

**Панкова Ольга Владимировна**

**Морфофункциональные особенности респираторного эпителия при  
немелкоклеточном раке легкого и хроническом воспалении и их связь с  
прогрессией опухолевого и предопухолевых процессов**

14.01.12 – онкология

**АВТОРЕФЕРАТ**

**Диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук**

Санкт-Петербург 2018

Работа выполнена в научно-исследовательском институте онкологии  
Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский  
национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

**Научные консультанты:**

**Перельмутер Владимир Михайлович**, доктор медицинских наук, профессор

**Тузиков Сергей Александрович**, доктор медицинских наук, профессор

**Официальные оппоненты:**

Член-корр. РАН, доктор медицинских наук, профессор

**Орлов Сергей Владимирович**

Директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии»

Доктор медицинских наук, профессор

**Акопов Андрей Леонидович**

Руководитель отдела торакальной хирургии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Доктор медицинских наук

**Раскин Григорий Александрович**

Руководитель патологоанатомической лаборатории высоких технологических методов морфологического исследования Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Ведущая организация**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_\_\_\_ г. в \_\_\_\_\_ часов

на заседании диссертационного совета Д 208.052.01 при ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России

(197758, г. Санкт-Петербург, Песочный, ул. Ленинградская, д.68)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России и на сайте

<http://www.niioncologii.ru/ru/node/284>

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_\_\_\_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Доктор медицинских наук

Филатова Лариса Валентиновна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Рак легкого в структуре онкологических заболеваний занимает одно из первых мест в мире (Давыдов М.И., Максимович Д.И., Заридзе Д.Г., 2015; Mahipal A., Malafa M., 2016). На долю немелкоклеточного рака легкого приходится ~ 80–85% новообразований данной локализации (Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. 2015; Siegel R., Naishadham D., 2013; Fan C., Gao S., 2013; Torre L.A., Bray F., 2015). На момент постановки диагноза лишь у 20-25% больных опухоль оказывается резектабельной (Копп М.В., Королева И.А., 2014). Несмотря на постоянное совершенствование методов диагностики, проведение радикального хирургического, химиотерапевтического и лучевого лечения, 5-летняя выживаемость составляет ~30% (Crino L., Weder W. et.al., 2010; Gold K.A., Kim E.S., 2014). У 60-75% больных немелкоклеточным раком легкого III стадии происходит прогрессирование опухолевого процесса в виде местного рецидива, метастазов в лимфоузлы грудной полости или развития отдаленных метастазов (Ettinger D.S., Wood D.E., Akerley W. et al., 2015; Mahipal A., Malafa M., 2016). Выявление первичной опухоли на ранней стадии существенно улучшает отдаленные результаты лечения, хотя и не гарантирует отсутствие риска прогрессирования новообразования. Поэтому актуальным остается поиск объективных маркеров, позволяющих прогнозировать риск развития рецидивов и гематогенных метастазов немелкоклеточного рака (Gold K.A., Kim E.S., 2014; Cheng H., Zhang Z., 2016).

Закономерности развития предопухолевых процессов в бронхиальном эпителии остаются на сегодняшний день важной и интенсивно изучаемой проблемой. Базальноклеточная гиперплазия и плоскоклеточная метаплазия – одни из первых морфологически идентифицируемых изменений бронхиального эпителия. Известно, что в основе появления и прогрессии этих процессов лежит генетическая нестабильность (Kadara H., Wistuba I., 2014; George J., Lim J.S., Jang S.J., et al., 2015). Она базируется на нарушениях механизмов репарации ДНК, изменениях регуляции клеточного цикла и апоптоза. Потеря контроля над процессами пролиферации, дифференцировки и гибели клеток коррелирует с развитием дисплазии и увеличением степени ее тяжести (Ciancio N., Galasso M.G., et al., 2012; Demirag F., Cakir E., et al., 2013; Gharbaran R., 2014; Khan, S., Jain, M., et al., 2015). Особое значение имеет плоскоклеточная метаплазия, которая, как правило, является основой для последующего развития диспластических изменений. Однако в доступной литературе достоверные критерии вероятности развития

плоскоклеточной метаплазии в условиях хронического воспаления, как и ее трансформации в дисплазию отсутствуют.

