

Сычугов Г.В.¹, Казачков Е.Л.¹, Азизова Т.В.²

Иммуноморфологическая характеристика маркеров системы апоптоза в ткани аденокарциномы легкого у работников плутониевого производства

1 – ФГОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Челябинск; 2 – ФГУП «Южно-Уральский институт биофизики» Федерального медико-биологического агентства, г. Озерск

Sychugov G.V., Kazachkov E.L., Azizova T.V.

Immunomorphological characteristics markers of apoptosis of pulmonary adenocarcinoma at workers of plutonium manufacture

Резюме

Цель работы – определение и оценка изменений в содержании в ткани легочных опухолей маркеров апоптоза и клеточной пролиферации у лиц, подвергшихся профессиональному облучению. Изучены иммунморфологические особенности системы апоптоза на аутопсийном материале 40 случаев аденокарциномы легкого, в том числе 22 работников ядерного предприятия ПО «Маяк». Показано, что содержание белков-регуляторов системы апоптоза в очагах аденокарциномы легкого у работников плутониевого производства, подвергшихся внутреннему альфа-облучению, значительно отличается от соответствующего показателя в образцах аденокарциномы легкого у лиц, не подвергавшихся профессиональному облучению.

Ключевые слова: аденокарцинома легкого, апоптоз

Summary

This work is aimed to identify changes in levels of apoptosis and cell proliferation markers in pulmonary tumour tissues in workers following occupational radiation exposure. We analyzed immune and morphological specific characteristics of apoptosis system using autopsy samples of 40 pulmonary adenocarcinomas including 22 samples from Mayak PA radiation workers. Levels of apoptosis regulating proteins were shown to differ considerably in pulmonary adenocarcinoma foci of plutonium workers internally exposed to alpha-particles compared to those in occupationally unexposed individuals.

Key words: adenocarcinoma of lung, apoptosis, cell proliferation

Введение

В современных условиях частота возникновения опухолей легких постоянно возрастает. Отмечается рост числа злокачественных новообразований (ЗНО) органов дыхания, индуцированных воздействиями, профессиональной и непрофессиональной природы. Достоверно установлена связь между развитием ЗНО легких и различными профессиональными факторами [1].

Одним из факторов профессиональной природы является производство плутония - сложный производственный физико-химический процесс с большим разнообразием техногенных факторов радиационной и нерадиационной природы. Главным из вредных факторов в этом производстве являются аэрозоли плутония [2]. Органы дыхания – основной путь, через который альфа-частицы плутония поступают в организм человека, и являются одним из органов основного депонирования [3].

Исследование путей активации генетически-детерминированной гибели клеток сегодня является ведущим направлением большого количества научно-исследовательских работ в биологии и медицине. Обусловлено это тем, что изменение точек контроля различных этапов апоптоза вызывает патологические нарушения на многочисленных уровнях регуляции органов и систем человеческого организма. Повреждающее воздействие ионизирующего излучения активирует как рецептор-опосредованный (внешний), так и связанный с митохондриями и ядром (внутренний) путь генетически-детерминированной гибели клеток [4].

Исследованиями последних лет показаны различия в нарушениях регуляции клеточного обновления при периферическом пневмофиброзе и новообразованиях легких. Дисрегуляторные процессы системы клеточного обновления и апоптоза являются немаловажным факто-

ром в воспалительных, склеротических и канцерогенных эффектах при длительном облучении инкорпорированными частицами плутония [5]. В исследованиях показана корреляция между внутренним альфа-облучением инкорпорированным плутонием и лучевым пневмофиброзом, отличающимся от пневмофиброза, развивающегося в исходе хронических заболеваний легких [6].

Ранее нами показано, что содержание белков-регуляторов системы апоптоза в очагах плутониевого пневмофиброза и аденокарциномы легкого значительно отличается от соответствующего показателя в образцах легочной ткани у работников плутониевого производства без легочной патологии [7]. Однако до сих пор остаются недостаточно изученными изменения системы клеточного обновления при легочных опухолях, развивающихся при профессиональном альфа-облучении.

