

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ И РЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ХАРАКТЕРА ДИСРЕГЕНЕРАТОРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЭПИТЕЛИИ БРОНХОВ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО

О.В. Панкова¹, В.М. Перельмутер^{1,2}, О.В. Савенкова¹

*НИИ онкологии СО РАМН, г. Томск¹
Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск²
634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, e-mail: pvm@ngs.ru¹*

У 49 больных, оперированных по поводу плоскоклеточного рака, исследовались фрагменты ткани удаленного легкого вне опухоли. По результатам микроскопического исследования выявлены различные варианты дисрегенераторных изменений. Изучались факторы, отражающие уровень пролиферативной активности и участвующие в апоптозе (Ki67, p53, bcl-2) в динамике гиперпластических, пренеопластических и неопластических изменений эпителия бронхов. Показано, что увеличение числа клеток, экспрессирующих Ki67, p53 и bcl-2 в последовательности базально-клеточная гиперплазия – плоскоклеточная метаплазия – дисплазия I (пренеоплазия) – дисплазия II–III (неоплазия), не зависит от индивидуальных особенностей, поскольку наблюдается при сочетании разных форм дисрегенераторных изменений в бронхиальном эпителии одного больного.

Ключевые слова: бронхиальный эпителий, дисрегенераторные изменения, пролиферативная активность, апоптоз.

CHARACTERISTICS OF PROLIFERATION MARKER EXPRESSION AND APOPTOSIS REGULATION DEPENDING ON THE CHARACTER OF DISREGENERATION CHANGES IN BRONCHIAL EPITHELIUM OF PATIENTS WITH SQUAMOUS CELL LUNG CANCER

O.V. Pankova¹, V.M. Perelmutter^{1,2}, O.V. Savenkova¹
*Cancer Research Institute, SB RAMS, Tomsk¹
Siberian State Medical University, Tomsk²
5, Kooperativny Street, 634050-Tomsk, e-mail: pvm@ngs.ru¹*

Tissue specimens of the removed lung outside the tumor were histologically studied from 49 patients operated on for squamous cell lung cancer. Microscopic examination revealed various disregeneration changes. Factors reflecting the level of proliferative activity and participating in apoptosis (Ki67, p53, bcl-2) in evaluation of hyperplastic, pereneoplastic and neoplastic changes in bronchial epithelium were studied. The increase in the number of cells expressing Ki67, p53 and bcl-2 in sequential progression: basal hyperplasia – squamous metaplasia – dysplasia I (preneoplasia) – dysplasia II–III (neoplasia) was not shown to depend on individual characteristics because it was observed in combination with various forms of disregeneration changes in bronchial epithelium of the patient.

Key words: bronchial epithelium, disregeneration changes, proliferative activity, apoptosis.

Канцерогенез в бронхиальном эпителии – сложный многоступенчатый процесс, требующий последовательного накопления генетических и молекулярных отклонений и идущий параллельно с морфологическими изменениями от нормального эпителия к пренеоплазии, а затем к неоплазии [9]. Риск и скорость прогрессирования пренеопластических поражений в инвазивный рак, а также механизм их прогрессии или регрессии еще не полностью понятны.

В основе появления и прогрессии неоплазии лежит генетическая нестабильность. Она базируется на нарушениях механизмов репарации ДНК, изменениях регуляции клеточного цикла и апоптоза. Потеря контроля над процессами пролиферации, дифференцировки и гибели клеток коррелирует с развитием дисплазии (неоплазии), увеличением степени ее тяжести и является известным фактом, описанным в эпителии многих органов [1, 3–6]. По данным

исследования M. Lai (2009), у больных с бронхиальной интраэпителиальной неоплазией выявлена аномальная пролиферация, заключающаяся в «гиперэкспрессии» Ki67 [8]. Мнения о роли молекулярных маркеров p53 и bcl-2 в динамике развития пренеопластических процессов противоречивы. Ряд авторов считают, что последовательность метаплазия–дисплазия–карцинома в легком ассоциируется с высокой пролиферативной активностью и не зависит от экспрессии p53 и bcl-2 [11]. По мнению Z. Vukobrat-Bijedic et al. (2007), экспрессия p53 в «предзлокачественных поражениях» может рассматриваться как индикатор канцерогенеза [12]. В преинвазивных изменениях высокая экспрессия p53 отмечается при умеренной дисплазии в 25 %, при CIS – в 75 % случаев [9]. Процент клеток, экспрессирующих bcl-2, также увеличивается с тяжестью преинвазивных изменений от легкой к тяжелой степени [7]. По результатам работ ряда исследователей экспрессия белка p53 в клетках опухоли является неблагоприятным прогностическим фактором, а bcl-2 – благоприятным [2, 7].

