Особенности ангиогенеза и стромообразования рака легкого, развившегося у лиц, длительное время проживавших на радиоактивно загрязненных территориях Семипалатинской области Казахстана

1 — ММА им. И.М.Сеченова, г. Москва;

2 — Городской онкологический диспансер, г. Алматы

G.E.Sagindikova, E.A.Kogan, E.B.Satbaeva

Particularities of lung tumour angiogenesis and stroma formation in inhabitants from radionuclide-contaminated territories at Semipalatinsk region, Kazakhstan

Summary

The aim of this study was to investigate particularities of angiogenesis and stroma formation in various histological types of lung carcinoma in inhabitants from radionuclide-contaminated territories at Semipalatinsk region, Kazakhstan. We used operational and biopsy material from 87 lung carcinoma patients. Of them, 33 patients (the 1st group) lived in the neighbourhood of Semipalatinsk testing area from their childhood to 2002 and were exposed to radiation for a long time (the mean year radiation dose exceeded 0.1 rem). Operational and biopsy material from 54 patients living at Kazakhstan territories with normal radiation level (14 patients) or in Moscow (40 patients) were as controls (the 2nd group). Immunohistochemical methods were used to detect MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, VEGF, CD34, chromogranin, and CD68. Expression of MMP-1, MMP-2, MMP-9 in tumour cells was enhanced in the 1st group compared to the controls. Angiogenesis in tumour stroma of Semipalatinsk patients was more significant compared to the controls with regard to VEGF expression and density of newly formed vessels. We proposed that the mentioned above factors could provide poor prognosis of lung carcinoma in inhabitants of radionuclide-contaminated territories.

Резюме

Целью настоящей работы было изучение особенностей ангиогенеза и стромообразования в различных гистологических типах рака легкого (РЛ), развившегося у лиц, длительное время проживавших на радиоактивно-загрязненных территориях Семипалатинской области Казахстана. Исследование выполнено на операционном и биопсийном материале, полученном от 87 больных с РЛ, из которых 33 больных (1-я группа) с детских лет до 2002 г. проживали вблизи Семипалатинского полигона и в течение длительного времени подвергались воздействию радиации (годовая доза облучения превысила 0,1 бэр). В целях контроля использовался операционный и биопсийный материал больных (2-я группа), проживавших на территориях с неизменным радиационным фоном Казахстана (14 пациентов) и г. Москвы (40 больных). Проводили иммуногистохимическое выявление MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, VEGF, CD34, хромогранина, CD68. Обнаружено усиление экспрессии MMP-1, -2 и -9 в раковых клетках основной группы по сравнению с контрольной. Ангиогенез в строме РЛ в Семипалатинском регионе, как правило, был более выраженным, судя по экспрессии VEGF и плотности новообразованных сосудов по сравнению с контрольной группой. Высказывается предположение, что перечисленные факторы могут обуславливать плохой прогноз РЛ у лиц, проживавших на радиоактивно загрязненных территориях.

Прогрессия злокачественных опухолей зависит от стромально-паренхиматозных взаимоотношений. Стромобразование и ангиогенез в опухолях регулируются множеством факторов, среди которых немаловажную роль отводят семейству матриксных металлопротеиназ (MMPs). MMPs принимают непосредственное участие в ангиогенезе, происходящем в опухолях путем деградации базальных мембран сосудов и активации ангиогенных факторов, одним из которых является фактор роста эндотелия (VEGF). Опухолевые клетки продуцируют VEGF и MMPs в большом количестве. VEGF заставляет клетки эндотелия делиться, и капилляры преобразуются в опухоли. MMPs разрушают внеклеточный матрикс, упрощая инвазию клеток эндотелия и об-

разованных ими капилляров в опухолевую ткань [1]. Инвазия сосудов в опухоль и способность опухолевых клеток растворять с помощью MMPs базальные мембраны позволяет им проникать в кровоток с последующим метастазированием в другие органы и ткани [2].

