

Н.В. Бородай
І.О. Дацюк
В.Б. Топчій
В.Ф. Чехун

Інститут експериментальної
патології, онкології
і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
НАН України

ДУ «Національний інститут
раку», Київ, Україна

Ключові слова: фібroadеноматоз,
фібroadенома, рак молочної
залози, екстрацелюлярний
матрикс, гомоцистеїн.

ГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ЕКСТРАЦЕЛЮЛЯРНОГО МАТРИКСУ ПУХЛИН ТА ВМІСТ ГОМОЦИСТЕЇНУ У ПЛАЗМІ КРОВІ ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Резюме. У оперативно видалених молочних залозах 62 пацієнток, хворих на фібroadеноматоз (ФАМ), фібroadеному (ФА) та рак молочної залози (РМЗ) проведено гістохімічний аналіз компонентів екстрацелюлярного матриксу та аналіз змін окремих його компонентів при різних рівнях вмісту гомоцистеїну в плазмі крові цих хворих. Показано, що в ФАМ та ФА знаходяться різні типи глікозаміногліканів, а в злоякісних пухлинах переважають хондроїтинсульфати А та С або сульфомуцини. Встановлена гетерогенність стромальних елементів у залежності від переважання десмолітичних або десмопластичних процесів. Встановлено кореляційний зв'язок між експресією колагена ІV типу, еластолізісом та рівнем гомоцистеїну в плазмі крові.

ВСТУП

Відомим є факт, що канцерогенез обумовлений накопиченням соматичних мутацій в епітеліальних клітинах, а також впливом на цей процес мікрооточення, яке включає в себе позаклітинний (екстрацелюлярний) матрикс (ЕЦМ), систему кровоносних судин, клітини запалення, а також фібробласти [1, 10–12]. ЕЦМ складається із структурних фібрилярних білків, представлених різними типами колагену, еластину та інтерстиціального матриксу, який утворений адгезивними глікопротеїнами, зануреними в гель, більшу частину яких складають протеоглікани і глікозаміноглікани (ГАГ). До інтерстиціального матриксу відносяться і базальні мембрани (БМ), які оточують епітеліальні, ендотеліальні та гладком'язові структури.

Завдяки своїм поліаніонним властивостям та особливостям конформації, ГАГ здатні вступати у специфічні взаємодії з молекулами різної хімічної природи, в тому числі із білками, проявляючи високу біологічну активність. ГАГ разом із глікопротеїнами та гліколіпідами приймають участь у регуляції проліферації та диференціювання, є медіаторами міжклітинних взаємодій у гемопоезі та імунній відповіді. Клітинні ГАГ активно залучаються до неопластичної трансформації, що проявляється у зміні їх складу, структури та метаболічної активності [2–4].

БМ відіграють важливу роль у якості субстрата, який сприяє адгезії, міграції та проліферації клітин, а також впливають на форму клітин, їх розташування та деякі інші функції [13]. Індикатором цілісності БМ можна вважати характер експресії колагена ІV типу [5].

Відомо, що гомоцистеїн — сірковмісна кислота, яка є проміжним продуктом метаболізму метіоніна та цистеїна, може також залучатися до низки обмінних процесів в організмі людини, в тому числі і при пухлинному рості. Гомоцистеїн є інгібітором ключових механізмів ангіогенеза, включаючи проліферацію ендотеліальних

клітин судин, інвазію та перебудову екстрацелюлярного матриксу [7]. Гіпергомоцистеїнемія індукує еластолітичну активність металопротеїназ 2 та 9, що сприяє фрагментації більшості компонентів ЕЦМ, відіграючи роль у міграції клітин та інвазивному рості [6]. Крім того, за даними [9], тіолактон гомоцистеїну, який продукується пухлинними клітинами, може зв'язуватися з білками, нуклеїновими кислотами та ГАГ, впливаючи на функції та структури білків, що приводить до змін у мембранах клітин, а також до експресії деяких генів у злоякісних клітинах [8].

