

Тучные клетки молочной железы в процессе формирования рака молочной железы в эксперименте

М.Э. Дзодзикова, В.А. Шахламов, Т.Т. Березов, К.Д. Салбиев

Тучные клетки впервые описал Р. Ehrlich в 1877 году. Это особая функционально лабильная группа клеток, располагающаяся во всех органах и тканях без исключения, влияющая на микроциркуляцию, трофику тканей и функцию клеток микрорайона [2,13,15]. За более чем столетний период изучения тучных клеток (мастоцитов, гепариноцитов, лаброцитов) накопилось большое количество фундаментальных сведений, обобщение которых позволяет выделить две их основные функции: 1) участие в образовании межклеточного вещества путем синтеза сульфатированных гликозаминогликанов (эта пластическая функция клеток обеспечивает нормальную структуру соединительной ткани); 2) синтез, накопление и экзоцитоз биологически активных веществ, влияющих на микроокружение, т.е. регуляция местного гомеостаза, прежде всего путем участия в контроле за тонусом артериол и проницаемостью капилляров [6,9].

С другой стороны, почти во всех экономически развитых странах рак молочной железы является самой распространенной формой онкологических заболеваний у женщин, составляя во Франции 28% от всех случаев злокачественных заболеваний у женщин, в США – 29%, в Швеции 24%, в Японии – 13,9% [18]. В России к 1999 г. этот показатель равен 19% [12], высокие показатели заболеваемости раком молочной железы (РМЖ) в 2000 году были отмечены в Северной Осетии – 60,2 (на сто тысяч населения); в Санкт-Петербурге – 49,3; в Москве – 47,7; низкие – в Дагестане – 21,8; в Алтайском крае – 21,9; в республике Мари Эл – 23,8; в Чувашской республике – 24,0 [8,12]. Уровень заболеваемости раком молочной железы в Северной Осетии к 2002 году

несколько снизился (59,1 на сто тысяч населения), по сравнению с 1998 и 1999 гг. (63,4 и 62,0 соответственно), но это все же высокий уровень, по сравнению с 1997 годом (27,9) [3,4].

Несмотря на большое количество исследований онкологической направленности, нет еще окончательного представления о механизмах развития опухоли [1,5,7,8,14,17]. Вместе с тем, мало работ посвящено изучению региональных и системных реакций соединительной ткани в онкогенезе и канцерогенезе вообще и роли тучных клеток в реагировании стромы в этих условиях в частности [7,10,11,16].

Целью настоящего исследования явилось изучение динамики морфологических изменений в популяции тучных клеток (ТК) молочной железы у крыс на разных этапах формирования рака молочной железы.

Исследование проведено на 120 белых беспородных крысах-самках, массой 120-150 г. Опухоли молочной железы индуцировали путем подкожных инъекций химического канцерогена N-метил-N-нитрозомочевина (МНМ). МНМ вводили подкожно в основание 2-й молочной железы слева в дозе 2,5 мг/крысу в виде раствора в 0,2 мл изотонического раствора натрия хлорида. 90 животным было сделано по 6 инъекций с интервалом в 1 неделю (суммарная доза канцерогена 15 мг/крысу). Контрольной группе вводили по 0,2 мл изотонического раствора натрия хлорида. Животных содержали в условиях постоянного (24 часа в сутки) освещения [14]. Декапитировали их под эфирным наркозом в одно и то же время суток. Полученные опухоли гистологически были верифицированы большей частью как аденокарциномы. Объектом морфологических исследова-

Маргарита Эльбрусовна Дзодзикова – к.б.н., ст.н.с. центральной научно-исследовательской лаборатории СОГМА.

Владимир Аркадьевич Шахламов – чл.-корр. РАМН, д.м.н., проф., зав. лабораторией экспериментальной патологии клетки НИИ морфологии человека РАМН.

Темирболат Темболатович Березов – действительный член РАМН, д.м.н., лауреат премии им. Н.И. Пирогова Президиума РАМН, заслуженный деятель науки и техники РСО-А, проф. кафедры биохимии Российского университета дружбы народов.

Казбек Дахцикоевич Салбиев – действительный член РАЭН, д.м.н., проф., зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии, ректор СОГМА.

