

Л.С. Болгова
Т.Н. Туганова
О.И. Алексеенко
П.В. Погребной
Т.С. Шестакова
В.С. Усенко
О.В. Лихолетова
Ю.С. Хожяенко

Национальный институт рака

Институт экспериментальной патологии, онкологии, радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины

БИОНТЕК (ОООНПЦ «Медицинские технологии»), Киев, Украина

Ключевые слова: гистогенез, рак легкого, гистологическое, иммуногистохимическое исследование.

ВВЕДЕНИЕ

Многолетние статистические исследования свидетельствуют о том, что наиболее частое злокачественное новообразование у мужчин — рак легкого (РЛ) [14]. Более 55% больных погибают до года с дня установления диагноза [16]. Только ранняя диагностика РЛ позволяет улучшить прогноз [1, 9]. Одним из проблемных является вопрос гистогенеза РЛ. Его решение может способствовать возникновению новых подходов к профилактике, диагностике и лечению РЛ. До настоящего времени проблема гистогенеза РЛ остается открытой. Существует наиболее распространенная точка зрения о том, что РЛ развивается из слизистой оболочки бронхов, и поэтому его еще называют бронхогенным [11]. Высказывают мнение [9, 10, 13], что центральные формы РЛ развиваются в крупных бронхах вплоть до проксимальных отделов сегментарных. Полагают также, что периферический РЛ развивается из эпителия мелких бронхов (начиная с дистальных отделов сегментарных), бронхиол и, вероятно, альвеол; сделан вывод о едином гистогенезе различных типов РЛ из поли- и унипотентных клеток-предшественниц. Такими клетками могут быть: цилиндрическая секреторная клетка, ее аналог на периферии — клетка Клара или же базальная клетка. Параллельно проведенные рентгенологические, бронхоскопические и морфологические исследования позволили установить [3] в большинстве наблюдений перибронхиально растущий РЛ. Отмечены также интактные бронхи среди разрастаний бронхоалоальвеолярного рака [16]. Все сказанное свидетельствует о неоднозначности гистогенеза РЛ. В связи с этим мы предприняли попытку изучения гистогенеза РЛ как по данным литературы, так и по материалам собственных исследований.

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В УТОЧНЕНИИ ГИСТОГЕНЕЗА РАКА ЛЕГКОГО

Резюме. На основе изучения особенностей морфологической структуры разных гистологических типов рака легкого (РЛ) выявлена, помимо характерных для определенных вариантов типичных признаков, общая закономерность роста раковой опухоли от базальной мембраны альвеолы к ее центру. Иммуногистохимические исследования с использованием МкАТ явились подтверждением выявленных при гистологическом изучении признаков роста раковых клеток от базальной мембраны альвеол, а также признаков созревания и склонности к апоптозу клеток, расположенных над базальными, что подтверждает альвеолярный генез РЛ.

Поиск литературы проводился по различным научным направлениям. Так, изучены труды об исследовании эпителиальных клеток легкого [6, 15], по которым можно проследить период обновления, митотической активности и других параметров эпителия легочной ткани в эксперименте. Авторы установили, что митотическая активность эпителия трахеи составляет 3,4 на тысячу клеток, в бронхах среднего калибра 1–1,5, в мелких бронхах — 0,5–1,5, а в клетках межальвеолярных перегородок — 8,25. Отмечено также, что на долю пневмоцитов II типа приходится 50% всех митозов, то есть именно они обладают наиболее высокими потенциями к пролиферации, а значит, и возможностью безудержного роста с явлениями озлокачествления. Время обновления эпителия трахеи составляет 47,6 сут, в крупных бронхах — 18,1, в средних — 7–10, в мелких — 167–200, а в клетках межальвеолярных перегородок наиболее короткое время обновления клеток — 3–7 сут. Это означает, что альвеолярный эпителий (АЭ) наиболее подвержен пролиферации, размножению и опухолевой трансформации. Естественно, что полученные в эксперименте данные нельзя полностью переносить на человеческий организм, но предположить общность данной тенденции представляется возможным. Независимо от других авторов ультраструктурные исследования [8] подтверждают данные о наибольшей пролиферативной активности клеток АЭ и, в частности, пневмоцитов II типа по сравнению с другими эпителиальными клетками легкого. Эти исследования также доказывают, что пневмоциты II типа можно отнести к стволовым клеткам легкого, то есть к таким, из которых могут развиваться разные патологические разрастания, в том числе и злокачествен-

