

УДК 611-018:616.61-006

**ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ
БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ И ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ
В ПЕРИТУМОРОЗНОЙ ЗОНЕ РАКА ПОЧКИ В ЗАВИСИМОСТИ
ОТ ПЛОИДНОСТИ ОПУХОЛИ**

**Черданцева Т.М., Бобров И.П., Климачев В.В., Брюханов В.М., Лазарев А.Ф.,
Авдалян А.М., Гервальд В.Я., Долгатов А.Ю.**

*ГОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет»,
Барнаул, e-mail: drakon@agmu.ru*

Изучены особенности гистологического строения перитуморозной зоны (ПЗ), а также биосинтетических и пролиферативных процессов, происходящих в сосудах и системе эпителий-соединительная ткань в тканях, прилежащих к раку почки. Показаны отличия в строении ПЗ в зависимости от ploidy уровня опухоли. В ПЗ полиплоидных опухолей усиливались фибропластические, склеротические и пролиферативные процессы. В зонах выраженного склероза в ПЗ отмечены очаги выраженной дисплазии тубулярного эпителия, которые при микроспектрофотометрии ДНК были неотличимы от рака. Также в ПЗ полиплоидных опухолей обнаружена редукция предрасполагающих сосудов и возникновение патологического неоангиогенеза. Высокая плотность сосудов микроциркуляции соотносилась с высоким темпом пролиферации эндотелия (по данным серебрения ядрышковых организаторов) и коррелировала с наличием регионарных и отдаленных метастазов ($r = 0,72$).

Ключевые слова: рак почки, перитуморозная зона, ploidy уровень, ангиогенез

**THE HISTOLOGICAL STRUCTURE AND SEVERAL PECULIARITIES
OF THE BIOSYNTHETIC AND PROLIFERATIVE PROCESSES
IN THE PERITUMOROUS ZONE OF THE KIDNEY'S CANCER DEPENDING
ON THE TUMOUR'S PLOIDY LEVEL**

**Cherdantseva T.M., Bobrov I.P., Klimachev V.V., Brjuhanov V.M., Lazarev A.F.,
Avdaljan A.M., Gervald V.J., Dolgatov A.J.**

*The Altay state of medical university, Barnaul;
The Altay branch GU «The Russian oncological centre of N.N. Blohina of the Russian Academy of
Medical Science, Barnaul, e-mail: drakon@agmu.ru*

The peculiarities of the histological structure of the peritumorous zone (PZ) and also the biosynthetic and proliferative processes, taking place in vessels and the epithelium-connective tissue system in tissues adjoining to a kidney's cancer, have been studied. The distinctions in the structure of the PZ depending on the tumour's ploidy level are shown here. Fibroplastic, sclerotic and proliferative processes intensified in the PZ of polyploidy tumours. The focuses of the manifest dysplasia of the tubular epithelium were noticed, which were not distinguished from the cancer by the DNA's microspectrophotometry. Also the reduction of preexisting vessels and the appearance of the pathological neoangiogenesis was found. The high density of microcirculatory vessels related to the high speed of the endothelium's proliferation (according to silvering nucleolus organizer regions) and correlated with the presence of regional and distant metastasises ($r = 0,72$).

Keywords: kidney's cancer, peritumorous zone, ploidy level, angiogenesis

В последние годы выявлен целый ряд изменений, происходящих вблизи опухоли при раке различных локализаций [1, 3, 4, 6, 7]. Показано, что перитуморозная зона (ПЗ) при многих злокачественных новообразованиях имеет важное биологическое значение. Изучение изменений тканей, граничащих с опухолью, важно для выявления фоновых процессов, способствующих развитию опухоли. Именно к этой зоне относится понятие «опухолевое поле» и в ней начинается рост опухоли, но также ПЗ во многом способствует прогрессии уже возникшей опухоли. Для оценки морфофункциональных изменений, происходящих в ПЗ, наиболее информативным является изучение системы эпителий-соединительная ткань.

Ангиогенез имеет важное значение для роста и распространения рака почки [8, 9]. Однако при сложившемся мнении о неблагоприятном значении активного опухолевого ангиогенеза влияние развития микроциркуляторного русла в ПЗ на прогрессию рака почки изучено недостаточно.