№ опыта	Дни воздейст.	Статист. показат.	Кол-во туч. кл.	Зрелые туч. кл.	Дегран. туч. кл.	Тот. дег. туч. кл.
	контроль	M	6,68	2,71	2,4	1,58
		m	0,67	0,56	0,31	0,46
		%	100	41	36	23
1	64-й день	M	12,25	3,31	5,26	3,68
		m	0,49	0,54	0,71	0,66
		t	7,44	0,38	4,01	2,65
		p	<0,001	-	<0,002	<0,05
		%	100	27	43	30
2	97-й день	M	44,7	37,06	6,28	1,36
		m	7,74	8,02	2,04	0,72
		t	4,89	4,27	1,88	0,26
		p	<0,001	<0,001	<0,10	-
		%	100	83	14	3
3	180-й день	M	41,6	4,28	9,7	27,6
		m	2,32	0,61	1,23	2,38
		t	14,49	1,89	1,75	10,75
		p	<0,001	<0,10	<0,10	<0,001
		%	100	10	24	66

дилатном буфере или 0,1 М фосфатном буфере Милонига (pH=7,2) с дофиксацией в 1% растворе четырехоксида осмия. Обезвоживали в спиртах и ацетоне и заключали в эпоксидные смолы Эпон-812 и Араалдит М. Полутонкие срезы окрашивали 1% раствором метиленовой сини с 0,5% раствором буры по Линну. Ультратонкие срезы контрастировали 0,2% раствором уранилацетата и цитратом свинца по Рейнольдсу. Изучение и фотосъемка препаратов осуществлялась в электронном микроскопе Tesla-BS 500.

Первая декапитация была произведена на **64-й день** с начала эксперимента, после завершения

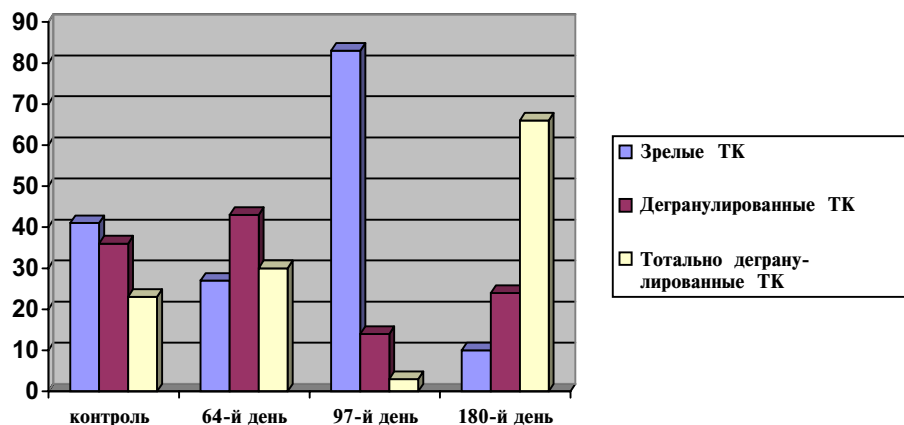
реакции неспецифической резистентности организма (Selye H.) на введение агента. В контрольной группе нефункционирующие ацинусы, представленные мелкими внутريدольковыми протоками, окруженными жировой клетчаткой, местами наблюдается гиперплазия долек молочной железы, с признаками лактации (*фото 1*); ТК в молочной железе оказалось немного, одиночные и в виде цепочек (*фото 2*) вдоль кровеносных сосудов около 3-7 клеток в 1 мм², функциональная активность была умеренна – дегранулирующих 2,4±0,31, totally дегранулирующих 1,58±0,46 (*табл.1*).

реакции неспецифической резистентности организма (Selye H.) на введение агента. В контрольной группе нефункционирующие ацинусы, представленные мелкими внутريدольковыми протоками, окруженными жировой клетчаткой, местами наблюдается гиперплазия долек молочной железы, с признаками лактации (*фото 1*); ТК в молочной железе оказалось немного, одиночные и в виде цепочек (*фото 2*) вдоль кровеносных сосудов около 3-7 клеток в 1 мм², функциональная активность была умеренна – дегранулирующих 2,4±0,31, totally дегранулирующих 1,58±0,46 (*табл.1*).

В опытной группе полученные результаты свидетельствуют о значительной дестабилизации си-

дестабилизации си-

Диаграмма 1.



