

# Komórki neuroendokrynne tchawicy u chorych z rakiem krtani

## Neuroendocrine cells in the trachea of patients with larynx cancer

MONIKA OLSZEWSKA<sup>1/</sup>, STANISŁAW CHODYNICKI<sup>2/</sup>, LECH CHYCZEWSKI<sup>3/</sup>, MAREK ROGOWSKI<sup>2/</sup>, ALBERT AUGUSTYNOWICZ<sup>4/</sup>, MACIEJ CHODYNICKI<sup>5/</sup>

<sup>1/</sup> Oddział Medycyny Ratunkowej Dzieci SPDSK AM, ul. Waszyngtona 17, 15-269 Białystok

<sup>2/</sup> Klinika Otolaryngologii AM, ul. Skłodowskiej-Curie 24A, 15-264 Białystok

<sup>3/</sup> Zakład Biologii Molekularnej AM, ul. Waszyngtona 13, 15-269 Białystok

<sup>4/</sup> Zakład Patomorfologii Lekarskiej AM, ul. Waszyngtona 13, 15-269 Białystok

<sup>5/</sup> Department of Psychiatry, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland

**Wprowadzenie.** Komórki neuroendokrynne znajdują się w nabłonku dróg oddechowych człowieka i należą do układu APUD (*Amine Precursors Uptake and Decarboxylation*). Najbardziej charakterystyczną ich cechą jest obecność ziarnistości neurowydzielniczych. Uważane są one za miejsce syntetyzowania, magazynowania i wydzielania amin i hormonów peptydowych.

**Cel.** Ocena morfometryczna komórek neuroendokrynnych (NE) w nabłonku tchawicy u chorych z rakiem krtani.

**Materiał i metody.** Wycinki tchawicy pobrano podczas tracheotomii od 30 pacjentów z nowotworami krtani oraz 20 pacjentów, hospitalizowanych na oddziałach intensywnej opieki medycznej. Pobrany materiał został opracowany histologicznie i zabarwiony z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko chromograninie A, neurospecyficznemu enolazie, synaptofizynie i kalcytoninie.

**Wyniki.** U chorych z rakiem krtani obserwowano komórki neuroendokrynne u wszystkich pacjentów (100%), natomiast w grupie porównawczej wykazano obecność komórek neuroendokrynnych jedynie u 45% pacjentów. W grupie pacjentów onkologicznych obserwowano większe zagęszczenie komórek NE (średnio 334 komórki na mm<sup>2</sup> powierzchni nabłonka tchawicy w porównaniu z 20 komórkami na mm<sup>2</sup> w grupie porównawczej) oraz większe ich zróżnicowanie pod względem wielkości.

**Wnioski.** U chorych z nowotworami krtani obserwuje się zwiększoną proliferację i polimorfizm komórek neuroendokrynnych nabłonka tchawicy.

*Otolaryngologia, 2005, 4(4), 183-186*

**Słowa kluczowe:** nabłonek tchawicy, komórki neuroendokrynne, rak krtani

**Introduction.** Neuroendocrine cells are localized in the respiratory tract epithelium and belong to the APUD (*Amine Precursors Uptake and Decarboxylation*) system. Their most characteristic feature is the presence of neurosecretory granulations. They synthesize, store and secrete amines and peptide hormones.

**Aim.** Morphometric assessment of neuroendocrine cells in the trachea of larynx cancer patients.

**Material and methods.** Fragments of tracheas were obtained during the tracheostomy from 30 patients with cancer of the larynx and 20 patients hospitalized in intensive care units. Primary antibodies against chromogranin A, neurospecific enolase, synaptophysin and calcitonin were used in immunohistochemical tissue evaluation.

**Results.** Increased numbers of neuroendocrine cells in the tracheal epithelium were observed in all patients with larynx cancer, while in the control group the neuroendocrine cells were observed only in 45% patients. Higher neuroendocrine cell densities (on average 334 cells per sq.mm of the tracheal epithelium in the cancer patients vs. 20 cells per sq.mm in controls); neuroendocrine cells of the cancer patients were also found to vary considerably more in size.

