

В.В. Жарков, П.И. Моисеев, Е.И. Юневич, В.П. Курчин

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ МЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

Определены основные диагностические параметры мелкоклеточного рака легкого при световой микроскопии: характер распределения хроматина в ядре, ядерно-цитоплазматический индекс, высокая митотическая активность и наличие розеткоподобных структур. Установлена прогностическая значимость по показателю 5-летней выживаемости объема некроза в опухоли, характера распределения хроматина и гистологических типов мелкоклеточного рака легкого. Определен минимальный набор иммуногистохимических маркеров: CD 56, SYN, CGA, CK 34 E12, CAM 5.2, LSA.

Ключевые слова: мелкоклеточный рак легкого, световая микроскопия, иммуногистохимия.

V. Zharkov, P. Moiseev, E. Yunevich, V. Kurchin. THE PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF SOME HISTOLOGICAL PARAMETERS OF SMALL CELL LUNG CANCER

The basic diagnostic parameters of small cell lung cancer in light microscopy were determined: the pattern of chromatin distribution in the nucleus, nuclear/cytoplasmic ratio, high mitotic activity and the presence of rosette-like structures. The prognostic significance of the tumor necrosis volume, the pattern of chromatin distribution and histological types of small cell lung cancer was established for 5-year survival rate. A minimal set of tumor markers was ascertained: CD 56, SYN, CGA, CK 34 E12, CAM 5.2, LSA.

Key words: small cell lung cancer, light microscopy, immunohistochemistry.

ВВЕДЕНИЕ

Мелкоклеточный рак легкого (МКРЛ) относится к категории наиболее агрессивных опухолей и по данным литературы составляет 20-25% в структуре злокачественных новообразований легкого [6]. Отличительными чертами данного типа карциномы являются: скрытое течение, короткий анамнез, быстрое развитие болезни, раннее метастазирование и плохой прогноз. Первые попытки выделения МКРЛ, как нозологической формы патологического процесса, были предприняты еще в 1926 г. Barnard [2]. Гистологическое описание опухоли обозначило МКРЛ как самостоятельную нозологию, а не вариант медиастинальной саркомы, к которому его ошибочно относили ранее. Это подтвердили и дальнейшие работы Azzopardi, Liebow, Ackeman [1, 11], в том числе комплексные научные исследования в определении гистогенеза МКРЛ с использованием электронной микроскопии, обнаружив неоднородность клеточной популяции опухоли, различную направленность дифференцировки клеточных элементов. С учетом этих данных МКРЛ

рассматривают как высоко злокачественную эпителиальную опухоль, происходящую из недифференцированных полипотентных камбиальных клеток базальных слоев эпителия бронхов.

Одним из спорных вопросов в диагностике МКРЛ является его гистологическая классификация. За время существования она неоднократно изменялась, но споры по этому поводу продолжаются [8]. В 1962 г. комиссия ВОЗ под председательством Kreyberg выделила два типа МКРЛ: овсяноклеточный и полигонально-клеточный, отличающийся более крупными ядрами. Этот вариант классификации считался предварительным, так как не были разработаны четкие морфологические критерии диагностики. Первая официальная классификация МКРЛ была опубликована ВОЗ в 1967 году. Она базировалась на морфологических описаниях, сделанных Barnard и включала четыре типа: лимфоцитоподобный, полигонально-клеточный, веретенчатый и другие [7]. При этом основным критерием считалась форма ядра, а в категорию «другие» отнесли типы МКРЛ, содержащие дополнительные плоскоклеточные и железистые фокусы. Однако эта классификация оказалась достаточно трудной для использования патологами, и к тому же была неясна роль выделения различных типов. Поэтому в 1981 г. ВОЗ модифицировала ранее предложенную классификацию МКРЛ, объединив в одну группу полигональный и веретенчатый типы, обозначив ее как промежуточно-клеточный тип (или МКРЛ из клеток промежуточного типа). Позднее, в 1988 г. Международная Ассоциация по изучению рака легкого (IASLC) предложила разделить МКРЛ на три категории: 1) мелко-клеточный рак, 2) смешанный мелко-/крупноклеточный рак, 3) комбинированный мелко-клеточный рак, в котором имеются компоненты плоскоклеточного и/или аденокарциномы (табл.1) [9].

