

Л.С. Болгова
О.И. Алексеенко
Т.Н. Туганова
Л.А. Зотиков
М.С. Кретевиц

ГУ «Национальный институт рака», Киев, Украина

Ключевые слова:

альвеолярный эпителий, железистый рак легкого, гистогенез, цитологические, цитогенетические, ультраструктурные исследования.

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ, ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ГИСТОГЕНЕЗА ЖЕЛЕЗИСТОГО РАКА ЛЕГКОГО

Резюме. Результаты цитоморфологического, цитогенетического и электронно-микроскопического исследований демонстрируют наличие опухолевых элементов среди альвеолярного эпителия с высокой пролиферативной активностью в различных визуально неизменных участках легкого при железистом раке. В клетках альвеолярного эпителия с признаками выраженной пролиферации и некоторой атипичии, взятых с перитуморальной зоны, установлена активация ядрышкообразующих регионов хромосом, проявляющаяся в увеличении общего количества ядрышек и числа наиболее морфофункционально активных компактных их форм при сравнении с пролиферирующим альвеолярным эпителием, что подтверждает возможность его малигнизации при железистом раке легкого.

Исследование гистогенеза рака легкого (РЛ) обусловлено необходимостью рациональных подходов к его профилактике и ранней диагностике, что самым непосредственным образом влияет на эффективность лечебных мероприятий. Кроме того, существуют различные взгляды на роль каждого из клеточных элементов дыхательного аппарата в неопластической трансформации при развитии различных гистологических типов РЛ [1–3].

Большинство авторов считают основным источником возникновения РЛ базальный эпителий бронхов [1, 3]. В то же время разными экспериментально-морфологическими исследованиями показано, что эпителий выстилки альвеол характеризуется высокой пролиферативной активностью, что может привести к чрезмерной гиперплазии и анаплазии при предопухолевых состояниях и развитии РЛ [4]. Однако единого мнения о возможности малигнизации альвеолярного эпителия (АЭ) не существует.

Одним из объективных морфофункциональных способов оценки изменений эпителиальных клеток в процессе злокачественного перерождения может служить изучение ядрышкообразующих регионов (ЯОР) хромосом [5–9].

Кроме того, исследование цитоморфологических и электронно-микроскопических показателей структур легочной паренхимы при РЛ позволит на клеточном и субклеточном уровнях проследить возможный процесс малигнизации АЭ с учетом теории R.A. Willis об «опухолевом поле» [10, 11].

Цель работы — изучить цитологические, цитогенетические и ультраструктурные особенности АЭ и возможность его малигнизации при железистом РЛ (ЖРЛ).

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследованы цитологические препараты, полученные путем соскобов с перитуморальной зоны (ПТЗ) ЖРЛ — участка ткани легкого на расстоянии от края видимой границы опухоли до 2 см к периферии от нее. При этом соскобы с ПТЗ проводили по направлению к опухоли, не доходя до нее, с тем, чтобы исключить механическое попадание опухолевых клеток в исследуемую зону. Всего изучали цитограммы с ПТЗ у 23 больных, которым не проводили предоперационную противоопухолевую терапию. Из них у 16 пациентов исследованы также цитологические препараты наиболее отдаленной от ЖРЛ зоны (НОЗ) операционного материала — участка ткани легкого на расстоянии от 5 до 10 см и более от края видимой границы опухоли в зависимости от объема оперативного вмешательства (лобэктомия или пульмонэктомия). Все случаи ЖРЛ верифицированы гистологическим методом согласно международной гистологической классификации [12].

Больные были в возрасте от 44 до 73 лет, средний возраст составил $61,26 \pm 1,74$ года. Преобладали мужчины (73,9%). В большинстве случаев наблюдали периферическую форму ЖРЛ (73,9%).

Проводили цитологическое исследование препаратов, окрашенных по методам Паппенгейма и Папаниколау, на микроскопе OLYMPUS—CX 41 при увеличении $\times 100$; $\times 200$; $\times 400$; $\times 1000$.

