



Морфологические и ультраструктурные особенности эпителиально-мезенхимальной трансформации при раке молочной железы

М.В. Мнихович

ФГБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» РАМН;
ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова»
Минздрава России, г. Москва, Россия

В статье проведён анализ морфологических проявлений и выявлены особенности ультраструктурных особенностей эпителиально-мезенхимальной трансформации при раке молочной железы (n=127). Морфологически у 86 пациенток верифицирован инфильтрирующий протоковый РМЖ, у 29 – инфильтрирующий дольковый и у 12 – медуллярная карцинома. Материал подбирался таким образом, что пациентки не получали до операции никакого специфического лечения.

Показано, что параллельно изменениям иммуногистохимических маркёров происходит перестройка ультраструктуры опухолевой клетки и её клеточного окружения, в частности, экстрацеллюлярного матрикса.

Ключевые слова: эпителиально-мезенхимальная трансформация, рак молочной железы, морфология, ультраструктурные изменения, экстрацеллюлярный матрикс

Введение. Эпителиально-мезенхимальная трансформация (ЭМТ) играет решающую роль в формировании организма и в дифференциации многих тканей и органов. ЭМТ также способствует восстановлению тканей, что может стать причиной фиброза органов (почка, клетчаточные пространства) и способствовать прогрессии рака с помощью различных механизмов [1-3,9]. ЭМТ наделяет клетки миграционными и инвазивными свойствами, стимулирует свойства стволовых клеток, предотвращает апоптоз и старение, способствует иммуносупрессии [4,6,12]. Эпителиально-мезенхимальная трансформация была впервые описана как морфологическая перестройка, которая определяет ряд ключевых стадий обособления и формирования эмбриональных тканей [5,7,10]. Позже оказалось, что ЭМТ играет важную роль в прогрессии эпителиальных опухолей в сторону дедифференцированного, более злокачественного фенотипа [8,9,11].

В процессе ЭМТ изменяется морфология и целый ряд биологических свойств клеток и тканей: эпителиальные клетки теряют клеточно-клеточные соединения и обособляются, теряют полярность, изменяют свою форму, приближаясь к фибробластоподобной, возрастает их подвижность, снижается пролиферация, происходит возрастание ангиогенеза, возникает иммуносупрессия, инактивируется созревание, и клетки приобретают свойства стволовых с их поли-

потентностью, увеличивается выживаемость клеток, их резистентность к апоптозу [12].

Эпителиально-мезенхимальная трансформация часто встречается и вовлечена в патогенез злокачественных эпителиальных опухолей человека, сопровождаясь агрессивным клиническим течением их с возрастанием инвазивных свойств и метастатических потенций (схема 1).

Сущность этого процесса заключается в потере клетками эпителиального фенотипа и приобретении мезенхимального, что характерно для нормального эмбрионального развития, органогенеза, а также встречается в патологии при склерозе органов и в карциномах.

Большинство зрелых тканей и органов в своём развитии может проходить многократную смену процессов ЭМТ и обратного процесса мезенхимально-эпителиального перехода. В опухолях возможен процесс возврата к той или иной стадии, этапу развития органа и ткани, давно известный в онкологии как анаплазия, и это определяет её прогрессию.

ЭМТ возникает под влиянием многих факторов микроокружения (воспаления с выделением различных факторов роста, цитокинов, активных форм кислорода, гипоксии и др.), воздействующих на соответ-

