

Костерина Н.Е.^{1,2}, Гринберг Л.М.^{1,2}

Алгоритм морфологической диагностики мелкоклеточного рака легкого по данным биопсий бронхов

1 – Кафедра патологической анатомии и ЦНИИЛ ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Екатеринбург; 2 - ГБУЗ СО «Противотуберкулезный диспансер», г. Екатеринбург.

Kosterina N.E., Grinberg L.M.

Algorithm of morphological diagnostics of small cell lung cancer on bronchial biopsy

Резюме

В работе приведены результаты цитологического, гистологического и иммуногистохимического исследований биопсий бронхов 95 больных с мелкоклеточными опухолями легких. В 85,3% случаев достоверно верифицирован мелкоклеточный рак легкого на светооптическом уровне при помощи комплексного цитологического и гистологического исследования, в оставшихся 14,7% случаев выявлена необходимость проведения дополнительных методов исследования для определения варианта мелкоклеточных опухолей легких. В 24 случаях проведено иммуногистохимическое исследование, в 10 случаях – для подтверждения морфологического диагноза мелкоклеточного рака легкого, в 14 – для определения варианта мелкоклеточной опухоли легкого с использованием различных наборов антител в зависимости от дифференциально-диагностическо ряда. В результате иммуногистохимического исследования выявлено, что 20 опухолей имеют иммунофенотип мелкоклеточного рака легкого, оставшиеся четыре мелкоклеточные опухоли – иммунофенотип мелкоклеточного варианта плоскоклеточного рака легкого, низкодифференцированной аденокарциномы легкого солидного строения, крупноклеточной В-клеточной лимфомы и карциномы молочной железы. Сформулирован алгоритм комплексного гистологического, цитологического и иммуногистохимического методов исследования, использование которого позволяет оптимизировать диагностику мелкоклеточного рака легкого по данным биопсий бронхов.

Ключевые слова: мелкоклеточный рак легкого, морфологическая диагностика

Summary

Results of cytological, histological and immunohistochemical analyses of bronchial biopsies of 95 patients with small cell lung cancer have been provided in this paper. In 85.3% of the cases small cell lung cancer within optic level has been verified by complex cytological and histological diagnosis. In the rest of 14.7% of the cases it has been revealed the necessity of using additional analysis methods to detect a version of small cell lung cancer. In 24 cases immunohistochemical analysis has been made, in 10 of them – to confirm morphological diagnosis of small cell lung cancer, in 14 of them – to detect a version of small cell lung tumour by using different antibodies sets depending on differentially diagnostic series. Immunohistochemical analysis has shown that 20 tumours have immunophenotype of small cell lung cancer, trustworthy lung adenocarcinoma, diffuse large cell B-cell lymphoma and mammary gland carcinoma. It has been worked out an algorithm of complex histological, cytological and immunohistochemical methods of diagnostics. Using it allows to improve diagnostics of small cell lung cancer on data of bronchial biopsies.

Keywords: small cell lung cancer, morphological diagnostics

Введение

В настоящее время рак легкого (РЛ) является одной из наиболее распространенных злокачественных опухолей и наиболее частых причин смерти больных злокачественными новообразованиями. Опухоль значительно чаще обнаруживают у мужчин, преимущественно сред-

него и пожилого возраста. Подавляющее большинство случаев РЛ ассоциировано с курением [1-5].

Первичный РЛ подразделяется на четыре основных гистологических типа: аденокарцинома, плоскоклеточный рак и недифференцированные мелкоклеточный и крупноклеточный раки [1, 5-9]. Гистологические типы

рака легкого отличаются друг от друга течением, прогнозом и чувствительностью к лучевой и химиотерапии, что определяет тактику лечения. Основной метод лечения мелкоклеточного рака легкого (МРЛ), который в настоящее время рассматривается как системное заболевание, состоит в химиотерапии, отдельно или в сочетании лучевой терапией [2-4, 7]. Наличие столь отличительных признаков МРЛ, особенно высокой чувствительности к химиотерапии, дает основание подразделять все РЛ на две основные группы – МРЛ и немелкоклеточный РЛ (НМРЛ), к которому относятся все остальные гистологические типы РЛ [2-4, 7].

Различные подходы в лечении МРЛ и НМРЛ обуславливают необходимость достоверной морфологической диагностики на дооперационном этапе, которая проводится, преимущественно, по данным биопсий бронхов [2-4, 8]. Среди основных проблем морфологического исследования биопсий бронхов выделяют артефициальные изменения («раздавливание») на этапе забора материала и малый размер получаемых биоптатов при необходимости проведения цитологического, гистологического и иммуногистохимического (ИГХ) исследований [8, 9].