Цель исследования – изучение параметров пролиферативной активности и апоптоза в динамике гиперпластических, пренеопластических и неопластических изменений эпителия бронхов.

Материал и методы

В исследование вошли 49 больных в возрасте от 46 до 73 лет, прооперированных по поводу плоскоклеточного рака легкого. Материалом для морфологического исследования явились фрагменты ткани удаленного легкого вне опухоли. Гистологический материал фиксировался в нейтральном формалине, проводился по стандартной методике и заливался в парафин. Срезы толщиной 5–6 мкм окрашивались гематоксилином и эозином. Морфологическое исследование осуществлялось с помощью светового микроскопа «Axiostar plus» («K. Zeiss», Германия).

Иммуногистохимическое исследование проводилось по общепринятой методике. Демаскировку антигенов осуществляли путем инкубации срезов в микроволновой печи в течение 20 мин в цитратном буфере или ЭДТА-8. В качестве

хромогена применяли диаминобензидин (ДАБ). Визуализацию реакции антиген-антитело осуществляли с помощью системы «Super Sensitive Polymer – HRP Detection System» (Bio Genex, США). Использовались моноклональные антитела к белкам p53 (клон CM1, рабочее разведение 1:150, «Novocastra»), выявляющие «дикий» и «мутантный» варианты протеина, bcl-2 (клон bcl-2/100/D5, рабочее разведение 1:80, «Novocastra») и Ki67 (клон MIB-1, RTU, «Daco»). Результаты иммуногистохимической реакции оценивали по процентному содержанию положительно окрашенных клеток в разных участках препарата, соответствующих различным морфологическим процессам – гиперплазии бокаловидных клеток (ГБК), базально-клеточной гиперплазии (БКГ), плоскоклеточной метаплазии (ПМ), пренеоплазии, неоплазии. Обработка полученных результатов выполнялась с помощью пакета программ «Statistica 6.0». Использовались параметрические и непараметрические критерии (критерий t-Стюдента, критерий Манна-Уитни).

Результаты и обсуждение

По результатам микроскопического исследования гистологического материала удаленного легкого в крупных и средних бронхах выявлены различные варианты дисрегенераторных изменений. Группы наблюдения формировали, используя два подхода. При одном – определяющим признаком, на основании которого образовывали группы, был морфологический процесс, имевший более выраженную степень тяжести. Например, если в слизистой одновременно определялись БКГ, ПМ и неоплазия (Д II–III), то случай относили к группе неоплазий. На основании этого принципа пациенты были разделены на пять групп (табл. 1).

У 4 больных (1 группа) морфологическая картина соответствовала ГБК. У пациентов второй группы отмечались признаки базально-клеточной гиперплазии. В третьей группе у 10 пациентов ПМ имела очаговый характер и наблюдалась на фоне базально-клеточной гиперплазии. У 6 больных ПМ была диффузной. Четвертая группа (Д I) характеризовалась признаками дисплазии I степени, которая в различных вариантах сочеталась с базально-клеточной гиперплазией и/или метаплазией. В пятой группе (Д II–III) у 3

Таблица 1

**Распределение больных по группам
в зависимости от характера дисрегенераторного процесса**

Группа	Характер дисрегенераторного процесса
1. ГБК	Гиперплазия бокаловидных клеток – 4 больных
2. БКГ	Базально-клеточная гиперплазия – 19 больных
3. ПМ	Плоскоклеточная метаплазия на фоне базально-клеточной гиперплазии или без таковой – 16 больных
4. Д I	Дисплазия I степени в различных вариантах сочетания с БКГ и/или метаплазией – 3 больных
5. Неоплазия (Д II–III)	Дисплазия II–III степени в различных вариантах сочетания с БКГ и/или метаплазией – 7 больных

Таблица 2

Распределение больных в зависимости от морфологической характеристики эпителия

Группы	Варианты дисрегенераторных изменений эпителия
1	Нормальный (Н) бронхиальный эпителий – 11 больных
2	Гиперплазия бокаловидных клеток – 4 больных
3	Базально-клеточная гиперплазия – 33 больных
4	Плоскоклеточная метаплазия – 25 больных
5	Дисплазия I степени – 3 больных
6	Неоплазия (дисплазия II–III степени) – 7 больных

пациентов выявлена дисплазия II степени, у 4 – III степени. Во всех случаях дисплазии II степени и в одном – III степени дисплазия сочеталась с базально-клеточной гиперплазией и/или плоскоклеточной метаплазией. У 3 больных с тяжелой дисплазией она носила диффузный характер.