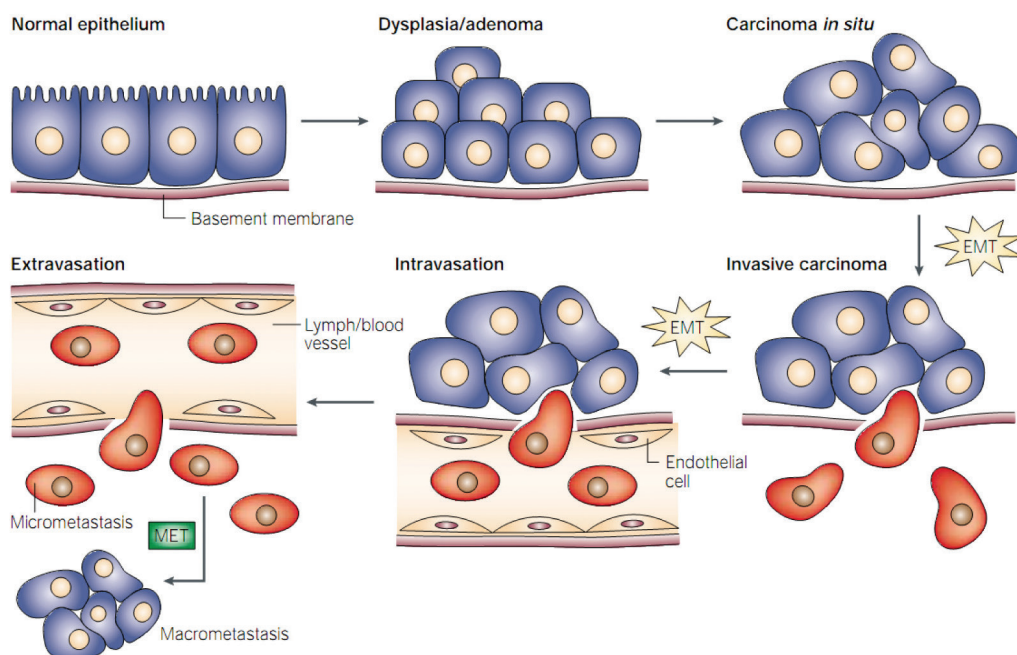


СХЕМА 1. ПРИНЦИПАЛЬНАЯ СХЕМА ФОРМИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕВОГО ПУЛА КЛЕТОК И РОЛЬ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ В МЕТАСТАЗИРОВАНИИ

ствующие рецепторы клеток, включающие молекулы сигнальной трансдукции, а затем на факторы транскрипции в ядре, запускающие генетические программы, определяющие морфологию и свойства клеток.

ЭМТ индуцируется сигналами, поступающими извне клетки. Это прежде всего растворимые ростовые факторы (эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста гепатоцитов (HGF/SF), факторы роста фибробластов (FGF), инсулиноподобные факторы роста (IGF) и трансформирующие факторы роста (TGF) и компоненты матрикса. Взаимодействие ростовых факторов со специфическими мембранными рецепторами приводит к активации внутриклеточных сигнальных каскадов, которые индуцируют нарушение межклеточных контактов и перестройки цитоскелета (схема 2).

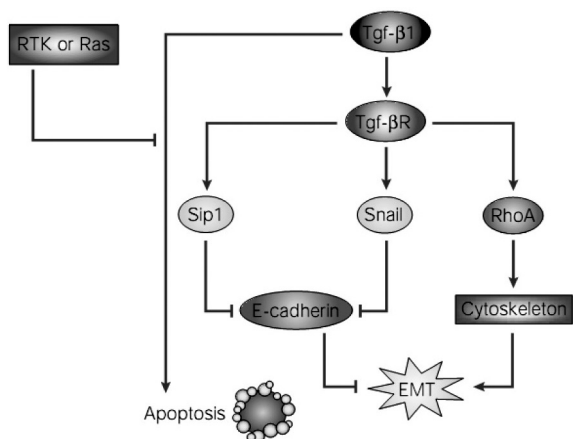


СХЕМА 2. СХЕМА УЧАСТИЯ ФАКТОРА МИКРООКРУЖЕНИЯ В ФОРМИРОВАНИИ ЭМТ

Понятно, что все эти свойства лежат в основе прогрессии опухоли и даже её устойчивости к терапии.