Мета дослідження — аналіз змін ГАГ інтерстиціального матриксу та волокнистих структур доброякісних неоплазій та раку молочної залози (РМЗ), а також вивчення впливу гомоцистеїну на компоненти ЕЦМ.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріал дослідження — 62 оперативно видалені тканини молочних залоз жінок: з приводу фібroadеноматозу (ФАМ) — 10 випадків, фібroadеному (ФА) — 11 випадків, раку різної гістологічної структури — 41 випадок.

Для гістохімічного виявлення ГАГ та глікопротеїнів проведені: реакція Мак Мануса-Моурі (AB-PAS реакція, рН = 2,5), яка базувалася на послідовному блокуванні та забарвленні різних типів мукополісахаридів за рахунок контрастуючих кольорів та проведення ферментативного контролю (амілаза, гіалуронідаза); забарвлення альціановим синім при рН = 2,0 для виявлення ГАГ (сіало- та сульфомуцинів); забарвлення альціановим синім при рН = 1,0 для виявлення сульфатованих субстанцій муцинів.

Для виявлення проколагенової фракції колагену зрізи забарвлювали пікрофуксином за методом ван Гізон, який визнаний гістохімічним методом детекції цієї речовини. Еластичні волокна виявляли резорцин-фуксином та орсеїном за методом Унна —

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Тенцера. Імуногістохімічне дослідження колагену IV типу проведено з використанням комерційних моноклональних антитіл фірми «ДАКО» (клон С1V 22, розведення 1 : 50) за стандартною методикою.

Для аналізу та оцінки інформативності рівня гомоцистеїну та експресії IV колагену, а також еластолізу була використана модель множинної лінійної регресії та вибіркового коефіцієнта кореляції [6]. Значення рівня експресії колагену IV типу, яке відповідало «+» було переведено до чисельного вигляду — 1, «++» — 2, «+++» — 3 відповідно.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При гістохімічному дослідженні ФАМ виявлено, що волокна перидуктальних муфт навкруги кістозних порожнин та деякі волоконця міжкістозної тканини відрізнялись альціанофілією. Обробка гіалуронідазою попереджає альціанофілію волокон ложевої стромі, що свідчить про наявність у ній гіалуронової кислоти. Гіалуронідаза не змінювала інтенсивності альціанофілії аморфних мас у просвітах внутрішньодолькових молочних ходів та волокон передуктальних муфт кістозно розширених протоків. У той же час вона посилювала PAS-реакцію та виявляла більшу кількість аморфно-волокнистих структур, які сприймали цю реакцію. Амілаза різко зменшувала PAS-реакцію в цитоплазмі епітеліальних клітин, у той час як у волокнах та гомогенних масах міждолькової сполучної тканини (СТ) ця інтенсивність не змінювалась. У просвітах кістозно розширених протоків, волокнах міждолькової та перидуктальної тканини, а також секреті відзначалося посилення інтенсивності альціанофілії. При гістохімічному дослідженні колагенових волокон відзначено, що волокнисті структури при ФАМ дають різної інтенсивності забарвлення цих стромальних компонентів. Про це свідчить слабке забарвлення ніжноволокнистих структур, інтенсивність якого зростає при їх дозріванні та гомогенізації. У цитоплазмі сполучнотканинних клітин колаген виявляється у вигляді гомогенної субстанції або у вигляді гранул. Еластичний каркас виявляється тільки у протоках, інтерстиціальній тканині та кістах. У залозистих структурах фіброаденоматозних вузлів еластичні волокна не виявляли. Еластоз прогресивно збільшувався при гіперплазії епітеліальних елементів.

