

МОЛЕКУЛЯРНАЯ, ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ И УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ОЦЕНКА ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА В КАРЦИНОМАХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА

М.В. МНИХОВИЧ^{* **}, Т.В. БЕЗУГЛОВА^{*}, К.Ю. МИДИБЕР^{****}, К.В. БУНЬКОВ^{****},
И.В. ВАСИН^{*****}, С.В. СНЕГУР^{*****}, Г.П. КАЗАНЦЕВА^{*****}, Ю.Г. ПАВЛОВА^{*****}

^{*}ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека»,
ул. Цюрупы, 3, Москва, 117418, Россия

^{**}ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им.
Н.И. Пирогова» Минздрава России, ул. Островитянова, 1, Москва, 117997, Россия

^{***}ГБУЗ «Городская клиническая больница №31 ДЗМ», ул. Лобачевского, 42, Москва, 119415, Россия

^{****}ОГБУЗ «Смоленский областной институт патологии», пр-т Гагарина, 27, Смоленск, 214018, Россия

^{*****}ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»
Минздрава России, ул. Высоковольтная, 9, Рязань, 390026, Россия

^{*****}ГБУ РО «Областная клиническая больница»,
ул. Интернациональная, 3а, корп. 2, Рязань, 390039, Россия

Аннотация. Эпителиально-мезенхимальный переход играет важную роль процессах развития и регенерации тканей, а также ассоциирован с фиброзом и злокачественными новообразованиями. Во время канцерогенеза пути эпителиально-мезенхимального перехода используются опухолевыми клетками для накопления миграционного и инвазивного фенотипа, что позволяет данным клеткам метастазировать. Выполнен анализ операционного материала, полученного от 118 больных протоковым раком молочной железы, в возрасте от 40 до 80 лет. Иммуногистохимическое исследование проводили с применением следующей панели поликлональных антител: к p63, гладкомышечному актину, общему цитокератину, цитокератинам 7, 8, 18, 16, 19, виментину, E-кадгерину, Ki67, рецепторам эстрогена и прогестерона. Установлено, что стромаобразование в опухоли является результатом многообразных взаимодействий опухолевых клеток, гематогенных и гистиогенных клеток соединительной ткани. Существенными дифференциально-диагностическими признаками эпителиальных комплексов инвазивного рака являются интенсивное накопление в клетках белка p63, Ki67 по периферии эстроген- и прогестерон-положительных эпителиальных опухолевых комплексов; экспрессия цитокератинов 7, 8, 18, 16, 19 и ламинина в мембранах эпителиальных клеток; очаговый и диффузный лизис базальной мембраны с полной потерей ее первичных тинкториальных свойств, активация перифокального неопластического ангиогенеза с / без выраженной иммунноклеточной реакции со стороны стромы.

Ключевые слова: эпителиально-мезенхимальный переход, рак молочной железы.

MOLECULAR, IMMUNOHISTOCHEMICAL AND ULTRASTRUCTURAL EVALUATION OF EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION IN BREAST CARCINOMAS OF NONSPECIFIC TYPE

M.V. MNIKHOVICH^{* **}, T.V. BEZUGLOVA^{*}, K.YU. MIDIBER^{****}, K.V. BUNKOV^{****},
I.V. VASIN^{*****}, S.V. SNEGUR^{*****}, G.P. KAZANTSEVA^{*****}, Y.U. PAVLOVA^{*****}

^{*}Research Institute of Human Morphology, 3 Tsyurupa Str., Moscow, 117418, Russia

^{**}Pirogov Russian National Research Medical University, 1 Ostrovityanov Str., Moscow, 117997, Russia

^{***}Municipal Clinical Hospital №31, 42, Lobachevski Str., Moscow, 119415, Russia

^{****}Smolensk Regional Institute of Pathology, 27, Gagarin Av., Smolensk, 214018, Russia