Считается, что базальноклеточная гиперплазия, плоскоклеточная метаплазия, а также, в большинстве случаев легкие и умеренные диспластические изменения, могут подвергаться спонтанной регрессии. Тяжелая дисплазия имеет высокий потенциал малигнизации (Lantuejoul S., Salameire D., Salon C., 2009; Ooi Aik T., Gower Adam C., Zhang Kelvin X., et al., 2014). Переход с одного уровня изменений на другой может занимать различное время. По данным литературы продолжительность этих временных отрезков существенно различается – от полугода до нескольких десятков лет (Lai M., 2009; Lantuejoul S., Salameire D., Salon C., 2009). Какие характеристики базальноклеточной гиперплазии, плоскоклеточной метаплазии и дисплазии связаны с их трансформацией из одного состояния в другое и делают процессы необратимыми, до сих пор неизвестно. В этой связи необходимы дальнейшие исследования, посвященные поиску новых прогностических признаков вероятности прогрессирования морфологических изменений респираторного эпителия до дисплазии III степени у больных хроническим бронхитом.

Развитие и прогрессия предопухолевых изменений зависят от влияния клеток микроокружения, в частности, воздействия цитокинов воспалительного инфильтрата (Mohamed Z., Pinato D.J., Mauri F.A., 2014). Известно, что предопухолевые изменения развиваются в условиях хронического воспаления как проявления ускоренной регенерации и замедления дифференцировки эпителия (Koungou K., Exarchos T., Exarchos K., 2015). Изучение связи между вариантом предопухолевых изменений респираторного эпителия и типом воспалительной реакции, выяснение клеточных и молекулярно-генетических особенностей альтернативных вариантов воспаления может внести вклад в понимание механизмов развития диспластических процессов в респираторном эпителии.

Прогрессирование предопухолевых процессов может быть связано не только с воздействием клеток микроокружения, но и с генетическими или эпигенетическими нарушениями в самих клетках эпителия (Lowe F., Shen W., Zu J., 2014), в конечном счете, приводящими к изменению экспрессионного профиля. Однако сведения в литературе о существовании специфической экспрессии генов, свойственной определенному варианту морфологических изменений бронхиального эпителия, отсутствуют. Выявление таких различий с помощью полнотранскриптомного анализа даст возможность определить гены, изменение экспрессии которых может детерминировать конкретный вариант предопухолевых изменений в бронхиальном эпителии.

Различные варианты морфологических изменений часто выявляются в бронхах, непосредственно не контактирующих с очагами немелкоклеточного рака легкого. Однако

особенности и значимость характера этих процессов недостаточно изучены. Базальноклеточная гиперплазия, плоскоклеточная метаплазия и дисплазия могут одновременно обнаруживаться при морфологическом исследовании в одном бронхе. Сочетания данных процессов бывают различными и, по-видимому, имеют неслучайный, пока еще неизвестный характер. Практически нет исследований, в которых изучались бы особенности воспалительной реакции в зависимости от варианта сочетания разных типов реактивных процессов и дисплазии. Значимость каждого из вариантов сочетания рассматриваемых морфологических изменений в прогрессии немелкоклеточного рака в отдаленном периоде после завершения лечения неизвестна.

**Цель исследования:**

Изучить морфофункциональные особенности различных вариантов изменений бронхиального эпителия при немелкоклеточном раке легкого и хроническом воспалении во взаимосвязи с прогрессией опухолевого и предопухолевых процессов.

**Задачи исследования:**

1. Изучить изменения цитометрических параметров клеток респираторного эпителия при базальноклеточной гиперплазии, плоскоклеточной метаплазии и дисплазии, развивающихся на фоне хронического бронхита.
2. Выявить критерии необратимости диспластических изменений, развивающихся на фоне хронического бронхита.
3. Изучить характер экспрессии маркеров пролиферативной активности (Ki-67), имеющих отношение к апоптозу (Bcl-2, p53) и дифференцировке плоского эпителия (syndecan-1 (CD138)) при различных вариантах сочетаний морфологических изменений респираторного эпителия, возникающих в бронхах, отдаленных от немелкоклеточного рака легкого.
4. Исследовать экспрессионные особенности базальноклеточной гиперплазии, плоскоклеточной метаплазии и дисплазии в зависимости от варианта их сочетания.
5. Изучить особенности воспалительного инфильтрата вблизи различных вариантов морфологических процессов в респираторном эпителии бронхов мелкого калибра, расположенных в отдалении от немелкоклеточной карциномы.
6. Изучить влияние неoadъювантной химиотерапии при немелкоклеточном раке легкого на характер проявления морфологических изменений респираторного эпителия в отдаленных от опухоли бронхах.
7. Изучить связь между вариантами сочетания морфологических изменений бронхиального эпителия, развивающихся в отдаленных от опухоли участках слизистой, и прогрессией немелкоклеточного рака легкого.