Функциональный профиль тучных клеток молочной железы крыс при раке молочной железы, индуцированном N-метил-N-нитрозомочевинной (%).

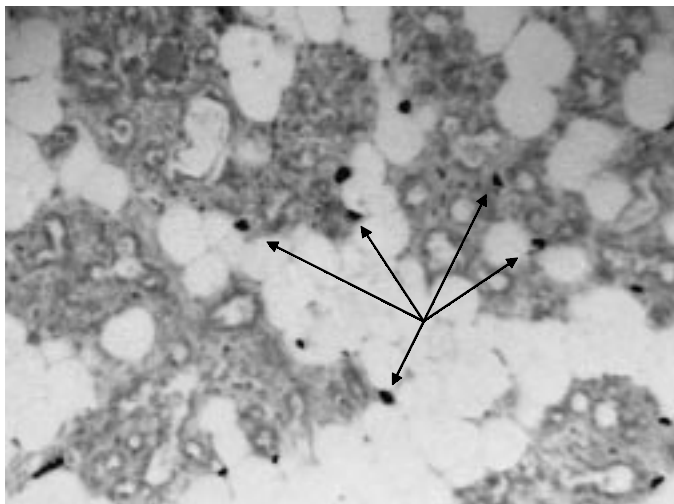


Фото 1. Тучные клетки молочной железы интактных крыс.

Окраска по Романовскому-Гимза (Ув.300).

стемы тучных клеток в начале развития опухолевого процесса (фото 3). Общее количество ТК ($p < 0,001$) и степень дегрануляции ($p < 0,002$) на 64-й день эксперимента достоверно выше такового в контроле (табл. 1). В процентном соотношении количество зрелых (З), дегранулированных (Д) и totally дегранулированных (ТД) ТК через два месяца после начала эксперимента З:Д:ТД=27:43:30 (в контроле З:Д:ТД=41:36:23), что свидетельствует о напряжении в системе ТК – степень функциональной активности популяции обратно пропорциональна росту ее численности. Основное количество ТК располагается в окружающих опухоль тканях, внутри самого образования сконцентрированы у периферии мелкие, единичные, чаще дегранулированные и totally дегранулированные. В целом наблюдаются признаки очагового склероза стромы, явления атрофии дольковых структур, кистозные протоки, общий и внутридольковый фиброз, экстазия междольковых протоков, со скоплением клеточного детрита в них. Кроме того, обращают на себя внимание остаточные явления воспалительного процесса – умеренная очаговая, а местами диффузная лимфогистиоцитарная инфильтрация. Общая структура сохранена.

На 97-й день опыта количество ТК (фото 4) достигает своего максимума ($p < 0,001$) в рамках данного эксперимента – 44,7 клеток в 1мм^2 (в контроле 6,68). По-прежнему основное количество ТК сконцентрировано в тканях, граничащих с узлом, на фоне умеренной лимфоидной инфи-

трации, здесь они крупные, овальные и веретеновидные.

Обращает на себя внимание, что в непосредственной близости от кровеносных сосудов отмечается возрастание количества мелких ТК с небольшим содержанием светлоокрашенных гранул, что подтверждает ранее высказанную мысль о путях миграции ТК [2,9]. Величина ТК возрастает по мере удаления от кровеносных сосудов. Несколько дальше вглубь опухоли ТК располагаются вдоль млечных протоков и внутри них – крупные, в стенках протоков – мелкие, чаще округлые, внутри протоков активно дегранулирующие. Внутри опухоли инфильтрация тучными клетками увеличилась, местами наблюдается очаговость скопления ТК, здесь они чаще округлой (фото 5) или вытянутой формы, очень мелкие, разной степени дегрануляции, часто ощутимо опустошенные. В процентном соотношении З:Д:ТД=83:14:3 (41:36:23 в контроле, соответственно). Видно, что степень напряжения в популяции также достигает своего апогея (диаграмма 1), фигуры дегрануляции, в целом, редки, причем количество случаев totalной дегрануляции растет прямо пропорционально удаленности от периферии к центру уплотнения. На этом этапе опыта возрастает степень сцепления опухолевого узла с подлежащими тканями, на фоне нарастания очаговой дегенерации тканей молочной железы.