^{*****}Pavlov Ryazan State Medical University, 9, Vysokovoltynaya Str., Ryazan, 390026, Russia

^{*****}Regional Clinical Hospital, 3a, 2 Internatsionalnaya Str., Ryazan, 390039, Russia

Abstract. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) plays an important role in the processes of tissue development and regeneration, and is also associated with fibrosis and malignant neoplasms. During carcinogenesis, EMT pathways are used by tumor cells to accumulate a migratory and invasive phenotype that allows these cells to metastasize. The analysis of the surgical material obtained from 118 patients with ductal breast cancer at the age of 40 to 80 years is performed. Immunohistochemical study was carried out using the following panel of polyclonal antibodies: for p63, smooth muscle actin, total cytokeratin, cytokeratins 7, 8, 18, 16, 19, vimentin, E-

cadherin, Ki67, estrogen and progesterone receptors. It has been established that stroma formation in a tumor is the result of a variety of interactions of tumor cells, hematogenic and histiogenic cells of connective tissue. Significant differential diagnostic features of epithelial complexes of invasive cancer are the intensive accumulation of the protein p63, Ki67 in the cells on the periphery of estrogen and progesterone-positive epithelial tumor complexes; expression of cytokeratins 7, 8, 18, 16, 19 and laminin in membranes of epithelial cells; focal and diffuse lysis of the basal membrane with complete loss of its primary tinctorial properties, activation of perifocal neoangiogenesis with / without pronounced immunocellular response from the stromal side.

Key words: epithelial-mesenchymal transition, breast cancer.

Введение. *Эпителиально-мезенхимальный переход* (ЭМП) играет важную роль в некоторых процессах развития, регенерации тканей, а также ассоциирован с фиброзом и злокачественными новообразованиями. Во время канцерогенеза пути ЭМП используются опухолевыми клетками для накопления миграционного и инвазивного фенотипа, что позволяет данным клеткам метастазировать. Повышенная способность к миграции зависит, к примеру, от значительных изменений в экспрессии молекул клеточной адгезии и реорганизации цитоскелета. Изучение состояния изменяющихся клеток во время ЭМП и важных связующих путей в пределах этих процессов должно помочь нам понять этапы метастазирования и привести к улучшению таргетной терапии.

Под *эпителиально-мезенхимальной трансформацией* (ЭМТ) понимается процесс, при котором покоящиеся эпителиальные клетки теряют свои межклеточные контакты и принимают мезенхимальную форму. Они приобретают способность к миграции через базальную мембрану, а значит, могут по кровеносному или лимфатическому руслу попасть в любые, сколь угодно отдаленные от своего исходного местонахождения ткани, где путем обратной трансформации в эпителиальные клетки (мезенхимально-эпителиальный переход) формируют новые структуры. Физиологически этот процесс играет значимую роль при заживлении ран и в ходе эмбрионального развития организма. Так, например, ЭМТ лежит в основе формирования сердца, закладки большинства краниофациальных структур, а также скелетных мышц и периферической нервной системы. В целом, ни один организм не разовьется дальше стадии бластулы, не будь ЭМП. Однако, данное явление находит свое место и в контексте патологической физиологии. ЭМТ способствует прогрессии опухолевых заболеваний за счет того, что озлокачествленные эпителиальные клетки получают способность к проникновению в сосудистое русло, то есть, им открывается прямой путь к метастазированию. Также эпителиальные клетки, претерпев ЭМТ, могут быть задействованы в фибротических процессах: чрезмерная продукция белков внеклеточного матрикса фибробластидными клетками может вести к функциональным нарушениям той или иной ткани [1, 8].