### Научная новизна

Впервые продемонстрировано, что при хроническом бронхите в сегментарных бронхах цитометрические показатели (площадь, периметр ядра и клетки) дисплазии I-III, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией (Д+ПМ+), превышают аналогичные параметры дисплазии I-III степени, не сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией (Д+ПМ-).

Впервые установлено, что сочетание дисплазии с плоскоклеточной метаплазией является неблагоприятным признаком, связанным с прогрессией и необратимостью дисплазии: в 47,7% случаев дисплазия прогрессировала до более высокой степени, а в 9,2% – перешла в плоскоклеточный рак.

Установлено, что диффузная плоскоклеточная метаплазия ассоциирована с высокой вероятностью прогрессии в дисплазию. В 76,2% случаев диффузная плоскоклеточная метаплазия перешла в дисплазию I-II степени против 23,8% при очаговой плоскоклеточной метаплазии.

Установлено, что в слизистой бронхов мелкого калибра, отдаленных от НМРЛ, дисплазия чаще всего встречается при плоскоклеточной раке и в тех случаях, когда определяется плоскоклеточная метаплазия, но отсутствует базальноклеточная гиперплазия (БКГ-ПМ+Д+) – 81,8% случаев; при других вариантах морфологических изменений бронхиального эпителия дисплазия определяется в 1,1% наблюдений.

Впервые оценен характер экспрессии маркеров пролиферативной активности, апоптоза и дифференцировки плоского эпителия при различных вариантах сочетания базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии. Установлено, что морфофункциональные характеристики (экспрессия Ki-67, p53, Vcl-2, CD138) базальноклеточной гиперплазии зависят от варианта ее сочетания с плоскоклеточной метаплазией. При базальноклеточной гиперплазии, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-) уровень экспрессии маркеров Ki-67, p53, Vcl-2 выше, а CD138 ниже, чем при «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-).

Впервые установлено, что при плоскоклеточной метаплазии и дисплазии в бронхах мелкого калибра, в отдалении от немелкоклеточного рака, отсутствует экспрессия маркера дифференцировки плоского эпителия CD138.

Установлено, что выраженность и состав воспалительного инфильтрата зависят от варианта сочетания морфологических изменений респираторного эпителия, определяемых в бронхах, отдаленных от НМРЛ. Показано, что в воспалительном инфильтрате вблизи БКГ сочетанной с ПМ (БКГ+ПМ+Д-) меньше CD68+ макрофагов, больше CD3+ Т- и CD20+ В-лимфоцитов, а также CD138+ плазматических клеток по

сравнению с «изолированной» базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ-Д-). При плоскоклеточной метаплазии, в сравнении с сочетающейся с ней базальноклеточной гиперплазией, вблизи первой меньше инфильтрация Т- и В-лимфоцитами, плазматическими клетками, CD68+ макрофагами. При сочетании в бронхах мелкого калибра дисплазии II-III степени с плоскоклеточной метаплазией (БКГ-ПМ+Д+), вблизи первой меньше инфильтрация Т- и В-лимфоцитами, чем при плоскоклеточной метаплазии.

Впервые установлено, что для каждого из вариантов сочетания базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии характерен свой набор специфических гипер- и гипоекспрессирующихся генов, регулирующих специфические биологические процессы.

Впервые установлено, что различные варианты сочетаний морфологических изменений респираторного эпителия характеризуются разной степенью связи с прогрессией немелкоклеточного рака. Показана сопряженность варианта сочетания базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии (БКГ+ПМ+Д-) с рецидивированием НМРЛ – 46,7% случаев, против 0,8% при других вариантах морфологических изменений эпителия мелких бронхов.

Впервые показано, что развитие гематогенных метастазов НМРЛ сопряжено с «изолированной» базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ-Д- – 43,2% случаев). Установлено, что при плоскоклеточном раке легкого развитие гематогенных метастазов сопряжено также с сочетанием плоскоклеточной метаплазии и дисплазии (БКГ-ПМ+Д+), выявляемым в бронхах, отдаленных от опухоли – 19,4% случаев.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Выявленные морфологические критерии риска развития, необратимости и прогрессии предопухолевых изменений респираторного эпителия позволяют прогнозировать развитие дисплазии в сегментарных бронхах, что дает возможность сформировать группу риска по немелкоклеточному раку легкого.

Выявленные морфофункциональные особенности, характер и выраженность экспрессии генов при базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии в зависимости от варианта их сочетаний, наблюдаемых в мелких бронхах отдаленных от НМРЛ, позволяют предсказать вероятность развития локорегионарных рецидивов и гематогенных метастазов у больных немелкоклеточным раком легкого.

