

УДК 611.69-018:612.6

**Ніколенко Д.Е.**

## **ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПАРЕНХІМИ ПРОТОКІВ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ЖІНКИ РЕПРОДУКТИВНОГО ВІКУ**

Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

*Мета дослідження – з'ясування імуногістохімічних особливостей паренхіми протоків молочної залози у спокої. Матеріал – аутопсійна тканина молочної залози. Методи: гістологічні, гістохімічні та імуногістохімічні (p63, bcl-2, α-sma). Виявлені особливості експресії даних маркерів в різних відділах протокової системи молочної залози: експресія p63 та α-sma м'якопителиєм в усіх відділах протоків. Bcl-2 експресується резервним епітелієм.*

Ключові слова: молочна залоза, протокова система, імуногістохімія епітелію.

### **Вступ**

За даними літератури [1,9] і уточненими нашими дослідженнями паренхіматозний компонент молочної залози (МЗ) у спокої жінок репродуктивного віку складається із системи протоків. Вони наступні: вивідні протоки, молочні синуси, міжчасточкові протоки, внутрішньочасточкові протоки, що закінчуються в нелактуючій МЗ сліпими трубочками – молочними ходами ( термінальний відділ) [1,6] .

Відома чутливість нелактуючої молочної залози до статевих гормонів оваріально-менструального циклу (естроген, прогестерон), яка супроводжується проліферативною активністю саме термінальних відділів протоків без ознак зовнішньої секреції МЗ [ 5,6,15,16 ]. Причому дисбаланс гормонального впливу порушує встановлений мітотичний режим клітин, здатних до проліферації [ 9,14]. Останнє, як відомо, при проліферативній нестабільності , веде до підвищення ризику неопластичної трансформації паренхіматозних і стромальних клітинних елементів МЗ, що є актуальним в медицині [ 8,9 ].

Мета дослідження – вивчити імуногістохімічні особливості паренхіми відділів протокової системи молочної залози жінки репродуктивного віку .

### **Матеріал і методи**

Вивчався аутопсійний матеріал з патологоанатомічного бюро (м.Полтава) молочної залози жінок віком до 40 років. Вірізані смужки тканини МЗ в напрямку від внутрішньої поверхні ареоли залози на глибину 5 см, розрізали на шматочки (30). Матеріал фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну; після проводки в спиртах, заключали в парафін по загальноприйнятій методиці. Гістологічні зрізи товщиною 5-7 мкм забарвлювали гематоксиліном та еозином, комбінованим гістохімічним способом Бергман+ШИК – реакція+ альціановий синій [10] . Імуногістохімічне дослідження проведене в сертифікованій імуногістохімічній лабораторії ПАБюро (м.Дніпропетровськ), дофарбування ядер клітин

виконували гематоксиліном Майера. Імуногістохімічні реакції проводили з використанням моноклональних антитіл: p63, bcl-2, α-sma (Dako Cytomation) [ 12,13,18].

Вибір маркерів мотивовано ядерною індикацією недиференційованих епітеліальних клітин дорослого організму з підтримкою цього стану – експресія про-онкогену p63; виявлення клітин із скорочувальною функцією – сироватка до скорочувального білка – гладком'язового актину α-sma, котрий входить до складу міофібрил, локалізованих в цитоплазмі м'язових клітин; білок bcl-2, запобігає загибелі клітини шляхом апоптозу, локалізований в мембранах мітохондрій ( блокує вихід цитохрому С з останніх для запуску каспаз-зумовленого механізму апоптозу) [ 2,3,4,11,13,17,18 ] .

### **Результати дослідження та їх обговорення**

Розглянутий нами [ 7 ] синусовий відділ протокової частини паренхіми МЗ мікроскопічно верифікований як протокова частина з найбільшим, округлої форми, просвітом після вузького вивідного протоку. Синус вистелений дворядним епітелієм . У просвіті виявляється залишок еозинофільного секрету з контурами апікальної частини поверхневих клітин синуса. Ядра останніх мають світло-базофільне забарвлення , містять переважно еухроматин та ядерця. В цитоплазмі даного епітелію забарвлюються ШИК,- та альціанопозитивні включення , що демонструє ,на нашу думку, функцію резорбції вуглеводно-білкового секрету залози.

Імуногістохімічні маркери антиапоптотичної активності епітелія – bcl-2 , а також p-63 не проявили своєї експресії, залишаючи оптично пустою цитоплазму даного епітелію в гістологічних препаратах дофарбованих гематоксиліном Майера.