Поскольку у каждого пациента в разных участках слизистой бронха одновременно наблюдались неодинаковые дисрегенераторные процессы, представляло интерес сравнить экспрессию показателей пролиферативной активности и апоптоза в клетках каждого варианта дисрегенераторных изменений, независимо от наличия или отсутствия других форм патологии. Например, для оценки параметров БКГ в одну группу объединяли все случаи с наличием этого варианта дисрегенераторных изменений без учета других форм патологии (плоскоклеточной метаплазии или дисплазии). Исходя из такого подхода, были сформированы следующие группы (табл. 2).

Исследование факторов, отражающих уровень пролиферативной активности и участвующих в апоптозе (Ki67, p53, bcl-2) в группах больных, сформированных по степени тяжести морфологического процесса, выявило следую-

щую картину. Показатель пролиферативной активности постепенно возрастал по мере прогрессирования дисрегенераторных процессов: ГБК – БКГ – ПМ – неоплазия (рис. 1).

У больных первой (ГБК) и второй (БКГ) групп количество меченых ядер составляло $11,1 \pm 3,6\%$ и $16,9 \pm 7,2\%$ соответственно ($p_{1-2}=0,14$). Резко возрастал показатель пролиферативной активности в группе больных с ПМ – $49,8 \pm 7,1\%$ меченых ядер ($p_{2-3}=0,0001$). В группе пациентов с Д I значение данного параметра не отличалось от группы ПМ. При неоплазии количество Ki67-экспрессируемых клеток достигало $77,0 \pm 8,5\%$ ($p_{4-5}=0,006$).

Подобными оказались различия пролиферативной активности и в группах, сформированных по морфологическим типам эпителия независимо от степени выраженности дисрегенераторных процессов. Ki67-положительные клетки встречались в нормальном респираторном эпителии и в очагах бокаловидно-клеточной гиперплазии, но характеризовались низкой экспрессией – $13,4 \pm 6,1\%$ и $10,7 \pm 4,6\%$ соответственно ($p_{1-2}=0,2$). Однако в участках базально-клеточной гиперплазии уровень экспрессии Ki67 резко возрастал до $28,7 \pm 10,9\%$ ($p_{1-3}=0,002$). Одинаково выражен-

ным этот показатель был в очагах плоскоклеточной метаплазии – $57,8 \pm 9,5\%$ ($p_{3-4}=0,0001$) и дисплазии эпителия I степени – $57,3 \pm 10,1\%$ ($p_{4-5}=0,6$). Самая высокая пролиферативная активность отмечалась в клетках неоплазии – $83,4 \pm 9,8\%$ ($p_{4-6}, p_{5-6}=0,0001$) (рис. 2).

Экспрессия белка p53 была близка по динамике пролиферативной активности (рис. 3). Продукт экспрессии p53 регистрировался в ядрах при всех вариантах дисрегенераторных изменений. В первой группе выявлялось $7,2 \pm 0,9\%$ окрашенных ядер в клетках бронхиального эпителия, во второй – $9,4 \pm 2,3\%$ ($p_{1-2}=0,09$). Значительно выше был уровень экспрессии гена-супрессора p53 в группах больных с плоскоклеточной метаплазией – $24,1 \pm 7,2\%$ ($p_{2-3}, p_{2-4}=0,0001$) и дисплазией I степени $24,3 \pm 6,4\%$ ($p_{3-4}=0,9$). Наиболее высокая экспрессия p53 наблюдалась в группе пациентов с дисплазией II–III степени – $41,3 \pm 8,9\%$ ($p_{4-5}=0,02$).

