

616.24-001.29

POSTRADIAČNÍ PLICNÍ ZMĚNY - VÝVOJ A DIAGNOSTIKA MORFOLOGICKÝCH ZMĚN

¹Npor. MUDr. Jan ÖSTERREICHER, ¹doc. MUDr. Pavel PETÝREK, CSc., ¹doc. RNDr. Jiřina VÁVROVÁ, CSc., ²MUDr. Jan NOŽIČKA¹Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové
(rektor: plk. doc. MUDr. Svatopluk Býma, CSc.)²Fingerlandův ústav patologie Fakultní nemocnice, Hradec Králové
(přednosta: prof. MUDr. Ivo Šteiner, CSc.)

Úvod

Po ozáření horní poloviny těla nebo po celotělovém ozáření absorbovanou dávkou větší než 8 Gy dochází k rozvoji radiační pneumonitidy (RP), obvykle po šestnáctidenní latenci. Tak dlouhé období vybízí k ovlivnění patogenetických mechanismů dříve, než dojde ke klinické manifestaci. K tomu, aby bylo možné cíleně terapeuticky zasáhnout, je nutné mít informace o rozsahu a rozvoji morfologických abnormalit dané tkáně, která je postižena ionizujícím zářením.

Získání ucelených patologických dat je u lidí, na rozdíl od pokusných zvířat, velký problém. Avšak histopatologické změny u experimentálních zvířat je možno extrapolovat i na člověka, a tak je možno se opírat o výsledky experimentálních prací.

Morfologický obraz

Při RP je makroskopicky popisováno zvýšení hmotnosti plic a přítomnost pleurálního výpotku (13, 16). Plíce jsou na řezu suché, bledé, hutné, se silně sníženou vzdušností (2).

Makroskopické abnormality při radiační fibróze (RF) se neobjevují dříve než za 30 týdnů od ozáření. Plicní tkáň je při vyšetření pohledem tuhá, síťovaná vazivem, zvláště pak pod pleurou. Zde bývá vidět bílá nitkovitá síť. Takový obraz byl pojmenován jako „lymphangitis reticularis“. Pokud je síť tvořena silnými pruhy, pak se nazývá „lymphangitis trabecularis“. Makroskopické alterace jsou přítomny pouze v ozářených okresech. Vzdušnost plicní tkáně je vzhledem k fibrotizaci snížena (2, 16). Down a Steel (3) navíc uvádějí v experimentu na myších přítomnost pleurálního výpotku.

V histopatologickém obraze ozářených savčích plic můžeme pozorovat v jednotlivých časových intervalech dynamický vývoj změn:

Po ozáření hrudníku se během prvních 24 hodin objevuje v plicních cévách městnání a současně je popisován intraalveolární edém. V tomto období byla také zaznamenána přítomnost zvýšeného množství makrofágů v plicním parenchymu (4, 12).

Kongesce i edém jsou úzce spojeny s poruchou endotelu kapilár alveolů, která byla pozorována v prvních 5 dnech po ozáření (4, 12). Popisované zduření endoteliálních buněk je následováno oddě-

lením od bazální membrány. Na takto obnaženou membránu pak nasedají trombocyty a vznikající destičkové tromby uzavírají lumen plicních kapilár. Rekanalizace obvykle probíhá do 6 měsíců, avšak výměna plynů je i nadále ztěžována perikapilární fibrózou (8, 11, 12).

Třetí až osmý týden po ozáření je možné pozorovat zánětlivé změny plic vznikající následkem výše uvedených poruch endotelu, kdy vzhledem ke zvýšené permeabilitě kapilár dochází k průniku plazmatických proteinů do alveolů (7). Čím větší je absorbovaná dávka, tím větší je intenzita projevů a tím déle přetrvává zvýšený obsah proteinů v alveolech (1).

Mezi osmým až šestnáctým týdnem po ozáření se při sekci zjišťuje zvýšení hmotnosti plic a při histologickém vyšetření bylo v alveolech pozorováno vyšší množství makrofágů. Stroma septa je edematózní, obsahuje mírně zvýšený počet mononukleárních buněk a fibroblastů (4, 7, 16). V alveolárním epitelu dochází k úbytku pneumocytů I. typu s prominentní hyperplazií pneumocytů II. typu. Pneumocyty II. typu jsou totiž kmenovou buňkou pro pneumocyty I. typu a jejich hyperplazie je přirozeným důsledkem snahy nahradit odumřelé pneumocyty I. typu. U pneumocytů II. typu jsou popisována hyperchromatická jádra a zmnožení cytoplazmatických sekretorických lamelárních tělísek. Tělíska obsahují nově tvořený surfaktant a jsou vhodným morfologickým korelátem pro sledování jeho tvorby.