Для выявления ЯОР хромосом использовали метод окрашивания серебром по W. Howell, D. Black [13]. Морфофункциональные типы ядрышек (Яд) изучали согласно классификации П.В. Челидзе, О.В. Зацепиной (1988) [14] и предложенной нами рабочей схеме [15] при 1000-кратном увеличении.

При цитогенетическом исследовании определено общее количество Яд на одно ядро и процентное содержание основных типов Яд: компактных, нуклеолонемных, кольцевидных и микроядрышек. Также установлены показатели собственно нуклеолонемных и переходных нуклеолонемно-компактных форм Яд. В каждом случае изучалось по 30–100 ядер клеток АЭ. Всего исследовано 5773 Яд в 2200 ядрах клеток пролиферирующего АЭ в ПТЗ у 23 больных, 2422 Яд в 790 ядрах клеток АЭ с признаками выраженной пролиферации и некоторой атипии в ПТЗ у 15 больных и 2632 Яд в 1600 ядрах клеток АЭ, которые получены при соскобе в НОЗ у 16 больных при ЖРЛ.

Электронно-микроскопические исследования проведены на операционном материале 14 больных ЖРЛ. Для электронной микроскопии операционный материал брали не позже 1 ч после удаления опухоли, как правило, из двух участков: из визуально определяемой краевой зоны опухоли (без видимых некрозов) и ПТЗ. Образцы опухолевой ткани и ПТЗ легкого измельчали до размеров 1 мм³ и немедленно фиксировали в 2,0% растворе глутарового альдегида в 0,1 М фосфатном буфере Серенсена в течение 1,5 ч при температуре 4 °С на встряхивателе. Затем ткань промывали в том же буфере в течение 20 ч и дофиксировали 2,0% раствором четырехоксида осмия (OsO₄) в том же буфере в течение 1,5 ч при температуре 4 °С с последующим обезвоживанием в спиртах восходящей концентрации (70°–96°–100°) и абсолютном ацетоне. Заклачивали ткань в смесь эпоксидных смол «Эпон» по методике Лафта. С эпоксидных блоков делали ультратонкие срезы до 500 А толщиной и контрастировали их уранил-ацетатом по Лафту и цитратом свинца по Рейнольдсу. Препараты изучали в электронном микроскопе JEM–100В (Япония) при ускоряющем напряжении 60 кВ.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента, уровень вероятности $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении цитологических препаратов ПТЗ при ЖРЛ в большинстве случаев определяли клетки пролиферирующего АЭ и опухолевые элементы в различных соотношениях (рис. 1), в среднем 51,48 ± 6,00 и 48,52 ± 6,00% соответственно (табл. 1).

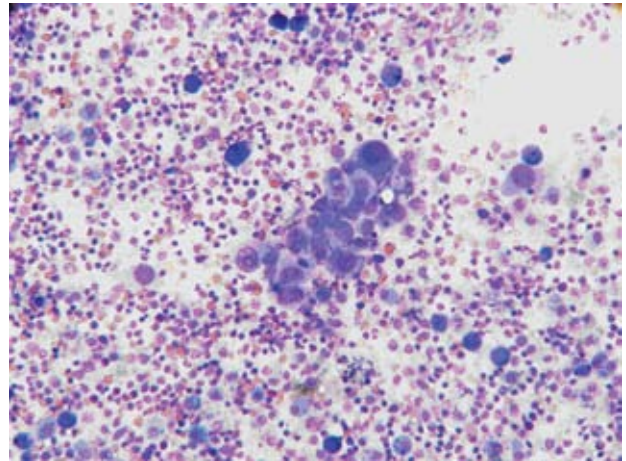


Рис. 1. Комплекс опухолевых клеток среди лимфоцитов и клеток АЭ с признаками пролиферации и дистрофическими изменениями. ПТЗ операционного материала при ЖРЛ. Цитологический препарат. Окраска по Папленгейму, х 200

