. В строме МЖ при узловых и диффузных КМ в целом сохраняются классические формы строения МЦР, такие как: наличие разветвленных анастомозов между капиллярами, близкое в топографическом отношении расположение артериол и венул, сопровождение первых последними, ближе всего к протокам лежат капилляры и венулы, затем артериолы. При электронно-микроскопическом исследовании определяются наряду с клеточной инфильтрацией толстые и тонкие микрофибриллы с поперечной исчерченностью и без нее, гранулярный аморфный материал (рис 6). В пролиферативных формах КМ доминируют толстые микрофибриллы. В околопротоковой строме происходит миграция лимфоцитов с эпителиальной пласт паренхимы железы с образованием лимфоэпителиального симбиоза (рис 7). Среди элементов ЭЦМ обнаруживаются замурованные остатки лактоцитов и отдельно лежащие свободные липидные клетки. Миоэпителиальные клетки с плохо различимыми органеллами, но с большим количеством пиноцитозных пузырьков. Лишь местами остаются сохранившиеся миоэпителиальные клетки с упорядоченными скоплениями микрофиламентов и гемидесмосом, в местах расположения которых, базальная мембрана утолщается и разрыхляется. Вокруг сосудов, в особенности вокруг венул

и капилляров, группируются лимфоциты, формирующие небольшие скопления и контактируя с плазмодитами. При данной патологии молочной железы, отмечено формирование плотных контактов лимфоцитов с незрелыми и камбиальными эпителиальными клетками (рис.8.). Отмечается контакты лимфоцитов с лимфоцитами, преимущественно за счет точечных и плотных щелевых контактов. В некоторые эпителиоциты лимфоциты выпускают по несколько пальцевидных отростков, в месте которых в цитоплазме эпителиоцитов происходят изменения, характеризующиеся резким просветлением и гомогенизацией цитоплазмы эпителиоцита с уменьшением количества митохондрий.



Рис. 7. Лимфоэпителиальный симбиоз в стромальном компоненте фиброаденомы. Контрастирование цитратом свинца; X 3500

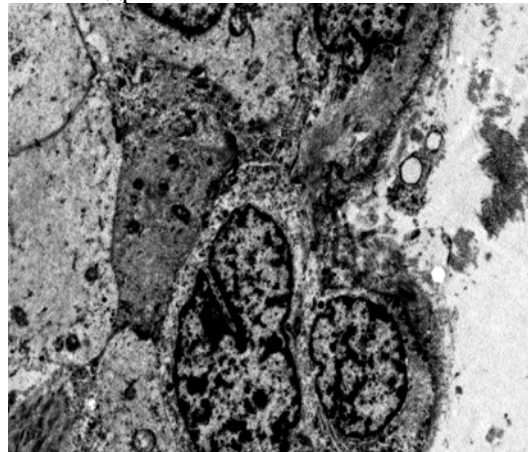


Рис. 8. Формирование комплексов камбиальная клетка-лимфоцит в околопротоковом стромальном окружении при фиброзно-кистозной мастопатии. Контрастирование цитратом свинца; X 4500

Таким образом, проведенное исследование показывает, что структурно-функциональное состояние экстрацеллюлярного матрикса, ангиогенеза и клеточное микроокружение при дисгормональных гиперплазиях, фиброаденомах и при раке молочной железы различно. Это четко подтверждается неодинаковой направленностью дифференцировки структурно-функциональных единиц доброкачественных и злокачественных опухолей молочной железы. Так же различен характер взаимодействия стромальных и паренхиматозно-стромальных компонентов и клеточного микроокружения опухоли, качественными особенностями микроциркуляторного русла.

Выводы

Экстрацеллюлярный матрикс при фиброаденомах и дисгормональных гиперплазиях отличается идентичностью изменений, при раке молочной железы, ЭЦМ отличается от ФА и КМ тем, что увеличивается количество основного вещества, состоящего из кислых гликозаминогликанов и макрофагов, богатых фаголизосомами и содержащих фрагменты эластических волокон.

Микроциркуляторному компоненту РМЖ свойственна гистофизиологическая неоднородность, которая проявляется в различных

микрорегионах новообразования активацией ангиогенеза, относительной дифференцировкой сосудов и регрессией отдельных звеньев микроциркуляторного русла.

В периваскулярных участках в опухолях и дисгормональных дисплазиях МЖ процессы стромообразования связаны с наличием определенного количества макрофагов, лимфоцитов и плазматических клеток.