Ulich a spol. (18) zaznamenali 2 rozdílné obrazy proliferace pneumocytů II. typu. Prvním z nich je tzv. „uzlíková“ (knobby) proliferace, kdy kubický pneumocyt II. typu vytváří vícevrstevné, pyramidě podobné uzlíky základnou nasedající na bazální membránu a hrotem směřujícím do lumen alveolu. Druhým obrazem proliferace pneumocytů II. typu je difúzní proliferace, kdy tyto zmnožené pneumocyty vystylají alveoly v jedné vrstvě. Zmíněné obrazy proliferace byly popsány po stimulaci pneumocytů II. typu podáním KGF (Keratinocyte Growth Factor).

Sedmnáctý až třicátý týden po ozáření je období charakteristické pro manifestaci klinického obrazu RP. Histologické vyšetření v této fázi popisuje intersticiální edém, ztlustění alveolo-kapilárního septa, zánětlivou infiltraci alveolů a zvýšenou buněčnost vazivové tkáně (15, 16).

Histologické změny na světelně mikroskopické

úrovni, specifické pro radiační fibrózu, lze pozorovat už od 30. týdne po lokálním ozáření hrudníku. Mikroskopicky v ozářené části plic lze sledovat nahromadění pěnovitých buněk v alveolech, ztlustění alveolárních stěn a jejich zvýšenou buněčnost, tj. vzestup počtu fibroblastů a fibrocytů. Dále jsou v intersticiu zjistitelná depozita nepravidelně uspořádaných kolagenních vláken (4, 15). Někdy se pro takový druh fibrotizace užívá termín „cirhóza plic“ (2).

Fibroblasty jsou často větší než fibroblasty neozářených tkání. Mají bazofilnější cytoplazmu, což je pravděpodobně dáno větším počtem ribozomů. Dále obsahují velká hyperchromatická jádra nepravidelného tvaru. Takové bizarní buňky jsou popisovány jako „radiační fibroblasty“ nebo jako „fibroblasty ve tvaru vlaštovčího ocasu“ (swallow-tail fibroblasts). Bývají diagnostikovány i po několika letech od ozáření plic velkými dávkami (4, 10).

Také elastické fibrily plicních cév a alveolo-kapilárních sept bývají ionizujícím zářením poškozeny a přerušeny. Svazek takových roztřepených a přerušovaných elastických vláken je možno sledovat ve ztlustělých septech. Tyto abnormality mohou hrát důležitou roli v často popisovaném vzniku spontánních ruptur velkých plicních cév (4).

Watanabe a spol. (19) už v roce 1974 popsali žírné buňky jako vedoucí komponentu infiltrátu alveolárních sept i alveolů samotných u ozářených plic potkanů.

Po ozáření se také v průběhu měsíců objeví nespecifické postradiační změny, jako jsou myointimální proliferace arteriol a nahromadění pěnovitých buněk v intimě cév (4).

Při histopatologickém vyšetření byla zaznamenána druhově závislá odlišnost. V lidských a psích plicích jsou, na rozdíl od potkanů a králíků, přítomny hyalinní membrány obsahující fibrin, od stěny alveolu odloučené pneumocyty I. typu a plazmatické proteiny proniklé díky zvýšené permeabilitě alveolo-kapilární membrány. Hyalinní membrány bývají různé velikosti a jsou obsaženy v alveolech i alveolárních duktech. Druhová odlišnost výskytu hyalinních membrán se vysvětluje sníženou hladinou aktivátoru plazminogenu po ozáření plic u lidí a psů, na rozdíl od potkanů a králíků (5, 6).

Diagnostické možnosti histologického vyšetření

V experimentu se používá kombinace přehledného barvení a speciálních metodik. Přehledná barvení poskytují pouze celkovou informaci o vyšetřovaném preparátu. Mezi zmíněné metody patří barvení hematoxylinem-eozinem, azanem podle Heidenhaina, modrým trichromem podle Massona a barvení podle van Giesona. Všechna barvení, mimo hematoxylin-eozin barevně odliší také kolagenní vlákna. Mezi přehledná barvení je řazen také fosfowolframový hematoxylin, který navíc od ostat-

ních struktur odliší fibrin a mitochondrie tmavomodrým zabarvením.