Следует отметить, что в тех случаях, когда была сильно выражена лимфоцитарная реак-

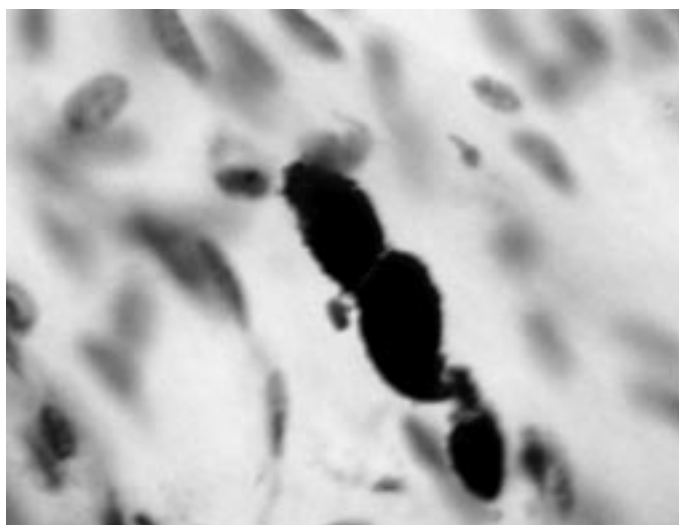


Фото 2. Зрелые тучные клетки молочной железы интактных крыс.

Окраска по Романовскому-Гимза. (Ув.2100).

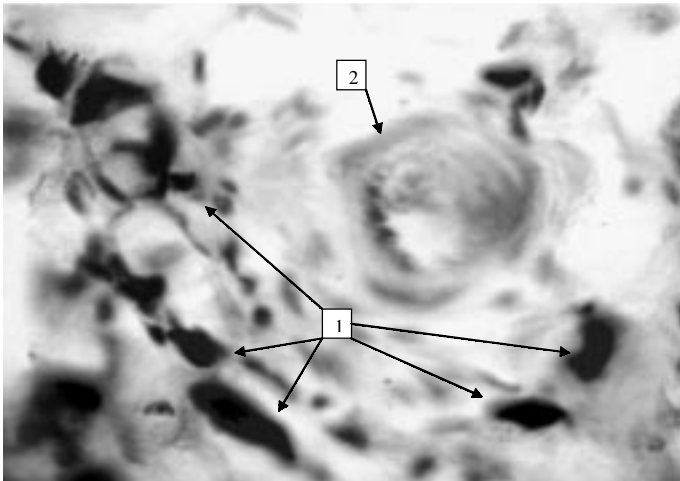


Фото 3. Тучные клетки молочной железы крыс на 64-й день опыта. Увеличение количества:
1 – тучные клетки, 2 – микрососуд с группой эритроцитов.
Окраска по Романовскому-Гимза (Ув. 900).

ция с примесью функционально активных ТК в месте врастания опухоли в подлежащую ткань, опухоль, как правило, была меньших размеров, а прогноз был более благоприятным. Явления склероза стромы и атрофия дольковых структур нарастают, общий и внутридольковый фиброз и экстазия междольковых протоков, со скоплением клеточного детрита в них, усиливается. Увеличивается количество крупных макрофагов со смещенным ядром, из-за фагоцитированного детрита.

На 180-й день эксперимента большинство опухолей имеет структуру аденокарцином, инфильтрирующих, умеренно низкодифференцированных и солидных железистого строения. Местами преобладают аденокарциномы железисто-скирозного строения, инфильтрирующие, умеренно низкодифференцированные. Имеются метастазы в региональные лимфоузлы, остатки нормальной структуры которых сохранены лишь по периферии. Учащение случаев глубокой инвазии опухоли в подлежащие ткани нарастает прямо пропорционально снижению уровня дифференцировки тканей молочной железы.

В месте врастания опухоли в подлежащую ткань молочной железы выявлялась сильно выраженная лимфоидная инфильтрация с увеличением представительства ТК. Общее количество ТК несколько снижается по сравнению с предыдущими показателями, но значительно ($p < 0,001$) превышает

контрольный уровень (табл. 1). При этом отмечается дальнейшее увеличение количества мелких ТК (фото 7), с небольшим содержанием светлоокрашенных гранул, степень зрелости которых, по-видимому, не дает возможности как-либо заметно влиять на патологическую ситуацию региона, хотя может свидетельствовать о степени декомпенсации в популяции ТК.