Есть основания полагать, что биологическое и клиническое поведение опухоли в значительной степени зависит от интенсивности пролиферации и генетических нарушений, отражением которых может служить несбалансированность содержания ядерной ДНК (полиплоидия и анеуплоидия) опухолевых клеток. Наиболее прогностически неблагоприятными формами анеуплоидии являются многоклоновые опухоли.

Исследований, посвященных изучению биосинтетических и пролиферативных процессов в системе эпителий-соединительная ткань в тканях, прилежащих к раку почки, и влиянию на эти процессы ploидности опухоли, в доступной литературе, нами не обнаружено.

Цель исследования: изучить особенности гистологического строения перитуморозной зоны, а также биосинтетических и пролиферативных процессов, происходящих в сосудах и системе эпителий-соединительная ткань в тканях, прилежащих к раку почки, в зависимости от ploидности опухоли.

Материал и методы исследования

Изучен операционный материал 32 больных раком почки. Средний возраст больных составил $53,4 \pm 1,2$ года. Мужчин было 18 (56,2%), женщин 14 (43,8%). По гистологическому строению опухоли были представлены светлоклеточным раком. При группировке опухолей по клиническим стадиям (I–IV) было выделено: I стадии (T1N0M0) соответствовали 14 (43,8%) наблюдений; II стадии (T2N0M0) 1 (3,1%) наблюдение; III стадии (T1N1M0, T2N1M0, T3N0M0, T3N1M0) – 7 (21,9%) и IV стадии (T4N0M0, T4N1M0, TлюбаяN2M1, TлюбаяNлюбаяM1) – 10 (31,2%).

Материал для исследования забирали из центра опухоли, перитуморозной зоны и неизменной ткани почки, из максимально отдаленных от опухоли участков. За ПЗ принимали непосредственно прилежащую к псевдокапсуле ткань опухоли, псевдокапсулу и ткань, расположенную за псевдокапсулой до неизменной ткани почки.

Степень злокачественности клеток опухоли оценивали по Fuhrman S.A. et al., (1982) [5]. В изученном материале было 12 (37,5%) опухолей степени анаплазии G1, 11 (34,4%) опухолей степени анаплазии G2 и 9 (28,1%) степени G3.

При анализе биосинтетических и пролиферативных процессов элементов перитуморозной зоны использовался комплексный подход с применением различных методов окраски: гистологических – окраска гематоксилином и эозином; гистохимических – окраска на коллаген по ван Гизон; на эластические волокна – резорцин – фуксином по Вейгерту; серебрение аргирофильных волокон по Гомори; на нейтральные гликозаминогликаны (ГАГ) ШИК – реакция по Мак–Манусу; на кислые ГАГ – окраска альциановым синим по Стивдену и коллоидным железом по Хейлу; на ДНК по Фельгену; на общие нуклеиновые кислоты по Эйнарсону и на активность аргирофильных белков, ассоциированных с областью ядрышковых организаторов (AgNOR) по Howel W.M., Black D.A. [10], в нашей модификации [2]. В каждом случае на масляной иммерсии при увеличении $\times 1000$ рассчитывали плотность микроциркуляторного русла (ПМЦР) в 20 произвольно выбранных полях зрения.

Морфометрические и микроспектрофотометрические исследования проводили с использованием системы компьютерного анализа изображений, состоящей из микроскопа Leica DME, цифровой камеры Leica EC3 («Leica Microsystems AG», Германия), персонального компьютера Pentium 4 и программного обеспечения ВидеоТест – Морфология 5,2. Пloi-

дометрию ДНК проводили на гистологических срезах, окрашенных по Фельгену. Среднее содержание ДНК в ядрах малых лимфоцитов принимали за диплоидное (2c) и использовали в качестве стандарта. Для получения стандарта в каждом срезе оценивали 25–30 лимфоцитов. Затем в исследуемых эпителиальных клетках высчитывали индекс накопления ДНК (ИНДНК) в единицах ploидности (c) и строили гистограммы клонального распределения клеток, по количеству генетического материала выраженного в процентах. Выделяли две группы опухолей:

- 1) диплоидные (< 4c);
- 2) полиploидные, анеуплоидные (> 4c).