Результаты исследования внедрены в практическую деятельность в клинике НИИ онкологии Томского НИМЦ.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Фактором высокого риска необратимости и прогрессии диспластических изменений в сегментарных бронхах при хроническом бронхите является сочетание дисплазии любой степени с плоскоклеточной метаплазией.
2. В зависимости от варианта сочетания базальноклеточной гиперплазии, плоскоклеточной и дисплазии метаплазии в эпителии мелких бронхов в отдалении от НМРЛ, каждый из процессов характеризуется специфическим индивидуальным набором гипер- и гипоекспрессирующихся генов, связанных с регуляцией специфических сигнальных путей и биологических процессов.
3. При НМРЛ в бронхах мелкого калибра, отдаленных от опухоли, морфофункциональные характеристики разных типов изменений эпителия, а также выраженность и состав воспалительного инфильтрата вблизи них связаны с вариантом сочетания изменений эпителия друг с другом.
4. Высокий риск развития гематогенных метастазов при НМРЛ сопряжен с наличием в эпителии бронхов мелкого калибра, отдаленных от опухоли, «изолированной» базальноклеточной гиперплазии, а в случаях плоскоклеточной карциномы и с сочетанием дисплазии и плоскоклеточной метаплазии.
5. Высокий риск развития рецидивов НМРЛ сопряжен с наличием в эпителии бронхов мелкого калибра, отдаленных от опухоли, сочетания базальноклеточной гиперплазии с плоскоклеточной метаплазией.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Полученные результаты и выводы, содержащиеся в диссертации, научно обоснованы и достоверны, что обеспечивается достаточным количеством исследованного материала. Всего в исследование было включено 443 пациента, из них 261 – с хроническим бронхитом и предопухолевыми изменениями слизистой сегментарных бронхов; 10 больных с плоскоклеточным раком легкого, у которых исследовался биопсийный материал; 172 больных немелкоклеточным раком легкого. В работе использовались современные методы морфологического исследования: количественный цитометрический анализ, иммуногистохимическое исследование с применением ряда антител, отражающих различные морфофункциональные характеристики изучаемых процессов. Использование лазерной микродиссекции и применение микроматричного экспрессионного анализа позволило идентифицировать экспрессию специфических генов для каждого изучаемого процесса. Статистическая обработка полученных результатов с использованием параметрических и непараметрических критериев: t-критерий Стьюдента, критерий Хи-

квадрат и точный критерий Фишера, позволяет говорить о достоверности проведенного исследования.

Основные результаты исследования были представлены на IV съезда онкологов и радиологов СНГ (Баку, 2006), V съезде онкологов и радиологов СНГ (Ташкент, 2008), Российской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 30-летию НИИ онкологии СО РАМН «Современная онкология: достижения и перспективы развития» (Томск, 2009), VI съезде онкологов и радиологов стран СНГ (Душанбе, 2010), VII съезде онкологов и радиологов стран СНГ (Астана, 2012), Российской научно-практической конференции с международным участием «Новые методы в онкологической практике» (25-26 июня 2013 г., Барнаул), Российской научно-практической конференции «Современные аспекты диагностики и лечения рака легкого» (Томск, 2013) VIII съезде онкологов и радиологов СНГ и Евразии (16-18 сентября 2014 г., Казань), Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (6-8 декабря 2016 г., Москва).

#### **Публикации:**

По теме диссертации опубликовано 47 печатных работ, из них 18 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ, в том числе 1 статья в зарубежном журнале, 25 тезисных работ в материалах региональных, всероссийских и международных съездов и конференций. Получено 4 патента и оформлена 1 база данных.

#### **Личный вклад автора:**

Автор самостоятельно собрал первичный материал, изучил и проанализировал литературу по теме диссертации, провел диагностическое цитологическое исследование мазков-отпечатков с бронхобиопсий, гистологическое исследование биопсийного материала, взятого у пациентов с хроническим бронхитом, а также материала, взятого из бронхов мелкого калибра у пациентов НМРЛ. Автор лично проводил цитометрический анализ, выполнял на иммуногистохимических микропрепаратах оценку уровня экспрессии маркеров Ki-67, p53, Vcl-2, CD138, CD68, CD3, CD20. Принимал участие в проведении морфологического исследования на этапах динамического наблюдения за пациентами. Автор самостоятельно составил электронную базу данных, провел статистическую обработку полученных результатов, обобщил, систематизировал и проанализировал результаты исследования, сформулировал выводы, практические рекомендации и оформил диссертационную работу.