Таблица 1 Классификации МКРЛ

Kreyberg (1962 г.)	ВОЗ (1967 г.)	ВОЗ (1981 г.)	IASLC (1988 г.)
Овсяноклеточный	Лимфоцитоподобный	Овсяноклеточный	Мелкоклеточный рак
Полигональный	Полигональный и веретенчатый	Промежуточный	Смешанный мелко-/крупноклеточный
	Другие	Комбинированный овсяноклеточный	Комбинированный мелко-клеточный

Выделение типов обусловлено не только их морфологическими особенностями, но и мнением ряда исследователей об их влиянии на результаты лечения [8].

Целью настоящего исследования явилось определение прогностической значимости некоторых морфологических признаков и типов МКРЛ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом исследования послужили гистологические препараты 86 больных МКРЛ, радикально оперированных в ГУ «НИИО и МР им. Александра» в период 1996 по 2000 г. Подразделение на типы осуществлено в соответствии с классификацией ВОЗ (1981 г.) Промежуточный тип МКРЛ установлен у 25 больных (29,1%), овсяноклеточный – у 49 (57,0%), комбинированный – у 5 (5,8%), немелкоклеточный рак – у 7 (8,1%). Учитывались следующие

морфологические критерии при стандартной окраске гематоксилин-эозином: форма ядра; ядерно-цитоплазматическое соотношение; характер распределения хроматина, визуализация ядрышка; объем некроза в опухоли; наличие розеткоподобных структур: (-) – отсутствуют; (+) – единичные в одном поле зрения (x20); (++) – не менее 2 в 1 поле зрения (x10) и (+++) – более 2 розеток в 1 поле зрения (x10), а также лимфоцитарная инфильтрация в строме опухоли.

Иммуногистохимическое исследование проведено у 27 пациентов (промежуточный тип – 8, овсяноклеточный – 13, эпидермоидный – 5, крупноклеточный – 1).

Для иммуногистохимии депарафинированные и дегидратированные срезы обрабатывали 3% раствором H₂O₂ в метаноле для инактивации эндогенной пероксидазы. Для восстановления антигенной специфичности и увеличения антигенных свойств белка применяли технологию микроволновой предобработки срезов 0,01М цитратном буфере pH 6,0 и протеолитическую предобработку 0,1% трипсином в TBS-CaCl₂ буфере. Срезы инкубировали с моноклональными и поликлональными антителами Neuron-Specific Enolase (NSE; 1:50; DAKO), Synaptophysin (SYN, 1:50, DAKO), Chomogranin A (CGA; 1; 50; DAKO), Epithelial Antigen (EMA; 1:50; DAKO), Cytokeratin (CK MNF 116; 1:50; DAKO), KI-67 Antigen (KI-67; 1:50; DAKO), Anti PGP 9,5 (PGP; 1:50; DAKO), Neural Cell Adhesion Molecule NCAM (CD 56; 1:50 MONOSAN), Cytokeratin High Molecule Weight (CK 34 ?E 12; 1:50; DAKO) в течение 1 часа во влажной камере при комнатной температуре. Для выявления иммунного окрашивания использовали стандартный метод Streптавидин-биотин пероксидазный комплекс (Strept ABC/HRP Kit; DAKO) с

3.3 diaminobenzidine- tetrahydrochloride (DAB; DAKO) в качестве хромогена. Ядра докрашивали гематоксилином Harris's (Sigma). Результаты иммуногистохимической реакции оценивали по наличию специфического продукта: желтовато-коричневого окрашивания ядра, цитоплазмы и цитоплазматической мембраны: (-) – нет специфической окраски; (+/-) – 1-2 клетки позитивно окрашены; (+) – 1-10% позитивно окрашенных клеток; (++) – 10-50% позитивно окрашенных клеток; (+++) – >50% позитивных клеток. Пролиферативную активность опухоли определяли как процент Ki-67-окрашенных клеток к общему их количеству.