Цель исследования – определение и оценка изменений в содержании маркеров апоптоза и клеточной пролиферации в ткани аденокарциномы легкого у лиц, подвергшихся профессиональному облучению, в зависимости от суммарной поглощенной дозы внутреннего альфа-облучения и продолжительности облучения.

Материалы и методы

Были изучены иммуноморфологические характеристики распределения маркеров апоптоза, используя аутопсийные образцы 40 случаев аденокарциномы легкого (АКЛ). Исследованный материал был распределен на две группы. Первую группу составили биологические образцы 22 работников плутониевого производства (РПП) производственного объединения (ПО) «Маяк» с диагнозом аденокарциномы легкого, вторую – 18 лиц с диагнозом АКЛ, которые не подвергались профессиональному облучению и проживали в муниципальных образованиях горно-заводской зоны Челябинской области в радиусе более 100 км от Озерского городского округа и зоны Восточно-Уральского радиационного следа.

С целью проведения обзорной микроскопии образцы ткани легкого окрашивали гематоксилином и эозином. Во всех случаях было проведено углубленное морфологическое изучение аутопсийного материала с применением метода иммуногистохимии (ИГХ). Для иммунного окрашивания использовали пероксидазный метод с полимерной системой детекции (Histofine® SimpleStainMAXPROMULTI, Япония). Срезы инкубировали с моноклональными антителами к каспазе 3 (клон 3SCP01, GeneTex, USA), антигену ядер пролиферирующих клеток Ki-67 (клон MIB-1, DakoCytomation, Denmark), рецепторам онкопротеина bcl-2 (клон 100/D5, CellMarque, USA) во влажной камере 60 мин при температуре 37°C.

Для количественной оценки результатов ИГХ-реакции получали микрофотографии образцов ткани с помощью системы фиксации микроскопических изображений, состоящей из микроскопа «CarlZeissAxioskop 40», цифровой камеры «JenoptikProgResCT3», персонального компьютера на базе Intel® Core™ i7, программного обеспечения «ProgResCapturePro 2.5». Из фотосъем-

ки исключали поля зрения, содержащие дефекты ткани, дефекты окрашивания и артефакты.

Фотосъемку проводили при увеличении 200 (окуляр 10, объектив 20) и 400 (окуляр 10, объектив 40) с полным закрытием апертурной диафрагмы, при поднятом конденсоре, время экспозиции 4,11 мс, размер изображения 1024x768 пикселей, графический формат изображения JPEG. Дальнейшее количественное исследование проводили с помощью программы компьютерного анализа изображений «Морфология 5.1» (Видео-Тест, Россия). При этом рассчитывали относительную плотность изучаемых структур по отношению к общей площади исследуемого кадра при длине волны 450 нм по методике М.Ю. Смирновой и соавт. [8].

Сведения о профессиональном маршруте, дозах облучения и медицинская информация были получены из медико-дозиметрической базы данных «Клиника» [9].

Статистическую обработку полученных данных производили с использованием пакета прикладных программ «StatisticaforWindows 6.0» с расчетом медианы и верхнего и нижнего квартилей. Равенство выборочных средних проверяли по непараметрическим критериям Вальда-Вольфовица и U-критерию Манна-Уитни. Тесноту связи между изучаемыми признаками оценивали с помощью непараметрического коэффициента корреляции Спирмена. Статистически значимыми принимали различия при уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В биологических образцах как 1, так и 2 групп выявлены очаги АКЛ различной степени дифференцировки, распределенные преимущественно в периферических отделах легочной ткани. Непосредственно вокруг полей и комплексов опухолевой ткани выявлен пневмофиброз. Фиброз был наиболее выражен в перифокальных к опухоли участках. В то же время, в самой опухолевой ткани выраженность фиброза зачастую была минимальной.

Клеточный инфильтрат в параканкротной легочной ткани определялся в большом количестве случаев и был представлен в основном интрамукозальными лимфоцитами и альвеолярными макрофагами.