**Объем и структура диссертации:**

Диссертация изложена на 288 страницах машинописного текста и состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Текст иллюстрирован 57 таблицами и 43 рисунками. Список литературы включает 429 источников, из них 49 публикаций отечественных и 382 зарубежных авторов.

**ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ  
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ***Клиническая характеристика материала*

Цитометрические параметры и прогноз дисплазии бронхиального эпителия изучали в группе больных хроническим бронхитом. В исследование был включен 261 пациент с ХБ в возрасте от 32 до 67 лет (средний возраст  $47,8 \pm 8,6$ ). Среди них было 87 (33,3%) женщин и 174 (66,7%) мужчины. Следует отметить, что для данного этапа исследования специально проводился отбор пациентов, у которых в слизистой сегментарных бронхов выявлялись диспластические изменения. Для сравнения цитометрических параметров клеток дисплазии тяжелой степени с параметрами клеток рака легкого в исследовании использовался биопсийный материал 10 больных с плоскоклеточным раком легкого.

Характер морфологических изменений эпителия мелких бронхов в отдалении от опухоли и связь этих изменений с прогрессией опухоли изучали в группе больных немелкоклеточным раком легкого. В данное исследование были включены 172 больных НМРЛ T<sub>1-4</sub>N<sub>0-3</sub>M<sub>0</sub>, находящихся на лечении в торакоабдоминальном отделении НИИ онкологии Томского НИМЦ с 2008 по 2015 годы. Из них 105 (61,1%) человек имели морфологический диагноз плоскоклеточного рака, а 67 (38,9%) – аденокарциномы легкого. Возраст больных составил от 41 до 76 лет (средний возраст  $58,4 \pm 8,2$  лет). В выборку вошли 147 (85,5%) мужчин и 25 (14,5%) женщин.

В исследование были включены пациенты только с хроническим бронхитом, сопутствующим НМРЛ. Критерием исключения из исследования были пациенты НМРЛ с обтурационным пневмонитом и периферическим раком легкого с распадом.

Распространенность опухолевого процесса определяли согласно международной классификации по системе TNM (Sobin L.H., Gospodarowicz M.K., Wittekind C., 2011г.). Преобладали пациенты с III стадией заболевания (48,8% из всех случаев).

В предоперационном периоде 86 из 172 больных (50,0%) получили неоадьювантную химиотерапию по схеме: паклитаксел 175 мг/м<sup>2</sup> внутривенно 1 день/карбоплатин АUC 6 внутривенно 1 день. Проводилось 2-3 курса с интервалом в 3 недели. Во время проведения радикальной операции 39/86 (45,4%) пациентов однократно получили

интраоперационную лучевую терапию в дозе 10-15 Гр. Из них 14/39 (35,9%) больным перед облучением вводили радиосенсибилизатор цисплатин/гемзар. Характеристика пациентов, получивших НАХТ, и без таковой представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика пациентов, получивших неoadьювантную химиотерапию, и без таковой

Параметр	Количество больных n, (%)		p
	НАХТ+, n=86	НАХТ-, n=86	
Стадия			
I	6 (7,0)	8 (9,3)	0,88
II	21 (24,4)	23 (26,7)	0,86
IIIА	48 (55,8)	36 (41,9)	0,21
IIIВ	11 (12,8)	19 (22,1)	0,53
Размер опухоли			
T <sub>1-2</sub>	23 (26,7)	34 (39,5)	0,32
T <sub>3-4</sub>	63 (73,3)	52 (60,5)	0,15
Степень дифференцировки			
G1 высокая	4 (4,6)	6 (7,0)	0,69
G2 умеренная	51 (59,3)	54 (62,8)	0,71
G3 низкая	31 (36,1)	26 (30,2)	0,64
Синхронные лимфогенные метастазы			
Есть			
Нет	39 (45,3)	37 (43,0)	0,84
	47 (54,7)	49 (57,0)	0,82
Рецидивы			
Есть	11 (12,8)	11 (12,8)	1,00
Нет	75 (87,2)	75 (87,2)	1,00
Гематогенные метастазы			
Есть	22 (25,6)	26 (30,2)	0,72
Нет	64 (74,4)	60 (69,8)	0,57

### ***Морфологические методы исследования***

При изучении характера морфологических изменений при ХБ материалом для исследования послужили бронхобиоптаты и цитологические мазки-отпечатки с них, взятые при фибробронхоскопии из сегментарных бронхов.

Для изучения характера морфологических изменений бронхиального эпителия при НМРЛ и их связи с прогрессией опухоли, материалом для исследования была сама опухоль и фрагменты ткани удаленного легкого с бронхом. Фрагменты ткани с бронхом брали на расстоянии 4-5 см от опухоли. Как правило, это были бронхи мелкого калибра (d=2–0,5мм).