Отмечено преобладание опухолевых клеток (более 90% клеточного состава) в 6 наблюдениях при макроскопически неизменной ПТЗ. В 3 случаях опухолевые клетки в ПТЗ при ЖРЛ отсутствовали. Среди пролиферирующего АЭ выявлялись в небольшом количестве клеточные элементы с признаками выраженной пролиферации и некоторой атипии — 8,04 ± 1,26% (см. табл. 1). При этом в них наблюдали укрупнение размеров клеток и ядер, неравномерную структуру хроматина, гиперхроматоз и неровный контур ядра, утолщение ядерной оболочки, увеличение количества и размера Яд.

Таблица 1
Основной клеточный состав цитогрaмм соскобов различных участков ткани легкого при ЖРЛ

Основные клеточные элементы	ПТЗ	НОЗ
Клетки пролиферирующего АЭ (%), в том числе	51,48 ± 6,00 ¹	91,38 ± 2,59 ²
клетки АЭ с признаками выраженной пролиферации и некоторой атипии (%)	8,04 ± 1,26	8,69 ± 1,33
Опухолевые клетки (%)	48,52 ± 6,00 ¹	8,62 ± 2,59

$p < 0,05$: ¹по сравнению с НОЗ; ²по сравнению с % опухолевых клеток.

В то же время в цитологических препаратах НОЗ определяли преимущественно клетки АЭ с признаками пролиферации (91,38 ± 2,59%), в некоторых из них также отмечены явления атипии (8,69 ± 1,33%), при этом в 5 случаях выявлены опухолевые элементы (8,62 ± 2,59%).

При цитогенетическом исследовании клеток АЭ с признаками выраженной пролиферации и некоторой

Таблица 2

Морфофункциональные типы Яд в клетках АЭ при ЖРЛ

Морфофункциональные типы Яд	ПТЗ		НОЗ
	АЭ		
	с признаками выраженной пролиферации и явлениями некоторой атипии (n = 15)	с признаками пролиферации (n = 23)	с признаками некоторой пролиферации (n = 16)
	Группа 1	Группа 2	Группа 3
Компактные, %	4,52 ± 1,02 ^{1,2}	1,51 ± 0,34 ¹	1,59 ± 0,32 ^{1,2}
Нуклеолонемные, %	39,75 ± 2,52	34,91 ± 2,00	42,13 ± 3,31
Из них:			
собственно нуклеолонемные, %	2,21 ± 0,50	3,79 ± 1,59	7,27 ± 1,73
переходные нуклеолонемно-компактные, %	37,54 ± 2,46	31,12 ± 2,18	34,86 ± 3,01
Кольцевидные, %	15,13 ± 1,58 ^{1,2}	21,12 ± 1,13 ^{1,2}	24,48 ± 1,43 ^{1,2}
Микроядрышки, %	40,60 ± 2,43 ²	42,46 ± 1,81 ^{1,2}	31,80 ± 2,17 ²
Всего Яд в 1 ядре, n	3,15 ± 0,11	2,75 ± 0,12	1,65 ± 0,06

$p < 0,05$ по сравнению с частотой выявления: ¹нуклеолонемных Яд, ²собственно нуклеолонемных Яд.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

атипии в ПТЗ при ЖРЛ (табл. 2, рис. 2 и 3) выявлено статистически достоверное ($p < 0,05$) увеличение в них общего количества Яд в одном ядре (от $2,75 \pm 0,12$ до $3,15 \pm 0,11$) и наиболее морфофункционально активных компактных их форм (от $1,51 \pm 0,34$ до $4,52 \pm 1,02\%$), а также уменьшение количества неактивных кольцевидных Яд (от $21,12 \pm 1,13$ до $15,13 \pm 1,58\%$) по сравнению с клетками АЭ с признаками пролиферации.