**Conclusions.** Increased neuroendocrine cell polymorphism and proliferation rates were observed in the larynx cancer patients.

*Otolaryngologia, 2005, 4(4), 183-186*

**Key words:** Tracheal epithelium, neuroendocrine cells, larynx cancer

Płucne komórki neuroendokrynne zostały po raz pierwszy opisane przez Feyerter'a w 1938 i są częścią rozsianego systemu endokrynnego, zwanego systemem *Amine Precursors Uptake Dekarboxilation* (APUD) [1]. Termin ten został wprowadzony przez Pearse'a, dla wyodrębnionej grupy komórek o szczególnych cechach cytochemicznych i ultrastrukturalnych [2,3]. Komórki te pojawiają się około 8 tygodnia życia płodowego,

a przez następne 10 tygodni różnicują się w pojedyncze komórki lub ich skupiska zwane ciałami neuroepitelialnymi [4]. Komórki neuroendokrynne (NE) są bardzo liczne u płodu i noworodka, a następnie ich liczba znacznie się zmniejsza [5]. W warunkach fizjologii na jeden centymetr błony podstawnej dróg oddechowych (płuc) obserwowana jest jedna komórka neuroendokrynną [6,7]. Obecność komórek NE jest charakterystyczna dla wielu

gruczołów dokrewnych w obrębie przewodu pokarmowego, układu moczowo-płciowego, nerwowego i dróg oddechowych. Jedną z cech tych komórek są ziarnistości zawierające wiele substancji syntetyzowanych, magazynowanych i wydzielanych [4]. Wśród nich należy wymienić substancje biologicznie aktywne, takie jak: serotonina, synaptofizyna, kalcytonina, chromogranina, neurospecyficzna enolaza, peptyd związany z genem kalcytoniny, enkefalina, endotelina, bombezyna, czyli peptyd uwalniający gastrynę, somatostatyna, cholecystokinina i substancja P [4,5,8,9]. Różne rodzaje peptydów mogą być umiejscowione w różnych komórkach, ale również w obrębie tej samej komórki, a nawet tej samej ziarnistości [5]. Komórki NE wydzielają wytwarzane przez siebie substancje do podścieliska, bardzo blisko błony mięśniowej oskrzeli i tchawicy, ale również w pobliżu innych komórek nabłonkowych i do światła oskrzela [5]. U ludzi komórki NE obecne są na całej długości błony śluzowej tchawicy, oskrzeli i oskrzelików, aż do poziomu przewodów pęcherzykowych. Lokalizują się blisko błony podstawnej, niekiedy sięgając światła dróg oddechowych [2]. Komórki NE odgrywają potencjalną rolę w zapaleniu dróg oddechowych, przebudowie ściany oskrzeli oraz przewlekłym zwężeniu dróg oddechowych [9].