Цель исследования – изучение ультраструктурных признаков и критериев ЭМТ в опухолях молочной железы.

Материал и методы. Нами изучен оперативно удалённый материал от 127 женщин, по поводу рака молочной железы (РМЖ). Морфологически у 86 пациенток верифицирован инфильтрирующий протоковый РМЖ, у 29 – инфильтрирующий дольковый и у 12 – медуллярная карцинома. Возраст больных составил от 29 до 76 лет. Материал подбирался таким образом, что пациентки не получали до операции никакого специфического лечения. Для электронно-микроскопического исследования материал префиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида. Постфиксировали в 1% растворе OsO_4 на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4). Образцы заключали в заливочную смесь аралдита М и эпона-812. Полутонкие срезы окрашивали смесью азура 2 и фуксина. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Препараты изучали в трансмиссионном электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Германия). Параллельно с электронно-микроскопическим исследованием, иммуногистохимически выявлялись маркёры эпителия (панцитокератин), а также клеточно-клеточной адгезии Е-кадгерин, мезенхимальные маркёры – виментин, альфа-гладкомышечный актин.

Результаты и их обсуждение. Одним из основных морфологических признаков ЭМТ является обосо-

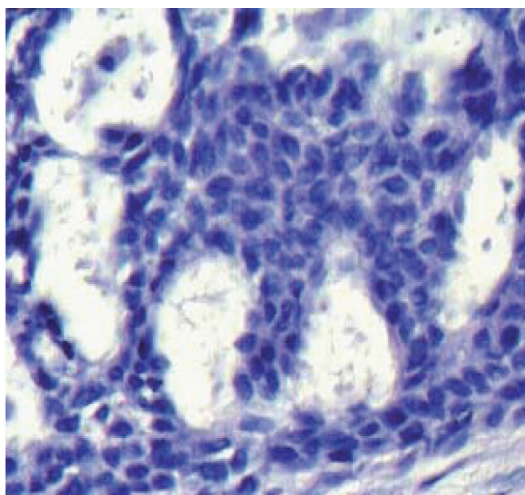


РИС. 1. МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ КАРТИНА ПРОТОКОВОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ; ОКРАСКА ГЕМАТОКСИЛИНОМ И ЭОЗИНОМ; X 200

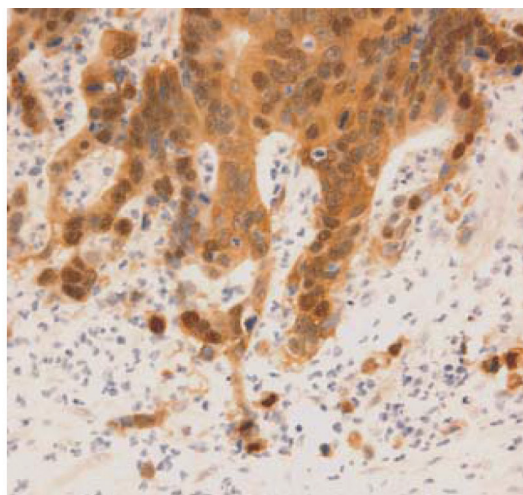


РИС. 2. ЭКСПРЕССИЯ Е-КАДГЕРИНА ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ; X100

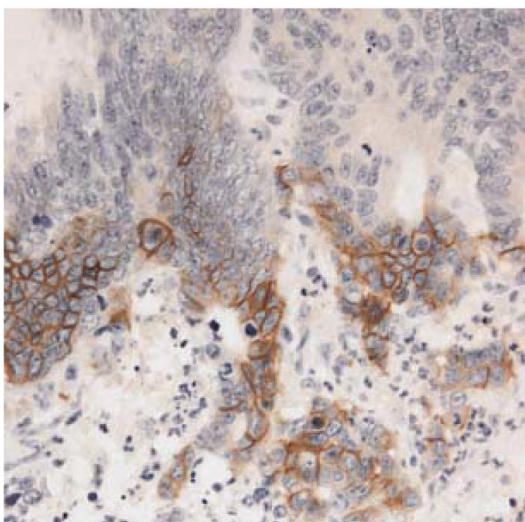


РИС. 3. ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ВИМЕНТИНА ПРИ ИНФИЛЬТРИРУЮЩЕМ ПРОТОВОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ; X100