В развитии злокачественных новообразований наряду с изменениями клеточной пролиферации важнейшая роль отводится системе апоптоза. В нашем исследовании было изучено содержание каспазы 3 (рис.1 - *этой и другие рисунки к статье смотри на специальной цветной вставке журнала - прим. ред.*) и белка bcl-2 (рис.2) в очагах АКЛ в образцах исследуемых групп. Активация каспаз является ключевым моментом в промежуточных и терминальных стадиях апоптоза [5]. Механизм действия каспаз реализуется через инактивацию белков, которые защищают клетку от апоптоза, в частности белка bcl-2. Уменьшение количества этого белка индуцирует развитие апоптоза [10].

В ткани АКЛ РПП (1 группа) выявлено значимое превышение экспрессии онкопротеина bcl-2 ($Me=0,72$ (0,45-1,31)) по сравнению с образцами 2 группы ($Me=0,44$ (0,17-1,03), $p < 0,05$). Наиболее высокий уровень экспрес-

Таблица 1. Экспрессия биомолекулярных маркеров клеточной пролиферации и апоптоза в легочной ткани образцов (в объемных процентах от общего объема образца, об%)

Показатель	Обозначение	crr32	bcl-2	Ki-67
1 группа (РПП)				
Число наблюдений	n	22	22	22
Медиана	Me	0,123	0,720	0,316
Ниж. квартиль	QL	0,697	0,450	0,094
Верх. квартиль	QU	1,787	1,310	0,912
2 группа (группа сравнения)				
Число наблюдений	N	18	18	18
Медиана	Me	7,32	0,44	8,45
Ниж. квартиль	QL	4,61	0,17	2,72
Верх. квартиль	QU	12,01	1,03	12,74

сии апоптогенного маркера каспазы 3 обнаружен во 2 группе (Me=7,32 (4,61-12,01)); причем уровень данного маркера в ткани опухоли превысил аналогичный показатель, выявленный в группе РПП на порядок (Me=0,123 (0,697-1,787), $p<0,001$).

Уровень экспрессии антигена ядер пролиферирующих клеток Ki-67 также был значительно повышен в ткани АКЛ во 2 группе образцов (Me=8,45 (2,72-12,74)) и различался с соответствующим показателем в 1 группе на порядок (Me=0,316 (0,094-0,912), $p<0,001$) (рис. 3).

Результаты экспрессии биомолекулярных маркеров клеточной пролиферации и апоптоза в легочной ткани образцов исследуемых групп представлены в таблице 1.

Был проведен корреляционный анализ взаимосвязи между изучаемыми параметрами, а также дозами и продолжительностью внутреннего альфа- и внешнего гамма-излучения.

Ранее нами было показано [7], что в 1 группе (РПП) выявлены отрицательные корреляционные взаимосвязи сильной степени между продолжительностью альфа-облучения и экспрессией маркера апоптотической активности каспазы 3 (crr32) в опухолевой ткани ($r=-0,76$; $p=0,013$), а также положительные корреляционные взаимосвязи сильной степени с экспрессией crr32 в легочной ткани, окружающей опухоль ($r=0,78$; $p=0,033$).

Также при АКЛ выявлены отрицательные корреляционные взаимосвязи сильной степени между продолжительностью альфа-облучения и экспрессией онкобелка bcl-2 как в опухолевой ткани ($r=-0,87$; $p=0,041$), так и в легочной ткани, окружающей опухоль ($r=-0,697$; $p=0,016$). В то же время, в ткани АКЛ РПП выявлены отрицательные корреляционные взаимосвязи сильной степени между продолжительностью внутреннего альфа-облучения и пролиферативной активностью клеток опухоли ($r=-0,69$; $p=0,01$), а также отрицательные корреляционные взаимосвязи

умеренной степени пролиферативной активности клеток перифокальной зоны опухоли с суммарной поглощенной дозой внутреннего альфа-излучения в легких ($r=-0,34$; $p=0,033$).