В соответствии с Гистологической классификацией опухолей легких ВОЗ (2004г) МРЛ рассматривается как недифференцированная злокачественная эпителиальная опухоль нейроэндокринной природы, образованная округлыми, овальными или веретенообразными клетками мелкого размера (10-15 мкм) с плохо различимыми клеточными границами, скудной цитоплазмой, округлым, овальным или вытянутым ядром с мелкозернистой структурой хроматина без ядрышек и высокой митотической активностью. Клетки опухоли образуют гнездовые, трабекулярные, палисадообразные структуры и розетки. В опухолевой ткани часто обнаруживаются многочисленные фокусы некроза. Для МРЛ характерен краш-феномен, который морфологически проявляется наличием в ткани опухоли скоплений значительно деформированных опухолевых клеток и тяжелой ядерной субстанции. Краш-феномен наиболее выражен в биоптатах бронхов, что обусловлено «раздавливанием» ткани опухоли при бронхоскопическом заборе материала [1-7, 9].

Основными ИГХ-маркерами МРЛ, как и других нейроэндокринных опухолей, являются хромогранин (CG), синатофинин (SP), нейронспецифическая энзола (NSE) и CD56. Нейроэндокринные маркеры не являются строго специфичными для МРЛ, так до 70 % НМРЛ могут экспрессировать NSE, 20-30 % - CG и SP. Наиболее специфичным нейроэндокринным маркером является CD56, однако, и он экспрессируется в небольшом проценте случаев НМРЛ. Около 1/3 МРЛ выборочно не экспрессируют нейроэндокринные маркеры, а 10-15 % дают отрицательную реакцию со всеми нейроэндокринными маркерами. Поэтому нейроэндокринные маркеры не могут изолированно использоваться для дифференциальной диагностики МРЛ и НМРЛ. МРЛ в 90 % случаев экспрессирует тиреоидный фактор транскрипции (TTF-1), в небольшом проценте случаев – кератины 7, 8, 18, 19 (Ker 7, 8, 18, 19), крайне редко – Ker 20 и маркер пролиферации p63 [1-5, 10-12].

Достоверная верификация МРЛ на диагностическом этапе крайне важна, так как определяет тактику лечения и прогноз заболевания, которые существенно отличаются при МРЛ и НМРЛ. Основой достоверной верификации МРЛ являются морфологические критерии, определяемые при гистологическом и цитологическом исследованиях, а также ИГХ-исследование с использованием различных панелей антител в зависимости от дифференциально-диагностического ряда [2-5, 11].

Цель исследования - разработать алгоритм морфологической диагностики мелкоклеточного рака легкого по материалам биопсий бронхов на основании гистологического, цитологического и ИГХ-исследований.

Материалы и методы

В исследование включены 95 больных с мелкоклеточными опухолями трахей и бронхов, находившихся на амбулаторном обследовании в ГБУЗ СО ПТД в 2009 году. Из них 92 мужчины в возрасте от 32 до 80 лет (средний возраст 59±10 лет) и 3 женщины в возрасте 53, 62 и 71 год (средний возраст 62±9 лет). Морфологические критерии для отбора опухолей соответствовали общепринятым для диагностики МРЛ.

Гистологическое и цитологическое исследования выполнялись в ЦПАО и КДЛ ГБУЗ СО «ПТД», ИГХ-исследование в гистологической лаборатории ЦНИЛ ГБОУ ВПО УГМУ.

Был проведен анализ заключений гистологического и цитологического исследований биопсий бронхов указанных больных, которые выполнялись разными специалистами (патологоанатомами и цитологом). Одним специалистом (Н.Е. Костерина) выполнена реэкспертиза гистологических и цитологических препаратов с комплексной оценкой как гистологической, так и цитологической картины [12].

В 24 случаях было выполнено ИГХ-исследование непосредственным методом с использованием биотин-авидинового комплекса и набора антител - Vimentin (Vim), Keratin multi (Ker multi), CD45RB, Neuron Specific Enolase (NSE), Synaptophysin (SP), Chromogranin (CG), CD56, Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1), Keratin 5/6, 7, 20 (Ker 5/6, 7, 20), p63 Protein (p63), Ki67 Antigen (Ki67), p53 Protein (p53), CD 20, CD3, Bcl-2 alpha Oncoprotein, Bcl-6 Oncoprotein, TdT, Estrogen Receptor (ER) и Progesterone Receptor (PG). ИГХ-реакции оценивались с учетом их локализации (диффузная или очаговая) и степени выраженности окраски хромогеном (слабая, умеренно выраженная или хорошо выраженная). Маркеры пролиферации оценивались на 1000 клеток в процентном соотношении.