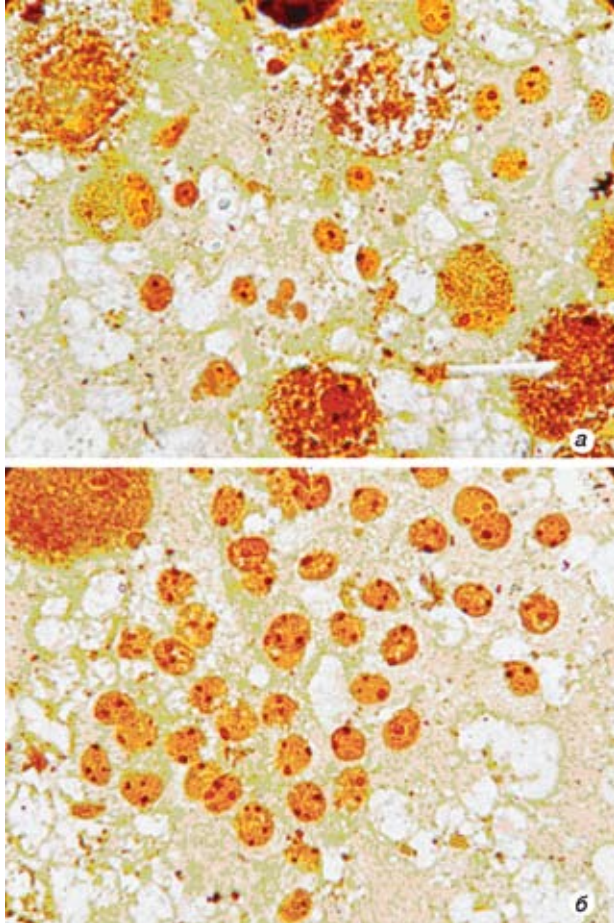


Рис. 2. Основные морфофункциональные типы Яд в клетках АЭ: а) с признаками пролиферации, б) с признаками пролиферации и некоторой атипии. ПТЗ операционного материала при ЖРЛ. Цитологический препарат. Окраска по методу W. Howell, D. Black, x 1000

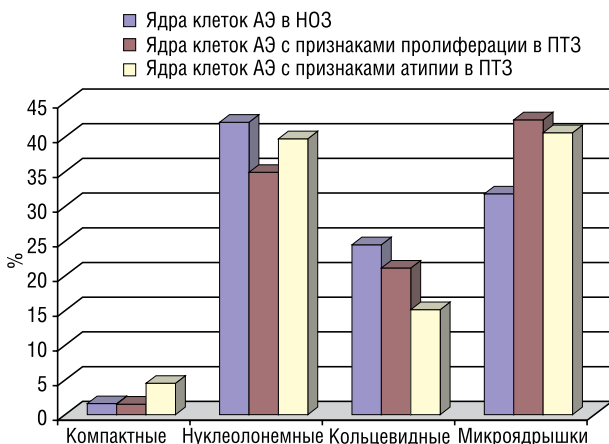


Рис. 3. Основные морфофункциональные типы Яд в клетках АЭ перитуморальной и наиболее отдаленной зон при ЖРЛ

Клетки АЭ в НОЗ при ЖРЛ характеризовались более низкими ($p < 0,05$) показателями общего количества Яд в ядре ($1,65 \pm 0,06$) и микродрышек ($31,80 \pm 2,17\%$); а также большими ($p > 0,05$) значениями собственно нуклеолонемных ($7,27 \pm 1,73\%$) и кольцевидных ($24,48 \pm 1,43\%$) форм Яд, чем пролиферирующий АЭ в ПТЗ (см. табл. 2; рис. 3, 4).