Представительство популяции ТК внутри опухоли молочной железы неоднородно. В центре опухоли ТК было мало или не было совсем. Они были одиночные, часто со слипанием зернистости, распадающиеся или полностью распавшиеся. По мере приближения к периферии опухоли наблюдается увеличение количества тучных клеток и урежение случаев их деструкции. Обращает на себя внимание факт повсеместной тотальной дегрануляции ТК на этом этапе эксперимента (фото 6), что свидетельствует об авральной попытке решения возникшей проблемы, на клеточном уровне, популяцией ТК и соединительной ткани в целом (диаграмма 1). При этом достоверное уменьшение количества зрелых ТК обратно пропорционально резкому увеличению ($p < 0,001$) их функциональной активности. Значительное преобладание случаев тотальной дегрануляции в системе ТК – 66% (контроль – 23%) также свидетельствует о степени декомпенсации адаптационных возможностей популяции ТК (табл. 1).

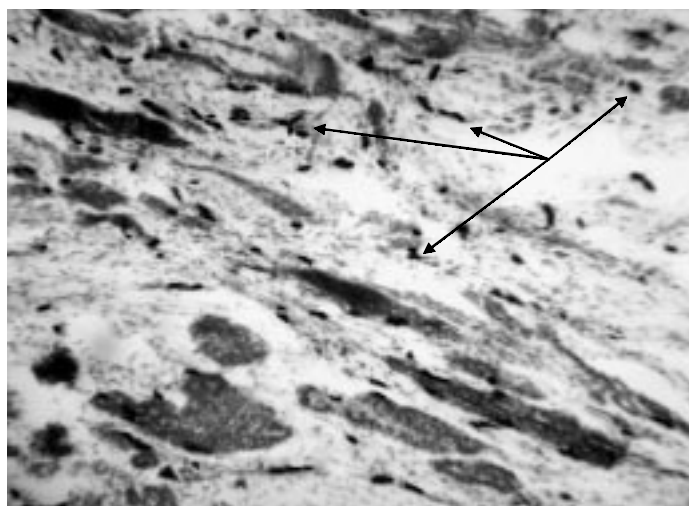


Фото 4. Тучные клетки молочной железы крыс на 97-й день с начала эксперимента. Увеличение общего количества.
Окраска по Романовскому-Гимза (Ув. 250).

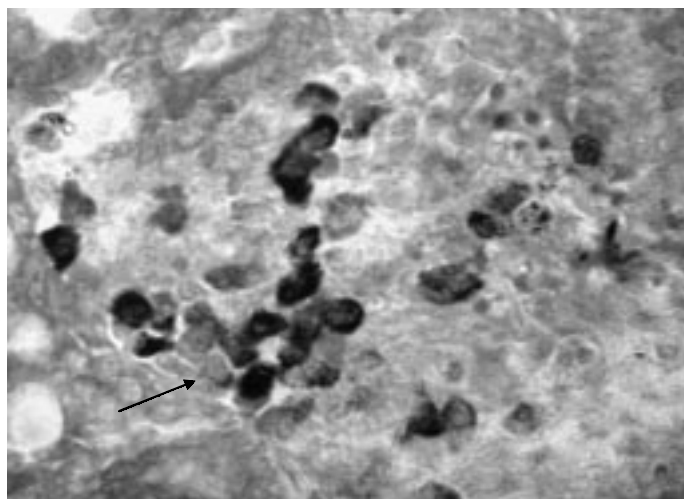


Фото 5. Тучные клетки молочной железы крыс в участках, близких к центру опухоли. Очаговый характер их скоплений. Окраска по Романовскому-Гимза (Ув. 1800).

Отчетливо видна степень опустошенности ТК (фото 5,6,7). Отчетливо видно, по фотоматериалу, что в процессе эксперимента меняется, помимо других характеристик, также и индекс насыщения ТК гранулами (фото 2-7), уменьшающийся прямо пропорционально длительности эксперимента. Таким образом, в центре опухоли отмечалось нарастание явлений истощения и угнетения функций ТК. Функциональный профиль ТК молочной железы свидетельствует о нарастающих явлениях истощения компенсаторных возможностей популяции ТК и в целом соединительной ткани на этом этапе эксперимента.