Материалы и методы исследования. Выполнен анализ операционного материала, полученного от 118 больных протоковым *раком молочной железы* (РМЖ), в возрасте от 40 до 80 лет. Средний возраст пациенток составил 61 год. Материал изучали с помощью световой и электронной микроскопии, а также с применением иммуногистохимических методик. Иммуногистохимическое исследование проводили с применением следующей панели поликлональных антител: p63, гладкомышечного актина, общего цитокератина, цитокератинов 7, 8, 18, 16, 19, виментина, E-кадгерина, Ki67, рецепторам эстрогена и прогестерона (*Dako, Lab Vision Flex*). Изучена экспрессия в опухолевых клетках РМЖ маркеров ЭМП.

Результаты и их обсуждение. Классический вариант протокового РМЖ по своей гистологической структуре, как правило, – неоднородная опухоль, представлена полями различной дифференцировки от высокой до низкой, включая анапластический компонент. В исследуемой серии анапластический компонент присутствовал в 21,2% (25/118) случаев. 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 (рис. 1).

Опухолевые клетки, плотно располагаясь друг к другу, создают подобие стромального каркаса из самих себя. Кроме того, выявленная в анапластических клетках диффузная экспрессия с виментином (рис. 2), гладкомышечным актином и p63 подтверждает, что в процессе потери дифференцировки опухолевые клетки приобретают миоэпителиальный и/или мезенхимальный фенотип.

Данный факт связан с ЭМП 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 E-кадгерина) и реорганизация комплексов, обеспечивающих прикрепление клетки к субстрату. Однако частично сохраненная экспрессия цитокератинов и эпителиально-мембранного антигена свидетельствует о сохранении цитокартиновых рецепторов и возможной обратной трансформации при изменении микроокружения (рис. 3).

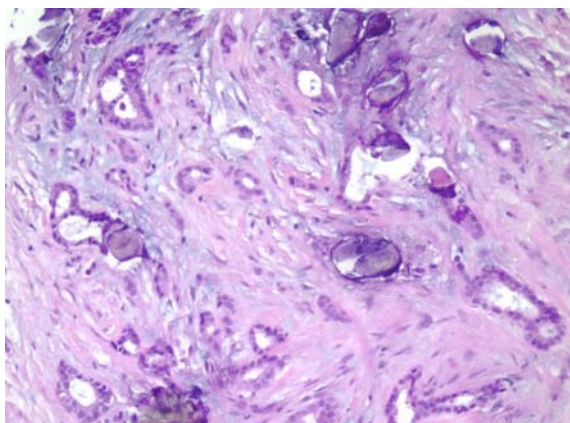


Рис. 1. Демсопластические участки стромы протокового РМЖ

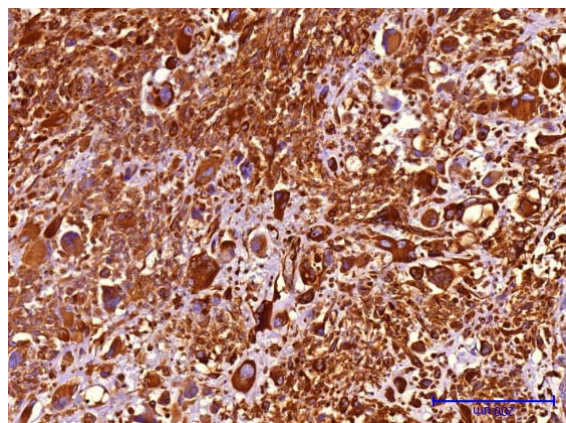


Рис. 2. Диффузная экспрессия с виментином в анапластических участках стромы протокового РМЖ

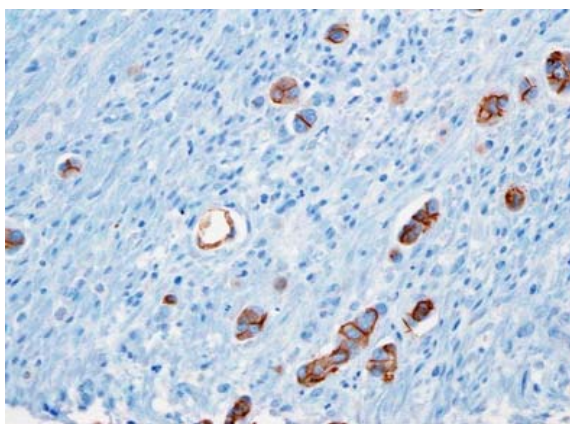


Рис. 3. Отрицательная мембранная и цитоплазматическая экспрессия белка Е-кадгерина в анапластическом компоненте протоковой карциномы МЖ