Известно, что разные типы MMPs способны провоцировать деградацию экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) и базальных мембран, что обеспечивает инвазию в сосуды и распространение опухоли. MMPs могут влиять на прогрессию опухоли и за счет других механизмов, что было установлено в последние годы [3]. MMPs способны индуцировать злокачественную трансформацию клеток, апоптоз, а также их пролиферацию и дифференцировку. Изучена

возможность взаимодействия MMPs с цитокинами, факторами роста (FGF, VEGF и др.) и их рецепторами, адгезивными молекулами и медиаторами апоптоза и FAS-лигандом [4]. Существуют естественные тканевые ингибиторы MMPs (TIMPs), тормозящие инвазию и метастазирование опухолей, что было доказано в ходе экспериментов [1]. Выявлено влияние MMP-1,2,9,12 на течение и прогноз при различных новообразованиях, в том числе и при раке легкого (РЛ) [5, 6]. Показано, что MMP-2 коррелирует с появлением метастазов, более низкими показателями выживаемости больных с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) [7], рецидивов РЛ [8]. Имеется взаимосвязь между экспрессией MMP-2 и MMP-9 в опухолевых клетках и фибробластах стромы и ангиогенезом в опухоли, а также неблагоприятным прогнозом [9–11]. Установлено, что существует генетический полиморфизм MMP-2, MMP-9 и MMP-1 [12–14].

Особенности стромообразования и ангиогенеза, а также роль системы MMP в развитии различных гистологических типов РЛ у лиц, длительное время проживавших на радиоактивно загрязненных территориях Семипалатинской области Казахстана, практически не изучены. В то же время известно, что заболевание у данной группы пациентов нередко развивается на фоне интерстициального легочного фиброза, в том числе радиационного, на чем основана концепция "рака легкого в рубце".

Цель исследования — изучить особенности ангиогенеза и стромообразования в различных гистологических типах РЛ, развившегося у лиц, длительное время проживавших на радиоактивно загрязненных территориях Семипалатинской области Казахстана.

Материалы и методы

Исследован операционный и биопсийный материал, полученный от 87 больных с РЛ, из которых 33 пациента (1-я группа) с детских лет до 2002 г. проживали вблизи Семипалатинского полигона и в течение длительного времени подвергались воздействию радиации (годовая доза облучения превысила 0,1 бэр). В качестве контроля использовался операционный и биопсийный материал 54 пациентов (2-я группа), проживавших на территориях с неизменным радиационным фоном Казахстана (14 пациентов) и г. Москвы (40 больных). В работе был использован парафиновый архив онкологического центра и патологоанатомического бюро г. Семипалатинска, городского онкологического диспансера г. Алматы и материал Московской медицинской академии им. И.М.Сеченова (1999–2002 гг.). Среди больных основной группы были 81 мужчина и 6 женщин, возраст которых составлял 13–69 лет, а в контрольной группе возраст больных колебался от 47 лет до 81 года. Метастазы в регионарные лимфоузлы имелись у всех пациентов как основной, так и контрольной групп, а отдаленные метастазы отсутствовали.

РЛ был представлен различными гистологическими типами опухоли: мелкоклеточным раком легкого (МРЛ) — 19 случаев в 1-й группе и 11 во 2-й группе, плоскоклеточным раком (ПРЛ) — 7 случаев в 1-й группе и 17 во 2-й группе, аденокарциномой (АК) — 7 случаев в 1-й группе и 26 во 2-й. НМРЛ с нейроэндокринной дифференцировкой (НЭД) обнаружен только у пациентов 1-й группы — 14 случаев. С каждого блока готовили серийные парафиновые срезы толщиной 4 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином, ализциановым синим, пикрофуксин по ван Гизону.