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью пакета программ Statistica 6,0. Рассчитывали среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего значения (m), достоверность различия средних, которую рассчитывали с помощью t-критерия Стьюдента, данные считали достоверными при $p < 0,05$. Корреляционные взаимосвязи определяли путем расчета коэффициента корреляции Пирсона.

Результаты исследования и их обсуждение

В процессе исследования материал был нами распределен на 2 группы: диплоидные и полиploидные опухоли. Диплоидных опухолей оказалось 12 (37,5%), полиploидных – 20 (62,5%). ИНДНК клеток опухолей имел сильную положительную взаимосвязь со степенью анаплазии опухоли (G) ($r = 0,82$).

Для изучения процентного содержания клонов клеток для каждой группы были построены гистограммы клонального распределения по количеству генетического материала.

Гистограмма распределения ядер по количеству ДНК в группе диплоидных опухолей (группа I) имела унимодальный характер с пиком в области 2–3 c. (рис. 1).

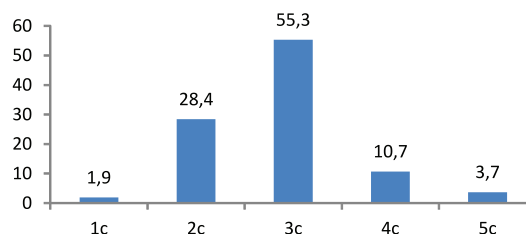


Рис. 1. Гистограмма распределения ядер по содержанию ДНК в диплоидных опухолях. По оси абсцисс – количество ДНК (в единицах ploидности); по оси ординат – количество клеток (в процентах)

Гистограмма распределения ядер по количеству ДНК в группе полиploидных опухолей (группа II) имела вид широкого плато, со сдвигом вправо и разбросом значений от 2 до 13 c, что отражало значительную многоклоновость, поли- и анеуплоидию (рис. 2).

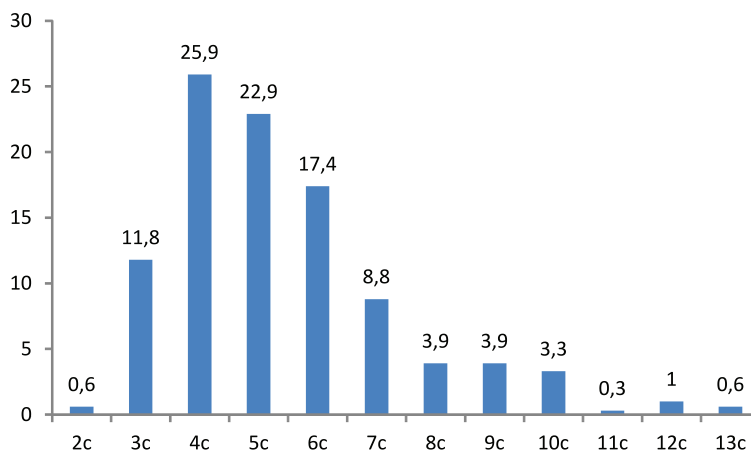


Рис. 2. Гистограмма распределения ядер по содержанию ДНК в полиплоидных опухолях. По оси абсцисс – количество ДНК (в единицах плоидности); по оси ординат – количество клеток (в процентах)

ПЗ рака почки имела различное гистологическое строение. Ширина ее колебалась от 152,5 до 2399,1 мкм и в среднем составила – $879,2 \pm 92,8$. Размеры и гистологическое строение ПЗ опухолей зависели, прежде всего, от плоидности опухоли (табл. 1).

Так, у полиплоидных новообразований (группа II) ширина ПЗ в среднем составила $1053,6 \pm 119,4$ мкм. При окраске по ван Гизону в таких ПЗ отмечалась выраженная фуксинофилия коллагеновых волокон, волокна давали интенсивную ШИК-реакцию при окраске по Мак–Манусу на нейтральные ГАГ. При окраске на эластические волокна резорцином фуксином по Вейгерту отмечено большое число тонких извитых волокон интенсивной сиреневой окраски, также отмечались толстые эластические мембраны на границе между опухолевой тканью и ПЗ. Аргирофильные волокна были утолщены, на границе ПЗ с опухолью они образовывали сплетения и мембраны. Кислые ГАГ отмечали в значительном количестве в зонах обнаружения эластических волокон. Плотность лимфо-плазмочитарной инфильтрации в ПЗ была умеренной или высокой, часто были видны фолликулоподобные структуры.