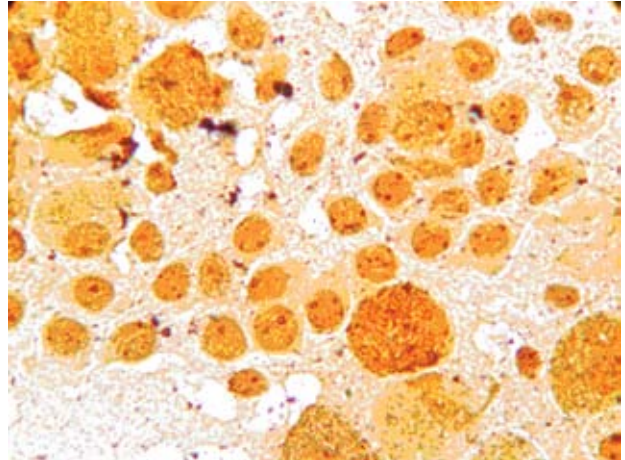


Рис. 4. Основные морфофункциональные типы Яд в клетках АЭ. НОЗ операционного материала при ЖРЛ. Цитологический препарат. Окраска по методу W. Howell, D. Black, x 1000

При этом уровень компактных Яд в клетках АЭ в НОЗ почти такой же, как и в пролиферирующем АЭ в ПТЗ при ЖРЛ (соответственно $1,59 \pm 0,32$ и $1,51 \pm 0,34\%$).

При электронно-микроскопическом (ЭМ) исследовании ткани ПТЗ при ЖРЛ выявлены различные изменения. Основные из них — инвазия клеток опухоли в виде отдельных атипических элементов и реже — в виде их сплошных пластов в ПТЗ (рис. 5).

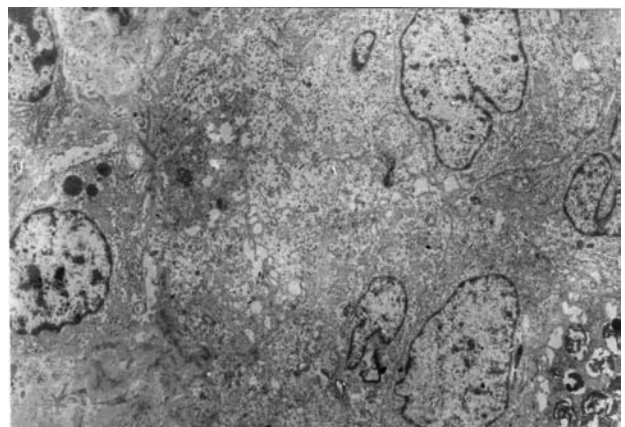


Рис. 5. Инвазия перитуморальной ткани пластом атипических эпителиальных клеток. ПТЗ умереннодифференцированной аденокарциномы легкого. Электронная микрофотограмма. x 6500

Такая инвазия наблюдалась в большинстве случаев при ЖРЛ, независимо от уровня его дифференцировки. Однако в некоторых случаях эпителиальные элементы ПТЗ определялись с выраженными признаками пролиферации и атипии (рис. 6) неза-

висимо от основной зоны опухолевого роста (как проявление «опухолевого поля» (?)).

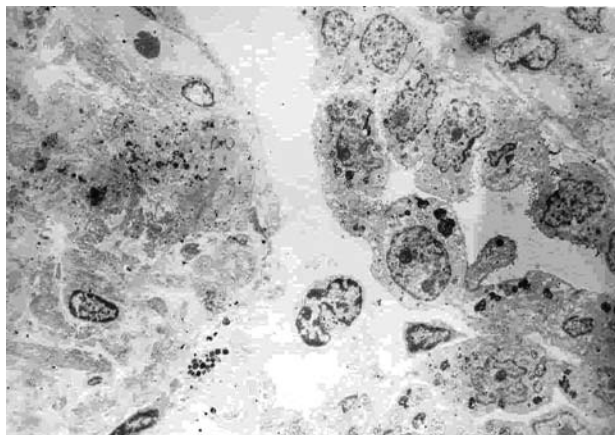


Рис. 6. Поэтапная пролиферация стволовых клеток (пневмоцитов I типа (?)) с дифференцировкой их в атипичные пневмоциты II типа в просвете альвеолы. ПТЗ низкодифференцированной аденокарциномы легкого. Электронная микрофотограмма. $\times 2500$

При наличии таких зон пролиферации и атипичии на больших расстояниях от основного очага принято говорить о множественных очагах малигнизации или о мультифокальном росте ЖРЛ или же о ближайшем метастазировании в периферических отделах легкого. О том, что это не метастазы примордиальной опухоли, может свидетельствовать сохранение связи пролифератов (например пневмоцитов II типа), даже при нарастающей атипичии составляющих их клеток, с базальными мембранами альвеол (рис. 7).