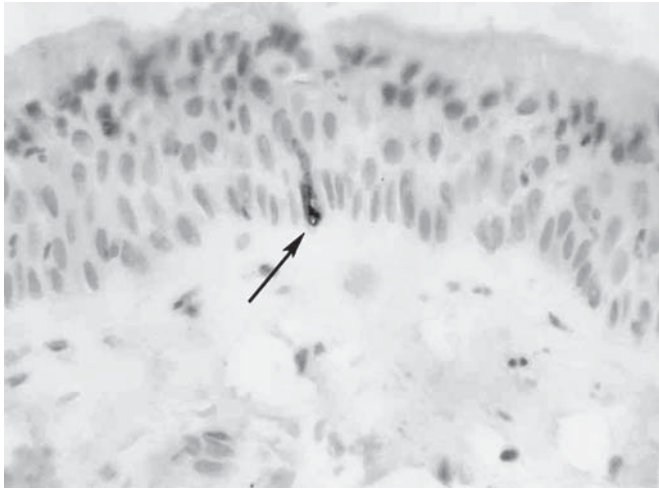
## MATERIAŁ I METODY

Wycinki tchawicy pobrane na poziomie 2 i 3 chrząstki tchawiczej, pochodziły od 30 pacjentów hospitalizowanych z powodu nowotworów krtani. Uzyskany materiał w 28 przypadkach (93%) pochodził od mężczyzn, a w 2 przypadkach (7%) od kobiet z rozpoznaniem rakiem płaskonabłonkowym krtani. Średnia wieku u chorych z rakiem krtani wynosiła 60,5 roku z czego pacjenci w wieku 47-57 lat stanowili 11 (36,6%), w wieku 58-68 również 11 (36,6%), a pacjentów w przedziale wiekowym 69-79 było 8 (26,6%). Materiał porównawczy stanowiły wycinki tchawicy pochodzące od 20 pacjentów w wieku 21-74 lat, hospitalizowanych na oddziałach intensywnej opieki medycznej, u których tracheotomia wykonywana była z powodu przedłużonej intubacji. Przyczyny hospitalizacji tych pacjentów były bardzo zróżnicowane, jednak w grupie tej nie było pacjentów z procesem nowotworowym. Materiał bezpośrednio po pobraniu został utrwalony w zbuforowanej formalinie, a następnie sporządzane były skrawki parafinowe. Preparaty przeglądowe barwiono hematoksyliną i eozyną (HE), a komórki neuroendokrynne wykrywano za pomocą reakcji immunohistochemicznych. Wykonywane były reakcje z przeciwciałami firmy DAKO skierowanymi przeciwko białkom funkcjonalnym takim jak: chromogranina A, synaptofizyna, kalcytonina, oraz neurospecyficzna enolaza. Reakcje wykonano zgodnie z protokołami zaproponowanymi przez producenta przeciw-

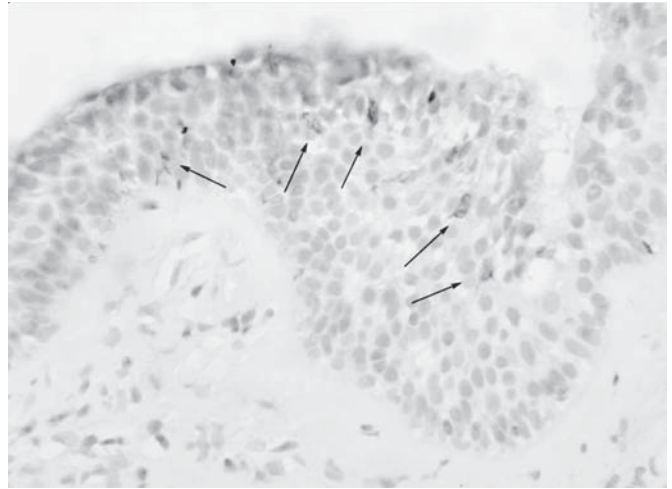
ciał. Gotowe preparaty histologiczne analizowane były pod mikroskopem świetlnym sprzężonym z komputerem przy wykorzystaniu programu morfometrycznego do oceny komórek neuroendokrynnych. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie przy udziale testu Mann-Whitney'a.