Во 2 группе выявлена положительная корреляционная зависимость умеренной степени выраженности между экспрессией в опухолевой ткани маркера апоптотической активности каспазы 3 и антигена ядер пролиферирующих клеток Ki-67 ($r=0,32$; $p<0,05$). Корреляционные связи между экспрессией онкопротеина bcl-2 и Ki-67 ($r=0,25$; $p<0,05$), а также bcl-2 и каспазой 3 ($r=0,1$; $p>0,05$) имели слабый положительный характер и низкую статистическую значимость.

Заключение

В генезе злокачественных новообразований наряду с изменениями клеточной пролиферации важнейшая роль отводится системе апоптоза. При развитии аденокарциномы легкого у работников плутониевого производства установлена взаимосвязь между продолжительностью альфа-облучения и экспрессией маркера апоптотической активности каспазы 3 и онкобелка bcl-2 как в опухолевой ткани, так и в легочной ткани, окружающей опухоль.

Содержание белков-регуляторов системы апоптоза в очагах аденокарциномы легкого у работников плутониевого производства статистически значимо отличается от соответствующего показателя в образцах аденокарциномы легкого у лиц, не подвергавшихся профессиональному облучению. При этом отмечается выраженное снижение уровня экспрессии каспазы 3 и Ki67 в ткани аденокарциномы легкого у работников плутониевого производства.

Продолжительность и доза внутреннего альфа-облучения оказывают выраженное негативное воздействие на экспрессию белков-регуляторов системы апоптоза в опухолевой ткани. ■ 

Сычугов Г.В. – к.м.н., ассистент кафедры патологической анатомии и судебной медицины ФГОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск, начальник ГБУЗ ЧОПАБ, г. Челябинск; **Казачков Е.Л.** – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии и судебной медицины ФГОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск; **Азизова Т.В.** – к.м.н., зам. директора по науке, зав. клиническим отделом ФГУП ЮУрИБФ, г. Озерск, заведующая ЦПРП ЦМСЧ №71, г. Озерск. Автор, ответственный за ведение переписки - Казачков Е.Л., 454 052, Челябинск, а/я 6132, тел. 8(351)232-01-45, e-mail: doktorkel@narod.ru

Литература:

1. Гринберг Л.М., Валамина И.Е., Мецержакова Е.Ю. Патоморфологическая диагностика сочетанных опухолевых и пылевых поражений легких по материалам резекций. Материалы V съезда Российского общества патологоанатомов – М.: Группа МДВ, 2017. – С. 81-82.
2. Плутоний. Радиационная безопасность. Под ред. Л.А. Ильина, М: Изд.АТ; 2005.
3. Бисалиев Р.В. Состояние респираторного тракта человека и экспериментальных животных при радиационном воздействии. *Соврем.наукоемкие технологии.* 2007; 5: 62-3.
4. Андрийчук Т.Р., Ракиша Н.Г., Остапченко Л.И., Цудзевич Б.А. Некоторые аспекты реализации радиационно-индуцированного апоптоза. VII Съезд по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность): тезисы докладов. – Москва: РУДН, 2014: 17.
5. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and function during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999; 68: 383-424.
6. Park JF, Watson CR, Buschbom RL, Dagle GE, Strom DJ, Weller RE. Biological effects of inhaled $^{239}\text{PuO}_2$ in Beagles. *Radiat Res.* 2012 Nov; 178(5):447-67.
7. Сычугов Г.В., Казачков Е.Л., Азизова Т.В., Теплякова О.В., Ревина В.С. Иммуноморфологическая характеристика аденокарциномы легкого у работников плутониевого производства. *Уральский медицинский журнал.* 2016; 03 (136): 33-39.
8. Смирнова М.Ю., Джемлиханова Л.Х., Костючек И.Н., Кветной И.М., Ниаури Д.А., Пальцев М.А. Количественная иммуногистохимия: оптимизация анализа экспрессии сигнальных молекул в миометрии. *Арх. патологии.* 2010; 4: 51-5.
9. Азизова Т.В., Тепляков И.И., Григорьева Е.С., и соавт. Медико-дозиметрическая база данных «Клиника» работников ПО «Маяк» и их семей // *Медицинская радиология и радиационная безопасность.* 2009. Т.54. №5. С.26-35.
10. Пальцев М.А., Кактурский Л.В., Зайратьянц О.В., редакторы. *Патологическая анатомия: национальное руководство.* М:ГЭОТАР-Медиа; 2011.