Такой же была динамика процентного содержания клеток, экспрессирующих p53, и в группах, сформированных по варианту дисрегенераторного процесса эпителия независимо от его сочетания с другими процессами (рис. 4). В участках неизменной слизистой оболочки бронха и бокаловидно-клеточной гиперплазии p53 выявлялся в ядрах клеток в минимальном количестве – $6,2 \pm 1,7\%$ и $6,7 \pm 1,9\%$ соответственно ($p_{1-2}=0,1$). В эпителиальном пласте с признаками базально-клеточной гиперплазии значения данного показателя составляли $13,6 \pm 5,4\%$ ($p_{2-3}=0,001$), кроме того, они повышались до $28,7 \pm 7,2\%$ в участках плоскоклеточной метаплазии ($p_{3-4}=0,0002$) и до $32,0 \pm 6,2\%$ – при дисплазии I степени ($p_{4-5}=0,2$). В участках дисплазии II–III степени позитивная экспрессия p53 была максимальной – $45,7 \pm 11,2\%$ ($p_{5-6}=0,001$).

Экспрессия ингибитора апоптоза bcl-2 при гиперпластических, пренеопластических и неопластических процессах в бронхиальном эпителии также соответствовала динамике экспрессии вышеописанных маркеров – Ki67 и p53 (рис. 5). Уровень экспрессии bcl-2 в группе с ГБК и БКГ составлял $6,8 \pm 2,7\%$ и $8,4 \pm 4,7\%$ соответственно ($p_{1-2}=0,5$). Также он возрастал в группах пациентов с плоскоклеточной метаплазией – $16,7 \pm 4,7\%$ ($p_{2-3}=0,0001$) и Д I – $18,6 \pm$

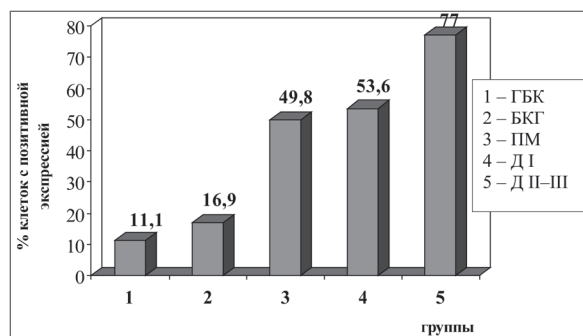


Рис. 1. Экспрессия Ki 67 в бронхиальном эпителии в группах больных с различными дисрегенераторными процессами. Примечание: различия между группами статистически значимы: $p_{1-3}=0,0001$, $p_{1-4}=0,0007$, $p_{2-3}=0,0001$, $p_{2-4}=0,0001$, $p_{3-5}=0,007$, $p_{4-5}=0,006$

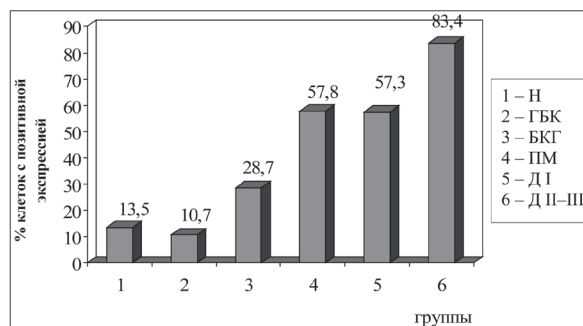


Рис. 2. Экспрессия Ki67 в эпителии различных вариантов дисрегенераторных изменений. Примечание: различия между группами статистически значимы: $p_{1-3}=0,002$, $p_{2-3}=0,001$, $p_{3-4}=0,0001$, $p_{3-5}=0,0001$, $p_{4-6}=0,0001$, $p_{5-6}=0,0001$

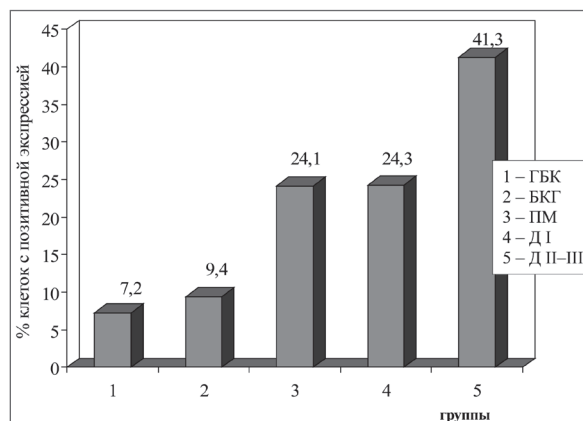


Рис. 3. Экспрессия p53 в бронхиальном эпителии в группах больных с различными дисрегенераторными процессами. Примечание: различия между группами статистически значимы: $p_{1-3}=0,0006$, $p_{1-4}=0,01$, $p_{2-3}=0,0001$, $p_{2-4}=0,0001$, $p_{4-5}=0,02$