У диплоидных опухолей (группа I) ширина ПЗ в среднем составила $580,5 \pm 71,4$ мкм. Коллагеновые волокна при окраске по ван Гизону в таких ПЗ окрашивались в розоватый цвет с участками желтого, в то же время волокна коллагена были ШИК-позитивны при реакции по Мак–Манусу на нейтральные ГАГ. Кислые ГАГ в соединительной ткани не обнаруживались, но определялись в стенках сосудов. При окраске на эластические волокна резорцином – фуксином по Вейгерту отмечено высокое содержание тонких извитых волокон, тонкие эластические мембраны на

границе с опухолью обнаруживались лишь на некоторых участках. В пучках коллагеновых волокон определялись истонченные «штопорообразные» аргирофильные волокна. Плотность лимфо-плазмочитарной инфильтрации была слабой или умеренной.

Таблица 1

Морфометрические параметры элементов ПЗ в зависимости от плоидности опухоли

Параметры ПЗ	Плоидность опухолей	
	диплоидные	полиплоидные
Ширина перитуморозной зоны, мкм	$580,6 \pm 71,4^*$	$1053,6 \pm 119,4^*$
Площадь ядер эпителия канальцев, мкм ²	$38,9 \pm 2,1^*$	$56,2 \pm 5,5^*$
Площадь ядер миофибробластов, мкм ²	$32,4 \pm 2,2^*$	$64,7 \pm 4,2^*$
Плотность сосудов микроциркуляции	$5,8 \pm 0,6^*$	$8,6 \pm 0,8^*$

Примечание: * – $p < 0,05$.

В ПЗ, в большем или меньшем количестве, нами отмечались элементы канальцевого аппарата почки. В ПЗ полиплоидных опухолей канальцев было значительно больше, они выглядели замурованными в плотной соединительной ткани и содержали небольшое число клеточных элементов. Такие канальцы были окружены резко ШИК-положительной базальной мембраной. При окраске нитратом серебра по Гомори базальная мембрана выглядела утолщенной. Клетки канальцевого эпителия имели признаки атипизма: полиморфизм и

гиперхромия ядра, увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения, большое количество общих НК. Площадь клеточного ядра в среднем составила $56,2 \pm 5,5$ мкм². Число AgNORs в ядрах клеток достигало $5,2 \pm 0,3$ на 1 ядро. В ядрах канальцевого эпителия ПЗ диплоидных опухолей число AgNORs составило в среднем $2,2 \pm 0,2$ на 1 ядро (табл. 2). Ядра клеток были округлой формы, небольшого размера, гиперхромность отсутствовала. Площадь клеточного ядра составила $38,9 \pm 2,2$ мкм². Клетки располагались на тонкой ШИК-положительной базальной мембране.

Таблица 2

Параметры ядрышкового аппарата клеток ПЗ в зависимости от пloidности опухоли

Параметры ядрышкового аппарата клеток ПЗ	Пloidность опухолей	
	диплоидные	полипloidные
число ядрышек, на ядро:		
в ядрах эпителия канальцев	$1,3 \pm 0,2^*$	$1,6 \pm 0,1^*$
в ядрах миофибробластов	$1,2 \pm 0,1^*$	$1,5 \pm 0,1^*$
в ядрах эндотелия	$1,3 \pm 0,08^*$	$1,5 \pm 0,1^*$
Число AgNORs, на ядро:		
в ядрах эпителия канальцев	$2,2 \pm 0,2^*$	$5,2 \pm 0,3^*$
в ядрах миофибробластов	$1,5 \pm 0,2^*$	$2,8 \pm 0,4^*$
в ядрах эндотелия	$1,7 \pm 0,1^*$	$3,5 \pm 0,4^*$

Примечание: * – $p < 0,05$.

При микроспектрофотометрическом исследовании ДНК клеток эпителия канальцев в ПЗ обнаружено увеличение среднего содержания ДНК в полипloidных опухолях (рис. 3).