ные. Согласно классическим данным [7], все патологические процессы в легком начинаются из бронхиол и реакции выстилочного АЭ; это положение принято и международными экспертами. С другой стороны, показано [12], что бронхиальный эпителий (БЭ) является наиболее устойчивым к вредным воздействиям по сравнению с другими эпителиальными структурами легкого. Уместно вспомнить микрофотографии крупных монографий, многотомных руководств по патологической анатомии, где демонстрируется РЛ. На фотографиях, независимо от локализации опухоли, — в центральном или в периферическом отделе легкого, виден обширный перибронхиальный компонент опухоли и небольшой экзофит в бронхе. Наконец, экспериментальные данные известной школы Л.М. Шабада по канцерогенезу РЛ [4, 5, 17] подтверждают начало развития и дальнейшую малигнизацию эпителия в субплевральных зонах независимо от пути введения канцерогена — эндобронхиально, внутрибрюшинно или других. Эти работы также, независимо от приведенных, подтверждают развитие РЛ не из БЭ, а из субплевральных отделов, то есть из АЭ. Таким образом, все полученные результаты экспериментальных, патологоанатомических, гистологических и иммуногистохимических исследований (ИГХ) сводятся к тому, что АЭ, а именно пневмоциты II типа, являются стволовыми клетками легкого, поэтому логично предположить начало развития РЛ именно из них. Для уточнения этого вопроса нами проведено настоящее исследование.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучен операционный материал 120 больных, которым выполнены лобэктомии, билобэктомии или пульмонэктомии по поводу РЛ III стадий в период 2006–2008 гг. Среди них — 49 больных с плоскоклеточным РЛ (ПРЛ), 66 — с железистым (ЖРЛ), 3 — с альвеолярноклеточным типом (АКРЛ) и 5 больных — с мелкоклеточной (недифференцированной) формой РЛ (МКРЛ). Наиболее часто отмечались пациенты в возрасте 50–70 лет. Мужчин было 79 (66%), женщин — 41 (34%). После классической проводки и окраски материала гематоксилином и эозином гистологические препараты тщательно изучали. При этом во всех препаратах и по всей площади срезов изучали особенности морфологической структуры РЛ. Особое внимание обращали на наличие роста опухоли в альвеолах, в которых идентифицируется рядность клеток и их наслаившийся рост от базальной мембраны к ее центру. Гистологический тип опухолей легкого оценивали по характерным структурным признакам с учетом новой Международной гистологической классификации [20]. Проведено также ИГХ-исследование опухолей с использованием МкАТ («ДАКО») к Ki67, PCNA, Vcl-2 и p53. При проведении ИГХ-реакций руководствовались инструкциями фирмы «ДАКО» и опытом других лабораторий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение макроскопических особенностей направленности роста и распространенности РЛ по отношению к стенке бронха, в том числе к его слизистой оболочке, позволило установить ряд закономерностей. Одной из главных, имеющих отношение к изучению гистогенеза РЛ, можно считать соотношение эндобронхиальной и перибронхиальной части опухоли. Преобладание перибронхиальной части опухоли замечено нами ранее [2]. Продолжение исследований в настоящее время позволило убедиться, что экзофитно растущая в просвет бронха часть РЛ составляет небольшую часть — от 1/4 до 1/40 всей опухоли, а остальная часть растет перибронхиально. Из 120 больных у 94 (78%) мы не смогли найти эндобронхиальное поражение слизистой оболочки бронха, то есть опухоль росла только перибронхиально.

Исследования гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, показали, что во всех препаратах есть участки, где виден рост раковых клеток от базальных мембран альвеол по направлению к их центру (рис. 1).

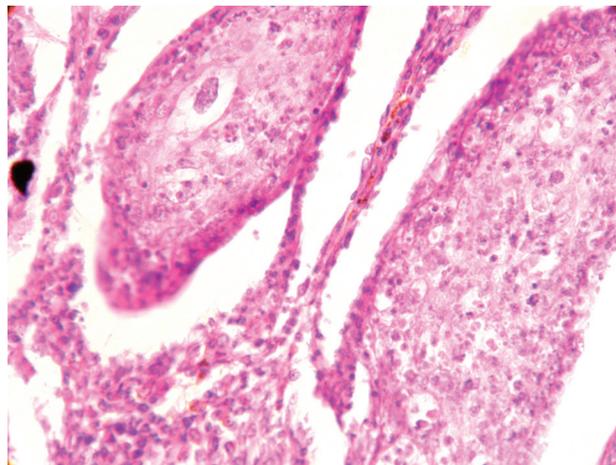


Рис. 1. Межальвеолярные перегородки. Рост ПРЛ от базальной мембраны. Гематоксилин, эозин; x200