На ультраструктурном уровне синхронно с усугублением общей ситуации в ТК молочной железы отмечается нарастающий полиморфизм и бледность секреторных гранул, свидетельствующий о снижении, с одной стороны, скорости их созревания, с другой стороны – степени их зрелости (фото 8), при этом постепенное увеличение количества пустот в цитоплазме ТК является признаком их активной дегрануляционной деятельности [3,14]. Диаметр наиболее крупных гранул ТК колеблется от 1,2 до 1,4 мкм², в активно дегранулирующих клетках ближе к концу опыта наблюдается более выраженный полиморфизм секреторных гранул. В них встречаются гранулы диаметром 0,9 - 0,5 мкм² и даже 0,3 - 0,1 мкм². К концу эксперимента учащаются случаи плотной агрегации туч-

ных клеток по 3-5 клеток и более в сочетании с тенденцией к полярному расположению их ядер, а также нарастание в ТК деструктивных изменений, с последующим разрывом клеточных мембран и сморщивание цитоплазмы. На ультраструктурном уровне особенно отчетливо видно увеличение количества случаев и степени разрушения ТК, а также степень деструктивных изменений в других клетках молочной железы и прилежащих тканях.

Таким образом, детальное изучение морфологических характеристик ТК в процессе формирования РМЖ свидетельствует о наличии определенной временной связи между глубиной и тяжестью развития рассмотренных выше изменений и степенью выраженности тенденции к росту опухоли и ее величиной. Анализ всего комплекса полученных, в рамках проведенного эксперимента, данных подтверждает мысль о том, что ТК являются частью интегрированной системы местного иммунитета [2,6]. Нарастание, в процессе формирования опухоли, случаев тотальной дегрануляции, явлений слипания гранул и распад ТК свидетельствует о постепенном понижении функции этих клеток [10,15]. Так, в центре сформировавшейся опухоли, на фоне высокой пролиферативной активности и низкой степени дифференцировки тканей молочной железы, преобладали тотально дегранулирован-

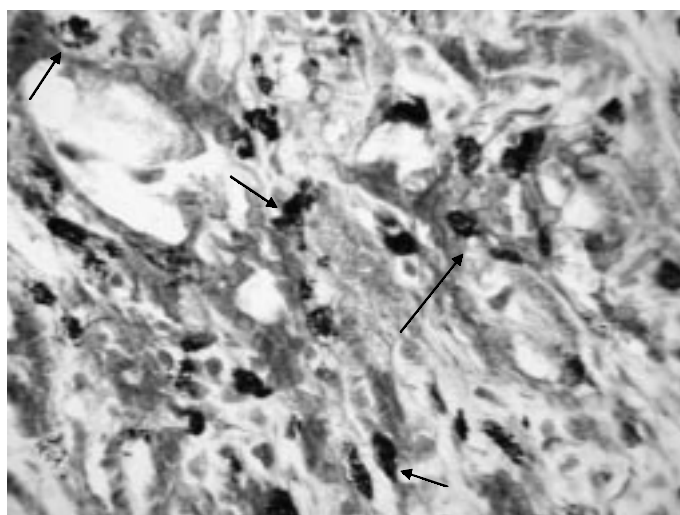


Фото 6. Тотальная дегрануляция тучных клеток молочной железы крыс на 180-й день опыта. Видна также степень деструктивных изменений тканей молочной железы. Окраска по Романовскому-Гимза (Ув. 840).

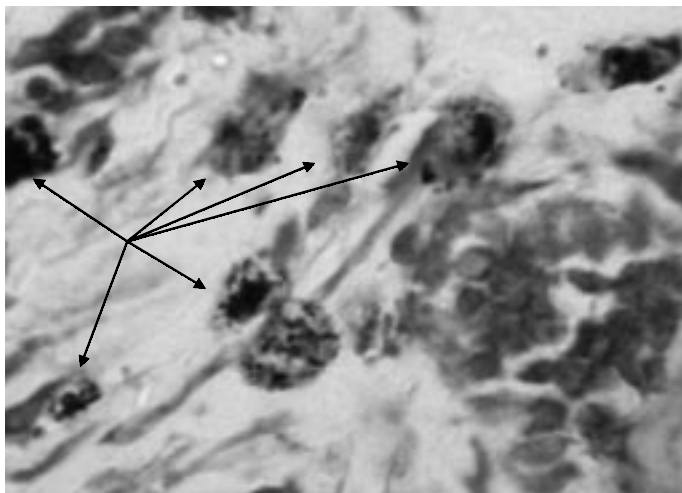


Фото 7. Тучные клетки молочной железы крысы при РМЖ, индуцированном N-метил-N-нитрозомочевинной. Возрастание количества мелких ТК с малым количеством незрелых гранул. Окраска по Романовскому-Гимза (Ув.2100).