Оценка прогностической значимости различных вариантов МКРЛ по их влиянию на показатель 5-летней выживаемости после комбинированного лечения проводился по методам таблиц дожития и методом Kaplan-Meier [5], а сравнение выживаемости в различных группах - по методу Wilcoxon в модификации Gehan и с использованием log-rank теста [3,4].

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Гистологическая характеристика типов МКРЛ.

Овсяноклеточный тип. Диаметр клеток в 1,5-2 раза больше диаметра лимфоцита. Ядра округлые, овальные или чуть веретено подобные, как бы заостренные с концов, с мелко диффузным зернистым хроматином. Ядрышки не видны или очень маленькие и не выделяются. Цитоплазма скудная, видна в виде узкого слабо контурируемого ободка, что создавало впечатление так называемых «голых ядер». Высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение

наблюдалось в 88,2% и было достоверно выше, чем при промежуточном типе - 8% ($P < 0,001$). Почти всегда наблюдались розеточные структуры. Степень выраженности розеткоподобных структур колебалась от (+/-) и (+) в 74% случаев до (++) и выше - в 26%. Для МКРЛ всегда характерна высокая митотическая активность. При помощи маркера пролиферации белка Ki-67, синтез которого начинается в G-фазе и увеличивается в S и G2-фазах клеточного цикла выявлена высокая пролиферативная активность - 80%. В нашем исследовании в 86,6% фигуры митоза преобладали над апоптозом. Характерен обширный некроз, который более чем в половине случаев превышал 50% объема опухоли. Содержание стромальных элементов скудное. Тонкая фиброваскулярная строма разделяет по периферии опухоли группы клеток в виде пластов, тяжей, гнезд, волокнистых структур. Лимфоплазмочитарная инфильтрация отсутствует либо слабо выражена в периферических отделах опухоли.

Промежуточный тип содержит субпопуляцию крупных клеток, основным признаком которых является наличие в ядре эозинофильного ядрышка. По нашим наблюдениям ядрышки определялись в 44 % случаев ($p < 0,0001$ по сравнению с овсяноклеточным). Ядра клеток округлые, полигональные с мелкозернистым хроматином, рисунок которого может быть четким или стертым. Цитоплазма умеренная, более выражена, чем при овсяноклеточном типе. Степень выраженности розеткоподобных структур колебалась от (+/-) и (+) в 84% случаев до (++) и выше - в 16%, достоверно не отличаясь от овсяноклеточного типа. Также была характерна высокая митотическая активность (в 91,3%), однако объем некроза более 50% наблюдался лишь в 24% случаев ($P < 0,02$). Стромальный компонент более выражен для данного типа, с наличием лимфоплазмочитарной инфильтрации.

Комбинированный тип - сочетание овсяноклеточного типа с компонентом плоскоклеточного рака или аденокарциномы. Следует учитывать, что плоскоклеточный или аденогенный компонент составляет обычно не более 5%.

2. Иммуногистохимическое исследование.

Иммуногистохимическому исследованию в диагностике опухолей легких принадлежит важная роль. Использование специфичных нейроэндокринных маркеров в дифференциальной диагностике МКРЛ значительно повышает качество специальной терапии.

При иммуногистохимическом исследовании все клеточные элементы МКРЛ имели положительную реакцию к нейроэндокринным маркерам: Neuron-specific enolase (NSE), synaptophysin (SYN), Chromogranin A (CGA) с числом позитивно окрашенных клеток не менее 10%. Реакция (++++) при применении CGA отмечалась только при овсяноклеточном типе ($P < 0,01$), а при использовании SYN эта реакция встречалась в 3 раза чаще, чем при промежуточном типе. По нашим результатам и данным литературы, наиболее специфичным маркером является CGA, а более чувствительным - SYN. Однако эти маркеры требуют высокого качества исследуемого материала [10].