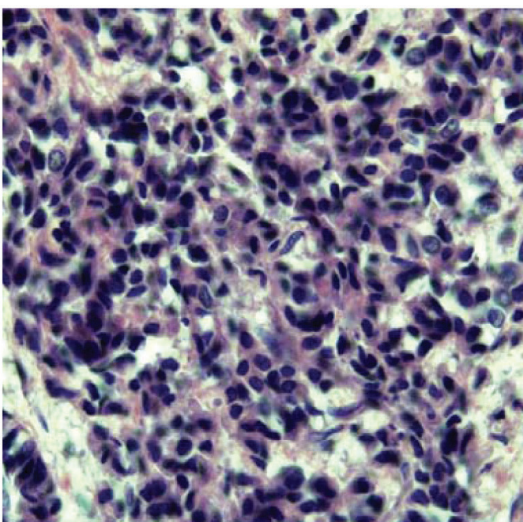


РИС. 4. ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫЕ КЛЕТКИ В УЗЛАХ ИНФИЛЬТРИРУЮЩЕГО ПРОТОВОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ; ОКРАСКА ГЕМАТОКСИЛИНОМ И ЭОЗИНОМ; X 200

бление опухолевых клеток вследствие нарушения в них клеточно-клеточной адгезии, обусловленной потерей экспрессии Е-кадгерина. Максимально этот признак выражен в медулярном раке молочной железы, где резко снижена, вплоть до отсутствия, мембранная экспрессия Е-кадгерина.

Морфологическая картина характеризуется множественными тубулярными либо солидно-железистыми структурами, располагающимися в плотной фиброзной ткани. Тубулярные и солидные комплексы образованы довольно мономорфными клетками со светлыми либо гиперхромными ядрами (рис.1). Митозы встречаются редко. По данным иммуногистохимического анализа, в случаях инфильтрирующего протокового РМЖ, мембранная экспрессия Е-кадгерина

сохранена в крупных комплексах опухолевых клеток и становится цитоплазматической или исчезает в мелких группах клеток, инвазирующих строму (рис.2).

Ультраструктурные проявления ЭМТ в различных гистологических типах рака молочной железы были однотипны. Обособление опухолевых клеток сопровождалось изменением их формы, приобретением ими фибробластоподобной формы с инвазией в строму. Дискомплексація опухолевых клеток, приобретение ими вытянутой фибробластоподобной формы уже являются признаками мезенхимальных клеток. В части случаев опухолевые клетки при этом экспрессируют и соединительно-тканый маркер виментин, что и было показано нами в инфильтрирующих карциномах МЖ (рис.3).