Статистическую обработку проводили с помощью пакета статистических программ «Biostat».

Результаты и обсуждение

Анализ заключений морфологических исследований биопсий бронхов вышеописанных больных показал, что при гистологической и цитологической диагностике мелкоклеточных опухолей легких разными специалистами морфологический диагноз МРЛ был поставлен в 76

случаях (80,0% от общего числа больных). При реэкспертизе гистологической и цитологической картины одним специалистом, морфологический диагноз МРЛ был поставлен еще в 5 случаях, а общее количество морфологических диагнозов МРЛ увеличилось с 76 до 81 случая (85,3 %).

В добавленных 5 случаях подразумевался предположительный гистологический диагноз МРЛ (3 случая) или

дифдиагноз между МРЛ и мелкоклеточным вариантом плоскоклеточного РЛ (2 случая) при однозначном гистологическом диагнозе МР во всех 5 случаях, что и позволило отнести эти опухоли к МРЛ. В указанных 5 случаях, а также еще в 5 случайно выбранных случаях с достоверно верифицированным морфологическим диагнозом МРЛ, было выполнено ИГХ-исследование с использованием набора антител - Vim, Ker multi, CD45RB, NSE, SP, CG, CD56, TTF-1, Ker 5/6, Ker 7.

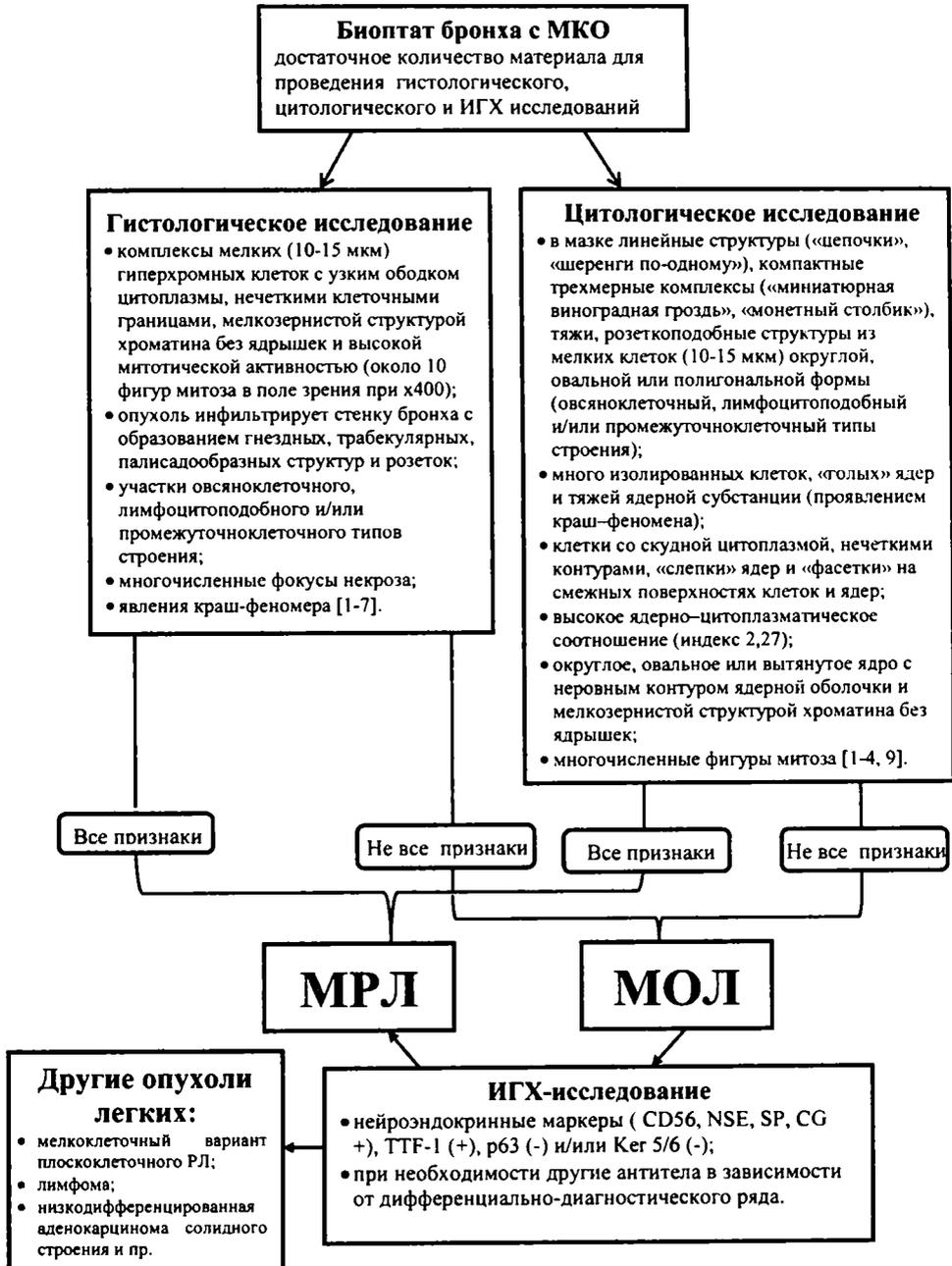


Рисунок 1. Алгоритм морфологической диагностики мелкоклеточного рака легкого по материалам биопсий бронхов.

Ker 20, p63, Ki67 и p53. В результате ИГХ-исследования было доказано, что все 10 опухолей имеют иммунофенотип МРЛ. Следует отметить, что во всех исследованных случаях определяется диффузная (хорошо или умеренно-выраженная) экспрессия NSE и CD56, в 8-ми - диффузная или очаговая (слабо или умеренно-выраженная) экспрессия SP и ни одна из опухолей не экспрессирует CG. В 8-ми случаях определяется диффузная экспрессия Ker 7 с реакцией «dot-like», а в одном случае - слабая очаговая экспрессия p63.

Проведенное ИГХ-исследование подтвердило правомочность отнесения 5-ти вышеописанных случаев к МРЛ и достоверность морфологической диагностики МРЛ на основании совокупного использования гистологического и цитологического методов исследования в группе с диагнозом МРЛ.