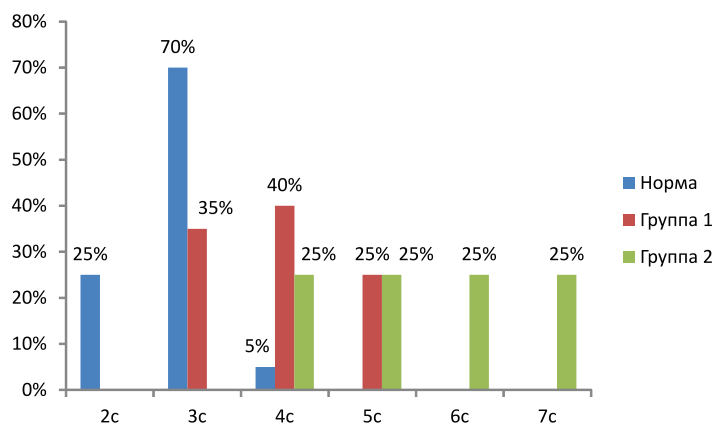


Рис. 3. Гистограмма распределения ДНК в ядрах эпителия канальцев в норме и перитуморозной зоне диплоидных и полипloidных опухолей. По оси абсцисс – количество ДНК (в единицах пloidности); по оси ординат – количество клеток (в процентах)

Увеличение ИНДНК сопровождалось нарастанием гетерогенности клеток нефротелия по содержанию ДНК и появлением поли- и анеупloidии. Также была отмечена тенденция к уменьшению коэффициента эллиптичности – от 0,75 при диплоидных опухолях до 0,69 при полипloidных опухолях.

Клетки миофибробластического ряда ПЗ полипloidных опухолей имели увеличенные ядра. Площадь ядра в среднем составила $64,7 \pm 4,2$ мкм². Они содержали 1–2 ядрышка, в среднем $1,5 \pm 0,1$ на 1 ядро, при этом отмечалось многообразие морфофункциональных типов ядрышек. Отмечали ядрышки кольцевидного, нуклеолонемного типов и переходные между ними формы. Число AgNORs в таких клетках составило $2,8 \pm 0,4$ на 1 ядро. Данные клетки можно отнести к активно синтезирующим юным миофибробластам. В ПЗ диплоидных опухолей ядра клеток миофибробластического ряда имели удлиненную волнообразную форму. Площадь ядра в среднем составила – $32,4 \pm 2,2$ мкм². Ядра содержали преимущественно одно кольцевидное ядрышко, среднее число ядрышек на 1 ядро составило $1,2 \pm 0,1$ на 1 ядро. Число AgNORs составило $1,5 \pm 0,2$ на 1 ядро. Такие клетки нами были отнесены к зрелым малоактивным миофибробластам.

При исследовании ПМЦР в ПЗ установлено вовлечение сосудов в патологический неoангиогенез. В большинстве случаев сосуды расположенные рядом с опухолью, не имели мышечной оболочки. Встречались структуры, имеющие трубчатое строение и образованные одним слоем эндотелиоподобных клеток. В ПЗ полипloidных опухолей ПМЦР составила – $8,64 \pm 0,8$, а в диплоидных опухолей – $5,8 \pm 0,6$. Также отмечали возрастание числа AgNORs до $3,5 \pm 0,4$ в эндотелии новообразованных сосудов ПЗ

полиплоидных опухолей, по сравнению с диплоидными опухолями ($1,7 \pm 0,1$). ПМЦР в ПЗ коррелировала с наличием региональных и отдаленных метастазов ($r = 0,72$). Соединительная ткань вокруг новообразованных сосудов была представлена пучками рыхлых тонких бледно окрашенных волокон. В соединительной ткани, окружающей сосуды, определялось значительное количество тучных клеток, причем в ПЗ полиплоидных и анеуплоидных опухолей преобладали дегранулированные формы тучных клеток. В предсуществующих сосудах ПЗ опухолей обеих степеней пloidности отмечали явления выраженного эластофиброза, с сужением просвета и гиперплазией эластических мембран.