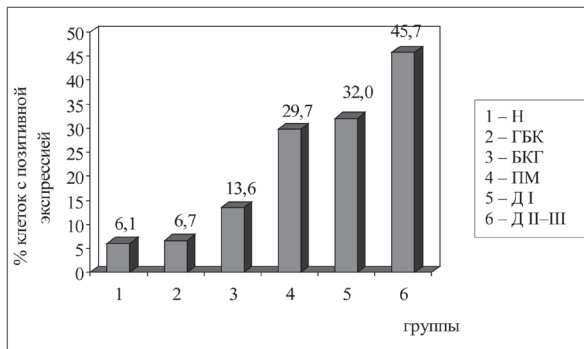


Рис. 4. Экспрессия p53 в эпителии различных вариантов дисрегуляторных изменений. Примечание: различия между группами статистически значимы: $p_{1-3}=0,001$, $p_{2-3}=0,001$, $p_{3-4}=0,0002$, $p_{3-5}=0,002$, $p_{4-6}=0,001$, $p_{5-6}=0,0001$

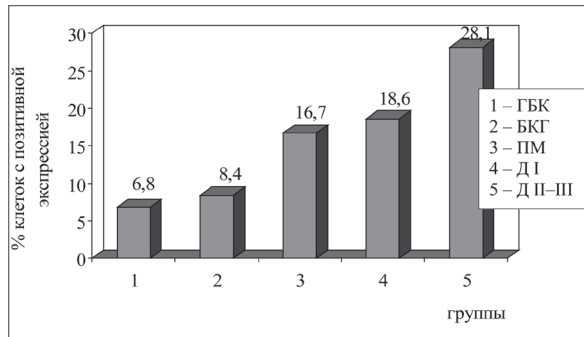


Рис. 5. Экспрессия bcl-2 в бронхиальном эпителии в группах больных с различными дисрегуляторными процессами. Примечание: различия между группами статистически значимы: $p_{1-3}=0,001$, $p_{1-4}=0,02$, $p_{2-3}=0,0001$, $p_{2-4}=0,003$

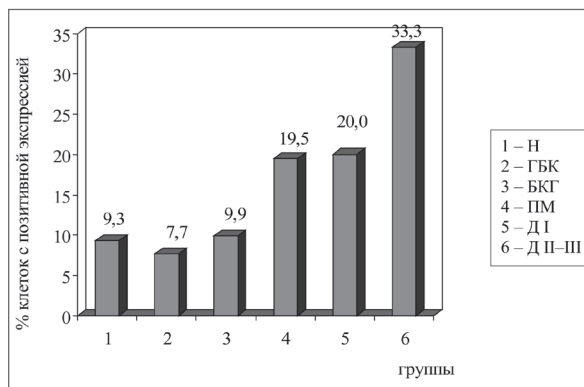


Рис. 6. Экспрессия bcl-2 в эпителии различных вариантов дисрегуляторных изменений. Примечание: различия между группами статистически значимы: $p_{1-4}=0,002$, $p_{1-5}=0,002$, $p_{2-4}=0,003$, $p_{2-5}=0,003$, $p_{4-6}=0,001$, $p_{5-6}=0,001$

7,1 % ($p_{3-4}=0,5$). Значения данного показателя при Д II–III достигали $28,1 \pm 6,7$ % ($p_{4-5}=0,05$).

Характер экспрессии bcl-2 в цитоплазме клеток различных типов дисрегуляторных процессов также не зависел от их глубины у каждого пациента (рис. 6). Экспрессия bcl-2 в «нормальном» эпителии, в участках эпителия с бокаловидно-клеточной гиперплазией и базально-клеточной гиперплазией была наименьшей – $9,3 \pm 4,3$ %, $7,7 \pm 3,7$ % и $9,9 \pm 5,3$ % соответственно. Значительно большее количество клеток экспрессировало bcl-2 в участках плоскоклеточной метаплазии – $19,5 \pm 4,6$ % ($p_{1-4}, p_{3-4}=0,002$, $p_{2-4}=0,001$) и Д I – $20,0 \pm 5,2$ % ($p_{4-5}=0,5$). Наиболее высокая экспрессия bcl-2 наблюдалась в неопластическом эпителии – $33,3 \pm 5,7$ % ($p_{4-6}, p_{5-6}=0,001$).