В оставшихся 14 случаях (14,7 %) из 95 для постановки достоверного морфологического диагноза было необходимо выполнение ИГХ-исследования. В первоначальную ИГХ-панель были включены следующие антитела: NSE, TTF-1, Ker 5/6, Ker 7 и CD45RB. В результате ИГХ-исследования было определено, что 10 опухолей (10,5%) имеют иммунофенотип МРЛ с экспрессией в разных соотношениях NSE, TTF-1, Ker 7 и отсутствием экспрессии Ker 5/6 и CD45RB. В 4 случаях диагноз МРЛ не был поставлен. В диагностическую панель были выборочно добавлены следующие антитела: CD 20, CD3, Bcl-2 alpha, Bcl-6, TdT, ER и PG. Опухоли расценены как мелкоклеточный вариант плоскоклеточного РЛ, низкодифференцированная аденокарцинома легкого солидного типа, крупноклеточная В-клеточная лимфома и метастаз карциномы молочной железы.

В случае мелкоклеточного варианта плоскоклеточного РЛ была выявлена диффузная хорошо выраженная экспрессия Ker 5/6, очаговая слабо выраженная экспрессия TTF-1 и отрицательная реакция с антителами Ker 7, NSE и CD45.

В случае низкодифференцированной аденокарциномы легкого солидного типа была выявлена диффузная хорошо выраженная экспрессия TTF-1, диффузная умеренно выраженная экспрессия Ker 7 и отрицательная реакция с другими антителами первичной дифференциально-диагностической панели (NSE, Ker 5/6 и CD45RB). Также при исследовании материала в серийных срезах удалось получить недеформированную опухолевую ткань, часть клеток которой содержат цитоплазматическую слизь (при окраске аляциановым синим).

В случае крупноклеточной В-клеточной лимфомы была выявлена диффузная хорошо выраженная экспрессия CD45RB и отрицательная реакция с оставшимися антителами первичной дифференциально-диагностической панели (NSE, TTF-1, Ker 5/6, 7), что обусловило её расширение с использованием антител CD 20, CD3, Bcl-2 alpha Oncoprotein, Bcl-6 Oncoprotein, TdT и Ki67. Клетки опухоли экспрессируют CD 20, часть клеток Bcl-2 alpha и Bcl-6, не экспрессируют CD3 и TdT, Ki67 – от 50 до 70%.