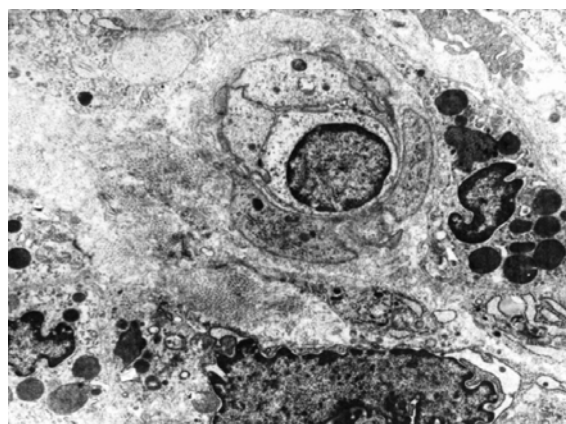


Рис. 4. Активация перифокального неоангиогенеза с/без выраженной иммунноклеточной реакции со стороны стромы, разрыхление, разволокнение, очаговый зернистый распад коллагена

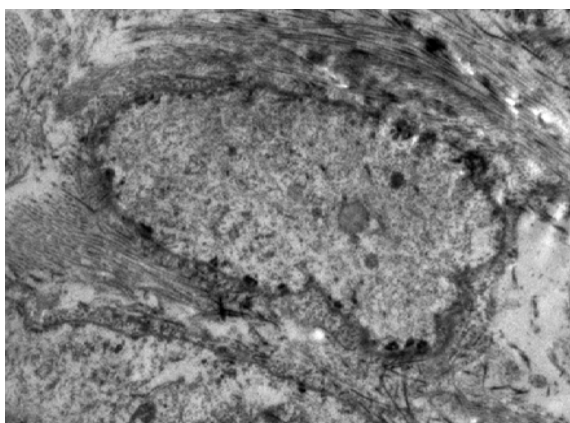


Рис. 5. Миофибробластоподобные клетки характеризуются двойным направлением дифференцировки

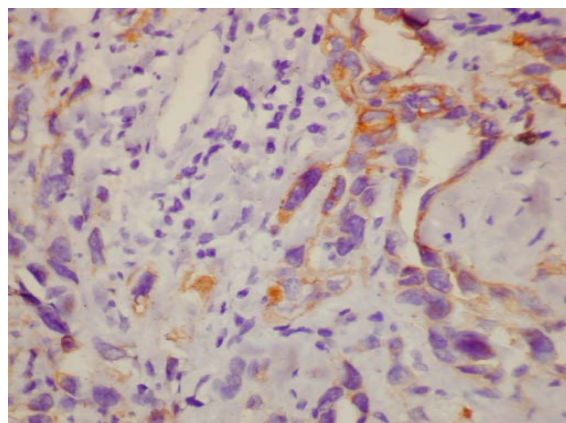


Рис. 6. Миофибробластоподобные клетки экспрессируют виментин и альфа-гладкомышечный актин

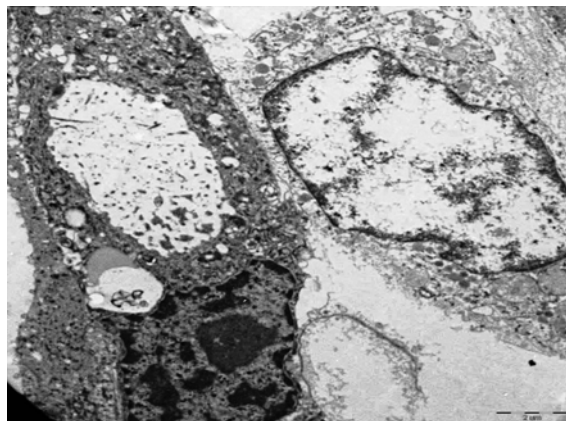


Рис. 7. В стромаобразовании РМЖ участвуют как клетки, формирующие инфильтрат опухоли, так и сами эпителиальные клетки