При интерпретации результатов реакции с NSE необходимо учитывать, что, несмотря на положительную реакцию в 100% клеточных элементов мелкоклеточного рака, другие типы карцином могут также иметь позитивные

реакцию к этому маркеру. Поэтому, при дифференциальной диагностике МКРЛ с мелкоклеточным типом низкодифференцированной плоскоклеточной карциномы дополнительно использовали цитokerатины. Клетки плоскоклеточного рака всегда имели позитивную реакцию к высокомолекулярному цитокератину СК 34?E12 и негативную – к низкомолекулярному цитокератину САМ 5,2. В противоположность, элементы МКРЛ имели положительную реакцию к низкомолекулярному цитокератину и частично позитивную реакцию с РАН СК и ЕМА. Дифференциальная диагностика МКРЛ с типичными и атипичными карциноидными опухолями, как правило, не вызывала трудностей и основывалась на микроскопии участков опухоли, низкой степени злокачественности (митотический индекс значительно ниже, чем в мелкоклеточном раке) и негативной реакции клеточных элементов карциноида с ЕМА. Основываясь на критериях световой микроскопии, проводилась дифференциальная диагностика между МКРЛ и крупноклеточной нейроэндокринной карциномой, так как обе эти опухоли имеют схожий иммунофенотип. Особое место в диагностике мелкоклеточного рака легкого уделялось использованию CD 56, который обладает высоким индексом чувствительности. Во всех случаях МКРЛ мы наблюдали 100% экспрессию CD 56, даже при «краш»- симптоме. Следует отметить, что число позитивно окрашенных клеток с CD 56 при различных типах мелкоклеточного рака достоверно не различалось. Однако необходимо помнить, что CD 56 экспрессируется также и клетками неходжкинской лимфомы (NK-like T cells). Поэтому в панель антител для дифференциальной диагностики с лимфомой следует включать общий лейкоцитарный антиген (LSA).

На основании полученных результатов, предлагаемая нами минимальная диагностическая панель МКРЛ должна быть представлена следующими иммуногистохимическими маркерами: CD 56, как сохраняющего высокую экспрессию антигена даже в поврежденных опухолевых клетках; SYN и CGA, которые могут быть использованы в дифференциальной диагностике типов МКРЛ, проявляя наиболее высокую экспрессию при овсяноклеточном типе, высокомолекулярный цитокератин СК 34?E12 для дифференциальной диагностики низкодифференцированного плоскоклеточного рака и МКРЛ, LSA для исключения неходжкинской лимфомы и низкомолекулярный цитокератин САМ 5,2, специфичный для нейроэндокринной карциномы.

3. Прогностическая значимость основных диагностических критериев.

Прогностическая значимость основных параметров световой микроскопии, включая гистологические подтипы, изучалась по их влиянию на показатель 5-летней выживаемости радикально оперированных больных МКРЛ.

Среди изученных морфологических признаков была установлено влияние на 5-летнюю выживаемость объема некроза в опухоли: менее 50% - выживаемость составила 49,2%, более 50% - только 29,3% ($P < 0,05$). В зависимости от характера распределения хроматина показатели выживаемости также достоверно различались: 33,7% и 78,4% (табл.2). Другие морфологические критерии не имели прогностического значения.

В результате изучения влияния типов МКРЛ на выживаемость установлено, что наиболее неблагоприятным по данному критерию является овсяноклеточный

тип, при котором 5-летняя выживаемость составила 24,9 % в отличие от комбинированного – 49,3 % ($P < 0,02$). Промежуточный тип с 5-летней выживаемостью 33,9% занимает среднее положение между двумя другими типами.

