



СКАНУЮЧА ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ ІНВАЗИВНОГО ПРОТОКОВОГО РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ

Волос Л.І.¹ ORCID: 0000-0002-1733-589X

Дацюк Ю.Р.² ORCID: 0000-0002-9893-720X

Дудаш А.П.^{1,3} ORCID: 0000-0002-7934-8995

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, м. Львів, Україна

¹ Кафедра патологічної анатомії та судової медицини

² Лабораторія електронної мікроскопії, м. Львів, Україна

³ Західноукраїнська гістологічна лабораторія, м. Львів, Україна

SCANNING ELECTRON MICROSCOPY OF INVASIVE DUCTAL BREAST CANCER

Liliya Volos¹ ORCID: 0000-0002-1733-589X

Yuriy Datsyuk² ORCID: 0000-0002-9893-720X

Andrii Dudash^{1,3} ORCID: 0000-0002-7934-8995

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

¹ Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine

² Laboratory Electron Microscopy, Lviv, Ukraine

³ Western Ukrainian Histological Laboratory, Lviv, Ukraine

Ключові слова: інвазивна протокова карцинома грудної залози, ступінь диференціювання, морфологія, скануюча електронна мікроскопія, мікроворсинки

Для цитування: Волос Л.І., Дацюк Ю.Р., Дудаш А.П. Скануюча електронна мікроскопія інвазивного протокового раку грудної залози. Львівський медичний часопис. 2021. Т. 27. № 3-4. С. 9-25. DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2021.3-4.009>

Для кореспонденції: Волос Лілія Іванівна, вул. Пекарська, 69, м. Львів, 79000

e-mail: Liliya.volos@gmail.com

Стаття надійшла: 1.10.2021 **Прийнята до друку:** 16.11.2021

Keywords: invasive ductal carcinoma of the breast, degree of differentiation, morphology, scanning electron microscopy, microvilli

For citation: Volos L, Datsyuk Y, Dudash A. Scanning electron microscopy of invasive ductal breast cancer. *Acta Medica Leopoliensia*. 2021;27(3-4):9-25. DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2021.3-4.009>

For correspondence: Volos Liliya, Pekarska, 69, Lviv, Lviv region, Ukraine, 79000

e-mail: Liliya.volos@gmail.com

Received: October 1, 2021 **Accepted:** November 16, 2021

Реферат

Мета. Встановлення особливостей поверхні протокового раку грудної залози різного ступеня диференціювання і гістологічної будови інвазивного компонента при скануючій електронній мікроскопії.

Матеріал і методи. Проаналізовано результати дослідження інвазивного протокового раку грудної залози при використанні світлової та скануючої електронної мікроскопії. Ступінь злоскісності визначався за модифікованою схемою P. Scarff, H. Bloom і W. Richardson. Електронно-мікроскопічні особливості поверхні інвазивного протокового раку грудної залози при скануючій мікроскопії в кожному випадку порівнювали з гістологічною будовою та ступенем злоскісності G.

Результати й обговорення. Гістологічно в інфільтративному компоненті інвазивної протокової карци-

Abstract

Aim. Establishing the surface characteristics of ductal breast cancer of different degree of differentiation and different histological structure of the invasive component in scanning electron microscopy.

Material and Methods. The results of the study of invasive ductal breast cancer using light and scanning electron microscopy were analyzed. The degree of malignancy was determined according to a modified scheme of P. Scarff, H. Bloom and W. Richardson. Electron microscopic features of the cell surface of invasive ductal breast cancer during this study were compared in each case with its histological structure and degree of malignancy G.

Results and Discussion. Histologically, tubular, trabecular, solid, alveolar structures and discrete (single)

номи грудної залози діагностовано тубулярні, трабекулярні, солідні, альвеолярні структури і дискретні (поодинокі) групи пухлинних клітин. З огляду поверхневої конфігурації пухлинних клітин виділено три варіанти клітин. Перший варіант характеризувався наявністю у більшості пухлинних клітин численних асиметричних мікрворсинок з дифузним або вогнищевим їх розподілом на поверхні і достовірно переважав за наявності тубулярних структур в інфільтративному компоненті протокових карцином залози всіх випадків ступеня градації G1 ($p < 0,05$). Другий варіант поверхневої конфігурації визначався малою кількістю асиметричних мікрворсинок, розсіяних по всій клітинній поверхні, і діагностувався при солідному і трабекулярному інвазивному компоненті ступенів злоякісності G2 і G3. Третій варіант характеризувався відсутністю у більшості пухлинних клітин мікрворсинок на поверхні і переважав в альвеолярних структурах інвазивного компоненту G2 і G3 ступенів. Встановлено, що зниження ступеня гістологічного диференціювання інвазивного протокового раку грудної залози асоційовано зі зменшенням або відсутністю асиметричних мікрворсинок на клітинній поверхні. Пухлини, класифіковані як G2, показали широкий спектр поверхневої конфігурації ракових клітин, а в 75,00% [27,96-99,89] випадків карцином G3 властивою була відсутність у більшості пухлинних клітин мікрворсинок на поверхні, тобто мав місце III варіант поверхневої конфігурації.

Висновки. Скануюча електронна мікроскопія уможлиблює надання інформації в нанометричному масштабі щодо поверхневих деталей пухлинних клітин, а виявлення особливостей фенотипу між такими клітинами можуть бути прогностично важливими при раку грудної залози.

Вступ

Рак грудної залози (РГЗ) - патологічний стан, пов'язаний зі злоякісною неконтрольованою швидкою клітинною проліферацією, інвазивним переміщенням клітин у сусідні тканини та метастатичним поширенням у віддалені місця [1-4]. РГЗ - найчастіше злоякісне захворювання серед жінок у всьому світі. У 2020 році рак грудей був діагностований у 2,3 мільйона жінок, при цьому у світі було зареєстровано 685 000 випадків смерті від цієї хвороби, незважаючи на вдосконалення підходів до діагностики та лікування. За даними ВООЗ на кінець 2020 року живими залишалися 7,8 мільйона жінок, у яких за останні п'ять років був діагностований рак грудної залози, а це означає, що вказаний вид раку є найпошире-

groups of tumor cells were diagnosed in the infiltrative component of invasive ductal breast carcinoma. In terms of the surface configuration of tumor cells, we have identified three cell variants. The first variant was characterized by the presence in most tumor cells numerous asymmetric microvilli with diffuse or focal distribution on the cell surface and was prevailed in the tubular structures of the infiltrative component of ductal breast carcinoma of G1 grade ($p < 0,05$). The second variant of the surface configuration was characterized by a small number of asymmetric microvilli scattered throughout the cell surface and was diagnosed in a solid and trabecular invasive component of malignancies G2 and G3 grades. The third variant was characterized by the absence of microvilli on the surface in most tumor cells and was prevailed in the alveolar structures of the invasive component of G2 and G3 grades. It was found that the decrease in the grade of histological differentiation of invasive ductal breast cancer is associated with a decrease or absence of asymmetric microvilli on the cell surface. Tumors classified as G2 showed a wide range of surface configurations of cancer cells; in 75% [27,96-99,89] of cases G3 carcinoma was characterized by the absence of microvilli on the surface in most tumor cells, i.e., there was a III variant surface configuration of cells.

Conclusions. Scanning electron microscopy makes it possible to provide information in a nanometer scale about the surface features of tumor cells, and the identification of phenotype features between tumor cells can be prognostically important in the course of breast cancer.

нішим онкологічним захворюванням у світі. Кількість втрачених років здорового життя жінок з цим діагнозом у світі перевищує аналогічний показник щодо будь-якого іншого різновиду раку у жіночого населення. Рак грудної залози трапляється у всіх країнах світу в жінок будь-якого віку після досягнення статевої зрілості, проте у більш старшому віці рівень захворюваності зростає (ВООЗ) [5]. У США цей показник становить 300 тисяч, у Європі - 458 тисяч випадків. В Україні зазначена онкологічна хвороба займає 1-е місце серед усіх злоякісних пухлин, що виявляються у жінок. У 2018 році в Україні зафіксовано 146 317 пацієнтів, які перебували на обліку в онколога з приводу раку грудної залози. Показник на 100 тис. жіночого населення ста-

новить 762,1 [6].

Морфологічні дослідження РГЗ, особливо із впровадженням у практику імуногістохімічних (ІГХ) методів, набули вирішального значення, оскільки їх результати дозволяють не тільки надати прогноз, але й визначити напрямок протипухлинної лікувальної терапії [7].

Окрім імуногістохімічного дослідження раку грудної залози, чільне місце посідає трансмісійна електронна мікроскопія. Детально описана ультраструктура гістологічних варіантів РГЗ, при цьому особлива увага зосереджена на значенні міоепітеліальних клітин, базальної мембрани, різних органел і включень [8]. Такі дослідження є корисними як для з'ясування гістогенезу, так і для діагностики пухлин. Але в трансмісійній електронній мікроскопії недостатньо уваги приділяється поверхневій конфігурації тканини раку грудної залози, в основному через технічні труднощі в оцінці складної поверхневої ультраструктури на тонких зрізах. За результатами дослідження скануюча електронна мікроскопія (СЕМ) зразків тканин РГЗ є технічно складною, оскільки оточуюча колагеново-волокниста строма може затемнювати епітеліальні структури, що призводить до важкості проведення обстежень та аналіз поверхневої конфігурації пухлини [9]. Проте застосування СЕМ у дослідженні протокового раку грудної залози різного ступеня диференціювання і різної гістологічної будови інвазивного компонента в порівняльному аспекті може мати прогностично важливе значення для оцінки перебігу захворювання.

