

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Мнихович М.В., 2013
УДК 618.19-006-07

**УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ОЦЕНКА ИММУННОГО ОТВЕТА
В КАРЦИНОМАХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
И ПРИ ФИБРОЗНО-КИСТОЗНОЙ БОЛЕЗНИ**

М.В. МНИХОВИЧ

Научно-исследовательский институт морфологии человека РАМН, г. Москва

**ULTRASTRUCTURAL ASSESSMENT OF IMMUNE RESPONSE
IN CARCINOMAS OF THE BREAST AND WHEN FIBROCYSTIC DISEASE**

M.V. MNIHOVICH

Research Institute of Human Morphology of the Russian Academy of Medical Sciences

В статье приводятся результаты электронно-микроскопического исследования стромального компонента молочной железы при фиброзно-кистозной болезни и инфильтрирующем протоковом раке молочной железы (РМЖ). Прицельно изучены иммунный ответ стромы молочной железы, произведена оценка и анализ межклеточных взаимодействий на ультраструктурном уровне, показана несостоятельность иммунологического надзора при инфильтрирующих РМЖ, что подтверждается определением лишь единичных контактов между раковыми и иммунокомпетентными клетками, отсутствием связей между лимфоцитами, макрофагами и плазмоцитами. Предполагается, что интенсивный апоптоз в лимфоцитах ткани РМЖ – одна из причин прогрессии новообразования.

Ключевые слова: молочная железа, фиброзно-кистозная болезнь, рак молочной железы, лимфоциты, ультраструктура.

The article leads the results of electron microscopic study of the stromal component in breast fibrocystic disease and infiltrating ductal breast cancer. Sighting study the immune response of the stroma of breast cancer, evaluated and analysis of cell-cell interactions on the ultrastructural level, pointed out the inconsistency of immunological surveillance during infiltrate ing breast cancer, as evidenced by the definition of a single contact between crustaceans, Vym and immune cells, lack of linkages between lymphocytes, macrophages and plasma cells . It is assumed that the intense lymphocyte apoptosis in breast cancer tissues max – one of the reasons for progression novoobformation.

Key words: breast, fibrocystic disease, breast cancer cells, ultrastructure.

Введение

В последнее десятилетие отмечен рост заболеваемости раком молочной железы и фиброзно-кистозной болезнью данного органа, в связи с чем, вопросы профилактики, ранней диагностики и эффективности лечения данного заболевания являются весьма актуальными [1, 7]. Одним из наиболее перспективных направлений современной онкологии является изучение роли иммунной системы в патогенезе злокачественных опухолей [2, 3].

Поиск структурных изменений, отражающих нарушения иммунного гомеостаза, оправдан с теоретической и практической стороны. Лимфоплазматическая инфильтрация паренхимы и стромы опухоли – материальный и морфологический субстрат нарушения системы иммунитета [2, 3, 5]. Сведения об изменении иммунного статуса при опухолях, в частности при раке молочной железы и фиброзно-кистозной болезни (ФКБ) противоречивы и вопрос о

лимфоцитарной инфильтрации стромы решается неоднозначно [2, 4, 6].

Цель исследования

Сравнительное изучение ультраструктурных особенностей стромальных клеточных элементов молочной железы при инфильтрирующем протоковом раке и ФКБ.

Материалы и методы

Изучен оперативно удаленный материал от 85 женщин, по поводу РМЖ и ФКБ. Возраст больных составил от 29 до 76 лет. В 43 случаях изучены участки молочной железы с ФКБ и в 42 изучен инфильтрирующий протоковый РМЖ. Материал подбирался таким образом, что пациентки не получали до операции никакого специфического лечения. Материал проходил стандартную проводку, заливался в парафин. Парафиновые срезы окрашивались гематоксилином – эозином. Для электронно-микроскопического исследования материал префиксирован

ли в 2,5 % растворе глутарового альдегида. Постфиксировали в 1% растворе OsO₄ на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4). Дегидратацию проводили в батарее с возрастающей концентрации этанола и ацетона. Образцы заключали в заливочную смесь аралдита, аралдита М и эпона- 812. Полутонкие срезы окрашивали смесью азура 2 и фуксина. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Препараты изучали в электронном микроскопе JEM-100В (Япония) при ускоряющем напряжении 60 кВ.