На відміну від поверхневого епітелію синуса, базальнорозташовані клітинні елементи, мають ядра з переважанням крупнобрильчастого гетерохроматину насичено базофільного виду. Останній відомий в літературі як транскрипційно-неактивний [9] . Оглядове забарвлення не ви-

\* Робота є фрагментом комплексної НДР академії « Вивчення закономірностей структурної організації внутрішніх органів в нормі і при патології. № держреєстра 0106U003236

явило певних тінкторіальних особливостей цитоплазми, залишаючи її оптично пустою. Гістохімічно базальний епітелій синусу мав однаково альціанпозитивні як ядро, так і цитоплазму. Імуногістохімічна реакція з ядерним маркером p63 не виявила експресії останнього в ядрах базальних клітин, вочевидь, через недиференційований їх стан, що співпадало з відсутністю гістохімічних та морфологічних ознак активного функціонування клітин. Маркер антиапоптотичного білка bcl-2 виявив інтенсивну цитоплазматичну експресію останнього в цитоплазмі епітелію синусу. Таким чином, приналежність даного епітелію до резервного типу підтвердилась у вигляді ухвалення останнього від апоптозу [ 19].

Нарешті клітинні елементи вуглуваті форми, з дрібними ядрами, розташовані на базальній мембрані синусу, мають темно забарвлене базозофільне ядро, гістохімічно- Бергман-позитивне. Дані клітини не мають гістохімічних ознак ні синтетичної, ні секреторної активності. Імуногістохімічна реакція з маркером p63 виявила інтенсивну, темно-коричневого кольору, експресію його ядрами даних клітин, демонструючи різко позитивну реакцію. Звертає на себе увагу тісне розташування даних клітин як з вищенаведеним епітелієм, так і з базальною мембраною синусу. З останньою ці клітини немовби повторюють її звивисту ходу, але місцями і занурюючись між епітелієм. Дані зовнішні особливості морфології цих клітин та їх просторова орієнтація демонструє тісний взаємозв'язок з паренхімою МЗ і базальною мембраною синусу. Реакція з bcl-2 не виявила експресії останнього у зовнішніх клітинах, прилеглих до базальної мембрани. Ідентифікування даних клітин з виявленням морфологічної приналежності стало можливим з імуногістохімічною реакцією  $\alpha$ -sma – маркером гладком'язевого актину. Була виявлена інтенсивна його експресія в цитоплазмі даних клітин. Тобто наявність гладком'язевого актину, відсутність ознак секреторної активності ( білково-вуглеводних компонентів), стало підставою для ідентифікації так званого міоепітелію, про який точиться дискусія щодо походження останнього. Слід зазначити, що в літературі даний тип клітин із скорочувальною функцією згадується лише в альвеолярних структурах лактуючої МЗ [ 1,6 ]. Підтвердженням скорочувальної функції міоепітелію синусу є паралельно позитивна експресія  $\alpha$ -sma в стінці артеріол строми.

Міжчасточковий протоковий відділ МЗ на гістохімічних препаратах ідентифікований нами за звивистим зірчастоподібним просвітом, що утворюється завдяки злиттю в нього часточкових протоків (ходів). Оточуюча паренхіму сполучна тканина має вигляд зрілої структури колагенових волокон, але більш ніжна та рихла за рахунок жирової клітковини, фіброblastів, клітин капілярного типу. Паренхіма даного молочного протоку представлена багаторядним призматичним епі-

телієм, який має світле забарвлення, ШИК-позитивне ядро, що займає центральну частину цитоплазми і орієнтоване перпендикулярно по відношенню до базальної мембрани. Цитоплазма клітин має світлі альціан-позитивні включення, а в апікальній частині клітина має дрібноворсинчасту поверхню. Ядра даного епітелію не проявляли імуногістохімічної реакції ні з p63, ні з bcl-2, що свідчить про високий ступінь диференціювання цього епітелію. В умовах лактації МЗ цей епітелій за даними літератури [ 1,6,7 ] виконує сольову резорбційну функцію. Епітелій вуглуваті форми, розташований на базальній мембрані протоки, має насиченобазозофільний вигляд ядра та оптично пусту цитоплазму. При комбінованому гістохімічному забарвленні цитоплазма набуває ШИК-позитивного виду, що вказує на наявність вуглеводного компоненту у складі останньої.