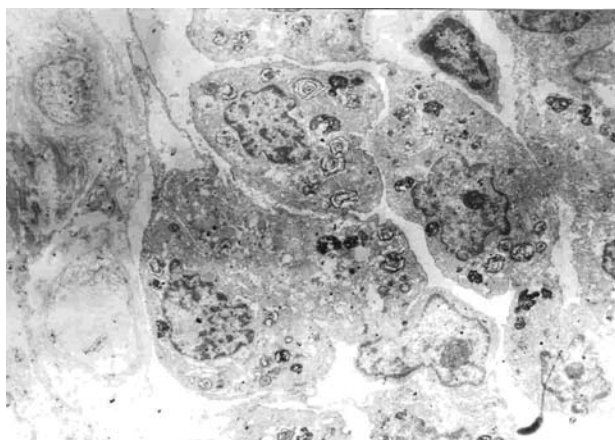


Рис. 7. Группа атипичных пневмоцитов II типа в просвете альвеолы, местами сохраняющих контакт с аэрогематическим барьером. ПТЗ низкодифференцированной аденокарциномы легкого. Электронная микрофотограмма. $\times 5500$

АЭ в ПТЗ при ЖРЛ характеризовался различными ультраструктурными признаками атипичии: значительные искажения формы пневмоцитов I типа, а также различные деформации миелиновых телец, их запустения и отклонения в продукции деградированного сурфактанта в просветы альвеол (в виде «нереализованного сурфактанта»). Типичным явлением в ПТЗ являлось

утолщение межальвеолярных перегородок аэрогематического барьера за счет утолщения базальных мембран капилляров и альвеол, фибриноза и склероза межучточной ткани, а также дистрофия и отслойка пневмоцитов I и II типов с «оголением» больших участков внутренней поверхности альвеол.

Результаты цитологического, цитогенетического и ЭМ-исследований ПТЗ при ЖРЛ демонстрируют частое распространение опухолевых клеток за границы визуально определяемой зоны роста опухоли. При этом в клеточных элементах АЭ отмечаются реактивные изменения, выражающиеся в высокой степени пролиферации и явлениями атипичии части из них. Клетки увеличиваются в размерах, значительно укрупняются ядра, нарушается структура хроматина, утолщается ядерная оболочка, увеличивается количество и размер Яд. Выявление большого количества опухолевых клеток в ПТЗ и отдельных их групп в НОЗ свидетельствует о нарастании атипичии, о возможной малигнизации АЭ как рядом с опухолью, так и на расстоянии от нее. Выявленные цитоморфологические признаки пролиферации клеток АЭ в ПТЗ подтверждаются наличием наиболее морфофункционально активных компактных форм Яд ($1,51 \pm 0,34\%$). В то же время в клетках АЭ с явлениями атипичии в ПТЗ при ЖРЛ наблюдается рост этого показателя до $4,52 \pm 1,02\%$, а также увеличение общего количества Яд при сравнении с пролиферирующим АЭ, что свидетельствует об усиленной активации ЯОР хромосом и возможной злокачественной трансформации АЭ. Это также подтверждается ЭМ-исследованием, которое, кроме упомянутого, констатирует нарастание атипичии в АЭ — в пневмоцитах I и II типов, растущих на месте, то есть неразрывных с базальной мембраной как в ПТЗ, так и в НОЗ ЖРЛ. Таким образом, проведенные цитоморфологические, цитогенетические и ультраструктурные исследования подтверждают теорию «опухолевого поля» Р.А. Willis и обосновывают выводы о мультифокальном росте периферического ЖРЛ и об альвеологенном источнике его развития.