Образцы ткани (биоптаты и операционный материал) немедленно помещали в 10% рН-нейтральный формалин. Продолжительность фиксации составляла 18-24 часа. Далее материал проводили по стандартной методике, заливали в парафин. С парафиновых блоков готовили серийные срезы толщиной 4-5 мкм. Микропрепараты окрашивали растворами красителей гематоксилина и эозина, приготовленными по общепринятым протоколам.

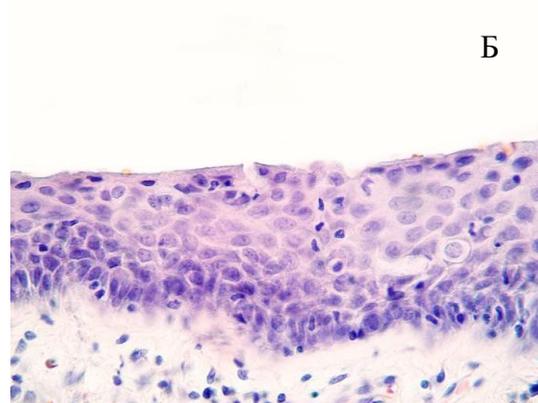
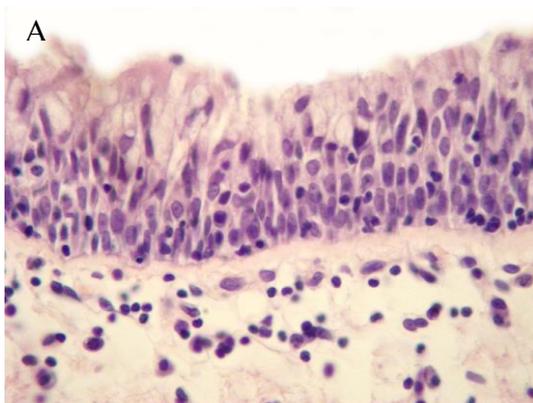
С биопсийного материала, взятого при фибробронхоскопии, делали тонкослойные мазки-отпечатки для цитологического исследования. Цитологические препараты окрашивали по стандартной методике (Шапиро Н.А., 2008). Следует отметить, что в исследование были включены пациенты, у которых цитологический диагноз «дисплазия» был подтвержден гистологически.

Морфологическое исследование проводили с помощью светового микроскопа «Axio Scope. A1» фирмы «Karl Zeiss», Германия. Цитометрический анализ осуществляли с помощью цифровой видеокамеры «Epson» и программой компьютерной обработки изображений «Photoshop».

При цитометрическом анализе в каждой мазке-отпечатке измеряли не менее 100 клеток (использовался иммерсионный объектив, x100). Регистрировали следующие параметры клеток бронхиального эпителия: площадь клетки (S1), площадь ядра (S2), периметр клетки (P1), периметр ядра (P2). Рассчитывали коэффициенты формы клеток (F1) и ядер (F2) по формуле:

$$F_1 = P_1^2 / 4\pi S_1 \quad F_2 = P_2^2 / 4\pi S_2 \quad \pi = 3,14$$

Микроскопическую оценку базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии (рисунок 1А, Б, В) проводили по общепринятым критериям (Greenberg A., Yee H., Rom W., 2002; Kerr K.M., Popper H.H., 2010). Оценка дисплазии бронхиального эпителия (рисунок 1Г) различной степени выраженности осуществляли согласно критериям, описанным в «Гистологической классификации опухолей легких» ВОЗ 2015. Морфологический диагноз плоскоклеточного рака и аденокарциномы легкого устанавливали согласно «Гистологической классификации опухолей легкого» ВОЗ 2015 и «International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma» (2011).