Проведене імуногістохімічне дослідження експресії маркера p63 виявило насичене забарвлення ядер вище названих клітин в темнокоричневий колір, чітко контрастуючи їх овальну форму та спрямування в цитоплазмі більшим діаметром вздовж базальної мембрани протоки. Причому, щільність розташування клітин з такими ядрами значно менша, ніж в синусах молочної залози, до того ж проглядається тенденція до періодичності клітин.

Більш ясну уяву про ступінь диференціювання даних клітин внесла імуногістохімічна реакція з сироваткою до гладком'язевого актину -  $\alpha$ -sma. Виявлена виражено-позитивна експресія маркера в цитоплазмі вище описаних клітин, підтвержуючи наявність скорочувального білка – актина. Останній ідентифікувався у вигляді тонких темно-коричнево забарвлених ниткоподібних структур. Інші клітинні елементи цього типу містилися у цитоплазмі цілі конгломерати маркера білка (висока експресія маркера  $\alpha$ -sma). Дані тінкторіальні особливості цитоплазми, на наш погляд, демонструють різний ступінь конденсації міофіламентів, як прояв здатності до скорочувальної функції даного епітелію.

Разом із цим в стінці протоків, що ближче до молочних ходів, виявлені видовжені «щифтикоподібні» клітини. Ядро останніх орієнтовано перпендикулярно до підлеглої базальної мембрани. Воно має базозофільний вигляд за рахунок конденсованого гетерохроматину. Цитоплазма даних клітин у вигляді вузького обідка, має еозінофільне забарвлення. Останні були з негативною експресією щодо маркера p63. Однак експресія антиапоптотичного маркера bcl-2 була помірно виражена в цитоплазмі, що вказувало на захист «щифтикоподібних» клітин від елімінації шляхом апоптозу і підтримку існування популяції останніх. Даний тип епітелію, на нашу думку, є резервним і знаходиться у спокої.

Нарешті проведене дослідження внутрішньо-

часточкового відділу молочного ходу, оточеного рихловолокнистою сполучною тканиною з тонкостінними судинами типу капілярів і клітинними елементами плазмоцитарного виду. Гістологічно даний відділ описаний нами раніше як генеративна зона МЗ [ 7 ], в дистальній частині характеризувався вираженою багаторядністю розташування епітелію. Епітелій базальних відділів мав базофільні гіперхромні ядра округлої та овальної форми, оточені вузьким обідком еозинофільної цитоплазми. Ядра мали косий напрямок довгої вісі відносно базальної мембрани. Ближче до центральної вісі молочного ходу розміщувались клітини із світлозабарвленими базофільними ядрами, котрі мали одне або два гіпертрофованих ядерця та крайове розташування конденсованого хроматину. Навколишня цитоплазма набула світло-еозинофільного вигляду.

Нарешті, у внутрішній центральній частині молочного ходу, на гістологічних зрізах, визначались порожнини, в яких, без зв'язку із загальною клітинною популяцією, вільно розміщувались клітини-тіні з пікнотичним ядром базофільного та еозинофільного кольору.

Імуногістохімічна реакція даного відділу молочного ходу з маркером до р63 мала виражену внутрішньоядерну експресію в клітинах, розташованих на базальній мембрані. При цьому виявлено чітке контурування багаторядності ядер клітин відносно останньої. Це демонструє високу проліферативну активність базального епітелію і ознаку низького ступеню диференціювання. Вочевидь, це пов'язано з гормональною стимуляцією даної зони залози, при оваріоменструальному циклі жінки.

Негативну експресію щодо р63 мали клітини, розташовані ближче до просвіту протоки, але останні губили зв'язок із загальною клітинною популяцією та підлягали елімінації. Експресія  $\alpha$ -ста була вираженою не лише в цитоплазмі клітин, розташованих на базальній мембрані молочного ходу, а й в центральних відділах протоки між іншими клітинами. Причому чітко контурувалась відросчата структура цитоплазми даних клітин, та оточення ними клітин зі зниклою експресією р63 ближче до центральної вісі просвіту протоки.

Нарешті, термінальні відділи молочних ходів, що мали найменший діаметр без просвіту, локалізувались серед пухкої сполучної тканини та жирової клітковини. Імуногістохімічна реакція з маркером р63, як і в попередніх відділах протоків, була позитивною лише в ядрах багатівідросчатих клітин з позитивною експресією маркера до гладком'язового актину в цитоплазмі. Причому останні розташовувались поміж клітинами з

дрібними насичено-базофільними ядрами, оточеними вузькою смужкою цитоплазми, що не мала вираженої гістохімічної специфічності. Маркер до bcl-2 мав активне експресування в останній.