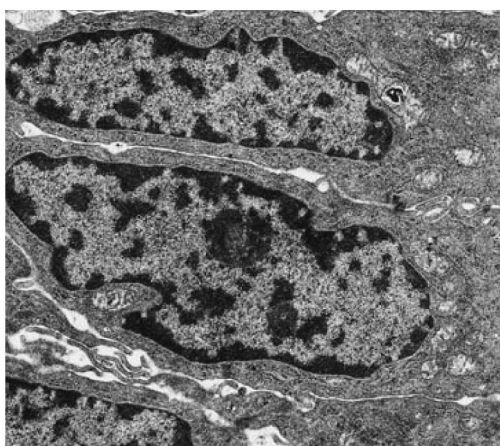


РИС. 5. ВЫТЯНУТЫЕ И ВЕРЕТЕНООБРАЗНЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ. ЭЛЕКТРОННОГРАММА; X 2500

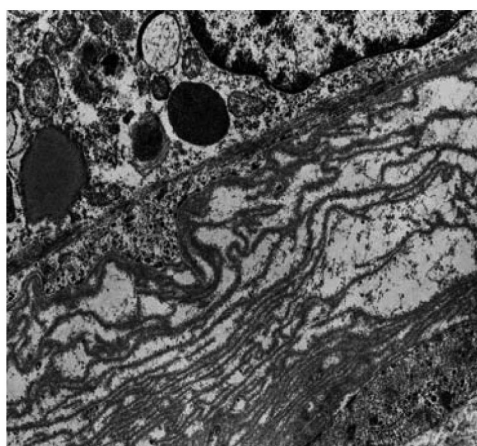


РИС. 6. ВОЛОКНА КОЛЛАГЕНА РЯДОМ С ЦИТОПЛАЗМОЙ ФИБРОБЛАСТОПОБОБНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ; ЭЛЕКТРОННОГРАММА X4000

Наиболее характерными признаками ЭМТ при РМЖ являются пучки, скопления миофибробластов в стро-ме. Нередко в таких участках экстрацеллюлярный матрикс дает базофилию, как показатель накопления гликозаминогликанов, более незрелого характера соединительной ткани. Местами, в участках активированной стромы с миофибробластами, накоплением в ней гликозаминогликанов, выраженной воспалительной инфильтрации, эпителий имеет клеточный и ядерный полиморфизм с наличием резко увеличенных гиперхромных ядер, изменением формы клеток с появлением отросчатых вытянутых клеток (рис.4) Значительная часть опухолевых клеток имеет полигональную форму, отросчатые поверхности округлые, овальные и, вместе с тем, в разной мере изрезанные ядерные контуры (рис.5). Рядом с резко вытянутыми веретенообразными клетками и между ними намечаются волокна коллагена (рис.6).

В ядрах – узкий периферический хроматин, диффузно конденсированный в глыбки, одно-два ядрышка. В цитоплазме таких клеток беспорядочно расположены разной длины и ширины фибриллы и фибриллярные структуры, напоминающие тонофиламенты, вакуоли, митохондрии, каналцы эндоплазматического ретикулума, рибосомы, полирибосомы, микровезикулы. На базальных поверхностях клеток просматриваются полудесмосомы. В цитоплазме некоторых клеток выявляются миелиноподобные структуры (рис.7).

Серое зернистое вещество межклеточных пространств с тончайшими и беспорядочно пересекающимися фибриллами либо очень плотно прилежит к поверхностям эпителиоцитов, либо между клеточными поверхностями и межклеточной субстанцией имеются узкие щели с незначительным количеством мелких зерен и беспорядочно пересекающимися тончайшими фибриллами или неплотными пучками

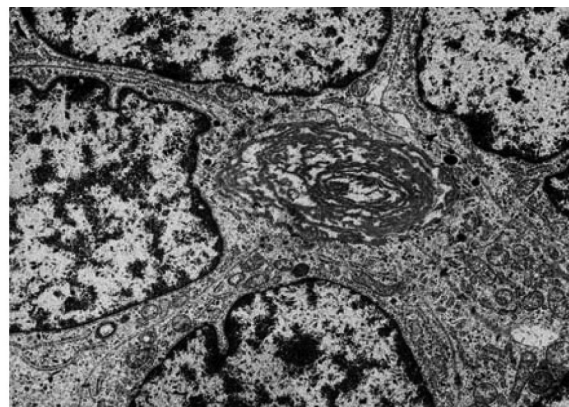


РИС. 7. МИЕЛИНОПОДОБНЫЕ СТРУКТУРЫ В ЦИТОПЛАЗМЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ; ЭЛЕКТРОННОГРАММА; X 3500

фибрилл, сориентированными перпендикулярно поверхностям опухолевых клеток (рис.8) .