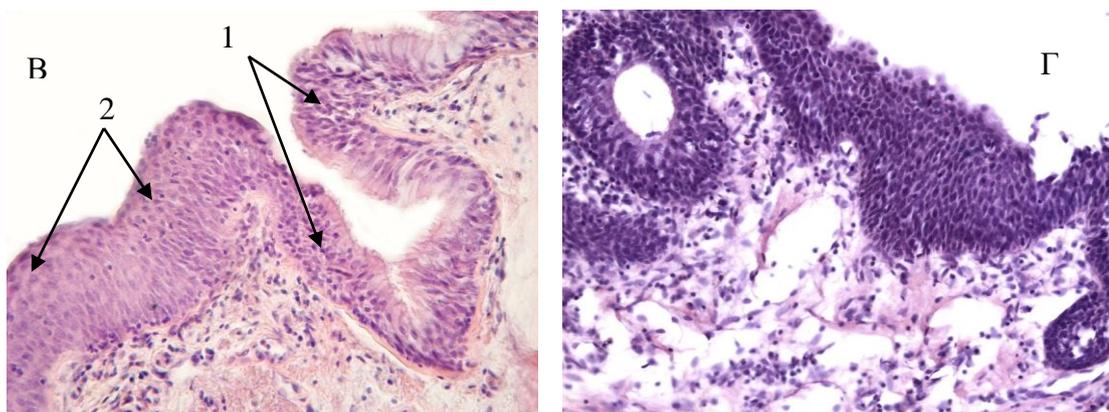


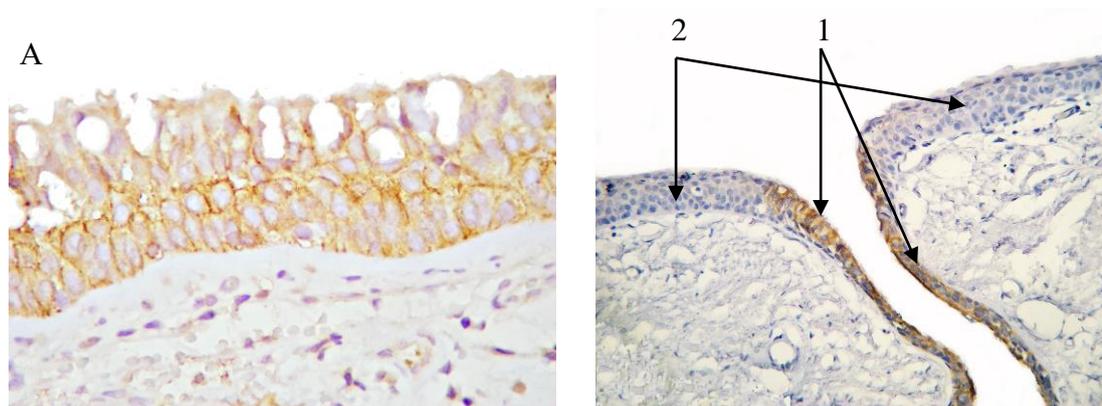
Рисунок 1 – Различные варианты морфологических изменений бронхиального эпителия: А – базальноклеточная гиперплазия, x400; Б – плоскоклеточная метаплазия, x400; В – сочетание базальноклеточной гиперплазии (1) и плоскоклеточной метаплазии (2), x200; Г – Дисплазия III степени, x200. Окраска – гематоксилин-эозин.

Иммуногистохимическое исследование проводили по стандартной методике. Демаскировку антигенов осуществляли с помощью аппарата «PT Link», «Dako» в буфере с высоким pH. Использовали систему визуализации LSAB System – HRP («Dako»).

Срезы докрашивали гематоксилином.

Применяли антитела к белкам p53 (clon DO-7, RTU, «Dako»), выявляющий «дикий» и «мутантный» варианты протеина; Bcl-2 (clon 124, RTU, «Dako»); Ki-67 (clon MIB – 1, RTU, «Dako»), syndecan-1 (CD138 – clon MI 15, RTU, «Dako»); CD68 (клон PG-M1, RTU, «Dako»); CD20 (клон L26, рабочее разведение 1:300, «Dako»); CD3 (клон UCHT1, рабочее разведение 1:1000, «Dako») – рисунки 2-3.

В сложных диагностических случаях, для уточнения гистотипа немелкоклеточного рака легкого, использовали панель антител к TTF-1 (clone 8G7G3/1, Dako), CK7 (clone OV-TL 12/30, Novocastra), CK20 (clone Ks 20.08, Novocastra), CEA (clone AMT28, Novocastra), CDX2 (clone AMT28, Novocastra), Napsin A (Napsin A, Rabbit Polyclonal), p63 (clone DAK-p63, Dako), HMW (clone 34BE12, Dako).