Таким образом, ПЗ рака почки не является статически замершей, неактивной системой или «капсулой» опухоли в привычном понимании, а является той «ареной», на которой происходят значимые динамические преобразования биосинтетических и пролиферативных процессов в клеточных и волокнистых элементах соединительной ткани, которые, в частности, во многом зависят от пloidометрических характеристик опухоли.

Выводы

1. Обнаружена взаимосвязь между показателем ИНДНК и степенью злокачественности опухолевых клеток по Фурману ($r = 0,82$).

2. Биосинтетические, пролиферативные процессы в клеточных элементах и активность неоангиогенеза в ПЗ взаимосвязаны с пloidностью опухоли.

3. В ПЗ поли- и анеуплоидных опухолей обнаружены выраженные явления склероза и эластоза, что имеет защитный, адаптивный характер, но в то же время ведет к развитию гипоксии и диспластическим изменениям регенерирующего эпителия канальцев.

4. В ПЗ поли- и анеуплоидных опухолях по сравнению с диплоидными отмечена более высокая ПМЦР и число AgNORs в эндотелии, указывающее на увеличение потенциальной скорости роста сосудов, что способствует инвазии опухолевых клеток и метастазированию.

Список литературы

1. Прогностическое значение исследования плотности сосудов микроциркуляторного русла в опухоли и перитуморозной зоне по данным выявления белка CD31 и количества аргирофильных белков области ядрышкового организатора (AgNOR) в эндотелии при лейомиосаркоме тела матки / А.М. Авдалян, И.П. Бобров, В.В. Климачев, Н.М. Круглова, А.Ф. Лазарев // *Фундаментальные исследования*. – 2010. – №5. – С. 12–20.
2. Модификация гистохимического метода выявления ядрышковых организаторов на гистологических срезах / И.П. Бобров, А.М. Авдалян, В.В. Климачев, А.Ф. Лазарев, В.Я. Гервадьд, А.Ю. Долгатов, О.В. Самуйленкова, М.В. Ковригин, Д.С. Кобяков // *Архив патологии*. – 2010. – Т. 72, №3. – С. 35–37.
3. Федосенко К.Ф. Некоторые особенности биосинтетических и пролиферативных процессов в эпителии и строме предстательной железы при nodозной гиперплазии, раке и в перитуморозной зоне // *Вопросы онкологии*. – 2002. – Т. 48, №1. – С. 47–50.
4. Федосенко К.В., Ковальский Г.Б. Пролиферация и апоптоз эпителия при раке предстательной железы, в перитуморозной зоне и при доброкачественной гиперплазии // *Архив патологии*. – 2003. – №3. – С. 18–20.
5. Fuhrman S.A., Lasky L.C., Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma // *Am. J. Surg. Pathol.* – 1982. – Vol.6. – P. 655–663.
6. Mairinger T., Mikuz G., Gschwendter A. Nuclear chromatin texture analysis of nonmalignant tissues can detect adjacent prostatic adenocarcinoma // *Prostate*. – 1999 – Vol. 41. – P. 12–19.
7. Montironi R., Hamilton P.W., Scarpelli M. Subtle morphological changes in normal – looking epithelium in prostates with prostatic intraepithelial neoplasia of cancer // *Europ. Urol.* – 1999. – Vol. 35, № 5–6. – P. 468–473.
8. Nativ O., Sabo E., Reiss A., Wald M., Madjar S., Moskovitz B. Clinical significance of tumor angiogenesis in patients with localized renal cell carcinoma // *Urology*. – 1998. – Vol. 51. – P. 693–696.
9. Kirkali Z., Yorukoglu K., Ozkara E., Kazimoglu H., Mungan U. Proliferative activity, angiogenesis and nuclear morphometry in renal cell carcinoma // *Int J Urol.* – 2001 – Vol 8. – P. 697–703.
10. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver staining of molecular organizer regions with protective colloidal development – a 1 step method // *Experimentia*. – 1980. – Vol. 36. – P. 1014–1015.

Рецензенты:

Высоцкий Ю.А., д.м.н., зав. кафедрой нормальной анатомии человека ГОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет», г. Барнаул;

Калачев Г.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой анатомии, физиологии и валеологии ГОУ ВПО «Алтайская государственная педагогическая академия», г. Барнаул.

Работа поступила в редакцию 24.06.2011.