Подтверждением того, что рост опухоли в легком начинается от базальной мембраны альвеолы, может быть исследование формы, размеров и тинкториальных свойств клеток опухоли и направленности роста. Отмечается закономерность построения рядов опухолевых клеток в альвеолах, которые растут от базальных мембран к центру альвеол, где выявляется содержимое предсуществующих альвеол — макрофаги, лейкоциты; в некоторых случаях — гибнущие опухолевые клетки (рис. 2). Кроме того, прослеживаются наслаивающиеся ряды клеток. При сравнении структуры клеток, расположенных в разных рядах альвеол, четко отмечаются признаки незрелых клеток у базальной мембраны по сравнению с теми, которые находятся над ними. Они отличаются меньшим размером, более интенсивно окрашенной базофильной цитоплазмой, увеличенным ядерно-цитоплазматическим соотношением и более гиперхромными, относительно укрупненными ядрами. Отмечаются отдельные альвеолы, в одной

части которых виден АЭ без патологических изменений, а в другой — с выраженными признаками атипии, характерными для рака.

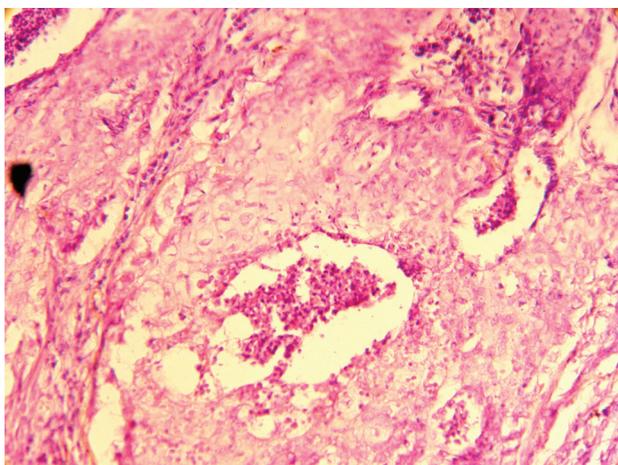


Рис. 2. ПРЛ: некроз в центре опухоли в альвеоле. Гематоксилин, эозин; $\times 400$

Следует подчеркнуть, что подобный рост опухоли в альвеолах отмечается при всех основных формах РЛ — ПРЛ, ЖРЛ, МКРЛ. Однако их не всегда просто выявить, так как каждый гистологический тип характеризуется классическими морфологическими особенностями, на основании которых устанавливается вариант опухоли. Кроме того, в операционном материале, как правило, хорошо развитый и далеко зашедший опухолевый процесс и поэтому выявить начальные этапы его роста не так просто. В ежедневной гистологической диагностике этим вопросом мало кто интересуется. При тщательном исследовании гистологических препаратов ПРЛ, ЖРЛ, МКРЛ нам удалось найти отдельные или целые поля альвеол, в которых прослеживается рост РЛ от базальной мембраны. При исследовании гистологических препаратов АКРЛ опухолевые клетки с признаками различной степени атипии растут преимущественно в альвеолах одним рядом, реже отмечаются места, в которых видно несколько рядов опухолевых клеток и папиллярные структуры АЭ.

Для подтверждения замеченного нами начала роста РЛ из альвеол проведено ИГХ-исследование с применением МкАТ, которые характеризуют уровень пролиферативной активности опухолевых клеток (по наличию Ki-67 и PCNA) либо позволяют оценить их склонность к апоптозу (по экспрессии Bcl-2 и p53). Ki-67 и PCNA изучены в ИГХ-препаратах 23 больных РЛ (у 11 был ПРЛ, у 12 — ЖРЛ). Интересно отметить, что только базальные клетки имели положительную реакцию на Ki-67 и PCNA, отражающую выраженную пролиферативную активность, а также морфологические признаки опухолевой трансформации АЭ. Это прослеживалось как при ПРЛ, так и при ЖРЛ; таким образом, можно трактовать это явление как закономерность. Найдены типичные структуры, в которых четко выявляются клетки ростковой зоны опухоли от базальной мембраны альвеол (рис. 3, 4).