ные и распадающиеся ТК. В то время как по краям опухоли состояние популяции ТК, наряду с частичным сохранением уровня дифференцировки основной ткани молочной железы, свидетельствовало о большей компенсированности патологических изменений, явления эти нарастали также по мере удаленности от основного узла.

Долгие годы господствовало убеждение о мультигенном происхождении ТК. Лишь сравнительно недавно орган, аккумулярующий зачатки ТК, определен как будто окончательно. Японские ученые обнаружили в красном костном мозге стволовую унипотентную клетку, из которой независимо от базофилов крови формируется мастоцит [17]. Удалось доказать, что его лимфоподобные предшественники циркулируют в крови [9]. Мигрируя, по потребностям организма, они дифференцируются в зрелые клетки уже на местах [2,9]. В этой связи следует особо отметить, что на поздних этапах формирования РМЖ в окружающих основной узел тканях и в самой опухоли появляется большое количество мелких и, по всей видимости, незрелых ТК, которые, скорее всего, еще не обладают достаточным биохимическим потенциалом для решения локальных проблем данного микрорегиона (фото 7). По морфометрическим характеристикам и особенностям окраски эти

клетки идентичны ТК слизистой оболочки кишечника (атипичным, интестинальным), которые, в свою очередь, могут представлять собой мобильный этап в процессе созревания ТК в целом.

Реактивные изменения в системе ТК молочной железы отражают степень обменных сдвигов и компенсаторной активности как региональной популяции ТК, так и в целом основного вещества соединительной ткани [2,11,13], по которой, в свою очередь, можно судить о прогнозе. При прогнозе рака молочной железы необходимо учитывать также степень лимфоидно-тучноклеточной инфильтрации в окружающих ее тканях [6,10], которая представляет собой проявление иммунологической настроенности организма в ответ на действие опухолевых антигенов.

Что касается прогностического значения собственно ТК, то вокруг медленно растущей опухоли ТК было много, и были они умеренной активности. В тех случаях, когда ТК было мало, преобладала тотальная их дегрануляция и наблюдалось большое количество мелких ТК с бледными гранулами – это была, как правило, быстрорастущая опухоль больших размеров.

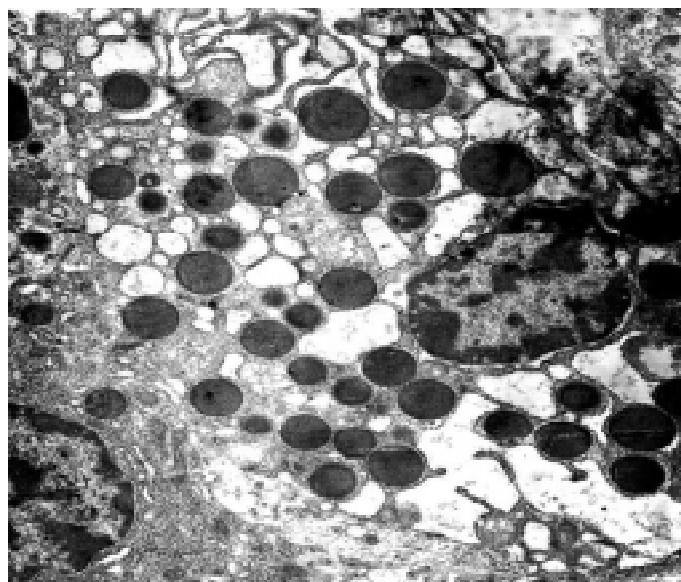


Фото 8. Фрагмент тучной клетки молочной железы крысы при раке молочной железы, индуцированном N-метил-N-нитрозомочевинной. Снижение величины и степени зрелости секреторных гранул и нарастание их полиморфизма, увеличение количества пустот в клетке. Контр. по-Рейнольдсу (Ув. 15000).