В случае метастаза карциномы молочной железы была выявлена очаговая умеренно выраженная экспрессия Ker 7 и отрицательная реакция с другими антителами пер-

вичной дифференциально-диагностической панели (NSE, TTF-1, Ker 5/6 и CD45RB). При уточнении анамнеза заболевания было выявлено наличие образования в молочной железе, что обусловило расширение панели с использованием антител Estrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor (PG) и Ker 20. Клетки опухоли диффузно экспрессируют ER, PG и очагово слабо выражено Ker 20.

На основании проведенного исследования был разработан алгоритм морфологической диагностики мелкоклеточного рака легкого по материалам мелких образцов ткани (биоптат бронха) на основании гистологического, цитологического и ИГХ-исследований (рис. 1 - *рисунки по патоморфологии мелкоклеточного рака легкого см. на специальной цветной вставке журнала - прим. ред.*). Следует подчеркнуть, что разработанный алгоритм концептуально совпадает с рекомендациями, изложенными в основных публикациях последних лет, которые сделаны ведущими легочными онкоморфологами - Travis W. D., Brambilla E., Beasley M. B. и пр. [2-4, 11].

Выводы

1. Морфологический диагноз МРЛ по данным биопсий бронхов должен основываться, в первую очередь, на гистологическом и цитологическом исследованиях.
2. Комплексная морфологическая (цитологическая и гистологическая) диагностика МРЛ по данным биопсий бронхов имеет существенное значение, так как увеличивает количество диагностированных случаев МР, не требующих дополнительных ИГХ-исследований.
3. По данным исследования в дифференциально-диагностическую панель мелкоклеточных опухолей легких входят МРЛ, лимфома, МВПРЛ и другие гистологические варианты НМРЛ. Первое место в дифференциально-диагностическом ряду МРЛ занимает МВПРЛ.
4. Первичная дифференциально-диагностическая панель при ИГХ-исследовании мелкоклеточных опухолей легких должна включать несколько нейромаркеров (NSE, SP, CG), TTF-1, p63 и/или Ker 5/6. При необходимости дополняться другими маркерами в зависимости от дифференциально-диагностического ряда. ■

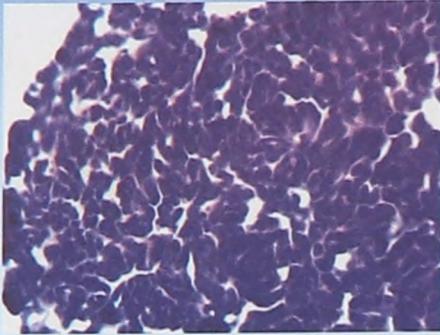
Авторы благодарят врача-патологоанатома Сорокину Н.Д. и цитолога Сипейко Л.М. за помощь в проведении данного исследования.

Костерина Н.Е., ассистент кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО «УГМУ» Министерства здравоохранения Российской Федерации, врач-патологоанатом ЦПАО ГБУЗ СО «ПТД», г. Екатеринбург; Гринберг Л.М., д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологической анатомии ГБОУ ВПО «УГМУ» Министерства здравоохранения Российской Федерации, зав. ЦПАО ГБУЗ СО «ПТД», г. Екатеринбург; Автор, ответственный за переписку - Костерина Н.Е., 620142, г. Екатеринбург, ул. Чаноева, 9, ГБУЗ СО «ПТД», hellodolly@mail.ru

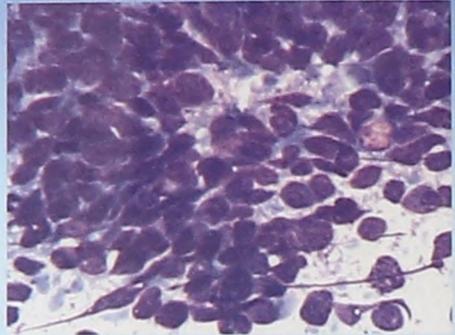
Литература:

1. Travis W.D., Brambilla E., Miller-Hermelink H.K., Harris C.C., editors. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon: IARC Press; 2004.
2. Travis W. D. Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Modern Pathology* 2012; 25:18-30
3. Krug L. M., Pietanza M. C., Kris M. G., et al. Small cell and other neuroendocrine tumors of the lung. *Hellman and Rosenberg's Cancer, Principle and Practice of Oncology* 2011; 9: 848-870.
4. Nicholson S. A., Beasley M. B., Brambilla E., et al. Small Cell Lung Carcinoma (SCLC). *The American Journal of Surgical Pathology* 2002; 26 (9): 1184-1197.
5. Мацко Д. Е., Желбунова Е. А., Имянитов Е. Н. Рак легкого: гистопатология и молекулярный патогенез. Приложение к журналу *Архив патологии* 2007: 2-22.
6. Dail D. H., Hammar S. P., editors. *Pulmonary Pathology*. NY: Springer-Verlag; 2007.
7. Краевский Н. А., Сыромятников Д. С., Саркисов Д. С., ред. *Патологоанатомическая диагностика опухолей человека*. В 2-х т. Т.1. М: Медицина; 1993.
8. William D. Travis, MD, Elisabeth Brambilla, MD, Masayuki Noguchi, MD et al. Classification of Lung Adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology* 2011; 6 (2): 244-285.
9. Шапиро Н. А. Цитологическая диагностика заболеваний легких. М: Репроцентр М; 2005.
10. Петров С. В., Райхлин Н. Т., ред. *Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека*. 4 изд., доп. и перераб. Казань; 2012.
11. Beasley M. B. Immunohistochemistry of Pulmonary and Pleural Neoplasia. *Arch Pathol Lab Med*. 2008; 132: 1062-1072.
12. Hammar S. P. Immunohistology of Lung and Pleural Neoplasms. In: Dabbs D. J., editor. *Diagnostic Immunohistochemistry*. 2nd. ed. Philadelphia: Elsevier; 2006.
13. Костерина Н.Е., Гринберг Л.М. Патоморфология мелкоклеточного рака легкого по данным биопсий бронхов (гистологические и цитологические сопоставления). *Уральский медицинский журнал* 2012; 13 (105): 83-87.

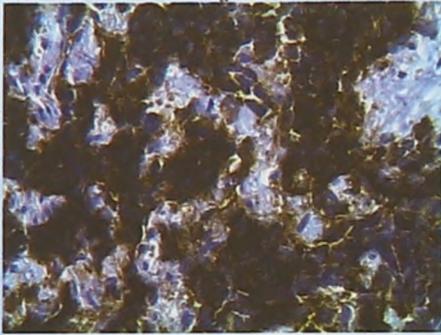
Алгоритм морфологической диагностики мелкоклеточного рака легкого по данным биопсий бронхов



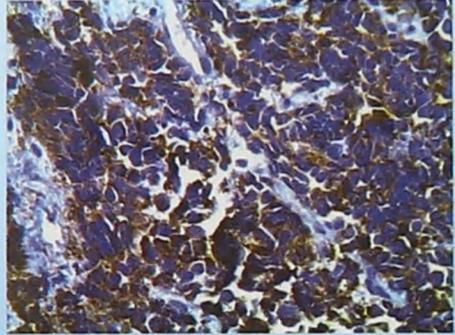
а



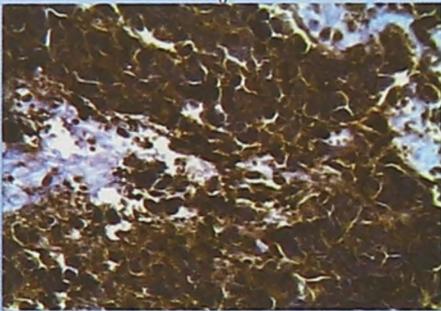
б



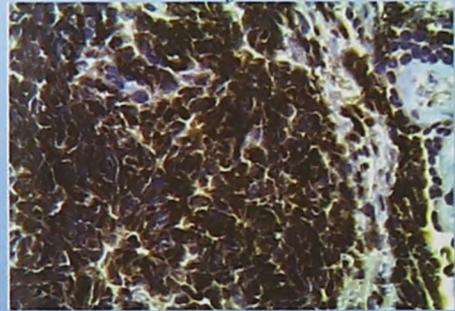
в



г



д



е

Патоморфология мелкоклеточного рака легкого.

а – гистологическое исследование, биоптат опухоли бронха (гематоксилин-эозин, X400), *б* – цитологическое исследование, отпечаток биоптата опухоли бронха (азур-эозин, X1000), ИГХ-исследование: *в* – экспрессия CD-56 (X400), *г* – экспрессия SP (X400), *д* – экспрессия NSE (X400), *е* – экспрессия TTF-1 (X400).