Иммуноморфологическая характеристика маркеров системы апоптоза в ткани аденокарциномы легкого у работников плутониевого производства

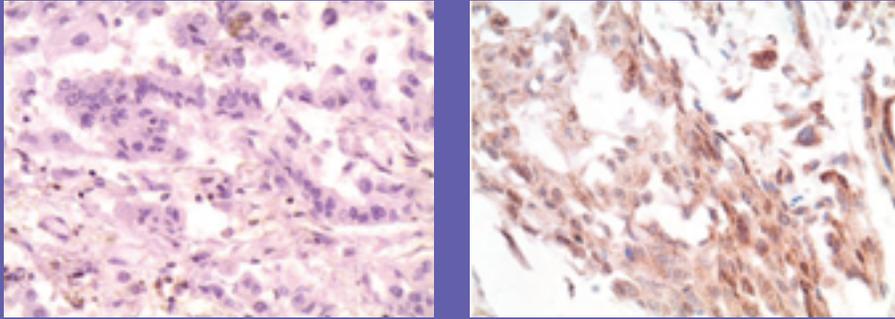


Рис 1. Экспрессия каспазы 3 в ткани АКЛ в образце 1 группы (РПП) (слева) и в ткани АКЛ в образце 2 группы (справа). Иммуногистохимический метод с АТ сpp32, полимерная тест-система, х400.

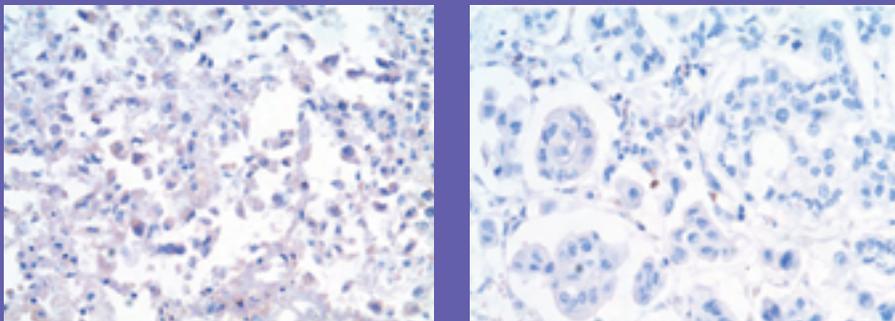


Рис 2. Экспрессия онкобелка bcl-2 в ткани АКЛ в образце 1 группы (РПП) (слева) и в ткани АКЛ в образце 2 группы (справа). Иммуногистохимический метод с АТ bcl-2, полимерная тест-система, х400.

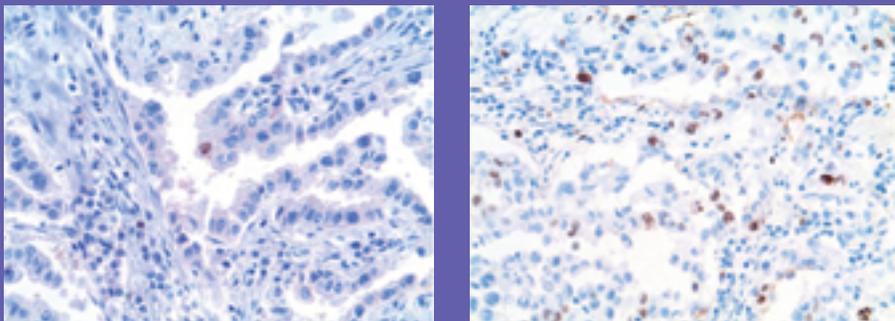


Рис 3. Экспрессия Ki67 в ткани АКЛ в образце 1 группы (РПП) (слева) и в ткани АКЛ в образце 2 группы (справа). Иммуногистохимический метод с АТ против Ki67, полимерная тест-система, х400.