Сопоставляя тщательный анализ состояния популяции ТК на разных уровнях РМЖ и окружающей ткани при поэтапном формировании опухолевого процесса в эксперименте и клинике

с данными литературы [1-18], помимо прогноза, можно планировать, как дальнейшие исследования, так и повышение эффективности превентивных и лечебных мер.

Литература

1. Бохман Я.В., Рыбин Е.П. Полинеоплазии органов репродуктивной системы. – СПб.: ООО «Нева-Люкс». 2001. 240 с.
2. Дзодзикова М.Э. Органная гетерогенность тучных клеток в норме и при воздействии постоянных магнитных полей. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. 14.00.23. – Москва, 1999. 32 с.
3. Дзодзикова М.Э., Березов Т.Т. Заболеваемость злокачественными новообразованиями в республике Северная Осетия-Алания в 1991-2000 гг. // Вопросы онкологии, 2003, том 49, №2. С. 181-185.
4. Дзодзикова М.Э., Салбиев К.Д. Заболеваемость злокачественными новообразованиями в долине реки Ардон в 1991-2002 гг. // Вестник ВНЦ РАН и Правительства РСО-А. 2003, том 3, №3. С. 40-45.
5. Заридзе Д.Г. Эпидемиология и скрининг рака молочной железы // Вопросы онкологии. 2002, том 48, №4-5. С. 489-495.
6. Зуга М.В., Невзорова В.А., Гельцер Б.И. Тучные клетки и их значение в физиологии и патологии легких // Терап. архив, 1999, том 71, №3. С.76-80.
7. Красноженов Е.П., Хлусов М.Ю. Морфофункциональное состояние тканевых базофилов при введении цитостатических препаратов // Актуальные проблемы фармакологии и поиска новых лекарственных препаратов. – Томск, 1993. С.52-54.
8. Кулаков В.И., Тохиян А.А. Проблемы злокачественных новообразований репродуктивной системы в практике гинеколога // Журн. Акушерства и женских болезней, 2001. Том XLX. вып.1. С.9-13.
9. Мотавкин П.А., Пиголкин Ю.И., Каминский Ю.В. Гистофизиология кровообращения в спинном мозге. – М., 1994. 142 с.
10. Овсиенко В.В. Контактное взаимодействие тучных клеток и лимфоцитов при опухолевом росте // Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.00.14 / АН УССР. Инст. Пробл. Онкологии им. Р.Е. Кавецкого.- Киев, 1988. 19 с.
11. Судаков В.В. Морфометрическая характеристика лаброцитов в строме при предраке и раке гортани // Сб. науч. тр. Морфология, клиника, диагностика и лечение предопухолевых процессов и опухолей. – Краснодар, 1986. С.75-80.
12. Чисов В.И. Современное состояние онкологии и перспективы ее развития // Росс. онкол. журнал, 1999, №4. С.50-54.
13. Юрина Н.А., Радостина А.И. Морфофункциональная гетерогенность и взаимодействие клеток соединительной ткани. – М.: Изд. УДН, 1990. 398 с.
14. Anderson L.E., Morris J.E., Sasser L.B., Stevens R.J. Effect of constant light on DMBA mammary tumorigenesis in rats // Cancer Lett, 2000, vol. 148. P.121-126.
15. Kaliner M.A. and Metcalfe D.D. The Mast Cell in Health and Disease. New York: Dekker, 1983.
16. Metcalfe D.D., Baram D., Mekori Y. Mast cells. Physiol. Rev., 1997, 77: 1033-1079.
17. Nokahata T., Kobayashi T., Ishigo A. Et al. // Nature, 1996, vol. 324, №6092. P.65-67.
18. Parkin D.M., Bray F.I., Deseva S.S. Cancer burden in the year 2000. The global picture // Europ. J. Cancer, 2001, vol.37. P.4-66.

ПОЗДРАВЛЯЕМ!



А.А. Абрикосов



В.Л. Гинзбург

За пионерский вклад
в теорию сверхпроводников
и сверхтекучих жидкостей
академику РАН
АЛЕКСЕЮ АЛЕКСЕЕВИЧУ АБРИКОСОВУ
и академику РАН
ВИТАЛИЮ ЛАЗАРЕВИЧУ ГИНЗБУРГУ
присуждена Нобелевская премия
по физике за 2003 год