Таким чином, при ФАМ у міждольковій СТ переважає гіалуронова кислота та сіалоглікопротеїни, у внутрішньодольковій стромі — гіалуронова кислота, навкруги кістозно-розширених протоків та в міжкістозній тканині — хондротинсульфати типу А та С, а в просвітах молочних ходів — сульфомуцини. Було відзначено, що в місцях фібробластичної реакції та інфільтрації лімфоцитів клітинними елементами переважають ГАГ, альціанофілія яких не «знімається» гіалуронідазою, а, навпаки, підсилюється обробкою амілазою, що свідчить про присутність сульфатованих ГАГ, у тому числі хондротинсульфатів А та С. Ці клітинні інфільтрати відсутні в тих місцях, де альціанофілія тканини обумовлена наявністю гіалуронової кислоти, або переважають PAS-позитивні субстанції, які не блокуються амілазою.

Цитоплазмі епітеліальних клітин ФА та волокнисті структури, які відокремлюють дольки, переважно була притаманна альціанофілія, яка повністю блокувалась при обробці гіалуронідазою, що свідчить про присутність у стромі доброякісних пухлин гіалуронової кислоти. Цитоплазми епітеліальних клітин та волокнисті структури, які відокремлюють дольки, переважно PAS-позитивні. При ФА виявляли незначне скупчення проколагену у внутрішньодольковій стромі периканалікулярних ФА та в стромі залозистих структур у випадках інтраканалікулярних ФА. У міждольковій стромі, навпаки, відзначали більш інтенсивне забарвлення пікрофуксином. Все це свідчить про нерівномірне розташування проколагену в різних місцях стромальних компонентів ФА, що обумовлено ступенем колагенізації волокнистих структур. Еластичні волокна відсутні у внутрішньодольковій стромі периканалікулярних та інтраканалікулярних фіброаденоматозних вузлів, переважно там, де знаходяться гіалінізовані волокнисті структури.

Отже, проведений нами гістохімічний аналіз свідчить про те, що незважаючи на різноманітність типів ГАГ, гіалуронова кислота є переважаючим типом ГАГ у стромі доброякісних новоутворень молочної залози. Однак при вираженій реакції фібробластичних елементів та лімфоцитарній інфільтрації міжкоміркової грубо-волокнистої СТ у ній, поряд із гіалуроновою кислотою та PAS-позитивними субстанціями, в незначній кількості виявляють сульфатовані форми ГАГ.

При гістохімічному аналізі хімічного складу ЕЦМ карцином відзначено, що сполучнотканинні волокна та аморфні гомогенні маси відзначаються інтенсивною альціанофілією, яка не «знімається» гіалуронідазою, що свідчить про переважання в стромі цих пухлин хондротинсульфатів А та С та сульфомуцинів. Останні виявляли у складі секрету та міжклітинних просторах пухлинного епітелію. Накопичення сульфатованих ГАГ спостерігали в ділянках гомогенізації та нагрубання СТ волокон, а гіалуронову кислоту виявляли лише на поверхні клітин, які активно діляться, та у пухлинах з агресивним характером росту (рис. 1).

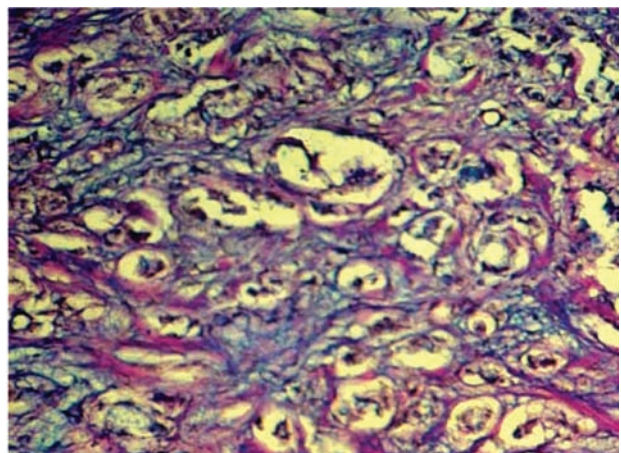


Рис. 1. Незначна кількість PAS-позитивних речовин та поява глікозаміногліканів у волокнистих структурах РМЗ (x 100)

Нами відзначено строкатість забарвлення волокнистих структур у карциномах молочної залози не тільки при різних гістологічних формах раку, а навіть у різних локусах однієї і тієї ж пухлини; ця особливість різко виражена при скіррозних формах РМЗ з явищами десмоплазії (рис. 2).