## WYNIKI

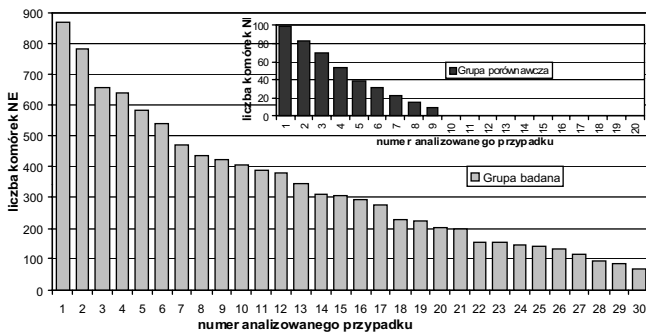
W preparatach tchawicy chorych z nowotworami krtani, widoczny jest dobrze zachowany nabłonek wielorzędowy migawkowy. Nabłonek wykazuje zróżnicowanie grubości zarówno w grupie porównawczej, jak i badanej. W grupie 30 pacjentów z rakiem krtani u 17 (56,6%) obserwowano prawidłowy nabłonek wielorzędowy migawkowy, natomiast w 13 przypadkach (43,3%) nabłonek był cienki i trudny do oceny, nierzadko z cechami ogniskowej metaplastyki płaskonabłonkowej. W grupie porównawczej spośród 20 przypadków w 14 (70%) obserwowano nabłonek był prawidłowy, a w 6 przypadkach (30%) był bardzo cienki, z cechami ogniskowej metaplastyki płaskonabłonkowej. Barwienia immunohistochemiczne wykazały obecność w nabłonku dróg oddechowych komórek neuroendokrynnych w kształcie wrzecionowatym i stożkowatym. Komórki te są wyposażone w wypustki cytoplazmatyczne sięgające do błony podstawnej i w pobliże światła przewodów oddechowych (ryc. 1a). Oś długa komórek jest prostopadła do błony podstawnej, a wypustki rozpościerają się pomiędzy sąsiadującymi komórkami nabłonka tchawicy. Stwierdzono zwiększoną liczbę komórek NE w tchawicy u pacjentów z rakiem krtani. Chorzy z rakiem krtani wykazywali duży stopień zaawansowania choroby nowotworowej według klasyfikacji TNM. 47% z nich to były raki określane jako T<sub>3</sub>, 23% jako T<sub>4</sub>, 20% jako T<sub>2</sub>, 10% jako T<sub>1</sub>. Im większe stadium zaawansowania procesu nowotworowego tym większą liczbę komórek NE udało się zaobserwować (ryc. 1b). U chorych z rakiem krtani obserwowano komórki neuroendokrynne u wszystkich pacjentów (100%), natomiast w grupie porównawczej wykazano obecność komórek neuroendokrynnych jedynie u 45% pacjentów. W grupie pacjentów onkologicznych obserwowano zdecydowanie większe zagęszczenie komórek NE - średnio 334 komórki na mm<sup>2</sup> powierzchni nabłonka tchawicy, zaś w grupie porównawczej średnio 20 komórek na mm<sup>2</sup> (p<0,001) (ryc. 2). W grupie pacjentów z rakiem krtani stwierdzono większe zróżnicowanie komórek pod względem wielkości. Obserwowano zdecydowaną przewagę komórek drobnych, o małej powierzchni - w przedziale wielkości od 0-10 μm<sup>2</sup> oraz nieliczne komórki bardzo dużych rozmiarów o powierzchni powyżej 140 μm<sup>2</sup> (ryc. 3, tab. I). W grupie porównawczej występowały przeważnie komórki małej wielkości poniżej 30 μm<sup>2</sup>. W badanej grupie chorzy z rakiem krtani byli przez wiele lat eksponowani na dym



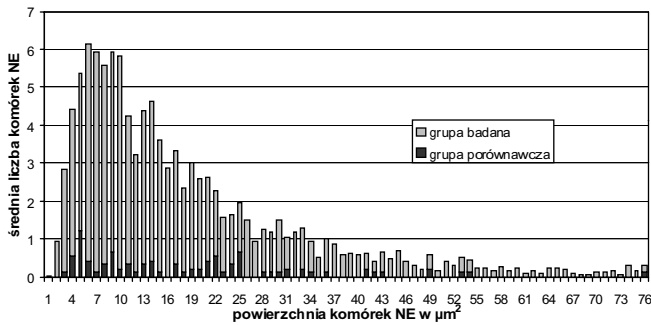
Ryc. 1a. Komórka neuroendokrynną w warstwie podstawnej nabłonka u chorego z grupy porównawczej



Ryc. 1b. Liczne komórki neuroendokrynne u chorego z rakiem krtani



Ryc. 2. Liczba komórek neuroendokrynnych przypadających na mm<sup>2</sup> powierzchni błony śluzowej nabłonka tchawicy, p<0,0001



Ryc. 3. Średnia liczba komórek NE o danej powierzchni w μm<sup>2</sup> przypadających na jednego pacjenta, p<0,0001

tytoniowy, palili od 20 do 40 papierosów dziennie. Fakt ten może mieć wpływ na zwiększoną proliferację komórek NE w grupie pacjentów z nowotworami krtani.