Pomocí speciálních histochemických barvení můžeme diagnostikovat i ty postradiační plicní změny, které se výše popsanými metodami dostatečně nezvýrazní. Změny hlenotvorby bronchiálního epitelu lze znázornit barvením alcianovou modří, abnormality architektiky elastických vláken plicních cév je možné sledovat pomocí barvení rezorcínovým fuchsinem podle Weigerta (obarvuje elastická vlákna modročerně) nebo barvením orceinem (zvýrazňuje elastická vlákna červenohnědě). K detekci neutrofilních granulocytů v období výskytu radiační pneumonitidy se používá barvení chloracetát esterázou (červená cytoplazma). Popisovanou přítomnost mastocytů ve fázi radiační fibrózy lze zvýraznit Lunovým barvením. K diagnostice kolagenních depozit je možno využít barvení Massonovými trichromy. Ty se dělí podle barevného tónu, jimiž vlákna barví, na modrý (viz výše), zelený a žlutý.

Jelikož po vystavení organismu ionizujícímu záření dochází ke snadnějšímu průniku bakterií do plic, je nutno daný vzorek tkáně vyšetřit Gramovým a Ziehl-Neelsenovým barvením.

Na světelné mikroskopické úrovni můžeme využívat také imunohistochemických metod. Z nepřehledného množství monoklonálních a polyklonálních protilátek se v diagnostice rozvoje postradiačních plicních změn používá těch, které mají vysokou afinitu pro „cílové“ buňky, a jejich produkty (viz níže) ovlivňující vznik a rozvoj RP a RF.

V poslední době světová literatura obsahuje stále více studií, kde byla použita *in situ* hybridizace mRNA. Touto, jednou z nejnovějších histologických metod, mohli Rubin a spol. (14) detekovat množství přepsané mRNA sledovaného produktu pomocí speciálně upravené sekvence nukleotidů vázající cílovou mRNA. Tak je možné získat informaci o změnách exprese zkoumaného genu po ozáření.

Z hlediska radiačního poškození plic existuje pět typů buněk, které považujeme za cílové. Jsou to pneumocyty I. a II. typu, endoteliální buňky, makrofágy a buňky epitelu bronchiální sliznice (17).

1. pneumocyty I. typu vytvářejí jednovrstevnou dlaždicobuněčnou výstelku alveolů. Na jakýkoli patologický podnět reagují nekrozou a odloučením od bazální membrány, čímž se mohou podílet na zvýšení alveolo-kapilární permeability. Bylo zjištěno, že tento typ buněk jeví silnou pozitivitu při barvení cytokeratinem 7 a 19 (CK7, CK19) (9). Použitím CK7 a CK19 a vizualizací diaminobenzidinem (hnědé zbarvení) pozorujeme místa, kde chybí odloučený pneumocyt I. typu jako defekt barvení v místě chybějícího alveolárního epitelu.

2. a) Pneumocyty II. typu se dobře znázorňují cytokeratinem 8 a 18 (9).

b) Další možnosti k identifikaci pneumocytu II. typu se jeví antisurfaktantový apoprotein, který se váže v intraplazmatických lamelárních tělíkách

na syntetizovaný surfaktant. Tato lamelární tělíska jsou dále pinocytózou exprimována do lumen alveolu. Antisurfaktantový apoprotein takto může diagnostikovat zmnožení počtu lamelárních tělísek, která jsou morfologickým korelátem postradiační proliferace pneumocytu II. typu.

c) Monoklonální protilátka CD 44, na rozdíl od surfaktantového apoproteinu, je specifická jen pro proliferující pneumocyt II. typu. Malá exprese byla pozorována také u makrofágů a endoteliálních buněk. Naopak pneumocyty I. typu se nebarví vůbec.

Je třeba dodat, že Kasper a spol. (9) definovali pneumocyt III. typu (tzv. brush cell). Od pneumocytu II. typu se liší nepřítomností lamelárních sekretorických granulí a přítomností ostrůvku mikrokvlů na apikální straně buňky. Pneumocyt III. typu můžeme diferencovat pouze cytokeratinem 18, který má však k němu velkou afinitu (9).

3. Endoteliální buňky plicní cév lze diferencovat pomocí monoklonální protilátky CD 34 a CD 31, která reaguje se 130 kDa glykoproteinem, zvaným též PECAM-1 (platelet cell adhesion molecule-1). Tato molekula je hojně obsažena právě v endoteliálních buňkách, kde můžeme detekovat postradiační abnormality jak v morfologii endotelu, tak v samotné PECAM-1.

4. Makrofágy je možno diferencovat pomocí protilátky CD 68, která váže monocyty a makrofágy, nikoli granulocyty.

5. Buňky bronchiálního epitelu není nutno speciálně barvit imunohistochemickými metodami, protože jsou dobře detekovatelné použitím alciánové modři.