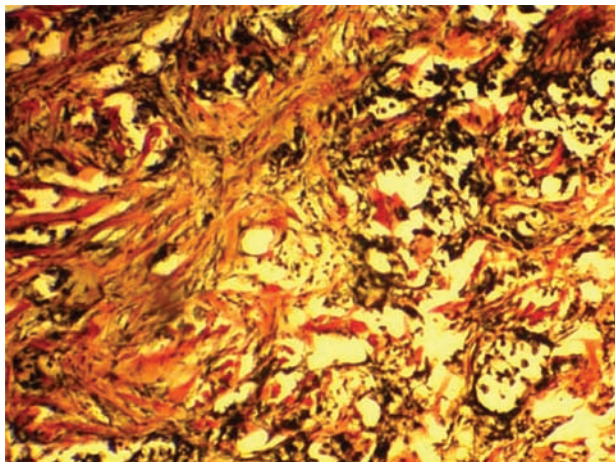


Рис. 2. Нерівномірний розподіл колагену у волокнистих структурах РМЗ (x 100)

Вищезазначене свідчить про спотворення, а місцями і зовсім гальмування процесу колагенізації, що в свою чергу призводить до розвитку несформованих, неповноцінних волокон у стані еластоподібної дегенерації.

Важливою ознакою, яка характеризує стан строми злоякісних пухлин, є ступінь прояву процесів дезорганізації, дистрофії, фрагментації та розвитку хімічно змінених зрілих колагенових волокон. Дистрофічно-деструктивні процеси в стромі карцином виявляються неоднаковими і визначають стадію процесу та рівень темпу прогресування пухлини. Так, у більшості РМЗ зі скіррозою формою росту в стромі переважають дистрофічні зміни, які не виходять за межі змін тінкторіальних властивостей сполучнотканинних волокон, проявом яких є збільшення кількості еластоподібно змінених колагенових структур. Для інфільтруючих форм РМЗ, які характеризуються швидким, прогресуючим ростом, характерним є переважання деструктивно-літичних процесів у волокнах строми. Морфологічним проявом цього є зменшення кількості волокон, аж до їх відсутності. В стромі таких пухлин виявляють лише фрагменти еластоподібно змінених волокон або гомогенно-зернисті маси фукселінофільного матеріалу як прояв коліквацийного розпаду та лізису волокнистих структур.

У багатьох кровоносних судинах спостерігали розриви внутрішньої еластичної мембрани та зернисто-глибчатий розпад її фрагментів, а в більш крупних судинах — гомогенізацію періадвентиціальної СТ із зростанням у ній кількості еластоподібно змінених колагенових волокон.

Причина змін тінкторіальних властивостей колагенових фібрил полягає у зміні хімізма білково-полісахаридних комплексів, які в свою чергу від-

ображають порушений метаболізм клітин. Тобто, еластоподібні фібрилярні структури утворюються в місцях, де переважають сульфатовані форми ГАГ типу хондроїтинсульфатів А та С, є домінуючим типом ГАГ у стромі карцином молочної залози.

Нами також відзначено, що перетворення СТ в грубоволокнисту, гомогенізовану субстанцію з дистрофічними змінами колагену не супроводжується реакцією з боку імункомпетентних клітин. І навпаки, розпад сполучнотканинних волокон та подальше хімічне перетворення цих волокон, є більш суттєвим стимулом, який викликає реакцію імункомпетентних клітин, ніж зміни з боку самих пухлинних клітин, а саме проліферація, рівень анаплазії, некроз.

У карциномах молочної залози еластична тканина інколи зовсім відсутня або вона визначається в стромі пухлин у вигляді поодиноких, хаотично розташованих волокон, більша частина з яких дезорганізована.

Головним структурним білком ЕЦМ є колаген IV типу, який відіграє важливу роль у пухлинній інвазії, оскільки його рівень впливає на метастатичний потенціал трансформованих і злоякісних клітин [2, 13]. При дослідженні характеру експресії колагену IV типу при РМЗ була встановлена виражена її варіабельність при різних за гістотипами карциномах (рис. 3).