Метою дослідження було встановлення особливостей поверхні протокового раку грудної залози різного ступеня диференціювання і різної гістологічної будови інвазивного компонента при скануючій електронній мікроскопії.

Матеріал і методи

Матеріалом для роботи слугували 39 випадків інвазивного протокового раку грудної залози з гістологічно верифікованим діагнозом.

Виконувалося морфологічне дослідження операційного матеріалу із застосуванням світлового мікроскопа Leica DM750 (Leica Microsystems GmbH) з дотриманням основних біоетичних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину (від 04.04.1997 р.), Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964-2008 рр.), наказу МОЗ України від 23.09.2009 р. № 690 "Про затвердження Порядку проведення клінічних випробувань лікарських засобів та експертизи матеріалів клінічних випробувань і Типового положення про комісії з питань етики" та "Положення про комісію з питань етики наукових досліджень, експериментальних розробок і наукових творів Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (2018).

Гістологічний тип раку встановлювався відповідно до рекомендацій ВООЗ [10]. Ступінь злоякісності визначався за модифікованою схемою P. Scarff, H. Bloom і W. Richardson [11]. При цьому враховувалася кількість тубулярних структур, число мітозів, клітинний поліморфізм і ядерна гіперхромія. За ступенем диференціації (G) пухлини розподілилися на 3 групи, відповідно: вискодиференційовані (G1 - 3-5 балів), помірнодиференційовані (G2 - 6-7 балів), низькодиференційовані (G3 - 8-9 балів).

Окрім світлової, використана скануюча електронна мікроскопія, яка є методом дослідження поверхні зразків, а також інших дрібних об'єктів. Глибина різкості при цьому є значною, що дає можливість отримати об'ємне чітке зображення. Зразки тканини 12 випадків інвазивної протокової карциноми фіксували в 2% розчині глютаральдегіду протягом 2 год. Згодом промивали тричі дистильованою водою по 10 хв. Чисті промиті зразки заморожували і поміщали в сублимаційну установку, де протягом двох годин проводилася сублимація води з тканин без втрати об'єму і форми. Оскільки поверхня зразка повинна бути електропровідною, висушені взірці

наклеювали провідною плівкою на предметні столики для подальшого напилення тонким шаром срібла у вакуумному напилювачі ВУП-5. Для фотографування поверхні зразків використовувалось збільшення $\times 35$ до $\times 4000$, а прискорююча напруга в усіх дослідженнях була рівною 25 кВ. Електронно-мікроскопічні дослідження проводилися скануючим електронним мікроскопом JEOL T220A на базі лабораторії фізичних методів дослідження в геології ЛНУ імені Івана Франка та лабораторії електронної мікроскопії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

Обробка даних проводилася прикладними статистичними методами, які використовуються в медицині, за допомогою програми R Commander. Отримані показники представлено у вигляді часток та 95% довірчих інтервалів (% [95%ДІ]), котрі вираховували за критерієм-ф кутового перетворення Фішера. Достовірність різниці визначали методом точного критерію Фішера при мінімальному рівні значимості $p < 0,05$.

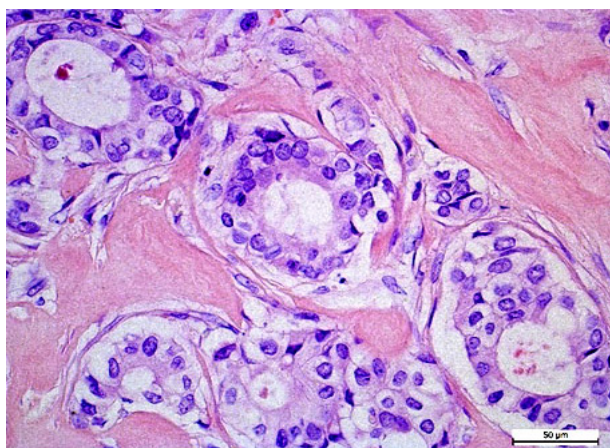
Результати й обговорення

Гістологічно в інфільтративному компоненті інвазивної протокової карциноми грудної залози ми виділили тубулярні, трабекулярні, солідні, альвеолярні структури і дискретні (поодинокі) групи пухлинних клітин. Тубулярні структури нагадували трубки, утворені одним рядом пухлинних клітин (рис. 1а). Трабекулярні структури репрезентували один-два ряди лінійно розташованих клітин (рис. 4а). Солідні структури виглядали як поля, що складаються з десятків і сотень пухлинних клітин (рис. 2а,б). Альвеолярні структури представляли формування пухлинних клітин округлої або близької до округлої форми (рис. 3а). Дискретні, чи поодинокі, групи визначалися як окремі пухлинні клітини або скупчення від двох до п'яти клітин (рис. 4б).

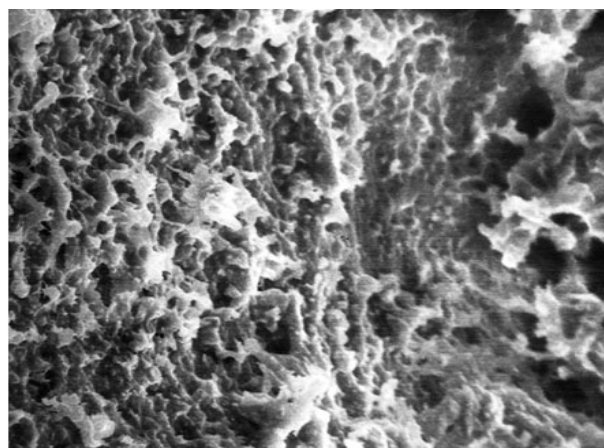
Оцінка ступеня злоякісності протокового раку грудної залози, описана P. Scarff, H. Bloom і W. Richardson, що базується на визначенні кількості проток, утворених пухлин-

ними клітинами, клітинного поліморфізму та ядерної гіперхромії ракових клітин, а також кількості мітотичних фігур, продемонструвала переважання в нашому матеріалі помірно-диференційованих карцином G2 - 69,23% [54,04-82,54] ($n=27$). Високодиференційовані карциноми (G1) становили 5 випадків (17,95% [7,67-31,36]), низькодиференційовані (G3) - 7 (12,82% [4,32-24,96]). Для дослідження у скануючому мікроскопі було відібрано інвазивні протокові карциноми ($n=12$) різного ступеня злоякісності: G1 - $n=3$ (25,00% [5,68-52,11]); G2 - $n=5$ (41,67% [16,54-69,4]); G3 - $n=4$ (33,33% [10,66-61,2]).

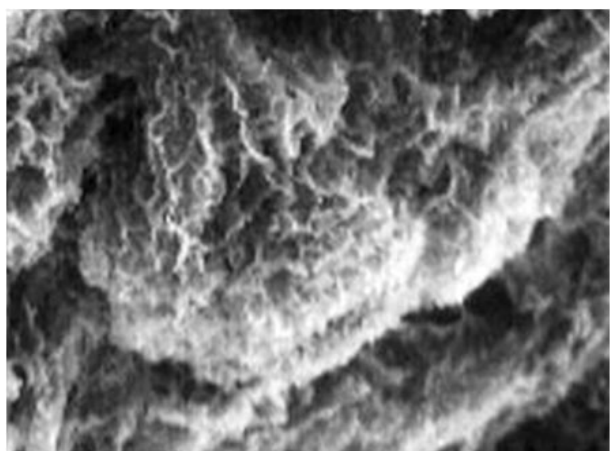
Скануюча електронна мікроскопія показала наявність поодиноких та скупчення пухлинних клітин різного розміру. Відмінності у розмірі та формі клітин, що утворюють кластери, проявлялися у неправильній формі, подібній до сферичної, утворювали щільні окремі ряди. Поверхні клітини в деяких кластерах чи скупченнях були досить плоскими і щільно прилягали або були розмежовані глибокими інвагінаціями. Конфігурація вільної поверхні клітин, що утворюють скупчення, була досить мінливою. У деяких випадках вся видима поверхня була вкрита численними несиметричними мікроворсинками різної довжини, розміру та щільності, які найчастіше покривали лише частину поверхні клітини. Траплялися скупчення із зовнішніми вільними клітинними поверхнями, вкритими кількома розсіяними асиметричними мікроворсинками або навіть повністю позбавлені їх. В інфільтруючих протокових карциномах трабекулярного типу пухлинні клітини розташовувалися щільно упакованими рядами. Вони, як правило, мали гладкі поверхні з невеликою кількістю везикул і рідкісними мікроворсинками (рис. 4в). Поодинокі відокремлені пухлинні клітини, в основному, були сферичними і мали різний розмір. Конфігурація їх поверхні була подібна до поверхні клітин, що утворюють кластерні скупчення, тобто були або покриті несиметричними мікроворсинками, розсіяними по всій поверхні клітини, або мали неправильну кон-



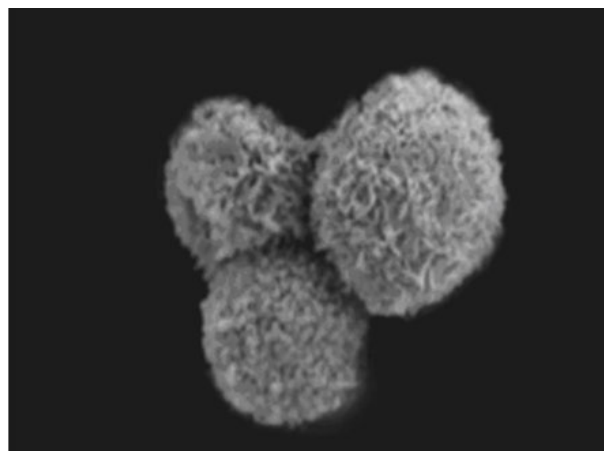
а



б



в



г

Рис. 1

Інвазивна протокова карцинома грудної залози: типові тубулярні структури в інфільтративному компоненті, гістологічно G2 ступінь злоякісності. Забарвлення гематоксином та еозином. $\times 400$ (а); скануюча електронна мікроскопія, I варіант поверхневої конфігурації, численні асиметричні мікротрабекулярні цитоплазматичні вирости покривають цілі вільні поверхні клітин (б-в), скупчення, утворене невеликими округлими клітинами, які вкриті щільно упакованими мікроворсинками (г). б $\times 725$; в $\times 800$; г $\times 3500$.