Проводили иммуногистохимическое выявление антигенов в парафиновых срезах иммунопероксидазным методом по общепринятой методике [4] с предварительной демаскировкой антигена в микроволновой печи в течение 20 мин при мощности 600 Вт. С помощью моно- и поликлональных антител выявляли MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 (LabVision), VEGF, CD34, хромогранин, CD68 (DAKO). В качестве вторичных антител применяли

Рис. 1. Гистограммы MMP-1, -2, -9, их ингибитор TIMP-1 и VEGF в РЛ, у лиц, длительное время проживавших на радиоактивно-загрязненных территориях Семипалатинской области Казахстана

Рис. 2. Гистограммы MMP-1,-2,-9, их ингибитор TIMP-1 и VEGF в РЛ контрольной группы.

биотинилированные антитела к иммуноглобулинам мыши и кролика (Dako LSAB+KIT, PEROXIDASE). Для фоновое докрашивания использовали гематоксилин. Выполняли позитивные и негативные контрольные реакции. Результаты иммуногистохимических реакций оценивали полуколичественным методом в баллах: 2 балла соответствовали 20 % и менее окрашенных опухолевых клеток, 4 балла — 20–50 %, 6 баллов — более 50 %. Уровень ангиогенеза рассчитывался по средней плотности новообразованных сосудов в 10 полях зрения при увеличении в 400 раз.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования установлено, что РЛ в 1-й группе отличался развитой стромой с большим количеством новообразованных сосудов по сравнению с опухолями во 2-й группе. Ангиогенез в строме опухоли оценивался по относительной плотности новообразованных сосудов, эндотелий которых экспрессирует CD34 и VEGF. VEGF выявляется в цитоплазме клеток паренхимы и стромы опухоли. При этом в основной группе отмечено уси-

ление экспрессии VEGF опухолевыми клетками МРЛ и ПРЛ с НЭД. В АК уровень экспрессии VEGF был одинаков в обеих группах (рис. 1, 2). Уровень экспрессии фактора роста коррелировал с высокой плотностью новообразованных сосудов, судя по CD34 (рис. 3А, 4А). В целом выявлено относительное увеличение плотности сосудов в РЛ больных основной группы по сравнению с контрольной. Таким образом, ангиогенез в опухолях основной группы повышается по сравнению с контрольной, что совпадает с данными по усилению экспрессии MMP-2. Усиление ангиогенеза наиболее выражено в РЛ с НЭД.

MMP-1 и MMP-9 при иммуногистохимическом исследовании обнаруживаются в цитоплазме опухолевых клеток, а также фибробластических элементов, эндотелия сосудов и макрофагов воспалительного инфильтрата стромы. Уровни экспрессии ферментов в раковых клетках, как правило, были

Рис. 3. Гистограммы CD34, CD68 и хромогранин в клетках различных гистологических типов РЛ

сопоставимы с таковыми в макрофагах (рис. 1, 2, 4В, Г). При этом наиболее высокий уровень экспрессии MMP-1 и MMP-9 в раковых клетках отмечается при АК и МРЛ обеих групп. Однако отмечены отличия в экспрессии данных ферментов, как по уровню, так и по локализации в двух исследуемых группах. В опухолевых клетках больных 1-й группы отмечался наивысший уровень экспрессии MMP-1 и MMP-9 по сравнению с контрольной группой. При этом раковые клетки больных 1-й группы содержали большее количество ферментов по сравнению со стромальными элементами, в то время как в контрольной группе уровни экспрессии MMP-1 и MMP-9 в паренхиматозных и стромальных элементах были примерно на одном уровне (рис. 1, 2).

MMP-2 при иммуногистохимическом исследовании выявляется также в цитоплазме клеток стромы, эндотелия сосудов, макрофагов и лишь в небольших количествах опухолевых клеток, в основном АК и ПРЛ. Наиболее высокий уровень экспрессии фермента обнаруживался в эндотелии сосудов обеих групп. Экспрессия данного фермента в эндотелии сосудов ПРЛ с НЭД усиливалась в основной группе по сравнению с контрольной (рис. 1, 2).

TIMP-1 при иммуногистохимическом исследовании выявляется в небольшом количестве в цитоплазме опухолевых клеток, а также фибробластических элементов, эндотелия сосудов и макрофагов воспалительного инфильтрата стромы. В тканях больных 1-й группы отмечалась тенденция к повышению уровня экспрессии TIMP-1 в паренхиме опухоли по сравнению с контрольной группой (рис. 1, 2).