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. Гетерогенность протокового рака проявляется анапластическим (саркомоподобным) компонентом, в котором прослеживается способность эпителиальных опухолевых клеток приобретать свойство мезенхимальных клеток, не требующих стромы и обладающих агрессивным злокачественным потенциалом, влияющим на выживаемость больных.

Показано, что вместе с изменениями иммуногистохимических маркеров при феномене ЭМТ при РМЖ происходит перестройка ультраструктуры опухолевой клетки и ее клеточного окружения, в частности, экстрацеллюлярного матрикса. Методом трансмиссионной электронной микроскопии установлено, что в стромаобразовании участвуют как клетки, формирующие инфильтрат опухоли, так и сами эпителиальные клетки (рис. 4). Миофибробластоподобные клетки характеризуются двойным направлением дифференцировки, экспрессируя виментин и маркер десмин и альфа-гладкомышечный актин (рис. 5, 6). Периваскулярно в опухоли обнаружены плотные щелевые контакты между активированными фибробластами и снижение функциональной активности лимфоцитов, плазмочитов и макрофагов.

Таким образом, стромаобразование в опухоли является результатом многообразных взаимодействий опухолевых клеток, гематогенных и гистиогенных клеток соединительной ткани. Существенными дифференциально-диагностическими признаками эпителиальных комплексов инвазивного рака являются интенсивное накопление в клетках белка *p63*, *Ki67* по периферии эстроген- и прогестерон-положительных эпителиальных опухолевых комплексов, экспрессия цитokerатинов 7, 8, 18, 16, 19, ламинина в мембранах эпителиальных клеток, очаговый и диффузный лизис базальной мембраны с полной потерей ее первичных тинкториальных свойств, активация перифокального неоангиогенеза с / без выраженной иммунноклеточной реакции со стороны стромы, разрыхление, разволокнение, очаговый зернистый распад коллагена и уменьшение удельного объема паренхимы и стромы, увеличение удельного объема сосудов микроциркуляторного русла (рис. 7). Базофильный экстрацеллюлярный матрикс свидетельствует о накоплении гликозаминогликанов и менее зрелой соединительной ткани.

Литература

1. Вторушин С.В. Клинико-морфологические особенности мультицентрического роста и рецидивирования при раке молочной железы: автореф. дис. ... д.м.н. Томск, 2011.
2. Засадкевич Ю.М., Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Особенности экспрессии маркеров эпителиально-мезенхимального перехода E-кадгерина и виментина при разных иммуногистохимических вариантах карциномы молочной железы // Уральский медицинский журнал. 2014. № 2 (116). С. 29–32.
3. Конышев К.В., Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Изменение экспрессии рецепторов к эстрогену клетками карциномы молочной железы при регионарном метастазировании // Вестник уральской медицинской академической науки. 2015. Т. 53, № 2. С. 4–6.
4. Мнихович М.В., Вернигородский С.В., Буньков К.В. Эпителиально-мезенхимный переход, трансдифференциация, репрограммирование и метоплазия: современный взгляд на проблему // Морфологические ведомости. 2017. Т. 25, № 3. С. 14–21.
5. Мнихович М.В., Мидибер К.Ю., Галлямова А.Р., Эрзиева А.Г., Лучинин В.В., Анистратов С.В., Шилов А.В. Иммуногистохимическая оценка экспрессии кадгерин-катенинового комплекса при раке

молочной железы // Журнал анатомии и гистопатологии. 2017. Т. 6, № 1. С. 63–68. doi: 10.18499/2225-7357-2017-6-1-63-68.