фігурацію поверхні без мікроворсинок (рис. 4г).

Проведений порівняльний аналіз конфігурації поверхні пухлинних клітин з різним гістологічним ступенем злоякісності дав можливість виділити три варіанти клітин:

- варіант I характеризувався наявністю у більшості пухлинних клітин численних асиметричних мікроворсинок, дифузно розподілених на поверхні клітин або зустрічалися вогнищево (рис. 1 б, в);
- варіант II - наявність дуже малої кількості асиметричних мікроворсинок, розсіяних по всій клітинній поверхні (рис. 2 в, г, рис. 4 в, г);
- варіант III характеризувався відсутністю у більшості пухлинних клітин мікроворсинок на поверхні (рис. 3 б, в, г).

Електронно-мікроскопічні особливос-

ті інвазивного протокового раку грудної залози при скануючій мікроскопії порівнювали в кожному випадку з гістологічним ступенем злоякісності G. Результати дослідження подано у Табл. 1.

Ми визначили 5 випадків (41,67% [16,54-69,4]) раку грудної залози I варіанта, 2 (16,67% [1,88-41,84]) - II варіанта та 5 (41,67% [16,54-69,4]) - III варіанта. Високодиференційовані інвазивні протокові карциноми G1 характеризувалися наявністю у більшості пухлинних клітин численних асиметричних мікроворсинок, які були дифузно розподілені на поверхні клітин або зустрічалися вогнищево. Варіант I переважав за наявності тубулярних структур в інфільтративному компоненті протокових карцином грудної залози

Таблиця 1

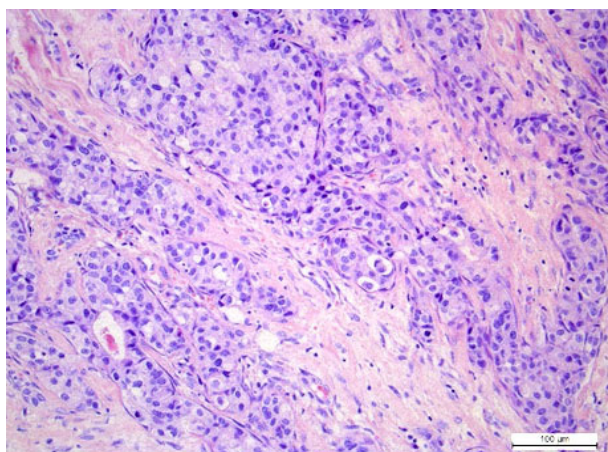
Розподіл варіантів клітин при різному гістологічному ступені злоякісності (% [95%ДІ])

Гістологічний ступінь злоякісності (G)	Варіант клітин I		Варіант клітин II		Варіант клітин III		Всього	
	n	% [95%ДІ]	n	% [95%ДІ]	n	% [95%ДІ]	n	%
G1	3	100,00%	0	0%	0	0%	3	100,00%
G2	2	40,00% [5,95-81,25]	1	20,00% [0,06-61,55]	2	40,00% [5,95-81,25]	5	100,00%
G3	0	0%*	1	25,00% [0,11-72,04]	3	75,00% [27,96-99,89]	4	100,00%
Всього	5	41,67% [16,54-69,4]	2	16,67% [1,88-41,84]	5	41,67% [16,54-69,4]	12	100,00%

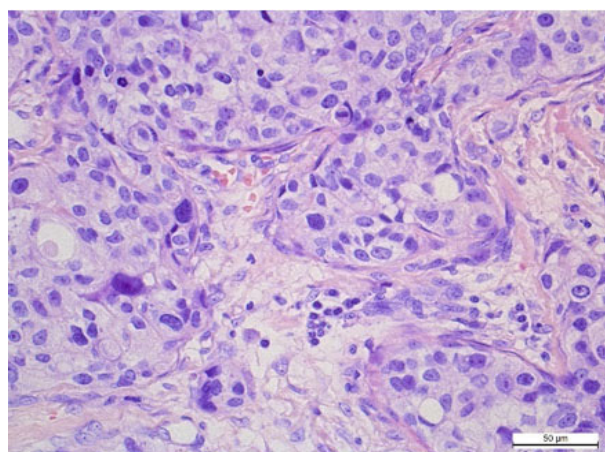
* $p < 0,05$ показника G1 з іншими гістологічними ступенями злоякісності

(рис.1 а). Помірнодиференційовані карциноми G2 (40,00% [5,95-81,25]) характеризувалися розмаїтістю поверхневої конфігурації пухлинних клітин. Для них була характерна

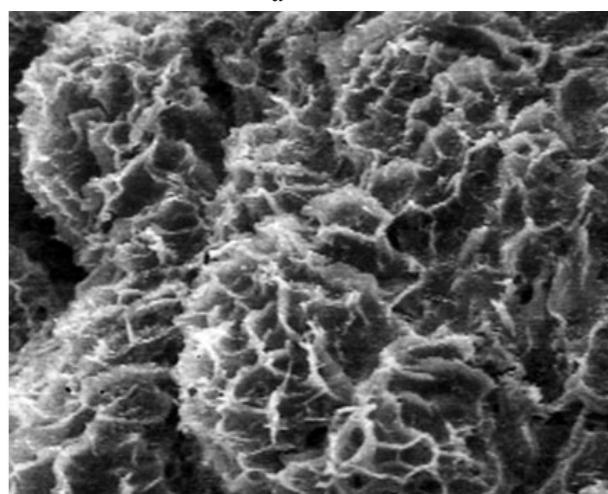
як присутність численних асиметричних мікрворсинок, так і їх повна відсутність. Подекуди можна було зафіксувати не значну кількість несиметричних мікрворсинок, розсія-