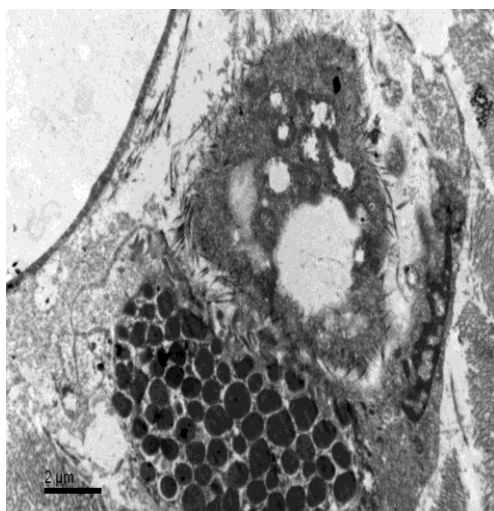


Рис. 1. Тучная клетка и макрофаг с околопротоковой строме молочной железы при фиброзно-кистозной болезни; контрастирование цитратом свинца; X 5000

Причём, стоит отметить, что при простых формах ФКБ, картина контактов и взаимодействий клеточного микроокружения разная. При простых (непролиферативных формах) ФКБ форма ядер МЭЛ округлая, почкооб-

Результаты и их обсуждение

Морфологическим выражением иммунного ответа при ФКБ является инфильтрация внутридольковой стромы лимфоцитами, плазматическими клетками, тучными клетками и макрофагами (рис. 1), миграцией лимфоцитов в эпителий с формирование лимфо-эпителиальных контактов (рис. 2) или симбиозов, так называемых межэпителиальных лимфоцитов (МЭЛ).

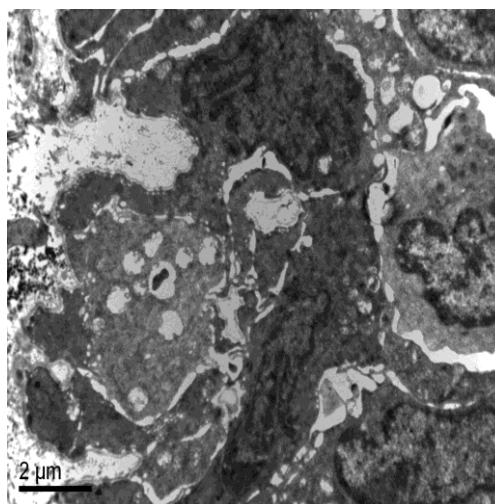


Рис. 2. миграция лимфоцитов в эпителий с формированием лимфо-эпителиальных контактов при фиброзно-кистозной болезни; контрастирование цитратом свинца; X 5500

разная, бобовидная, в виде "бабочки". Отмечаются выраженные единичные ядерные инвагинации. Гетерохроматин грубо конденсирован, по периферии ядра. Ядрышки, как правило, расположены центрально, и широко в цито-

плазме МЭЛ выявлены поля гранулярного эндоплазматического ретикулума (ГЭР), митохондрии, рибосомы и полисомы, электронно-плотные гранулы. МЭЛ контактировали с эпителием в виде цитоплазматических отростков, взаимодействующих с эпителиальными клетками в определенных точках или же вклиниваясь вглубь цитоплазмы последних. Цитолемма некоторых этих отростков расплывчата. Часть МЭЛ взаимодействуют с эпителием в виде плотных и щелевых контактов, в цитоплазме отдельных секреторных клеток, контактирующих с лимфоцитами, определены вакуолеподобные образования, набухшие с просветленным матриксом митохондрии, отсутствие цитолеммы на определенных участках клетки или расплывчатость ее контуров, гомогенизация цитоплазмы, в которой отмечены гетероморфные электронно-плотные гранулы. Обнаружены также МЭЛ, полностью окруженные цитоплазмой одной и той же эпителиальной клеткой, то есть явление эмпериполезиса. Данные изменения в отдельных эпителиальных клетках, с которыми указаны лимфоциты взаимодействует путем внедрения в их цитоплазму отростков, характерны для гибнущих эпителиоцитов при контакте с ними цитотоксических лимфоцитов.

В околопротоковой строме ФКБ отмечается наличие кровеносных капилляров, в просвете и периваскулярном пространстве которых выявлены

тромбоциты, лимфоциты, нейтрофилы и плазматические клетки. Здесь же можно видеть суженные («удушенные») сосуды с утолщенными склерозированными стенками. Между коллагеновыми пучками видны тонкие эластические волокна, местами образующие сгущение эластики больше вокруг лимфатических коллекторов. Клетки фибробластического ряда, участвующие в микроокружении, имели увеличенные ядра. Они содержали 1-2 ядрышка, при этом отмечалось многообразие морфологических типов ядрышек. Встречались ядрышки кольцевидного, нуклеолонемного типов и переходные между ними формы. Данные клетки можно отнести к активно синтезирующим юным фибробластам.