Межклеточные пространства между опухолевыми клетками между клетками небогатыми фибриллами варьируют от умерено широких до узких (рис.9). Рядом с резко вытянутыми веретенообразными клетками атипичных эпителиоцитов намечаются волокна коллагена (рис.10).

Следовательно, этот процесс приобретения вытянутой, уплощённой формы нельзя рассматривать как созревание, дифференцировку клеток, а следует расценить как результат потери эпителиального маркера, т.е. первый шаг эпителиально-мезенхимальной трансформации. Такое же снижение, вплоть до потери экспрессии цитокератинов, наблюдается в опухолевых клетках, которые не только изменяют свою форму и становятся полиморфными, но и инвазируют строму, располагаясь среди соединительной

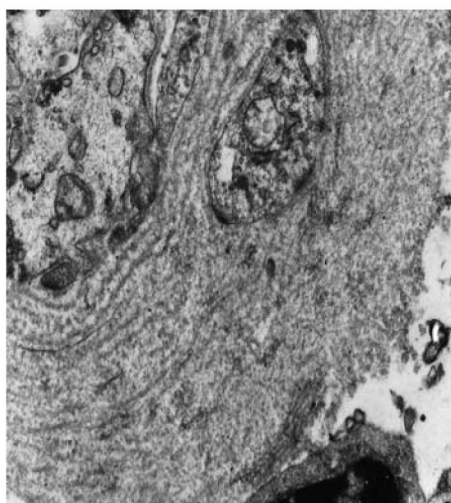


РИС. 8. АМОРФНОЕ ЗЕРНИСТОЕ
МЕЖКЛЕТОЧНОЕ ВЕЩЕСТВО;
ЭЛЕКТРОННОГРАММА; X 4000

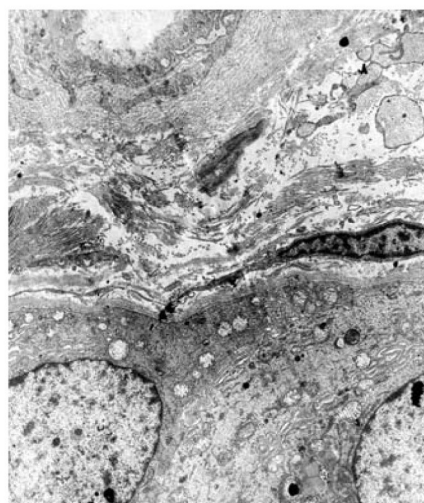


РИС. 9. К АТИПИЧНЫМ ЭПИТЕЛИОЦИТАМ
ПРИЛЕЖАТ ВОЛОКНА КОЛЛАГЕНА И
ФИБРОБЛАСТЫ; ЭЛЕКТРОННОГРАММА; X 2000

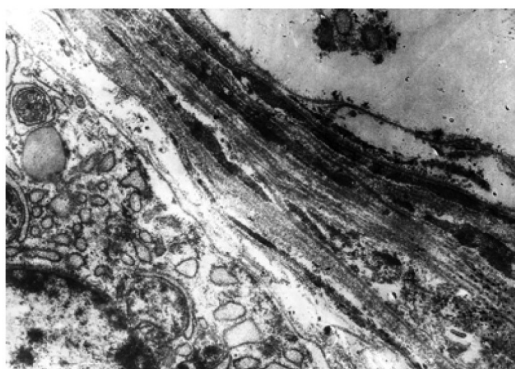


РИС. 10. РЯДОМ С РЕЗКО ВЫТЯНУТЫМИ
ВЕРЕТЕНООБРАЗНЫМИ КЛЕТКАМИ АТИПИЧНЫХ
ЭПИТЕЛИОЦИТОВ НАМЕЧАЮТСЯ ВОЛОКНА КОЛЛАГЕНА;
ЭЛЕКТРОННОГРАММА; X 4000