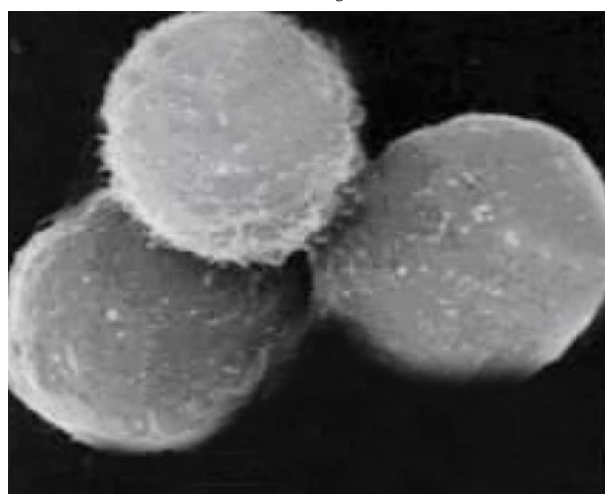
а



б



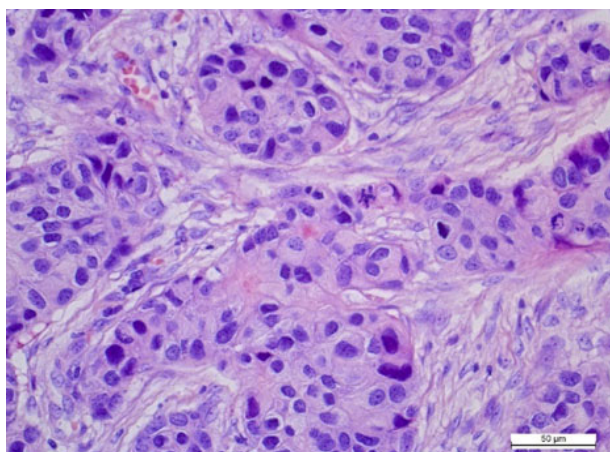
в



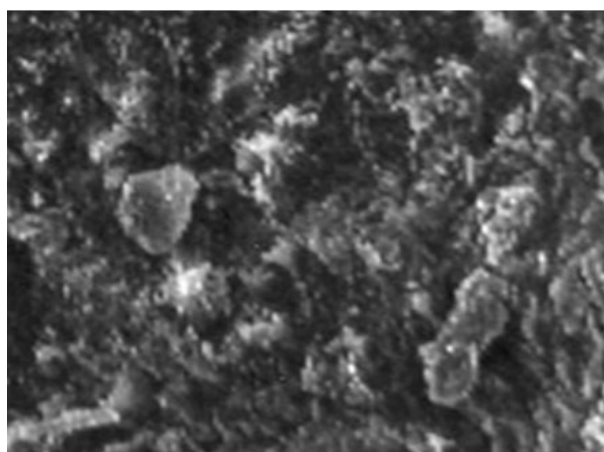
г

Рис. 2

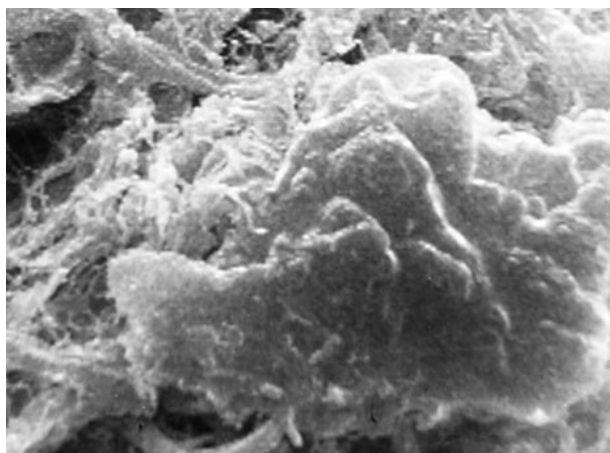
Інвазивна протокова карцинома грудної залози: солідні структури в інфільтративному компоненті, виражений клітинний поліморфізм, гіперхромія ядер, численні мітотичні фігури, гістологічно G3 ступінь злоякісності (а, б). Забарвлення гематоксилином та еозином, а $\times 200$, б $\times 400$; скануюча електронна мікроскопія, скупчення пухлинних клітин переважно округлої форми, II варіант поверхневої конфігурації, рідкісні мікротрабекулярні цитоплазматичні вирости (в) і мала кількість мікрворсинок на поверхнях пухлинних клітин (г). в $\times 700$, г) $\times 3500$.



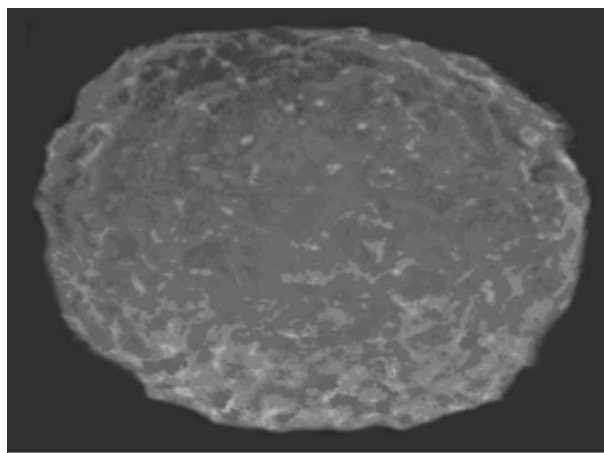
а



б



в



г

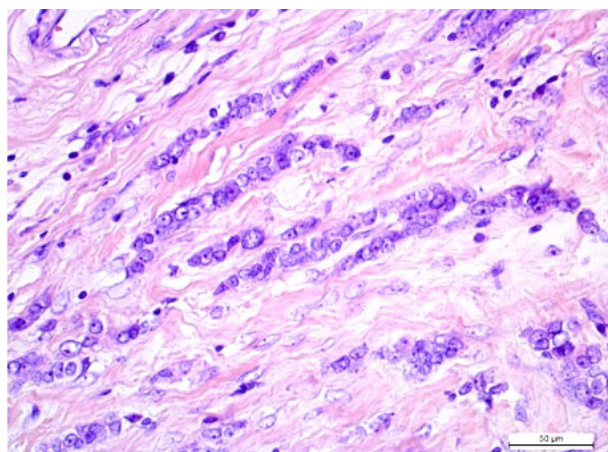
Рис. 3

Інвазивна протокова карцинома грудної залози: альвеолярні структури в інфільтративному компоненті, виражений клітинний поліморфізм, гіперхромія ядер, численні мітози, гістологічно G3 ступінь злоякості (а). Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 400$; скануюча електронна мікроскопія, III варіант поверхневої конфігурації, групи пухлинних клітин з гладкими поверхнями без мікротрабекулярних цитоплазматичних виростів (б, в) б $\times 312$, в $\times 3284$; поодинокі пухлинні клітини з несиметричною поверхнею без мікроворсинок (г) $\times 4000$.

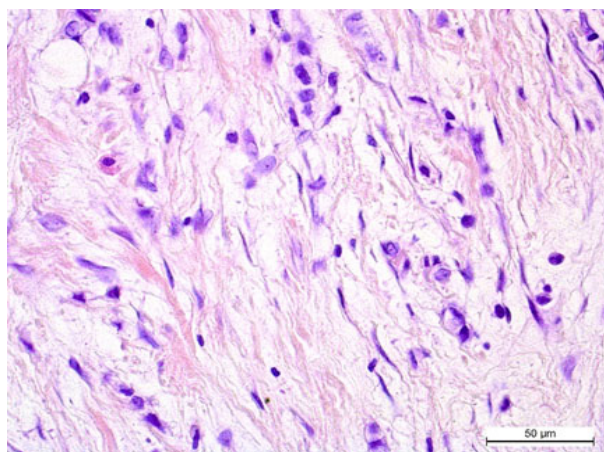
них по всій клітинній поверхні. Другий варіант - характерний для солідного, трабекулярного і тубулярного компонента інвазивних протокових карцином грудної залози ступенів злоякості G2 (20,00% [0,06-61,55]) і G3 (25,00% [0,11-72,04]) (рис. 2 а, б; рис. 4 а, б). Варто наголосити, що в низькодиференційованих карциномах G3, котрі становлять 75,00% [27,96-99,89] випадків, у більшості пухлинних клітин характерною була відсутність мікроворсинок на поверхні, тобто мав місце III варіант поверхневої конфігурації клітин. І тільки в поодиноких випадках зустрічалася незначна кількість асиметричних мікроворсинок, розсіяних по всій клітинній поверхні. Третій варіант поверхневої конфігурації характеризувався наявністю переважно

альвеолярних структур в інфільтративному компоненті (рис. 3 а).

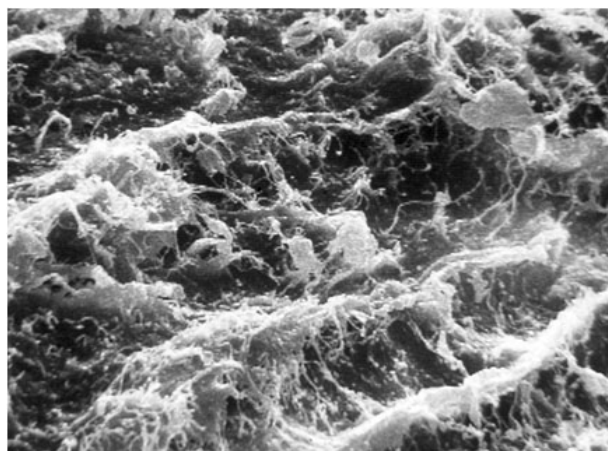
Таким чином, проведене дослідження продемонструвало, що пухлинні клітини інвазивного протокового раку грудної залози, мають, зазвичай, три варіанти поверхневої конфігурації. Деякі клітини були повністю або частіше вогнищево покриті несиметричними мікроворсинками. На інших клітинах було мало асиметричних мікроворсинок, розсіяних по всій клітинній поверхні. У третьому варіанті пухлинні клітини не мали мікроворсинок. Перший варіант переважав за наявності тубулярних структур в інфільтративному компоненті протокових карцином грудної залози. Другий варіант був характерний для солідного і трабекулярного компоненту інвазив-



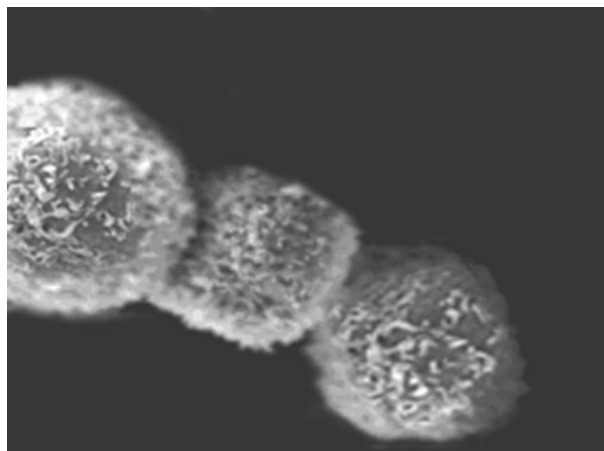
а



б



в



г

Рис. 4

Інвазивна протокова карцинома грудної залози: трабекулярні (а) та дискретні (б) структури в інфільтративному компоненті, виражений клітинний поліморфізм, гіперхромія ядер, численні мітотичні фігури, гістологічно G3 ступінь злоякості. Забарвлення гематоксином та еозином, $\times 400$; скануюча електронна мікроскопія, II варіант поверхневої конфігурації, пухлинні клітини з короткими мікротрабекулярними цитоплазматичними виростами (в); групи пухлинних клітин з рідкісними мікрворсинками. в $\times 1800$, г) $\times 3500$.

них протокових карцином. Третій варіант характеризувався наявністю переважно альвеолярних структур в інфільтративному компоненті.