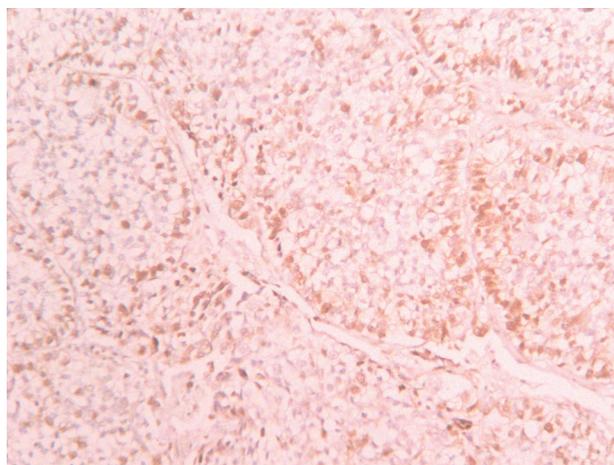


Рис. 3. ЖРЛ: ИГХ-реакция на антиген Ki-67; $\times 200$

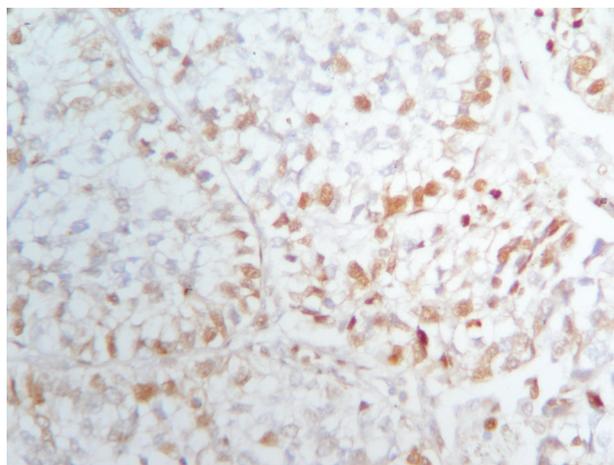


Рис. 4. ЖРЛ: ИГХ-реакция на антиген PCNA; $\times 400$

Наряду с этим, клетки, растущие над базальными рядами, не реагируют с названными МкАТ, то есть они соответствуют более зрелым элементам и утрачивают пролиферативную активность по сравнению с базальными клетками. Применение МкАТ к Bcl-2 и p53 выявило, что в базальных ростковых зонах опухолевые клетки практически не содержат названных антигенов; в то время как клетки, приближающиеся к центру предшествующих альвеол, имели положительную реакцию.

Полученные данные подтверждают известные морфологические закономерности роста, последующей дифференцировки и гибели клеточных элементов. При этом по цитоморфологическим признакам начального роста клетки относятся к незрелым, приобретают признаки опухолевой атипии, затем дифференцируются (созревают) и, наконец, претерпевают апоптотические изменения и гибнут. Эти данные принципиально схожи с результатами других исследователей [18, 19].

ВЫВОДЫ

1. Изучение особенностей морфологической структуры РЛ разных гистологических типов позволило выявить, кроме типичных признаков, характерных для определенного варианта РЛ, общую закономерность роста раковой опухоли от базаль-

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ной мембраны альвеолы к ее центру, в котором выявляются клетки АЭ, макрофаги, лейкоциты — характерное содержимое предрасполагающих альвеол.

2. ИГХ-исследования с использованием МКАТ подтверждают выявленные при гистологическом изучении признаки роста раковых клеток от базальной мембраны предрасполагающих альвеол (Ki-67 и PCNA-положительные) с нарастанием в клетках, приближающихся к их центру, признаков зрелости и склонности к апоптозу, что свидетельствует об альвеологенном генезе.

3. При макроскопическом и микроскопическом исследованиях РЛ, который развивается в периферических отделах, не найдено морфологических признаков связи с какими-либо бронхами, что не подтверждает развитие РЛ из слизистой оболочки бронха.