Závěr

Imunohistochemické a hybridizační metody jako nástroj histopatologické diagnostiky poškození plic po ozáření se jeví jako velmi perspektivní. Pomocí těchto metod bude možno již v časném stadiu po ozáření diagnostikovat poškození jednotlivých typů buněk plic, a nalézt tak účinnější terapeutický prostředek ovlivňující vznik a rozvoj radiační pneumonitidy a fibrózy.

Souhrn

Literární přehled předkládá syntézu nových a stávajících poznatků o morfologii postradiačních plicních změn. Jsou komentovány diagnostické možnosti pomocí histochemických a imunohistochemických metod. Dále se práce zabývá detekcí abnormalit „cílových“ buněk (pneumocytů I. a II. typu, endoteliálních buněk, makrofágů a epitelálních

buněk bronchiální sliznice), především imunohistochemickými metodami. Použití imunohistochemických metod je perspektivní z hlediska osvětlení mechanismů postradiačního poškození plic.

Literatura

1. AHIER, R. - ANDERSON, R. L. - COULTAS, P.: Response of mouse lung to irradiation. J. Europ. Soc. Therap. Radiol. Oncol., 1984, vol. 3, p. 61-68.
2. BEDNÁŘ, B.: Patologie II. 1. vyd. Praha. Avicenum, 1983. 592 s.
3. DOWN, J. D. - STEEL, G. G.: The expression of early and late damage after thoracic irradiation: A comparison between CBA and C57Bl mice. Radiat. Res., 1983, vol. 96, p. 603-610.
4. FAJARDO, L. F.: Pathology of radiation injury. 1st ed. Masson Publishing, USA. 285 p.
5. FAJARDO, L. F. - ACKERMAN, S.: Scanning electron microscopy of irradiated lung. Unpublished.
6. FLEMING, W. H. - SZAKACS, J. E. - KING, E. R.: The effect of gamma radiation on the fibrinolytic system of dog lung and its modification by certain drugs: relationship to radiation pneumonitis and hyaline membrane formation in lung. J. nucl. Med., 1962, vol. 3, p. 341-351.
7. GROSS, N. J.: The pathogenesis of radiation - induced lung damage. Lung, 1981, vol. 159, p. 115-125.
8. HASLETON, P. S.: Spencer's pathology of the lung. 5th ed. USA. The McGraw-Hill Companies, Inc., 1996. 1283 p.
9. KASPER, M., et al.: Colocalization of cytokeratin 18 and villin in type III alveolar cells (brush cells) of the rat lung. Histochemistry, 1994, vol. 101, p. 57-62.
10. DOSTÁL, M., aj.: Vojenská radiobiologie 2. díl. 1. vyd. Hradec Králové. VLVDÚ JEP, 1975. 114 s.
11. MAISON, J. R.: The ultrastructure of the lung of mice exposed to a supralethal dose of ionizing radiation on the thorax. Radiat. Res., 1970, vol. 44, p. 545-564.
12. REŠL, M.: Morfologie postradiačních změn plic. Inf. Zprav. VLVDÚ Hradec Králové, 1986, roč. 27, s. 89-95.
13. RONGEN, E. van - TAN, C. - ZURCHER, C.: Early and late effects of fractionated irradiation of the thorax of WAG/Rij rats. Br. J. Cancer, 1986, vol. 53, p. 333-335.
14. RUBIN, P., et al.: A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1995, vol. 33, p. 99-109.
15. SIEMANN, D. W. - HILL, R. P. - PENNEY, D. P.: Early and late pulmonary toxicity in mice evaluated 180 and 420 days following localized lung irradiation. Radiat. Res., 1982, vol. 89, p. 396-407.
16. TRAVIS, E. L.: The sequence of histological changes in mouse lungs after single doses of X-rays. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1980, vol. 6, p. 345-347.
17. TRAVIS, E. L. - TUCKER, S. L.: The relationship between functional assays of radiation response in the lung and target cell depletion. Br. J. Cancer, 1986, vol. 53, p. 304-319.
18. ULICH, T. R., et al.: Keratinocyte growth factor is a growth factor for type II pneumocytes in vivo. J. Clin. Invest., 1994, vol. 93, p. 1298-1306.
19. WATANABE, S., et al.: Mast cells in the rat alveolar septa undergoing fibrosis after ionizing radiation. Lab. Invest., 1974, vol. 31, p. 555-567.

Klíčová slova: Radiobiologie; Plice; Histologie; Imunohistochemie.

Do redakce došlo 13. 1. 1997