Порівняння конфігурації поверхні пухлинних клітин із гістологічно визначеним ступенем злоякості показало, що при G3 більшість клітин мали незначну кількість або взагалі не було мікрворсинок на поверхнях. У пухлинах зі ступенем диференціювання G1 більшість клітин мали на поверхні дифузно або вогнищево розподілені мікрворсинки. Це узгоджується з раніше опублікованими даними про їх наявність на поверхнях клітин пухлини. Мікрворсинки рідко зустрічаються на поверхнях недиференційованого раку, на

відміну від високодиференційованих, як, наприклад, при раку шлунка [12], раку підшлункової залози [13] та раку легені [14, 15]. Вони зменшуються за кількістю та розміром під час канцерогенезу [16]. Наявність мікрворсинок на обмеженій ділянці клітинної поверхні вказує на те, що полярність пухлинних клітин не втрачена, а отже, свідчить про краще збережену диференціацію пухлинних клітин. Орієнтація мікрворсинок, наявність яких була характерною для I і II варіантів поверхневої конфігурації пухлинних клітин, була різною. Вони могли бути вигнутими або косо орієнтованими до поверхні, прямими і перпендикулярними, переважно асиметричними і дуже рідко однакової довжини.

Труднощі зі встановленням надійного прогнозу протокового раку грудної залози сприяли розробці гістопатологічних систем класифікації, які розподіляли РГЗ на 3-4 ступені злоскісності [17, 18]. Ноттінгемська модифікація системи P. Scarff, H. Bloom і W. Richardson, відома як Ноттінгемська градуююча система, рекомендована різними професійними організаціями на міжнародному рівні (BOOЗ, AJCC, EU і королівська колегія патологів), має велику перевагу серед інших гістопатологічних класифікацій [11]. Тим не менше, скануюча електронна мікроскопія, особливо в поєднанні з імуногістохімічними параметрами, є великою допомогою у дослідженні та діагностиці патологічних змін, що відбуваються на поверхнях слизової і може сприяти прогностичній оцінці протокового раку грудної залози.

Висновки

1. Морфологічні зміни клітин та тканин залишаються еталоном для діагностики раку грудної залози. Варіації розміру ядра, форми та морфології клітин і їх функціональні зміни можуть надати вирішальне підтвердження певному типу пухлини та успішному лікуванню.
2. Цитоплазматична мембрана відіграє важливу роль у міжклітинних комунікаціях, рості та проліферації клітин, а наявність мікрворсинок на клітинній поверхні, які заповнені актиновими філаментами, чи їх відсутність, а також десмосоми або клітинні сполучення, до складу яких входять мікрофіламенти, утворені білком кератином, що є гістохімічним маркером клітин епітелію, мають прогностичне значення щодо перебігу інвазивного протокового раку грудної залози.

Introduction

Breast cancer (BC) is a pathological condition associated with malignant uncontrolled rapid cell division, invasive cell movement to adjacent tissues, and metastatic spread to distant sites [1-4]. Breast cancer is the most common malignancy disease among women worldwide. In 2020, breast cancer was diagnosed in 2.3

3. Із точки зору поверхневої конфігурації пухлинних клітин виділено три варіанти клітин. Перший варіант характеризувався наявністю у більшості пухлинних клітин численних асиметричних мікрворсинок з їх дифузним або вогнищевим розподілом на поверхні і достовірно переважав за наявності тубулярних структур в інфільтративному компоненті протокових карцином грудної залози всіх випадків ступеня градації G1 ($p < 0,05$ з G3). Другий варіант поверхневої конфігурації характеризувався малою кількістю несиметричних мікрворсинок, розсіяних по всій клітинній поверхні та діагностувався при солідному і трабекулярному інвазивному компоненту ступенів злоскісності G2 і G3. Третій варіант характеризувався відсутністю у більшості пухлинних клітин мікрворсинок на поверхні і переважав в альвеолярних структурах інвазивного компоненту G2 і G3 ступенів.

4. Встановлено, що зниження ступеня гістологічного диференціювання інвазивного протокового раку грудної залози асоційоване зі зменшенням або відсутністю асиметричних мікрворсинок на клітинній поверхні. Пухлини, класифіковані як G2, показали широкий спектр поверхневої конфігурації ракових клітин, а в 75% випадків карцином G3 властивою була відсутність у більшості пухлинних клітин мікрворсинок на поверхні, тобто мав місце III варіант поверхневої конфігурації клітин.

5. Скануюча електронна мікроскопія уможлиблює надання інформації в нанометричному масштабі щодо поверхневих деталей пухлинних клітин, а виявлення особливостей фенотипу між пухлинними клітинами можуть бути прогностично важливими при раку грудної залози.

million women, with 685,000 deaths from the disease reported worldwide, despite improved approaches to diagnosis and treatment. According to the WHO, at the end of 2020, 7.8 million women were diagnosed with breast cancer in the last five years, which means that this type of cancer is the most common cancer in the world. The number of lost years of healthy

life of women with this diagnosis in the world exceeds that of any other type of cancer in the female population. Breast cancer occurs in all countries of the world in women of all ages after puberty, but in older age the incidence rate increases (WHO) [5].

In the United States of America, the incidence of breast cancer is 300 thousand, in Europe - 458 thousand cases. In Ukraine, the incidence of breast cancer ranks 1st among all malignant tumors in women. In 2018, there were 146,317 patients registered with an oncologist for breast cancer in Ukraine, the standardized rate of breast cancer per 100,000 women was 762.1 [6].

Morphological studies of breast cancer, especially with the introduction of immunohistochemical (IHC) methods, have become crucial, as their results allow not only to give a prognosis, but also to determine the direction of antitumor therapy [7].

In addition to immunohistochemical examination of breast cancer, transmission electron microscopy has taken a prominent place. The ultrastructure of histological variants of breast cancer is described in detail, with special attention focused on the importance of myoepithelial cells, basement membrane, various organelles and inclusions [8]. Such studies are useful both for elucidating the histogenesis and for diagnosing the tumors. But in transmission electron microscopy studies, little attention has been paid to the superficial configuration of breast cancer tissue, mainly due to technical difficulties in assessing complex superficial ultrastructures on thin sections. At the same time, scanning electron microscopy (CEM) of breast cancer tissue samples is technically complex, as studies have shown, because the surrounding collagen fibrous stroma can darken epithelial structures, which determines the difficulty of research and analysis of tumor surface configuration [9]. However, the use of scanning electron microscopy in the study of ductal breast cancer with different degree of differentiation and different histological structure of the invasive component in comparative terms may be prognostically important for assessing

the course of the disease.

The aim of the study was to establish the surface characteristics of ductal breast cancer of different degree of differentiation and different histological structure of the invasive component in scanning electron microscopy.

Material and Methods

The material for the study were 39 cases of invasive ductal breast cancer. In all cases, the diagnosis was verified histologically. Morphological examination of the operation material using a light microscope Leica DM750 (Leica Microsystems GmbH) was performed. The study was conducted in compliance with the basic bioethical provisions of the Council of Europe Convention on Human Rights and Biomedicine (04.04.1997), the Helsinki Declaration of the World Medical Association on ethical principles of scientific medical research with human participation (1964-2008), the Ministry of Health of Ukraine № 690 of September 23, 2009, approved by the Commission on Ethics of Scientific Research of the Danylo Halytsky Lviv National Medical University.

Histological type of cancer was determined in accordance with WHO recommendations [10]. The degree of malignancy was determined by a modified scheme of P. Scarff, H. Bloom and W. Richardson [11]. The number of tubular structures, the number of mitoses, cell polymorphism and nuclear hyperchromia were taken into account. According to the degree of differentiation (G), the tumors were divided into 3 groups, respectively: highly differentiated (G1 - 3-5 points), moderately differentiated (G2 - 6-7 points), low differentiated (G3 - 8-9 points).

In addition to light microscopy, we used scanning electron microscopy, which is a method of examining the surface of samples and other small objects. The depth of field is significant, which makes it possible to obtain a three-dimensional sharp image. Tissue samples from 12 cases of invasive ductal carcinoma were fixed in 2% glutaraldehyde solution for 2 hours, then washed three times with distilled water for 10 minutes each time. Clean washed samples were

frozen and placed in a sublimation unit, where water was sublimed from the tissues for two hours without losing volume and shape. The dried samples were glued to the tables for further spraying with a conductive film in a vacuum sprayer, as the surface of the sample must be electrically conductive. Electron microscopic studies were performed on a scanning electron microscope JEOL T220A in the laboratory of physical research methods in geology of Ivan Franko Lviv National University and the electron microscopy laboratory of Danylo Halytsky Lviv National Medical University. The surface of the samples was sprayed with a thin layer of silver in a vacuum sprayer VUP-5. An increase from $\times 35$ to $\times 4000$ was used to photograph the surface of the samples, and the accelerating voltage in all studies was 25 kV.

Data processing was performed by applied statistical methods used in medicine including the program R Commander. The obtained indicators are presented in the form of shares and 95% confidence intervals (% [95% CI]). Confidence intervals were calculated by Fisher's angular transformation criterion- ϕ . The significance of the difference was determined by the method of Fisher's exact test, with a minimum significance of $p < 0.05$.