6. Acloque H., Adams M.S., Fishwick K., Bronner-Fraser M., Nieto M.A. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease // *J. Clin. Invest.* 2009. V. 119, №6. P. 1438–1449.

7. Zasadkevich Y.M., Brilliant A.A., Sazonov S.V. Characteristics of the relation between epithelial-mesenchymal transition and proliferative activity in breast carcinomas // *European Journal of Cancer.* 2013. P. 216.

8. Kriz W., Kaissling B., Le Hir M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? // *J. Clin. Invest.* 2011. V. 121, №2. 468–474.

References

1. Vtorushin SV. Kliniko-morfologicheskie osobennosti mul'ticentricheskogo rosta i recidivirovaniya pri rake molochnoj zhelezy [Clinical and morphological features of multicentric growth and recurrence in breast cancer][dissertation]. Tomsk (Tomsk region); 2011. Russian.

2. Zasadkevich YUM, Brilliant AA, Sazonov SV. Osobennosti ehkspressii markerov ehpiteli-al'no-mezenhimal'nogo perekhoda E-kadgerina i vimentina pri raznyh immunogistohimicheskikh variantah karcinomy molochnoj zhelezy [features of the expression of markers of epithelially-mesenchymal transition E-cadherin, and vimentin with different immunohistochemical variants of breast carcinoma]. *Ural'skij medicinskij zhurnal.* 2014;2 (116):29-32. Russian.

3. Konyshov KV, Brilliant AA, Sazonov SV. Izmenenie ehkspressii receptorov k ehstrogenu kletkami karcinomy molochnoj zhelezy pri regionarnom metastazirovanii [changes in the expression of estrogen receptors by breast carcinoma cells in regional metastasis]. *Vestnik ural'skoj medicinskoj akademicheskoy nauki.* 2015;53(2):4-6. Russian.

4. Mnihovich MV, Vernigorodskij SV, Bun'kov KV. EHpitelial'no-mezenhimnyj perekhod, transdifferenciatsiya, reprogrammirovanie i metaplaziya: sovremennyy vzglyad na problem [Epithelial-mesenchymal transition, transdifferentiation, reprogramming and metaplasia: a modern view on the problem]. *Morfologicheskie vedomosti.* 2017;25(3):14-21. Russian.

5. Mnihovich MV, Midiber KYU, Gallyamova AR, EHrzheva AG, Luchinin VV, Anistratov SV, SHilov AV. Immunogistohimicheskaya ocenka ehkspressii kadherin-kateninovogo kompleksa pri rake molochnoj zhelezy [Immunohistochemical evaluation of the expression cadherin-catenin complex in breast cancer]. *ZHurnal anatomii i gistopatologii.* 2017;6(1):63-8. doi: 10.18499/2225-7357-2017-6-1-63-68. Russian.

6. Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto M. A. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J. Clin. Invest.* 2009;119(6):1438-49.

7. Zasadkevich YM, Brilliant AA, Sazonov SV. Characteristics of the relation between epithelial-mesenchymal transition and proliferative activity in breast carcinomas. *European Journal of Cancer.* 2013;216.

8. Kriz W, Kaissling B, Le Hir M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? *J. Clin. Invest.* 2011;121(2):468-74.

Библиографическая ссылка:

Мнихович М.В., Безуглова Т.В., Мидибер К.Ю., Буньков К.В., Васин И.В., Снегур С.В., Казанцева Г.П., Павлова Ю.Г. Молекулярная, иммуногистохимическая и ультраструктурная оценка эпителиально-мезенхимального перехода в карциномах молочной железы неспецифического типа // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2018. №4. Публикация 3-18. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-4/3-18.pdf> (дата обращения: 17.07.2018). DOI: 10.24411/2075-4094-2018-16137.*

* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-4/e2018-4.pdf>