Tabela I. Rozkład liczbowy komórek NE w grupie badanej i porównawczej w zależności od ich wielkości

Liczba komórek NE w przedziałach wielkości				
Wielkość komórki w μm <sup>2</sup>		Grupa badana	Grupa porównawcza	
0	<x<	10	1141	33
10	<x<	20	931	20
20	<x<	30	410	22
30	<x<	40	232	6
40	<x<	50	113	6
50	<x<	60	82	2
60	<x<	70	42	0
70	<x<	80	43	1
80	<x<	90	26	0
90	<x<	100	23	0
100	<x<	110	13	0
110	<x<	120	10	0
120	<x<	130	9	0
130	<x<	140	10	0
140	<x<	150	3	0
150	<x<	160	4	0
160	<x<	170	5	0
170	<x<	180	2	0
180	<x<	190	1	0
190	<x<	200	1	0
200	<x<	210	1	0
210	<x<	220	1	0
220	<x<	230	0	0
230	<x<	240	1	0
240	<x<	250	0	0
250	<x<	260	0	0
260	<x<	270	0	0
270	<x<	280	0	0
280	<x<	290	1	0
290	<x<	300	0	0
300	<x<	310	0	0
310	<x<	320	0	0
320	<x<	330	1	0
330	<x<	340	0	0
340	<x<	350	0	0
350	<x<	360	1	0

## DYSKUSJA

Feyerter opisał komórki neuroendokrynne w ludzkich płucach ponad pół wieku temu. Nasza wiedza na ten temat do niedawna pozostawała niewielka, głównie ze względu na trudności w identyfikacji komórek dokrewnych w barwieniu HE w mikroskopie świetlnym. Dzięki rozwojowi technik immunohistochemicznych stało się łatwiejsze badanie systemu komórek neuroendokrynnych. W barwieniach tych wykorzystana została cecha neurowydzielnicza komórek związana z produkcją bioaktywnych substancji. Barwienia te pozwalają na łatwą lokalizację komórek NE wśród innych komórek nabłonka [10, 11]. Wielu autorów podejmowało badania nad oceną jakościową i ilościową komórek NE w dolnych drogach oddechowych [1, 4, 6, 7, 8, 12, 13]. Yu i wsp. ocenili występowanie komórek NE w krtani kotów [14] natomiast w oparciu o dostępny przegląd piśmiennictwa nikt nie podjął się opisu tych komórek w ludzkiej tchawicy. W warunkach fizjologii komórki NE występują w drogach oddechowych (w płucach) dorosłego człowieka z niezwykle rzadkością: w przybliżeniu 1 komórka na 1cm błony podstawnej [6, 7, 16].

Przeprowadzono badania wycinków tchawicy od pacjentów z nowotworami krtani. Wykazały one obecność w nabłonku tchawicy licznych komórek NE. Komórki te charakteryzowały się zróżnicowaną wielkością z przewagą komórek małych i dużych w zestawieniu z grupą porównawczą. Liczba komórek była zależna od stopnia zaawansowania procesu nowotworowego. W grupie porównawczej znajdowano pojedyncze komórki wykazujące ekspresję chromograniny. W obecnym badaniu istnieje wyraźna tendencja do wzrostu liczby komórek NE w nabłonku tchawicy u chorych z rakiem krtani.

Może mieć na to wpływ dym tytoniowy oraz hipoksja, która nasila się wraz ze wzrostem stadium zaawansowania nowotworowego. W materiale pochodzącym od pacjentów z rakiem krtani obserwowaliśmy znacznie większy odsetek hipertroficznym komórek NE. Wyniki naszych badań wskazują na prawdopodobny związek procesu nowotworowego z hipertrofią i proliferacją komórek neuroendokrynnych. Badania dowodzą, że w przebiegu toczących się procesów patologicznych w obrębie dróg oddechowych komórki NE ulegają proliferacji i hipertrofii [6, 10]. Dotyczy to głównie chorób tytoniozależnych takich jak: przewlekła obturacyjna choroba płuc, rak płuca, ziarniniak kwasochłonny, czy zapalenie oskrzelików [3, 9, 13, 15]. Można przypuszczać, że wzrost liczby komórek NE związany jest z reakcją organizmu na szereg czynników, które doprowadzają do kancerogenezy w obrębie krtani. Na nabłonek tchawicy wywierają wpływ różne czynniki środowiskowe oraz często substancje zawarte w dymie tytoniowym. Wyniki badań wskazują, że związki chemiczne zawarte w dymie tytoniowym oraz miejscowa hipoksja może prowadzić do wzrostu liczby komórek NE w tchawicy u chorych z nowotworami górnych dróg oddechowych. W nabłonku dochodzi do metaplastji płaskonabłonkowej, natomiast rzadko występuje rak tchawicy. Być może komórki NE stanowią jeden z mechanizmów obronnych tego narządu.