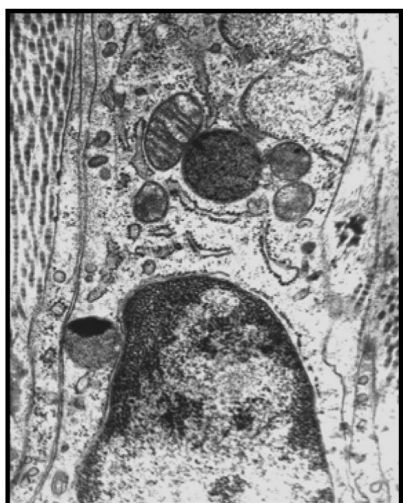


РИС. 11. ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНЫЙ ФИБРОБЛАСТ
В СТРОМЕ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ;
ЭЛЕКТРОННОГРАММА; X 4000

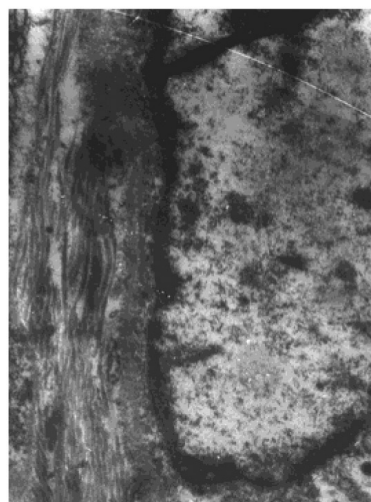


РИС. 12. СЕКРЕТИРУЮЩИЙ МИОФИБРОБЛАСТ
В СТРОМЕ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ;
ЭЛЕКТРОННОГРАММА; X 5000



ткани, иногда отростки этих клеток, сохраняя маркёры эпителия, проникают глубоко в подлежащую строму.

Главными стромальными клетками рака молочной железы, наряду с фибробластами (рис.11), особенно в местах инвазии в строму, были миофибробласты (рис.12).

По литературным данным они секретируют цитокины, протеазы и матриксные белки и являются прогностическим маркёром многих опухолей [14,17]. В нашем материале они имели большое представительство чаще в инвазивном крае опухоли. Таким образом, виден ещё один признак ЭМТ – нарушение межклеточной адгезии и инвазия эпителиальных клеток в интерстиций. Процесс ЭМТ определяется как одновременная экспрессия эпителиальных и мезенхимальных маркёров. Однако не установлено последовательность этих процессов: снижение эпителиальных маркёров встречается первым, а позже повышаются мезенхимальные маркёры или наоборот.

Таким образом, в процессе ЭМТ эпителиальные клетки теряют межклеточную адгезию с подавлением или изменением экспрессии E-кадгерина и маркёры эпителия, при этом клетки, подвергшиеся трансформации располагаются обособленно друг от друга, приобретают мезенхимальный фенотип, переходят в интерстиций и участвуют в продукции экстрацеллюлярного матрикса.

Клетки приобретают вытянутую, веретенообразную форму, теряют полярность и при гематоксилин-эозиновой окраске становятся плохо отличимы от фибробластов стромы. Происходит подавление или полная утрата клетками способности к экспрессии цитокератинов.