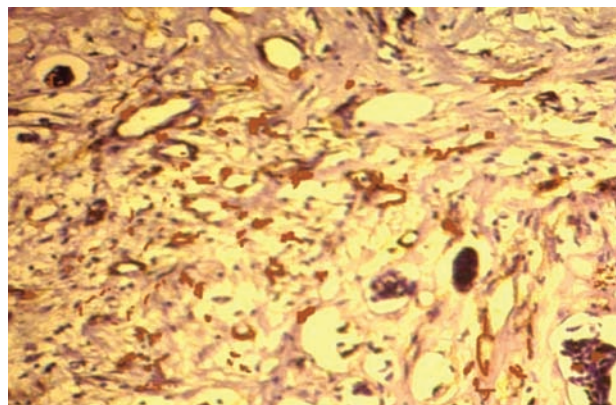


Рис. 3. Експресія колагену IV при внутрішньопротоковому РМЗ (x 100)

Так, при тубулярному та солідному внутрішньопротоковому варіантах цей білок виявляли у вигляді тонкої безперервної лінії або у вигляді розщеплених на тонкі короткі волоконця фрагментів, які забарвлювались у коричневий колір. У більшості випадків інвазивних варіантів РМЗ (дольковому або протоковому) колаген IV типу майже зовсім не виявлявся. Однак слід звернути увагу, що в деяких випадках інвазивного протокового і долькового РМЗ експресія колагену була виявлена не тільки в базальних мембранах, а і в цитоплазмі атипичних клітин у вигляді дифузного її забарвлення. Такий характер локалізації колагену ми не спостерігали в жодному випадку при доброякісних процесах молочної залози та інших типах РМЗ.

Експресія колагену IV залежить, з одного боку, від його продукування, а з іншого — від його розщеплення. Обидва процеси пов'язані з проліферацією епітелію та активністю ферментів, в першу чергу металопротеїназ, а також з гормональними факторами. Оскільки гомоцистеїн впливає на компоненти ЕЦМ, а базальна мембрана є його складовою, нами досліджено експресію колагену IV та лізис еластичних волокон (еластолізис) при різних рівнях гомоцистеїну в плазмі крові хворих на РМЗ. Показано, що при низькій концентрації гомоцистеїну в плазмі крові (7,32 мкмоль/л) виявляли низький рівень експресії колагену IV в базальній мембрані судин та протоків у злоякісних пухлинах молочної залози; при зростанні рівня гомоцистеїну (11,44 мкмоль/л і більше) цей показник збільшувався. За даними літератури це можна пояснити насамперед неоднаковим впливом різних концентрацій гомоцистеїну на матриксні металопротеїнази (ММП) 2 та 9: при низьких концентраціях гомоцистеїну відзначено активацію ММП 2, при високих — інгібування активності цього фермента [8].

При аналізі зв'язку рівня гомоцистеїну та експресії колагену IV в базальній мембрані нами було виявлено пряму помірну кореляцію між цими показниками, як при низьких, так і високих концентраціях гомоцистеїну ($r = 0,41$ і $r = 0,43$ відповідно).

Також був проведений аналіз впливу різних рівнів гомоцистеїну на еластичний компонент ЕЦМ. Виявлено, що при низьких концентраціях гомоцистеїну (8,40 мкмоль/л) відзначається лізис незначної частини еластичних волокон навколо судин та протоків, які зберігаються в пухлинах молочної залози, а при високих концентраціях (11,22 мкмоль/л) — еластолізис переважної більшості волокон. Виявлений зв'язок між рівнем гомоцистеїну в плазмі крові хворих на РМЗ та інтенсивністю проявів еластолізу можна пояснити тим, що високі концентрації гомоцистеїну індукують еластолітичну активність ММП 2 та 9.