Results and Discussion

Histologically, in the infiltrative component of invasive ductal carcinoma of the breast, we identified tubular, trabecular, solid, alveolar structures and discrete (single) groups of tumor cells. Tubular structures resembled tubes formed by a one row of tumor cells (Fig. 1a). Trabecular structures represented one or two rows of linearly arranged cells (Fig. 4a). Solid structures looked like fields consisting of tens and hundreds of tumor cells (Fig. 2a, b). Alveolar structures were the formation of tumor cells of round or close to round shape (Fig. 3a). Discrete, or single, groups of tumor cells were defined as individual tumor cells or clusters from two to five cells (Fig. 4b). Estimation of the degree of malignancy of ductal breast cancer, described by P. Scarff, H. Bloom and W. Richardson, based on the determination

of the number of ducts formed by tumor cells, cell polymorphism and nuclear hyperchromia of cancer cells, as well as the number of mitotic figures, showed a predominance in our materials moderately differentiated carcinoma G2 - 69.23% [54,04-82,54] ($n=27$). Highly differentiated carcinomas (G1) accounted for 5 cases (17.95% [7.67-31.36]), low differentiated (G3) - 7 (12.82% [4.32-24.96]). Invasive ductal carcinomas ($n=12$) of different degrees of malignancy were selected for examination in a scanning microscope: G1 - $n=3$ (25.00% [5,68-52,11]); G2 - $n=5$ (41.67% [16.54-69.4]); G3 - $n=4$ (33.33% [10.66-61.2]).

Scanning electron microscopy showed the presence of single cells and clusters of tumor cells of different sizes. Clusters of cells had an irregular shape, resembled a spherical, formed dense individual rows. Differences in the size and shape of the cells forming the clusters were noticeable. The cell surfaces in some clusters were fairly flat and close-fitting or were delimited by deep intussusception. The configuration of the free surface of the cells forming the clusters was quite variable. In some cases, the entire visible surface was covered with numerous, asymmetric microvilli of various lengths, sizes, and densities. More often such microvilli covered only a part of a cell surface. There were also clusters with outer free cell surfaces covered with a few scattered asymmetric microvilli or even completely devoid of microvilli. In infiltrating ductal carcinomas of the trabecular type, tumor cells were arranged in densely packed rows. Such cells, as a rule, had smooth surfaces with a small number of vesicles and rare microvilli (Fig. 4c). Single isolated tumor cells were usually spherical and of different sizes. Their surface configuration was similar to the surface of cells forming clusters, that is they were either covered with asymmetric microvilli scattered over the entire cell surface, or they had an incorrect surface configuration without microvilli (Fig. 4d).

We compared the surface configuration of tumor cells with different histological degrees of malignancy. From the point of view of the surface configuration of tumor cells, we have

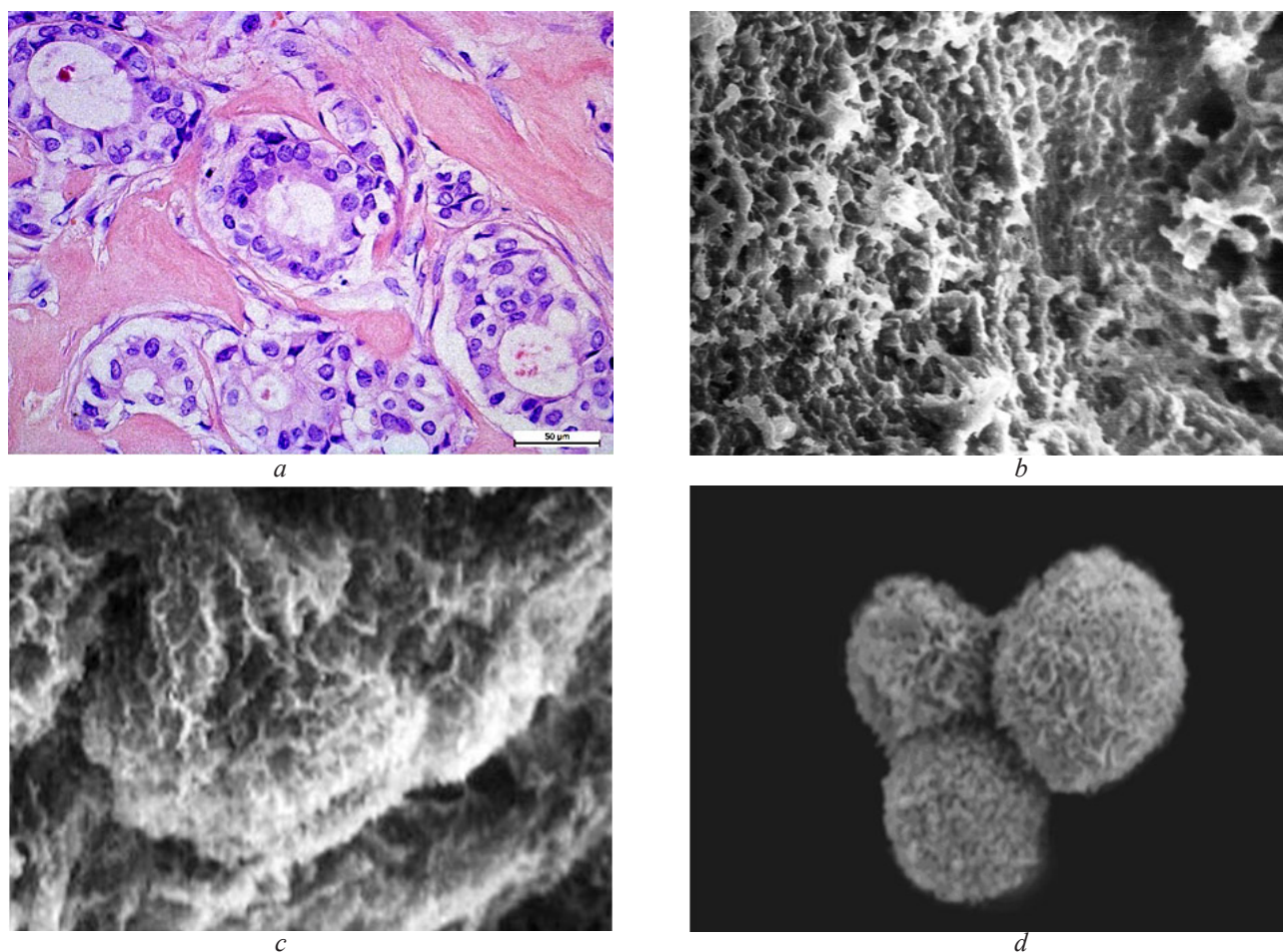


Fig. 1

Invasive ductal breast carcinoma: typical tubular structures in the infiltrative component, histologically G2 degree of malignancy. Hematoxylin and eosin staining. $\times 400$ (a); scanning electron microscopy, I variant of the surface configuration, numerous asymmetric micro trabecular cytoplasmic outgrowths cover entire free cell surfaces (b-c), a cluster formed by small rounded cells that are covered with tightly packed microvilli (d). b $\times 725$; c $\times 800$; d $\times 3500$.

identified three variants of cells:

Variant I was characterized by the presence in most tumor cells of numerous asymmetric microvilli, which were diffusely distributed on the cell surface or appeared in the form of foci (Fig. 1 b, c).

Variant II was characterized by the presence of a very small number of asymmetric microvilli scattered throughout the cell surface (Fig. 2 c, d, Fig. 4 c, d).

Variant III was characterized by the absence of microvilli on the surface of most tumor cells (Fig. 3 b, c, d).

Electron microscopic features of invasive ductal breast cancer in scanning microscopy were compared in each case with the histological degree of malignancy G. The results of the study are presented in Table. 1.

We identified 5 cases (41.67% [16.54-69.4]) of breast cancer variant I, 2 (16.67% [1.88-41.84]) - variant II and 5 (41.67% [16.54-69.4]) - III variant. Highly differentiated invasive ductal carcinomas of G1 were characterized by the presence in most tumor cells of numerous asymmetric microvilli, which were diffusely distributed on the cell surface or appeared in the form of foci. Variant I prevailed in the presence of tubular structures in the infiltrative component of ductal carcinoma of the breast (Fig. 1 a). Moderately differentiated carcinomas G2 (40.00% [5.95-81.25]) were characterized by a variety of surface configurations of tumor cells. They were characterized by the presence of numerous asymmetric microvilli, and their complete absence. In some places it was possible to register a very small number of asymmetric

Table 1

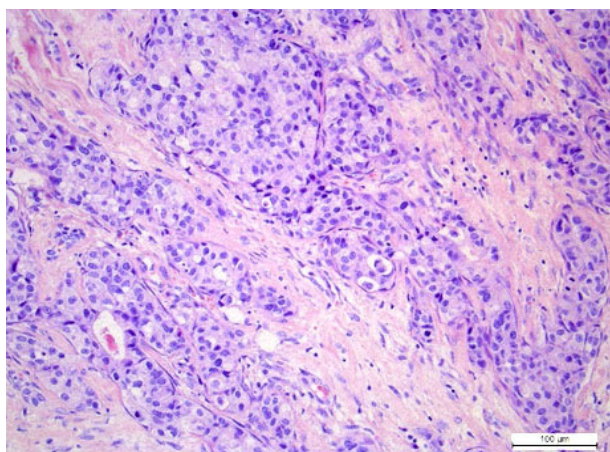
Distribution of cell variants with different histological grade of malignancy (% [95% CI])

Degree of histological malignancy (G)	Cell Variant I		Cell Variant II		Cell Variant III		Total	
	n	% [95% CI]	n	% [95% CI]	n	% [95% CI]	n	%
G1	3	100,00%	0	0%	0	0%	3	100,00%
G2	2	40,00% [5,95-81,25]	1	20,00% [0,06-61,55]	2	40,00% [5,95-81,25]	5	100,00%
G3	0	0%*	1	25,00% [0,11-72,04]	3	75,00% [27,96-99,89]	4	100,00%
Total	5	41,67% [16,54-69,4]	2	16,67% [1,88-41,84]	5	41,67% [16,54-69,4]	12	100,00%