Процентное содержание CD68-положительных клеток среди клеток инфильтрата составляет от 31 до 53 % в основной группе, и от 30 до 52 % — в контрольной (рис. 3Б). При этом макрофагальная инфильтрация стромы наиболее выражена в АК по сравнению с другими гистологическими типами РЛ и сопоставима в обеих группах. При МРЛ у больных 1-й группы отмечается выраженное снижение процентного содержания CD68-положительных клеток в строме опухоли до 31 % среди клеток инфильтрата по сравнению с группой контроля (42 %).

Хромогранин-А выявлялся в цитоплазме и ядрах опухолевых клеток МРЛ, а в опытной группе — и во всех случаях НМРЛ, что позволяет их считать НМРЛ с НЭД (рис. 4Б). При этом доля хромогранин+-клеток в ПРЛ с НЭД в среднем составила 30 %, а в АК с НЭД — 70 %. В контрольной группе хромогранин+-клетки среди НМРЛ выявлялись только в ПРЛ и составляли в среднем 2,5 % (рис. 3В).

В результате проведенного исследования установлено, что подавляющее большинство больных из Семипалатинского региона имели МРЛ. В случаях НМРЛ в опухолевых клетках также отмечалась нейроэндокринная дифференцировка, что было показано нами ранее при выявлении хромогранина. Особенностью РЛ в Семипалатинском регионе является также большой процент молодых пациентов. Воз-

раст больных колебался от 13 до 69 лет, в то время как в контрольной группе он составлял от 47 лет до 81 года.

Сопоставление экспрессии MMPs и других исследованных нами факторов в различных гистологических типах РЛ в сравниваемых группах было бы некорректным, так как в основной группе во всех изученных опухолях обнаруживалась НЭД. В то же время отмечены некоторые особенности экспрессии MMPs и VEGF в некоторых гистологических типах РЛ обеих групп: MMP-2 практически не экспрессировалась в опухолевых клетках МРЛ, MMP-9 была выше в НМРЛ по сравнению с МРЛ, а VEGF был самым низким в АК (рис. 1, 2).

Рак легкого, возникший в условиях повышенной радиации, отличается высоким потенциалом к инвазивному росту, судя по повышению уровня экспрессии MMP-1, -2 и -9 в эпителиальных клетках, а также усилению ангиогенеза в строме. При этом происходит компенсаторная активация механизмов антибластомной защиты путем усиления выработки TIMP-1, что, по данным литературы [15], может сочетаться с местной иммунодепрессией, индуцированной радиационным воздействием. Относительно высокий уровень металлопротеиназ в радиационном РЛ может быть косвенным подтверждением возникновения рака в условиях радиационного фиброза.

Таким образом, установлено, что злокачественный потенциал РЛ в плане инвазивного роста значительно выше у пациентов 1-й группы, что, вероятно, и определяет худший прогноз течения их заболевания. Это предположение основывается на обнаруженном нами усилении экспрессии MMP-1, -2 и -9 в раковых клетках основной группы по сравнению с контрольной. Полученные результаты подтверждаются и данными литературы. В ходе описанных исследований [7, 8, 11] была установлена корреляция MMP-9 и MMP-2 с низкой выживаемостью при НМРЛ и аденокарциноме (АК). При этом обнаружен полиморфизм MMP-9: генотипы 279QQ и 279RR коррелируют с повышенным риском РЛ с метастазами, а P574R и R279Q — с частотой РЛ. Кроме того, гетерозиготность по 574PR и гомозиготность по 574RR прогностически хуже, чем гомозиготность по 574RR [12]. Интересные факты по возрастанию риска развития РЛ в зависимости от гаплотипа MMP-2 и MMP-1 получены в последние годы. Показано, что C-1306-C-735 гаплотип MMP-2 коррелирует с более высоким риском РЛ и курением по сравнению с T-1306-T-735 [13], а полиморфизм MMP-1 по 1607 1G/2G связан с высоким риском РЛ у некурящих и АК у мужчин [14]. MMPs и TIMP оказывают воздействие на процессы инвазии, метастазирования РЛ и ангиогенеза. При этом MMP-2 наиболее активно экспрессируется в очагах новообразования сосудов в опухолях. РЛ, возникший в условиях повышенной радиации, отличается высоким потенциалом инвазивного роста за счет дисбаланса между экспрессией металлопротеиназ и их