В опухолях ЭМТ лежит в основе прогрессии, важнейшие этапы её – изменение клеточно-клеточной и клеточно-матриксной адгезии, приобретение способности к движению, миграции клеток, угнетение апоптоза и увеличение выживаемости клеток, иногда симметричное деление опухолевых стволовых клеток создают предпосылки для усиленной инвазии и метастазирования опухолей, агрессивности течения их, устойчивости к терапии, плохому прогнозу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абелев Г.И. Механизмы дифференцировки и опухолевый рост / Г.И.Абелев // Биохимия. -2000. -Т. 65. -С. 126-137
2. Абелев Г.И. Дифференцировочные антигены в опухолях – зависимость от механизмов канцерогенеза и прогрессии (гипотеза) /Г.И.Абелев // Молекуляр. биология. -2003. -Т. 37. -С. 4-11
3. Василенко И.В. Эпителиально-мезенхимальная трансформация и другие трансформации в норме и патологии (обзор литературы и собственные исследования) / И.В.Василенко [и др.] //Патология. - 2009. -Т6, №2. - С. 4-10
4. Acloque H. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease / H.Acloque [et al.] // J. Clin. Invest. - 2009. - V.119. - P.1438-1449
5. Arendt, L.M., Rudnick, J.A., Keller, P.J., Kuperwasser, C., Stroma in breast development and disease. Semin. Cell Dev. Biol. - 2010. - V.21. - P.11-18
6. Barnes, J.L., Gorin, Y., Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P) H oxidases. Kidney Int. - 2011.- V.79. - P. 944-956
7. Bhowmick N.A. Transforming growth factor- β 1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism / N.A.Bhowmick [et al.] // Mol. Biol. Cell. - 2001. - V.12. - P. 27-36
8. Casas E. Snail is an essential mediator of Twist-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis / E.Casas [et al.] // Cancer Res. - 2011. - V.71. - P.245-254
9. Chapman H.A. Epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis / H.A.Chapman // Annu. Rev. Physiol. - 2011. - V.73. - P. 413-435
10. Cheng C.-W. Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the twohit hypothesis of tumor suppressor gene / C.-W. Cheng [et al.] // Oncogene. - 2001. -V.20. - P.3814-3823
11. Gregory P.A. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1 / P.A.Gregory [et al.] // Nat. Cell Biol. - 2008. - V.10. - P.593-601
12. Hashimoto N. Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis / N.Hashimoto [et al.] // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. - 2010. - V. 43. - P. 161-172
13. Hinz B. Tissue stiffness, latent TGF- β 1 Activation, and mechanical signal transduction: implications for the pathogenesis and treatment of fibrosis / B.Hinz // Curr. Rheumatol. Rep. - 2009. - V.11. - P.120-126



14. Hinz B. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell / B.Hinz // J. Biomech. - 2010. - V.43. - P.146-155
15. Kaimori A. Transforming growth factor-b1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro / A.Kaimori [et al.] // J. Biol. Chem. - 2007. - V.282. -P.22089-22101
16. Lombaerts M. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines /M.Lombaerts [et al.] // Br. J. Cancer. - 2006. - V.94. - P.661-671
17. McAnulty R.J. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease / R.J.McAnulty // Int. J. Biochem. Cell Biol. - 2007. - V. 39. - P.666-671

Summary

Morphological and ultrastructural features of epithelial-mesenchymal transformation in breast cancer

M.V. Mnihovich

*FSBI «Scientific Research Institute of Human Morphology,» Russian Academy of Medical Sciences;
SBEI HPE «Russian National Research Medical University named N.I Pirogov «Russian Ministry of Health,
Moscow, Russia*

In the article the morphological manifestations and revealed features of ultrastructural peculiarity of epithelial-mesenchymal transformation in breast cancer (n = 127) is analyzed. Morphologically in 86 patients verified infiltrating of ductal breast cancer, in 29 - infiltrating lobular and 12 - medullary carcinoma. The material was selected in such a way that the patient did not receive before surgery any type of specific cure.

It is shown that to parallel changes of immunohistochemical markers is happened reorganization of ultrastructure of tumor cell and its environment, in particular, the extracellular matrix

Key words: epithelial-mesenchymal transformation, breast cancer, morphology, ultrastructural changes, extracellular matrix

АДРЕС ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Мнихович Максим Валерьевич – ведущий научный сотрудник центральной патологоанатомической лаборатории НИИ морфологии человека РАМН; Российская Федерация, г.Москва, ул. Цюрупы, 3
E-mail: mnichmaxim@yandex.ru