В строме пролиферативных форм ФКБ отмечены межклеточные контакты макрофагов и лимфоцитов с фибробластами – юными и коллагенобластами. Последнее, говорит о том, что в данном случае иммунная реакция направлена не на эпителиальный, а стромальный компонент. Это подтверждается тем, что морфогенез ФКБ во многом определяется структурно-функциональным состоянием фибробластов. Фибробласты взаимодействовали с макрофагами на большей протяженности в виде цитоплазматических выростов к плотного щелевого контакта. При этом в цитоплазме фибробластов определялись хорошо развитая с расширенными ци-

стернами эндоплазматическая сеть, вакуоли, средней электронной плотности гранулы и митохондрии, В цитоплазме контактирующего макрофага – зонально расположенные митохондрии, расширенные цистерны эндоплазматического ретикулума и электронно-плотные гранулы. Лимфоциты взаимодействовали с фибробластами путем плотных щелевых контактов и локального слияния цитолемм этих клеток. При этом на поверхности лимфоцитов определены единичные цитоплазматические отростки, а и их цитоплазме – электронно-плотные гранулы, рибосомы и полисомы, митохондрии и профили ГЭР; в фибробласте – локальное просветление цитоплазмы.

Таким образом, в указанных межклеточных контактах при ФКБ принимают участие юные фибробласты и коллагенобласты, что подтверждает существующую точку зрения о надзорной роли лимфоцитов и макрофагов за цитодифференцировкой фибробластов, с другой стороны не исключают факт наличия феномена эпителиально-мезенхимальной трансформации, что можно подтвердить в настоящее время ИГХ методиками.

В некоторых случаях в строме пролиферативных форм ФКБ отмечено большое количество плазматических клеток. Их форма и размеры варьируют. Многие из них секреторируют по голокриному типу и в них наблюдается клазматоз, что является морфо-

логическим отражением активности гуморального иммунитета. Лимфоциты, макрофаги, а также плазмоциты и тучные клетки в строме ФКБ отмечены как свободно, так и в просвете и периваскулярном пространстве микрососудов. В последних, выявлены ультраструктурные изменения в виде выраженного пиноцитоза, отека цитоплазмы, наличия трансэндотелиальных щелей и образования в данных сосудах многослойной базальной мембраны, что указывает на повышенную проницаемость эндотелия микрососудов. В эпителии при контакте с МЭЛ отмечались следующие морфологические признаки: наличие секреторных гранул, кристаллоподобных структур, гипертрофия везикулярных структур и нахождение последних в отростках МЭЛ, а также реориентация этих цитоплазматических структур в зону контакта с КМ и определение в последних ограниченных дефектов в их цитоплазме), отмеченные нами при взаимодействии МЭЛ с эпителиоцитами при ФКБ, указывает, на секреторный механизм цитотоксического воздействия МЭЛ на эпителиоциты.

В инфильтрирующих карциномах МЖ отмечены лишь единичные точечные контакты между лимфоцитами и опухолевыми клетками. При этом ультраструктурных признаков, указывающих на цитотоксическое воздействие лимфоцитов на опухолевые клетки, не выявлено.

В просвете и периваскулярном пространстве кровеносных капилляров карцином не выявлены клетки крови, в том числе лимфоциты и макрофаги. При этом в микрососудах, преимущественно в сосудах капиллярного типа, инфильтрирующих РМЖ отмечены гомогенизация цитоплазмы эндотелия, появление в нем большого количества везикулярных структур, локальное сращивание эндотелия с базальной мембраны кровеносных капилляров и выраженные дефекты в эндотелии микрососудов (рис. 3), морфологически напоминающие новообразованные капилляры. Обращает на себя внимание отсутствие лимфоцитов и макрофагов как в просвете, так и в периваскулярном пространстве микрососудов и среди стромальных элементов и глыбок эластики. 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 плазматизация стромы (рис. 4). В материале РМЖ, 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 сосудах опухолевой ткани молочной железы так же отсутствует. Функционирующие микрососуды опухолевой ткани остаются малодифференцированными сосудами капиллярного типа, в стенке которых отсутствуют перициты и оформленная базальная пластинка.

Большинство лимфоцитов в клеточном микроокружении РМЖ, имеют признаки апоптотических клеток. Ядра приобретают лопастной вид, обычно далее происходит его коллапс и распад на микроядра. В клетках обнаруживается маргинация хроматина в виде полу-сфер или глыбок. На клеточной поверхности появляются вдавливания и выпячивания. В некоторых лимфоцитах обнаруживаются довольно глубокие вдавливания ядерных мембран, происходит фрагментация ядер и обнаруживаются фрагменты ядра, ограниченные мембраной внутри клетки. Среди тонких ультраструктурных изменений, характерных для поздних стадий апоптоза, обнаружено изменение цитолеммы и поверх-