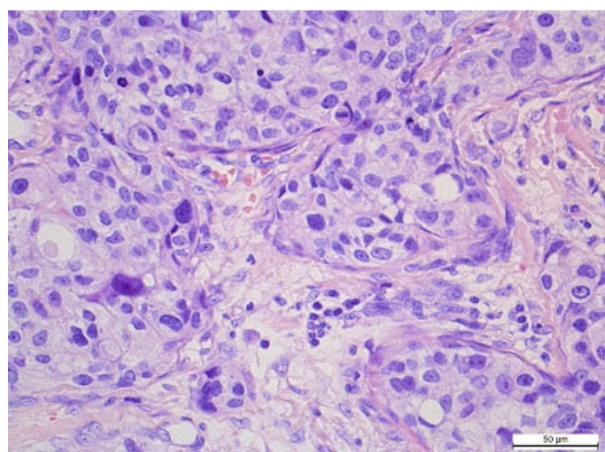
* $p < 0.05$ G1 with other histological degrees of malignancy

microvilli scattered throughout the cell surface. The second variant was characteristic of the solid, trabecular and tubular component of invasive ductal carcinoma of the breast with grade of malignancies G2 (20.00% [0.06-61.55])

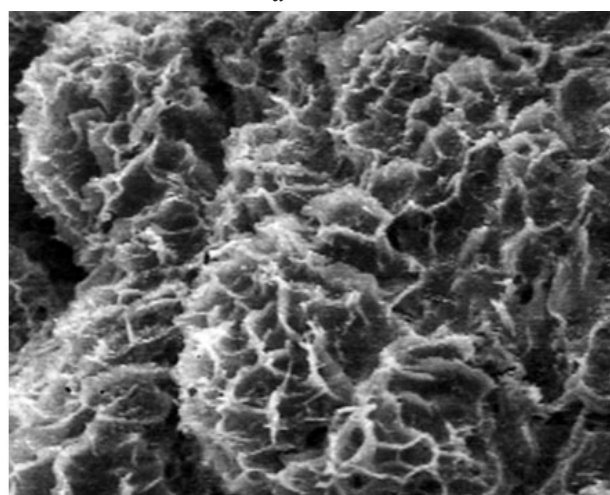
and G3 (25.00% [0.11-72.04]) (Fig. 2 a, b; Fig. 4 a, b). Concerning to low-differentiated G3 carcinomas, it should be noted that in 75.00% [27,96-99,89] cases, most tumor cells were characterized by microvilli on the surface, i.e., there



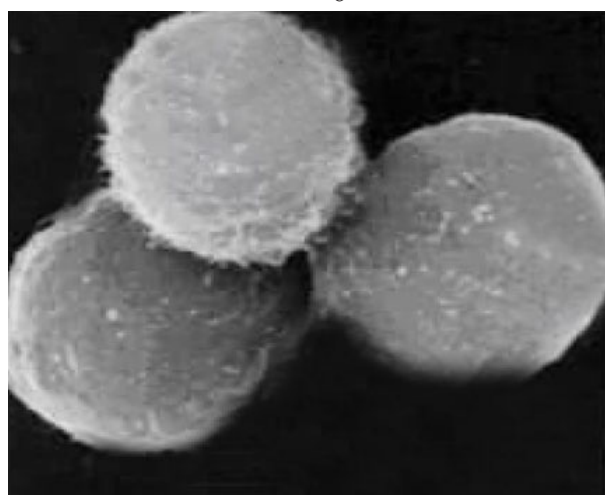
a



b



c



d

Fig. 2

Invasive ductal breast carcinoma: solid structures in the infiltrative component, obvious cellular polymorphism, nuclear hyperchromia, numerous mitotic figures, histologically G3 degree of malignancy (a, b). Staining with hematoxylin and eosin, a $\times 200$, b $\times 400$; scanning electron microscopy, clusters of tumor cells, mostly round in shape, variant II surface configuration, single micro trabecular cytoplasmic outgrowths (c) and a small number of microvilli on the surfaces of tumor cells (d). c $\times 700$, d $\times 3500$.

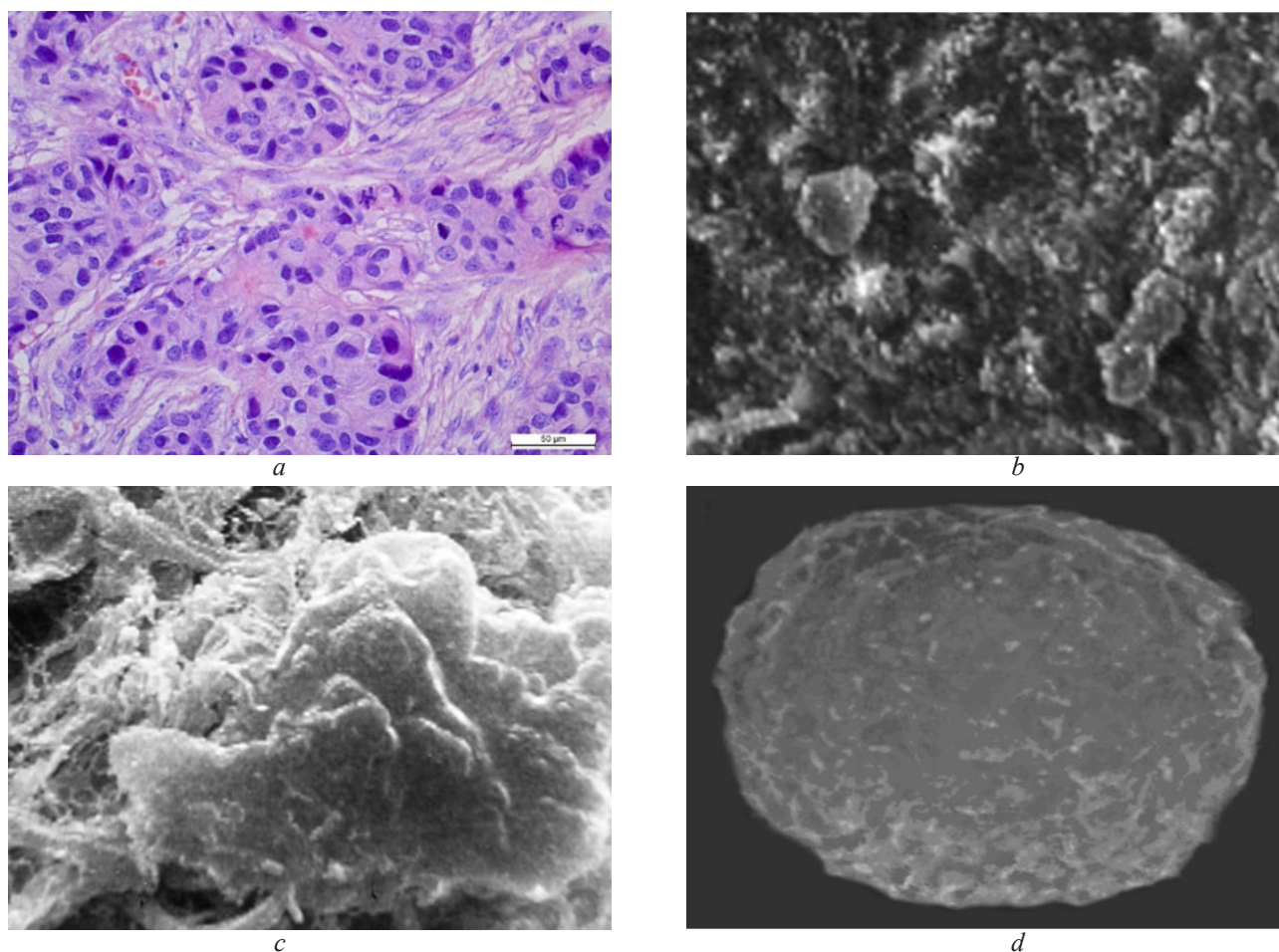


Fig. 3

Invasive ductal breast carcinoma: alveolar structures in the infiltrative component, obvious cell polymorphism, nuclear hyperchromia, numerous mitoses, histologically G3 degree of malignancy (a). Staining with hematoxylin and eosin, $\times 400$; scanning electron microscopy, III variant of surface configuration, groups of tumor cells with smooth surfaces without micro trabecular cytoplasmic outgrowths (b, c) $b \times 312$, $c \times 3284$; single tumor cell with asymmetric surface without microvilli (d) $\times 4000$.

was a variant III surface configuration of cells. And only in isolated cases there was a very small number of asymmetric microvilli, which are scattered throughout the cell surface. The third variant of the surface configuration was characterized by the presence of predominantly alveolar structures in the infiltrative components (Fig. 3 a).