4. Исследование операционного материала центральных форм РЛ позволило установить общую закономерность в виде наличия практически во всех случаях небольшой части ткани опухоли, растущей эндобронхиально или без эндобронхиального роста, и основного массива опухоли, растущего перибронхиально, что также не подтверждает развитие РЛ из эпителия бронхов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арсеньев АИ, Барчук АС, Канаев СВ. Паллиативное лечение распространенного рака легкого. *Вопр онкол* 2006; **52** (4): 464–71.
2. Болгова ЛС. О гистогенезе рака легкого. *Онкология* 1999; (3): 195–8.
3. Вагнер РИ, Барчук АС, Друкин ЭЯ и др. Итоги и перспективы выявления доклинических форм рака легкого. II Всероссийский съезд онкологов. Омск. Тез докл 1980; 26–30.
4. Веснушкин ГМ, Плотникова НА, Семенченко АВ и др. Мелатонин угнетает канцерогенез легких, индуцированный уретаном у мышей. *Вопр онкол* 2006; **52** (2): 164–8.
5. Грицюте ЛА. Экспериментальные опухоли легких. М: Медицина, 1975. 166 с.
6. *Клеточная биология легких в норме и при патологии.* / Под ред: ВВ Ерохин, ЛК Романова / М.: Медицина, 2000, 496 с.
7. Есипова ИК. Легкое в патологии. ч II. Новосибирск: Наука, 1975. 248 с.
8. Загоруйко АК, Аскари ТА. Атлас ультраструктурной морфологии респираторного отдела легких. Симферополь: AZ-PRESS-СОНАТ, 2002. 142 с.
9. Коган ЕА, Кодолова ИМ, Секамова СМ. Морфогенез периферического рака легкого. *Арх патол* 1988; **50** (6): 26–34.
10. Коган ЕА, Швец СИ, Коваленко ВЛ и др. Соотношение процессов пролиферации, апоптоза, ангиогенеза и метастазирования в различных гистогенетических типах рака легкого (иммуногистохимическое исследование). *Арх патол* 2004; **66** (6): 33–8.

11. Мацко ДЕ, Желбунова ЕА, Имянитов ЕН. Рак легкого: гистопатология и молекулярный патогенез. М: Медицина, 2007. 24 с. (Приложение к ж: *Архив патологии* 2007; **69**).

12. Непомнящих ГИ. Биопсия бронхов: Морфогенез общепатологических процессов в легких. М: РАМН, 2005. 384 с.

13. Паклина ОВ, Галил-Оглы ГА, Бершанская АМ и др. Атипичная аденоматозная гиперплазия легких. *Арх патол* 2000; **62** (3): 21–3.

14. Рак в Україні, 2008–2009, захворюваність, смертність, показники онкологічної служби. *Бюл національного канцерреєстру України* 2010; (11). 111 с.

15. Романова ЛК. Регуляция восстановительных процессов. М: Изд-во Московского ун-та, 1984. 174 с.

16. Харченко ВП, Галил-Оглы ГА, Коган ЕА и др. Бронхиолоальвеолярный рак. *Арх патол* 2000; **62** (3): 10–6.

17. Шабад ЛМ. Предрак в экспериментально-морфологическом аспекте. М., 1967. 382 с.

18. Kerr KM, Carey FA, Lamb D. Evidence that pulmonary atypical alveolar hyperplasia in human lung is premalignant. *J Pathol* 1994; **174**: 154–9.

19. Tomida Shuta, Yatabe Yasushi, Yanagisawa Kiyoshi Takashi. Throwing new light on lung cancer pathogenesis: Update on the on three recent topics. *Cancer Sci* 2005; **96** (2): 63–8.

20. World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon, 2004. 341 p.

HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES FOR SPECIFICATION OF LUNG CANCER HISTOGENESIS

L.S. Bolgova, T.N. Tuganova, O.I. Alekseenko, P.V. Pogrebnoy, T.S. Shestakova, V.S. Usenko, O.V. Liholetova, Yu.S. Hozhaenko

Summary. *On the basis of study of morphological structure of different histological types of lung cancer, apart from typical patterns characteristic for certain variants, we have revealed general regularity of tumor growth from basal membrane of alveolus to its center. Immunohistochemical studies with the use of MoAbs have confirmed histologically determined pattern of tumor cell growth from basal membrane of alveolus, and cells upper than basal ones for which maturation patterns and apoptotic manifestations (positive Bcl-2 and p53) are characteristic, that evidences on their alveolar genesis.*

Key Words: histogenesis, lung cancer, histological, immunohistochemical study.

Адрес для переписки:

Болгова Л.С.
03022, Киев, ул. Ломоносова, 33/43
Национальный институт рака