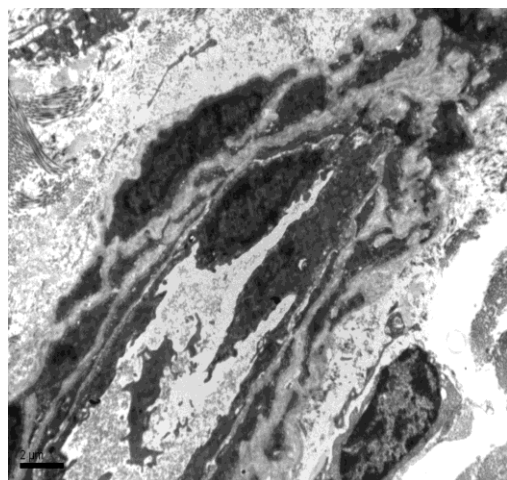


Рис. 3. Гомогенизация цитоплазмы эндотелия, появление в нем большого количества везикулярных структур, и выраженные дефекты в эндотелии микрососудов; контрастирование цитратом свинца; X5500

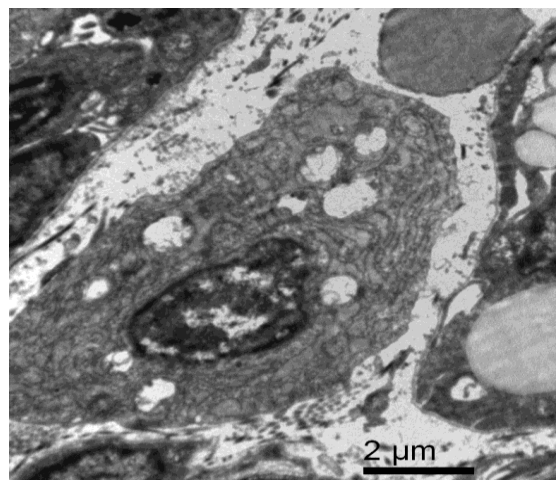


Рис. 4. Плазмотизация строма инфильтрирующего протокового рака молочной железы; контрастирование цитратом свинца; X8000

ностных структур. В первую очередь утрата микроворсинок и десмосом. На отдельных клетках появляются выпячивания и пузыри на мембране. Нет четко видимых мембранных структур клетки – однако, наблюдаются крупные вакуоли. Но целостность мембран самих лимфоцитов не нарушена.

Выводы

Таким результаты настоящего исследования указывают на несостоятельность иммунологического надзора при инфильтрирующих РМЖ, что подтверждается определением лишь единичных контактов между раковыми и иммунокомпетентными клетками, отсутствием связей между лимфоцитами, макрофагами и плазмочитами. На это также указывает и отсутствие лимфо-

цитов и макрофагов как в просвете, так и в периваскулярном пространстве микрососудов, если исходить из того, что клетки, участвующие в иммунных реакциях, мигрируют из сосудистого русла. Не исключается, что интенсивный апоптоз в лимфоцитах ткани РМЖ – одна из причин прогрессии новообразования. Отмеченные ультраструктурные признаки иммунологической несостоятельности при РМЖ необходимо в дальнейшем учитывать при исследовании новообразования, так как состояние иммунного гомеостаза опухоли влияет на их прогноз.

Литература

1. Божок А.А. Прогностические и предсказательные факторы при раке молочной железы / А.А. Божок [и др.]

// Вопр. Онкол. – 2005. – Т. 51, №4. – С. 434-443.

2. Золотова Е.Н. Современные аспекты морфогенеза рака молочной железы / Е.Н. Золотова, А.Е. Доросевич // Арх. патол. – 2004. – №1. – С. 51-55.

3. Нейштадт Э.Л. Патология молочной железы / Э.Л. Нейштадт, О.А. Воробьева. – СПб.: Фолиант, 2003. – 208 с.

4. Anderson T.J. Pathological studies of apoptosis in the normal breast / T.J. Anderson // Cancer. – 1999. – Vol. 6. – P. 9-12.

5. Assessment of the proliferative, apoptotic and cellular renovation indices

of the human mammary epithelium during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle / M.A. Navarrete [et al.] // Breast Cancer Research. – 2005. – Vol. 7. – P. 306-313.

6. Cardillo M.R. Proliferating cell nuclear antigen in benign breast diseases / M.R. Cardillo, G.W. Stamp, M. Pignatelli // Eur. J. Gynaecol. Oncol. – 1995. – Vol. 16, № 6. – P. 476-481.

7. Conner P. Breast epithelial proliferation in postmenopausal women evaluated through fine-needle-aspiration cytology / P. Conner, L. Skoog, G. Soderqvist // Climacteric. – 2007. – Vol. 4, № 1. – P. 7-12.

Сведения об авторе

Мнихович Максим Валерьевич – канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник центральной патологоанатомической лаборатории Научно-исследовательского института морфологии человека РАМН, г. Москва.

E-mail: mnichmaxim@yandex.ru.