### Висновки

1. Епітелій, що експресує  $\alpha$ -ста, містить гладком'язовий актин (міоепітелій), присутній як в синусовому відділі паренхіми молочної залози, так і в молочних протоках та ходах.

2. Імуногістохімічною особливістю міоепітелію є і внутрішньоядерна експресія р63.

3. Епітелій «резервного» типу молочної залози, що виявляється в молочних ходах, протоках, синусі залози виявляє експресію антиапоптотичного маркера bcl-2, запобігаючого елімінації останнього.

### Література

1. Алешин В.В. Женская половая система / В кн. Гистология/ Под ред. В.Г. Елисеєва, Ю.И. Афанасьєва, Н.А. Юриной. -[3-е изд. ] -М.: Медицина, 1983.-С.579
2. Барышников А.Ю. Иммунопатологические проблемы апоптоза / А.Ю. Барышников, Ю.В. Шишкин.-М.: Эдиторал УРСС, 2002.-320с
3. Боженко В.К. Оценка показателей клеточного цикла и апоптоза при раке молочной железы /В.К. Боженко, Е.А. Кудинова, Н.В. Мельникова [ и др. ]// Клинико-лабораторна діагностика. -2001.-№9.-С.32-33
4. Ермилова В.Д. Современные подходы в морфологической диагностике и прогнозировании рака молочной железы /В.Д. Ермилова, С.В. Петров //3-я Всероссийская школа-семинар по иммуногистохимической диагностике опухолей. - 2000.- Казань.
5. Зотов А.С. Мастопатия и рак молочной железы /А.С. Зотов, Е.О. Белик.-М.: МЕДпрогресс-информ, 2005.-с.7-11
6. Коколина В.Ф. Развитие молочной железы в процессе созревания репродуктивной системы /В.Ф. Коколина, М.А. Фомина // Рос.вестник акушера-гинеколога.-2006.-Т.6№3.-С.26-32
7. Ніколенко Д.Е. Морфологія молочної залози жінки репродуктивного віку / Д.Е. Ніколенко // Актуальні проблеми сучасної медицини. -Полтава, 2007.-Т.8.,Вип.4(24),ч.2.- С. 275-278.
8. Ніколенко Д.Е. Кариометрические особенности внутривидового рака молочной железы / Д.Е.Ніколенко // Современные проблемы экспериментальной и клинической онкологии:VIII конференция молодых онкологов с международным участием. Материалы конференции. К., 2007.-С.57
9. Пальцев М.А. Патологическая анатомия и молекулярная диагностика /М.А. Пальцев, Е.С. Северин, А.А. Иванов // Архив патологии, 2006, №4 - С.3-7
10. Пирс М. Гистохимия/ Пирс М. - М.: Медицина,1962.-962 с.
11. Серов С.В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / С.В. Серов, Н.Т. Райхлин [ 2-е изд. ] Казань, 2000 – 288 с.
12. Терещенко В.П. Окремі рекомендації щодо покращення морфологічної діагностики з позицій доказової медицини / В.П.Терещенко, Л.В.Дерхтарьєва, С.Г. Чичка [ та інш. ] // Світ медицини та біології.-Полтава, 2008.-№3.-С.88-91
13. Чумаков П.М. Функция гена p53: выбор между жизнью и смертью / П.М. Чумаков // Биохимия.-2000.-№65.-С. 34-47
14. Щелкунов С.И. Основные принципы клеточной дифференцировки / С.И. Щелкунов - М.,1977.-С.254
15. Mina J.Bissell, A. Rizki and J.Saira Mian Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function / Mina J.Bissell // Current opinion in Cell Biology – 2003. - №15.- P.753-762
16. Shacklenon M. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell / M. Shacklenon // Nature.-200.-P.84-88.
17. Smit J.H. Mammary epithelial stem cells / J.H.Smit, J.Chepko//Res.in Techn.-2001.-V.52, №2. - P.190-203.
18. Yang A. P63 and p73: p53 mimics, menacs and more/ A.Yang, Mc Keon F.//Nat.Rev.Mol.Cell.Biol.- 2000.- V.1. - P 199-207
19. Willis S.N. Life in the balance: how BH 3-only proteins induce apoptosis / S.N.Willis, J.M.Adams - Curr Opin Cell Biol. – 2005. - V 17, №617. - P 97-102.