Таблица 2 5-летняя выживаемость больных МКРЛ в зависимости от морфологических характеристик опухоли

Показатели	кол-во больных	5-летняя выживаемость, %	P-значение
Лимфоцитарная инфильтрация выражена / невыражена	56 / 17	45,0 / 29,7	P= 0,4
Гистiocитарная инфильтрация есть / нет	36 / 37	43,2 / 40,5	P= 0,8
<i>Объем некроза в опухоли до 50% / более 50%</i>	<i>46 / 31</i>	<i>49,2 / 29,3</i>	<i><u>P < 0,05</u></i>
Розеткоподобные структуры (+/-) в (+) / (++) и (+++)	61 / 16	38,9 / 44,7	P= 0,5
<i>Хроматин диффузно-зернистый / ядрышко</i>	<i>64 / 11</i>	<i>33,7 / 78,4</i>	<i><u>P < 0,05</u></i>
Митоз > Апоптоз	33 / 38	23,2 / 46,9	P= 0,8
Ядерно-цитоплазматическое соотношение Больше / Меньше	29 / 47	55,5 / 32,6	P= 0,2

ВЫВОДЫ

1. Основными диагностическими параметрами МКРЛ при световой микроскопии являются: форма ядра, характер распределения хроматина в ядре, ядерно-цитоплазматическое соотношении, митотическая активность и наличие розеткоподобных структур.
2. Установлена связь показателя 5-летней выживаемости с объемом некроза в опухоли и характером распределения хроматина.
3. Выделение типов МКРЛ имеет прогностическое значение: 5-летняя выживаемость при овсяноклеточном и комбинированном типах составляет 24,9% и 49,3% соответственно ($P < 0,02$), при промежуточном - 33,9%.
4. Обнаружение специфических иммуногистохимических маркеров является самым точным способом определения гистогенетической принадлежности опухоли, что имеет значение в разработке протоколов комбинированного лечения, систематизации и оценке прогностических факторов.
5. Диагностическая панель, включающая минимальное количество иммуногистохимических маркеров (CD 56, SYN, CGA, CK 34?E12, CAM 5,2 и LSA), является достаточной для диагностики МКРЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Azzopardi J.G. Oat-cell carcinoma of the bronchus // J. Pathol. Bactenol.- 1959.- Vol. 78.- P. 513-519.
2. Carter D. Small cell lung carcinoma of the lung // The American Journal of Surgical Pathology. – 1983. – Vol. 7. – P. 787-794.

3. Gehan E.A. A generalized Wilcoxon's test for comparing arbitrarily singly-censored samples // *Biometrika*.- 1965.-Vol. 52.-P. 203-223.
4. Gehan EA. Estimating survival functions from life table // *J. Chronic. Dis.*- 1969.- Vol. 21.- P. 629-644.
5. Kaplan E.L., Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations // *J. Amer. Stat. Ass.*- 1958.- Vol. 53.- P. 457-481.
6. Landis S.H., Murray T., Bolden S., Wingo P.A. Cancer statistics // *CA Cancer J. Clin.*- 1999.-Vol. 49.- P. 8-31.
7. Matthews M.J. Morphologic classification of bronchogenic carcinomas // *Cancer Chemother. Rep.*- 1973.- Vol. 3.- P. 229–302.
8. McCue P.A., Finkel G.C. Small-cell lung carcinoma: an evolving histopathological spectrum // *Semin. Oncol.*- 1993.- Vol. 20.- P. 153-62.
9. Thomas V. Colby, Michael N. Koss, William D. Travis. Tumors of the Lower Respiratory Tract // *Atlas of Tumor Pathology*, 1995.
10. Kaufmann O., Georgi Th., Dieter M. Utility of 123C3 Monoclonal Antibody Against CD56 (NCAM) for the Diagnosis of Small Cell Carcinomas on Paraffin Sections. // *Human Pathology*-1997.- Vol. 28.- № 12.
11. Shimosato Yu., NakajimaT., Hirohashi S. et al. Biological, pathological and clinical features of small cell lung cancer // *Cancer letters*, 1986.- P. 241-258.