Анализ экспрессии онкомаркеров в группах больных с различными дисрегуляторными процессами показал достоверное увеличение пролиферативной активности и экспрессии белка p53 в динамике гиперпластических, пренеопластических и неопластических изменений бронхиального эпителия. Наиболее высок уровень экспрессии маркеров Ki67, p53 и bcl-2 отмечен в группах больных с плоскоклеточной метаплазией и дисплазией. Наши данные согласуются с результатами исследования Т. Ishizumi et al. (2010), утверждающих, что «канцерогенез в бронхиальном эпителии начинается с нормального эпителия и продолжается через гиперплазию, метаплазию, дисплазию/рак in situ в инвазивный плоскоклеточный рак» [6]. Согласно исследованиям W. Pankiewicz et al. (2007), изменения в экспрессии онкомаркеров Ki67, p53 и bcl-2 наблюдаются в случае плоскоклеточной метаплазии, дисплазии и CIS (рак in situ) [10]. По мнению авторов, эти изменения происходят последовательно, а их количество и частота растут вместе с развитием атипии по пути метаплазия – дисплазия – CIS.

Результаты исследования позволяют предположить, что феномен увеличения доли клеток, экспрессирующих Ki67, p53 и bcl-2 в последовательности базальноклеточная гиперплазия – плоскоклеточная метаплазия – дисплазия I (пренеоплазия) – дисплазия II–III (неоплазия), не зависит от индивидуальных особенностей, поскольку наблюдается при сочетании раз-

ных форм дисрегенераторных изменений в бронхиальном эпителии одного больного. Не исключено, что развитие неопластического процесса обусловлено не столько генетическими изменениями, возникающими при ДІ–ДІІ, сколько экспансией клона клеток, появляющихся уже в пределах метапластического фокуса, а быть может, и в участках базально-клеточной гиперплазии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пожариский К.М., Леенман Е.Е. Прогностическое и предсказательное значение иммуногистохимических маркеров при онкологических заболеваниях // Материалы III съезда онкологов и радиологов СНГ. Ч. 1. Минск, 2004. С. 113–116.
2. Breuer R.H., Pasic A.F., Smit E.F. et al. The natural course of preneoplastic lesions in bronchial epithelium // *Carcinogenesis*. 2008. Vol. 29 (12). P. 2377–2384.
3. Chyczewski L., Niklinski J., Chyczewska E., Niklinska W. Morphological aspects of carcinogenesis in the lung // *Histopathology*. 2001. Vol. 39 (2). P. 149–152.
4. Dacic S. Pulmonary Preneoplasia // *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2008. Vol. 132. P. 1073–1078.
5. Greenberg A., Yee H., Rom W. Preneoplastic lesions of the lung // *Resp. Res.* 2002. Vol. 3 (1). P. 1–10.
6. Ishizumi T., McWilliams A., McAulay C. et al. Natural history of bronchial preinvasive lesions // *Cancer Metastasis Rev.* 2010. Vol. 29 (1). P. 5–14.
7. Kerr K.M. Pulmonary preinvasive neoplasia // *Clin. Pathol.* 2001. Vol. 54. P. 257–271.
8. Lai M. Intraepithelial Neoplasia of the Lower Respiratory Tract // *Intraepithelial Neoplasia*. 2009. Chapter 1. P. 30–58.
9. Lantuejoul S., Salameire D., Salon C., Brambilla E. Pulmonary preneoplasia – sequential molecular carcinogenetic events // *Histopathology*. Vol. 54. P. 43–54.
10. Pankiewicz W., Minarowski L., Niklińska W. et al. Immunohistochemical markers of cancerogenesis in the lung // *Folia Histochem. Cytobiol.* 2007. Vol. 45 (2). P. 65–74.
11. Törmänen U., Nuorva K., Soini Y., Pääkkö P. Apoptotic activity is increased in parallel with the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence of the bronchial epithelium // *Br. J. Cancer*. 2001. Vol. 79 (5–6). P. 996–1002.
12. Wistuba I.I., Gazdar A.F. Lung cancer preneoplasia // *Ann. Rev. Pathol.: Mech. Dis.* 2006. Vol. 1. P. 331–348.

Поступила 21.07.10