ингибитора, а также инактивацией механизмов антибластомной защиты. Перечисленные факторы могут обуславливать плохой прогноз РЛ у лиц, проживавших на радиоактивно загрязненных территориях.

Заключение

Стромообразование и ангиогенез при РЛ в Семипалатинском регионе были более выраженными, судя по морфологии, а также экспрессии VEGF и плотности новообразованных сосудов по сравнению с контрольной группой. РЛ, возникший в условиях повышенной радиации, отличается более высоким уровнем ангиогенеза, а также инвазивными свойствами опухолевой ткани, что обеспечивается более высоким уровнем экспрессии металлопротеиназ и факторов роста. MMP-2 экспрессируется в РЛ в основном в очагах ангиогенеза стромы на значительно более высоком уровне в 1-й группе по сравнению с группой контроля. Относительно высокий уровень металлопротеиназ в радиационном раке может быть косвенным подтверждением роста опухоли в условиях радиационного фиброза и ее высокого злокачественного потенциала.

Литература

1. Coussens L. M., Fingleton B., Matrisian L.M. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 2002; 295 (5564): 2387–2392.
2. Тюлядин С.А. Перспективные подходы лекарственной терапии немелкоклеточного рака легкого. В кн.: Новое в терапии рака легкого. М.; 2003.
3. Somerville R.P., Oblander S.A., Apte S. S. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biology* 2003; 4: 216.
4. Demedts I.K. et al. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir. Res.* 2006; 7: 53.
5. Снарская Е.С., Молочков В.А., Франк Г.А., Завалишина Л.Э. Матриксные металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы при базально-клеточном и метатипическом раке кожи. *Арх. пат.* 2005; 67 (3): 14–16.
6. Cox G., Steward W. P., O'Byrne K. J. The plasmin cascade and matrix metalloproteinases in non-small cell lung cancer. *Thorax* 1999; 54: 169–179.
7. Byun J.H., Lee M.A., Roh S.Y. Association between cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 expression in non-small cell lung cancer. *Japan. J. Clin. Oncol.* 2006; 36 (5): 263–268.
8. Cai M., Onoda K., Takao M. Degradation of tenascin-C and activity of matrix metalloproteinase-2 are associated with tumor recurrence in early stage non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8: 1152–1156.
9. Laack E., Kohler A., Kugler C. Pretreatment serum levels of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* 2002; 13: 1550–1557.
10. Pinto C.A., Carvalho P.E.O., Antonangelo L. Morphometric evaluation of tumor matrix metalloproteinase-9 predicts survival after surgical resection of adenocarcinoma of the lung. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9: 3098–3104.
11. Shinya I., Takenaka K., Yanagihara K. Matrix metalloproteinase-2 status in stromal fibroblasts, not in tumor cells, is a significant prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 6579–6585.
12. Hu Z., Huo X., Lu D. et al. Functional polymorphisms of matrix metalloproteinase-9 are associated with risk of occurrence and metastasis of lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 5433–5439.
13. Su L., Zhou W., Park S. Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevent.* 2005; 14: 567–570.
14. Zhou Y., Yu C., Miao X. Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 and lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 2005; 26 (6): 1117–1121.
15. Игембаева К.С. Последствия влияния ионизирующего излучения на клинику, течение и исход туберкулеза органов дыхания. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Семипалатинск; 2002.
16. Boume J. Handbook of immunoperoxidase staining methods. Santa Barbara: Dako Corp.; 1983.

Поступила 01.02.07
© Коллектив авторов, 2007
УДК 616.24-006.6-091