Thus, the study showed that tumor cells of invasive ductal breast cancer usually have three superficial configurations. Some cells were completely or more often focal covered with asymmetric microvilli. Other cells had few asymmetric microvilli scattered throughout the cell surface. In the third variant, the tumor cells did not have microvilli. The first variant prevailed in the presence of tubular structures in the infiltrative component of ductal carcinoma

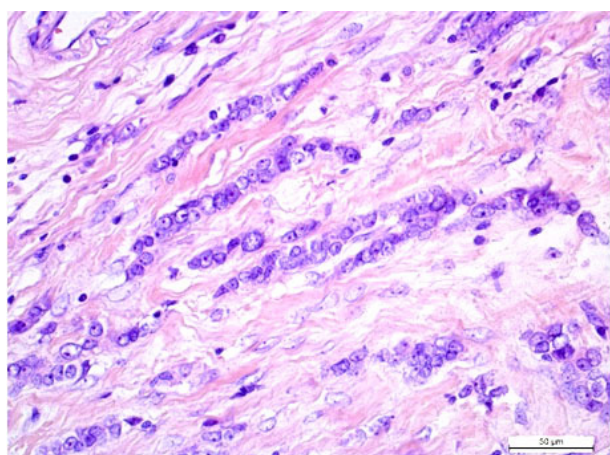
of the breast. The second variant was characterized by the presence of the solid and trabecular component in the invasive ductal carcinoma of the breast and the third variant was characterized by the presence of predominantly alveolar structures in the infiltrative component. A comparison of the surface configuration of tumor cells with a histologically determined degree of malignancy showed that in G3 tumors most cells had very few or no microvilli on their surfaces. In tumors with G1 differentiation, most cells had diffusely or focally distributed microvilli on the surface. This is consistent with previously published data concerning the presence of microvilli on the surfaces of tumor cells. Microvilli were often rare on the surfaces of undifferentiated carcinoma, in contrast to

highly differentiated cancers, such as gastric carcinoma [12], pancreatic cancer [13] and lung cancer [14, 15]. They decrease in number and size during carcinogenesis [16]. The presence of microvilli in a limited area of the cell surface indicates that the polarity of tumor cells is preserved, and therefore indicates a better-preserved differentiation of tumor cells. The orientation of microvilli, the presence of which was characteristic of I and II variants of the surface configuration of tumor cells, was different, microvilli could be curved or obliquely oriented to the cell surface, straight and perpendicular to the cell surface, mostly asymmetric and very rarely the same length. Difficulties in establishing a reliable prognosis for ductal breast cancer have led to the development of histopathological classification

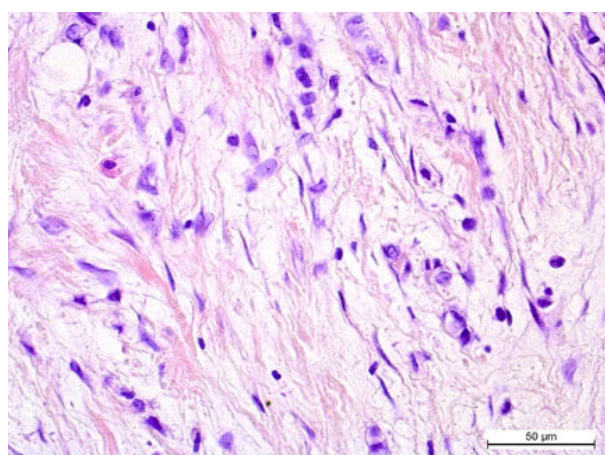
systems, which divided breast cancer into 3-4 degrees of malignancy [17, 18]. The Nottingham modification of the system by P. Scarff, H. Bloom and W. Richardson is known as the Nottingham grading system, recommended by various professional organizations internationally (WHO, AJCC, EU and the Royal College of Pathologists), has a great advantage among other histopathological classifications. However, scanning electron microscopy, especially in combination with immunohistochemical parameters, is of great help in the study and diagnosis of pathological changes occurring on tumor surfaces and can contribute to the prognostic assessment of ductal breast cancer.

Conclusions

1. Morphological changes of cells and tissues



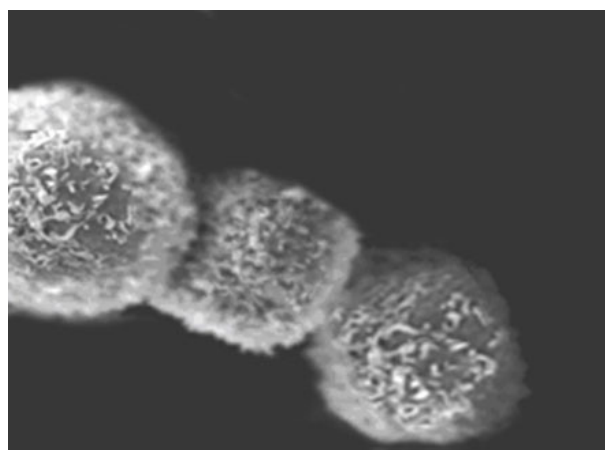
a



b



c



d

Fig. 4

Invasive ductal breast carcinoma: trabecular (a) and discrete (b) structures in the infiltrative component, obvious cellular polymorphism, nuclear hyperchromia, numerous mitotic figures, histologically G3 degree of malignancy. Staining with hematoxylin and eosin, $\times 400$; scanning electron microscopy, II variant of surface configuration, tumor cells with short micro trabecular cytoplasmic outgrowths (c); groups of tumor cells with single microvilli. c $\times 1800$, d $\times 3500$.

remain the standard for the diagnosis of breast cancer. Variations in the size, shape, and morphology of cells and their functional changes can provide crucial confirmation for a certain tumor type and successful treatment.

2. The cytoplasmic membrane plays an important role in intercellular communication, cell growth and proliferation, and the presence or absence of microvilli on the cell surface filled with actin filaments, as well as desmosomes or cellular compounds containing microfilaments formed by protein which are a histochemical marker of epithelial cells, have prognostic value in the course of invasive ductal breast cancer.

3. From a point of view of the surface configuration of tumor cells, we have identified three variants of cells. The first variant was characterized by the presence in most tumor cells of numerous asymmetric microvilli with diffuse or focal distribution on the surface and significantly prevailed in the presence of tubular structures in the infiltrative component of ductal carcinoma of the breast in all cases of grade G1 ($p < 0.05$ with G3). The second variant of the surface configuration was characterized by a small number of asymmetric microvilli scattered throughout the cell surface and was diagnosed with a solid and trabecular invasive component of grades malignancies G2 and G3. The third variant was characterized by the absence of microvilli on the surface of most tumor cells and prevailed in the alveolar structures of the invasive component of G2 and G3 degrees of differentiation.

4. It is established that the decrease in the degree of histological differentiation of invasive ductal breast cancer is associated with a decrease or absence of asymmetric microvilli on the cell surface. Tumors classified as G2 showed a wide range of surface configurations of cancer cells, however G3 carcinomas in 75% of cases were characterized by the absence of microvilli on most surface tumor cells, i.e., there was a variant III surface configuration of cells.

5. Scanning electron microscopy makes it possible to provide information on a nanometer scale on the surface details of tumor cells, and

the detection of phenotype features between tumor cells may be prognostically important in breast cancer.

Reference

1. National cancer institute/National institutes of health/ Department of health and human services, NIH, 2006. <https://www.nih.gov/about-nih/what-we-do/nih-almanac/national-cancer-institute-nci>
2. Deisboeck TS, Stamatakis GS. Multiscale cancer modeling, Chapman Hall/ CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 2011, 500 p., 113 B/W Illustration.
3. Kwabi-Addo B, Lindstrom TL. Cancer causes and controversies, Praeger, Barbara, Calif, USA, 2011, 241 p.
4. Weinberg R. The biology of cancer, Garland Science, New York, NY, USA, 2006. 850 p. ISBN: (hardcover) 9780815340782
5. Breast Cancer. WHO, 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
6. Bulletin of national cancer registry of Ukraine (English). (2020). Cancer in Ukraine, 2018-2019. Ukrainian cancer registry statistics, Vol.21 "Cancer in Ukraine", 2018-2019.
7. Chand P, Garg A, Singla V, Rani N. Evaluation of immunohistochemical profile of breast cancer for prognostics and therapeutic use. Niger J Surg. 2018 Jul-Dec; 24(2): 100-106. doi: 10.4103/njs.NJS_2_18
8. Gould VE, Jao W, Battifora H. Ultrastructural analysis in the differential diagnosis of breast tumors. The significance of myoepithelial cells, basal lamina, intracytoplasmic lumina and secretory granules. Path. Res. Pract. 1980, 167, 45-70. doi: 10.1016/S0344-0338(80)80181-6.
9. Spring-Mills E and Elias JJ. Cell surface changes associated with human breast cancer. Scanning Electron Microsc. 1976;11: 1-9.
10. WHO Classification of tumors editorial board, ed. WHO classification of tumors, 5th edition - Breast tumors. Lyon: International agency for research on cancer 2019 DOI: 10.1111/his.14091
11. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology. 1991;19: 403-10.
12. Tuk B, Corrales D. Scanning electron microscopy in gastric adenocarcinoma and intestinal metaplasia. Rev Biol Trop. 1986 Nov; 34(2): 167-70. PMID: 3423334
13. Toshiyuki T, Hasegawa F, Michishita M, Sasaki N et al. Electron microscopic analysis of different cell types in human pancreatic cancer spheres. Oncology Letters. 2018; 15: 2485-2490. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7554>
14. Wang NS. The surface appearance of some lung tumors, mesothelioma and their precursor lesions. Scanning Electron Microsc. 1980; III: 79-88.
15. Gao Z, Liu R, Ye N, Liu C. et al. FOXO1 inhibits

- tumor cell migration via regulating cell surface morphology in non-small cell lung cancer cells. *Cell Physiol Biochem* 2018; 48: 138-148. <https://doi.org/10.1159/000491670>
16. Trump BF, Heatfield BM, Phelps PC, Sanefuji H, Shamsuddin AK. Cell surface changes in preneoplastic and neoplastic epithelium. *Scanning Electron Microsc.* 1980; III: 43-60.
17. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Brit. J. Cancer* 1957; 11: 359-377.
18. Hartveit F. Prognostic typing in breast cancer. *Brit. Med. J.* 1973; 4: 253-257.