Reasumując, uzyskane wyniki wskazują, że w nabłonku tchawicy chorych z rakiem krtani obserwuje się zwiększoną liczbę komórek neuroendokrynnych. Komórki neuroendokrynne w tchawicy u chorych z rakiem krtani wykazują większe zróżnicowanie morfologiczne dotyczące kształtu i wielkości. Liczba komórek neuroendokrynnych wzrasta wraz ze stopniem zaawansowania raka krtani.

## Piśmiennictwo

- Gosney JR. Pulmonary neuroendocrine cells in species at high altitude. *Anat Rec* 1993; 236(1): 105-107, 108-112, 122-128.
- Fiks T, Słodkowska J. Morfologiczne i czynnościowe aspekty komórek rozproszonego układu neuroendokrynnego dróg oddechowych. *Pneumonol Pol* 1989; 58: 7-9.
- Rosai J. An evolutionary view of neuroendocrine cells and their tumors. *Int J Surg Pathol* 2001; 9(2): 87-92.
- Chyczewski L, Rydzewska-Rosołowska AE, Chyczewska E i wsp. Preneoplastic changes in lungs. (w) *Endocrine disrupters and carcinogenic risk assessment*. Chyczewski L, Nikliński J, Pluygers E. (red.) 2002: 147-177.
- Rowińska-Zakrzewska E. Neuroendokrynne komórki układu oddechowego i neuroendokrynne raki płuca. *Pneumonol Alergol Pol* 1995; 63(1-2): 99-103.
- Boers JE, Brok JLM, Koudstaal J, Arends JW, Thunnissen FBJM. Number and proliferation of neuroendocrine cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 758-753.
- Gubbelmans HLL, Maesen BLP, Koudstaal J, Thunnissen FBJM. Neuroendocrine cells in anthracosilicotic lungs. *Eur Respir J* 1991; 4(7): 824-828.
- Adriaansen D, Scheuermann D. Neuroendocrine cells and nerves of the lung. *The Anatomical Record* 1993; 236: 70-85.
- Siemińska A, Olszewska A. Role of neuroendocrine cells and bombesin-like neuropeptides in the pathogenesis of smoking related diseases, especially chronic obstructive pulmonary disease. *Pneumonol Alergol Pol* 1997; 65(1-2): 123-128.
- Takaaki I. Differentiation and proliferation of pulmonary neuroendocrine cells. *Prog Histochem Cytochem* 1999; 34(4): 247-322.
- Wilson BS, Lloyd RV. Detection of chromogranin in neuroendocrine cells with a monoclonal antibody. *Am J Pathol* 1984; 115: 458-468.
- Ghatei MA, Sheppard MN. Bombesin and vasoactive intestinal polypeptide in the developing lung: marked changes in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57: 1226-1232.
- Nylen ES, Linnoila RI, Becker KL. Prenatal cholinergic stimulation of pulmonary neuroendocrine cells by nicotine. *Acta Physiol Scand* 1988; 132(1): 117-118.
- Yu YC, Miyazaki J, Shin T. Neuroendocrine cells in the cat laryngeal epithelium. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1996; 253(4-5): 287-293.
- Aguayo SM. Determinants of susceptibility to cigarette smoke. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149(6): 1692-1698.
- Johnson DE, Georgieff MK. Pulmonary neuroendocrine cells. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 1807-1812.