Отже, нами продемонстровано, що різноманітність ГАГ у доброякісних пухлинах молочної залози змінюється на переважання одного або двох типів ГАГ при РМЗ — хондроїтинсульфатів А та С або сульфомуцинів. Для характеристики стромы карцином молочної залози особливого значення набувають співвідношення десмолітичних та десмопластичних процесів, що проявляється варіабельністю кількості волокнистих структур та їх гетерогенністю. У хворих на РМЗ експресія колагену IV в базальних мембранах, а також лізис еластичних волокон стінок артеріальних судин та ЕЦМ залежать від концентрації гомоцистеїну в плазмі крові. Високі концентрації останнього сприяють збільшенню експресії колагену IV і підвищенню еластолізу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Золотова ЕН, Доросевич АЕ. Современные аспекты морфогенеза рака молочной железы. Архив патол 2004; 1: 51–2.
2. Пальцев МА, Иванов АА, Северин СЕ. Межклеточные взаимодействия. Москва: Медицина, 2003. 288 с.

3. Серов ВВ, Шехтер АВ. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология). Москва: Медицина, 1981. 312 с.

4. Русова ТВ, Рыкова ВИ, Корель ВА и др. Гликозаминогликаны пластинки роста тела позвонков у больных идиопатическим сколиозом. БЭБИ 2005; 6: 711–3.

5. Гаенко ГП, Хайдуков СВ, Молотковский ЮГ. Экспресия коллагена IV типа клетками карцином легкого Льюис. БЭБИ 2004; 137 (1): 78–80.

6. Ключин ДА, Петунин ЮИ. Доказательная медицина. Применение статистических методов. Москва: ООО «И.Д. Вильяма», 2008. 320 с.

7. Chararria T, Rodrigues-Nicto S, Sanchez-Limenez P, et al. Homocysteine is a protect-inhibitor of human tumor cell gelatinases. Biochem Biophys Res Commun 2003; 303: 572–5.

8. Guo H, Lee J, Hiroyasu U, et al. Effects of folic acid and magnesium on the production of homocysteine-induced extracellular matrix metalloproteinase-2 in cultured rat vascular smooth muscle cells. Circ J 2006; 70: 141–6.

9. McCully KS. The biomedical significance of homocysteine. J Scient Exploration 2001; 15: 5–20.

10. Sade EH. Regulation of interaction between cells and extracellular matrix: a command performance in several stages. J Clin Invest 2001; 107: 781–3.

11. Shekhar MP, Werdell J, Santner S, et al. Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: implications for tumor development and progression. Cancer Res 2001; 61: 1320–6.

12. Shekhar MP, Pauley R, Heppner G. Host microenvironment in breast cancer development: extracellular matrix – stromal cells. Breast Cancer Res 2003; 5 (3): 130–5.

13. Werb Z, Ashkenazi J, Mac Auley A, Weigen JF. Extracellular matrix remodeling as a regulator of stromal-epithelial interaction during mammary gland development, involution and carcinogenesis. Braz J Med Biol Res 1996; 29 (9): 1087–97.

THE HISTOCHEMICAL ANALYSIS OF THE EXTRACELLULAR MATRIX OF TUMORS AND HOMOCYSTEINE CONTENT IN BLOOD PLASMA OF BREAST CANCER PATIENTS

N.V. Boroday, I.O. Datsyuk, V.B. Topchii, V.F. Chekhun

Summary. The extracellular matrix (ECM) in the samples of fibroadenoma (FA), fibroadenomatosis (FAM) and breast cancer (BC) resected in 62 patients were analysed histochemically. The blood content of homocysteine in these patients was assayed. The various types of glycosaminoglycans in FA and FAM were demonstrated while the chondroitinesulphate A and C or sulphomucynes prevail in BC. The qualitative changes of collagen fibrils or their destruction and lysis in BC were observed. The correlation between collagen IV expression and elastolysis and homocysteine content in blood plasma was demonstrated.

Key Words: fibroadenomatosis, fibroadenoma, breast cancer, extracellular matrix, homocysteine.

Адреса для листування:

Бородай Н.В.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України