ЛИТЕРАТУРА

1. Болгова ЛС. О гистогенезе рака легкого. Онкология 1999; 1 (3): 195–8.
2. Kim CF, Jakson EI, Wolfenden AE, et al. Идентификация бронхоальвеолярных стволовых клеток в норме и при раковой опухоли. Cell 2005; 6: 823–35.
3. Tomida Shuta, Yatabe Yasushi, Yanagisawa Kiyoshi, et al. Throwing new light on lung cancer pathogenesis: Update on three recent topics. Cancer Sci 2005; 96 (2): 63–8.
4. Романова ЛК. Регуляция восстановительных процессов. Москва: Изд-во Московского ун-та, 1984. 174 с.
5. Tere D. AgNOR staining and quantification. Micron 2000; 31 (2): 127–31.
6. Болгова ЛС, Лобода ВИ, Туганова ТН. Ядрышковые организаторы в процессе малигнизации бронхиального эпителия. Цитол генет 1998; 32 (1): 79–82.

7. Abe S, Ogura S, Kunikane H, *et al.* Nucleolar organizer regions in precancerous and cancerous lesions of the bronchus. *Cancer* 1991; **67** (2): 472–5.

8. Usuda K, Saito Y, Okaniwa G, *et al.* Assessment of nucleolar organizer regions (Ag-NORs) in bronchial dysplasia and roentgenographically occult bronchogenic squamous cell carcinoma. *Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi* 1995; **43** (6): 836–40.

9. Галахин КА, Лобода ВИ, Логинова ЕА. Значение активности ядрышковых организаторов в диагностике предраковых изменений бронхиального эпителия. В: Матеріали ІІІ наук-практ конф «Проблеми онкогенетики: наукові та прикладні аспекти». *Онкологія* 2002; **4** (Suppl): 11–2.

10. Райхлин НТ, Филиппова НА, Смирнова ЕА, Давид Г. Опухоли трахеи, бронхов, легких и плевры. В: Ультраструктура опухолей человека. Москва: Медицина, 1981: 92–113.

11. Willis RA. *Pathology of tumors*. London: Butterwoeth, 1953.

12. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, Harris CC (Eds.). *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. Lyon: IARC Press, 2004. 344 p.

13. Howell WM, Black DA. Controlled silver staining of nucleolar regions with protective colloidal developer: a one step method. *Experientia* 1980; **36**: 1014–5.

14. Челидзе ПВ, Зацепина ОВ. Морфофункциональная классификация ядрышек. *Усп совр биол* 1988; **105** (2): 252–68.

15. Туганова ТН, Болгова ЛС, Махортова МГ, Алексеенко ОИ. Диагностический алгоритм цитологического исследования фиброаденом и рака молочной железы. *Онкология* 2007; **9** (4): 315–20.

CYTOLOGIC, CYTOGENETIC AND ULTRASTRUCTURAL RESEARCHES BY STUDY HISTOGENESIS OF ADENOCARCINOMA OF LUNG

L.S. Bolgova, T.N. Tuganova, O.I. Aleksyeyenko, L.A. Zotikov, M.S. Krotevich

Summary. *Results of cytomorphologic, cytogenetic and electronic microscopical researches shown the presence cells of tumour among alveolar epithelium with high proliferative activity in various visual immutable parts of lung in adenocarcinoma. Activation nucleolus organized regions of chromosome in cells of alveolar epithelium with signs of pronounced proliferation and some atypia in peritumoural zone have been established. It was developed in increase the common number of nucleoli and the number most morphofunctionality active compact their forms in these cells in comparison with proliferative alveolar epithelium, that confirmes possibility of malignant regeneration of alveolar epithelium of lung in adenocarcinoma.*

Key Words: alveolar epithelium, adenocarcinoma of lung, histogenesis, cytologic, cytogenetic and ultrastructural researches.

Адрес для переписки:

Алексеенко О.И.

03022, Киев, ул. Ломоносова, 33/43

ГУ «Национальный институт рака»