Реферат

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПАРЕНХИМЫ ПРОТОКОВ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЖЕНЩИНЫ РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА

Николенко Д.Е.

Ключевые слова: молочная железа, протоковая система, иммуногистохимия эпителия.

Цель исследования – определение иммуногистохимических особенностей паренхимы протоков молочной железы в покое. Материал: аутопсийная ткань молочной железы. Методы исследования: гистологические, гистохимические, иммуногистохимические (p63, bcl-2, α-sma). Выявлены особенности экспрессии данных маркеров в разных отделах протоковой системы молочной железы: экспрессия p63 и α-sma миоэпителием всех отделов протоков железы. bcl-2 экспрессируется резервным эпителием.

Summary

IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE MAMMARY GLAND PARENCHYMAL DUCTS IN CHILDBEARING AGED WOMAN

Nikolenko D.Ye.

Keywords: mammary gland, ducts system, epithelial immunohistochemistry.

The purpose of the research is to define immunohistochemical characteristics of the ducts epithelium of mammary gland in rest. Materials: mammary gland's autopsy tissues. Methods: histological, histochemical, immunohistochemical (p63, bcl-2, α-sma). There have been found out the peculiarities of the markers' expression in the different parts of mammary glands.

УДК: 616 – 006.5/6 + 618.146 – 006 ] – 079.4 – 091.8

**Плутень О.Н., Марковский В.Д., Яковцова А.Ф.**

**ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА ПРОЛИФЕРАЦИИ Ki-67 В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫХ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ПОРАЖЕНИЙ И РАКА ШЕЙКИ МАТКИ**

Харьковский национальный медицинский университет

*Исследование экспрессии белка пролиферации Ki-67, показателя пролиферативного потенциала клеток, обнаруживает прямую зависимость между показателями его уровня активности и степенью клеточной и тканевой атипичии многослойного плоского эпителия шейки матки. Обнаруженные показатели могут служить патоморфологическими критериями в дифференциальной диагностике эпителиальных дисплазий шейки матки, интраэпителиальной карциномы и инвазивного рака.*

Ключевые слова: шейка матки, плоскоклеточные интраэпителиальные поражения, интраэпителиальная карцинома, рак, белок пролиферации Ki-67.

Рак шейки матки (ШМ) является одной из наиболее распространенных злокачественных опухолей женских половых органов и продолжает занимать одно из первых мест в структуре онкологической заболеваемости и смертности женского населения. На величину показателя летальности от рака влияет выявление больных с запущенными формами данного заболевания. А своевременное выявление предраковых заболеваний и начальных стадий рака ШМ являются необходимым условием для их успешного лечения [2, 5].

В настоящее время большое значение приобретает анализ экспрессии иммуногистохимических (ИГХ) маркеров для выявления и интерпретации диспластичных клеток. Одним из таких маркеров гиперпролиферативного состояния, связанного с неопластической трансформацией, является белок Ki-67 (универсальный маркер для оценки клеточного цикла) [6 - 8, 10, 12].

Целью данного исследования явилось изучение экспрессии белка Ki-67 в неизменном мно-

гослойном плоском эпителии (НМПЭ) ШМ, в очагах дисплазий различной степени тяжести, в интраэпителиальной карциноме (CIS) и инвазивном раке (invCa).

**Материал и методы исследования**

Материалом для исследования послужили 120 образцов ткани ШМ с различной патологией эктоцервикса. Для диагностики поражений ШМ использовали критерии Гистологической классификации опухолей женской половой системы [3], в которой диспластические изменения различных степеней тяжести и преинвазивная карцинома объединены под названием плоскоклеточные интраэпителиальные поражения, подразделяющиеся на степени цервикальной интраэпителиальной неоплазии (cervical intraepithelial neoplasia – CIN): слабую (CIN I), умеренную (CIN II) и тяжелую (CIN III). Последняя включает в себя и рак in situ (преинвазивная карцинома, CIS). Плоскоклеточные карциномы подразделяют на ороговевающий и неороговевающий рак.

В препаратах, обработанных ИГХ методом и

\* Данная публикация является фрагментом комплексной научно-исследовательской работы ХНМУ «Разработка и внедрение эффективных методов и средств профилактики, диагностики и лечения важнейших заболеваний и травм» (0101U001900)