Структурно-функциональное изучение экстрацеллюлярного матрикса, паренхимы и стромальных элементов при фиброаденомах и дисгормональных гиперплазиях крайне необходимо для определения прогноза и выбора методов лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абросимов С. Ю., Доросевич А. Е., Голубев О. А. Морфогенетические потенции коммуникационных систем при дисплазиях и фиброаденомах молочной железы. //Арх. пат. - 1996. - № 3. - С. 33-37.
2. Взаимосвязь морфологической гетерогенности инфильтрирующего протокового рака молочной железы с различными формами опухолевой прогрессии / В.М. Перельмутер, М.В. Завьялова, С.В. Вторушин и др. // Сибирский онкологический журнал. - 2007. - №3. - С. 58-64.
3. Гурьева В.А. Фиброзно-кистозная болезнь (патогенез, классификация, диагностика, лечение). – Барнаул, 2000. – 212 с.
4. Доросевич А.Е. Коммуникационные системы и опухолевый рост: актовая речь / А.Е. Доросевич. – Смоленск, 2007. – 44с.
5. Коган И.Ю. Оценка васкуляризации молочных желез при различных формах мастопатии / Коган И.Ю., Белоусова О.Н., Асеева И.В. // Бюллетень Сибирской медицины. – 2005. – Том 4. , прилож. 1. – С. 175
6. Коган И.Ю. Васкуляризация паренхимы молочных желёз у женщин с фиброзно-кистозной болезнью /Коган И.Ю., Мясникова М.О. // Ж. акуш. и жен. болезн. – 2007. – Том. LVI, спец.вып. – С.159.
7. Пальцев М.А, Иванов А.А., Северин С.Е. Межклеточные взаимодействия. – М., Медицина. – 2003.
8. Ситко Л.А., Степнов С.С., Никонов В.М., Либман Я.Н., Кудренко С.К., Суздальцева Л.В., Московская Ю.В., Васильева О.В. Структурно-функциональные взаимоотношения иннервации, кровообращения и гормональной регуляции на различных этапах маммогенеза в норме и патологии // Омский научный вестник. – 2003. – №24, Приложение. – С.147.
9. Altman R.A., Mesiano S., Jaffe R.B. Vascular endothelial growth factor is essential for ovarian cancer growth in vivo: VEGF antibody stuff. Proc Soc Gynecol Invest 1995; 42.
10. Artini P.G., Fasciani A., Monti M. et al. Changes in vascular endothelial growth factor levels and the risk of ovarian hyperstimulation syndrome in women enrolled in an in vitro fertilization program. Fertl Steril 1998; 70: 560–564.
11. Burgos H. Angiogenic and growth factors in human amniochorion and placenta. Eur J Clin Invest 1983; 13: 289–296.
12. Ferriani R.A., Charnock-Jones D.S., Prentice A. Immunohistochemical localization of acidic and basic fibroblast growth factors in normal human endometrium and endometriosis and the detection of their mRNA by polymerase chain reaction. Hum Reprod 1998; 8: 11–16.

13. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1995; 1: 27–31.
14. Gordon J., Shifren J.L., Foulk R.A. et al. Angiogenesis in the human female reproductive tract. *Obstet Gynecol Surv* 1995; 50: 688–697.
15. Gospodarowicz D., Cheng J., Lui G.M. et al. Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor. *Endocrinology* 1985; 117: 2383–2391.
16. Morgan K.G., Wilkinson N., Buckley C.H. Angiogenesis in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium. *J Pathol* 1996; 179: 317–320.

**EXTRACELLULAR MATRIX, ANGIOGENESIS AND CELLULAR MICROENVIRONMENT AT
DISHORMONAL HYPERPLASIA, FIBROADENOMA AND BREAST CANCER (LIGHT AND
ELECTRON MICROSCOPIC STUDY)**

M.V. Mnikhovich, M.M. Ternov

The article shows a light and electron microscopic examination of the extracellular matrix, angiogenesis and cellular microenvironment at dishormonal hyperplasia, fibroadenoma and breast cancer. Shown that the extracellular matrix in fibroadenoma and hyperplasia dishormonal different identity changes and is different in breast cancer. Microcirculatory component of breast cancer characterized gistofiziologicheskaya heterogeneity, which manifests the activation of angiogenesis, the relative differentiation of vessels and reg – Ressie individual links microcirculation. Processes stromoobrazovaniya hyperplasia and tumors of the breast associated with the presence of a certain number of macrophages, lymphocytes and plasma cells.

Key words: mammary gland, the cellular microenvironment, extracellular matrix, angiogenesis, breast cancer.

Мнихович М. В. - кандидат медицинских наук, ассистент кафедры нормальной и топографической анатомии ГОУ ВПО РязГМУ им. акад. И.П. Павлова, врач-патологоанатом первой квалификационной категории Областной клинической больницы и БСМЭ г. Рязани; mnchmaxim@mail.ru