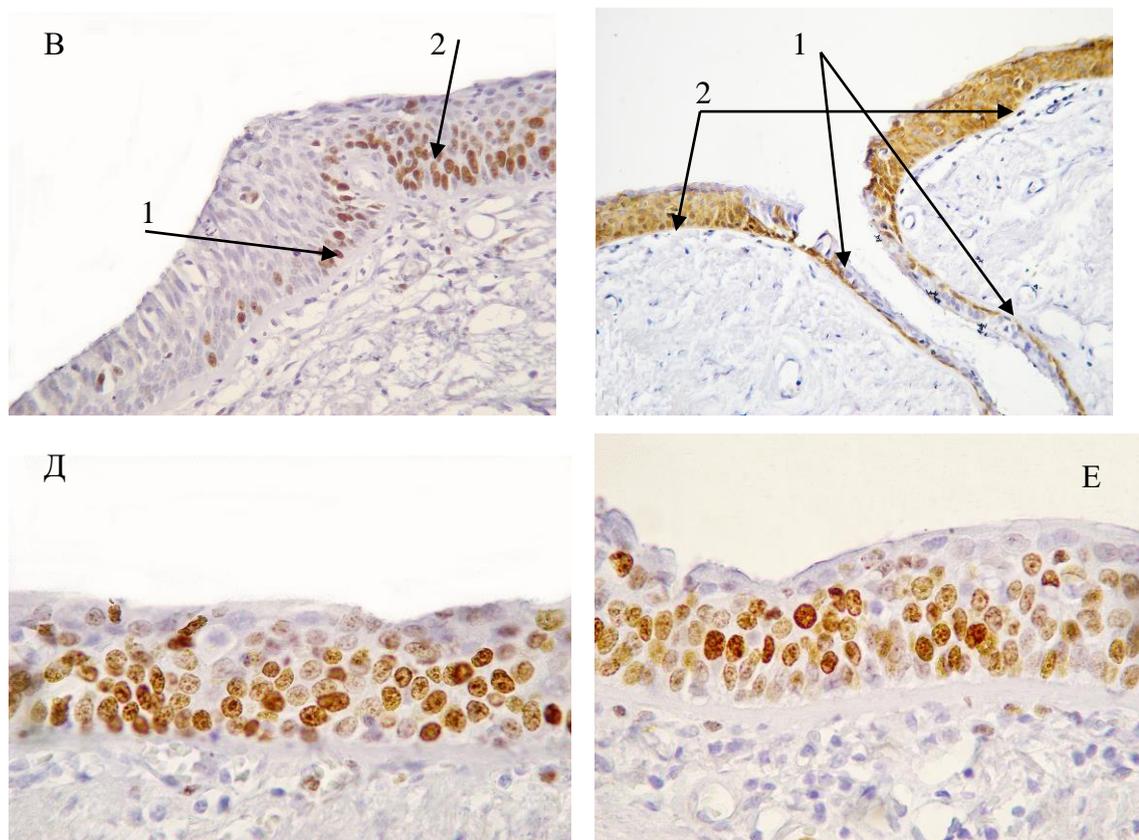
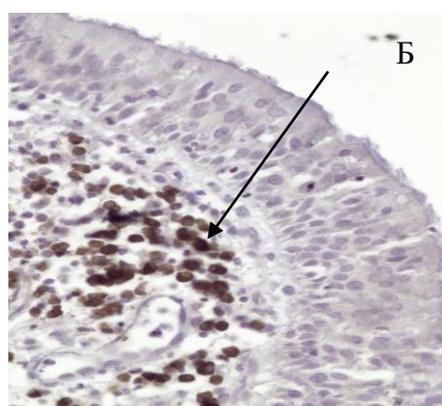
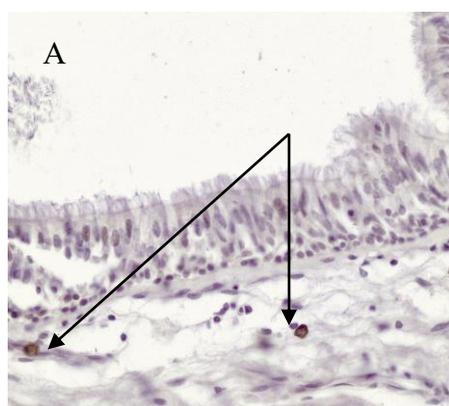


Рисунок 2 – Экспрессия маркеров пролиферативной активности, апоптоза и дифференцировки клеток при различных вариантах морфологических изменений бронхиального эпителия.

А – Экспрессия CD138, мембранное окрашивание при изолированной БКГ, х400; Б – экспрессия CD138 в участках БКГ (стрелка 1) и отсутствие экспрессии в участках ПМ (стрелка 2), х100; В – умеренная ядерная экспрессия Ki-67 в клетках БКГ (стрелка 1) и выраженная в ПМ (стрелка 2), х200; Г – слабая экспрессия Vcl-2 при БКГ (стрелка 1) и выраженная при ПМ, х100; Д – выраженная ядерная экспрессия Ki-67 в клетках дисплазии III, х400. Е – выраженная ядерная экспрессия p53 в клетках дисплазии III, х400



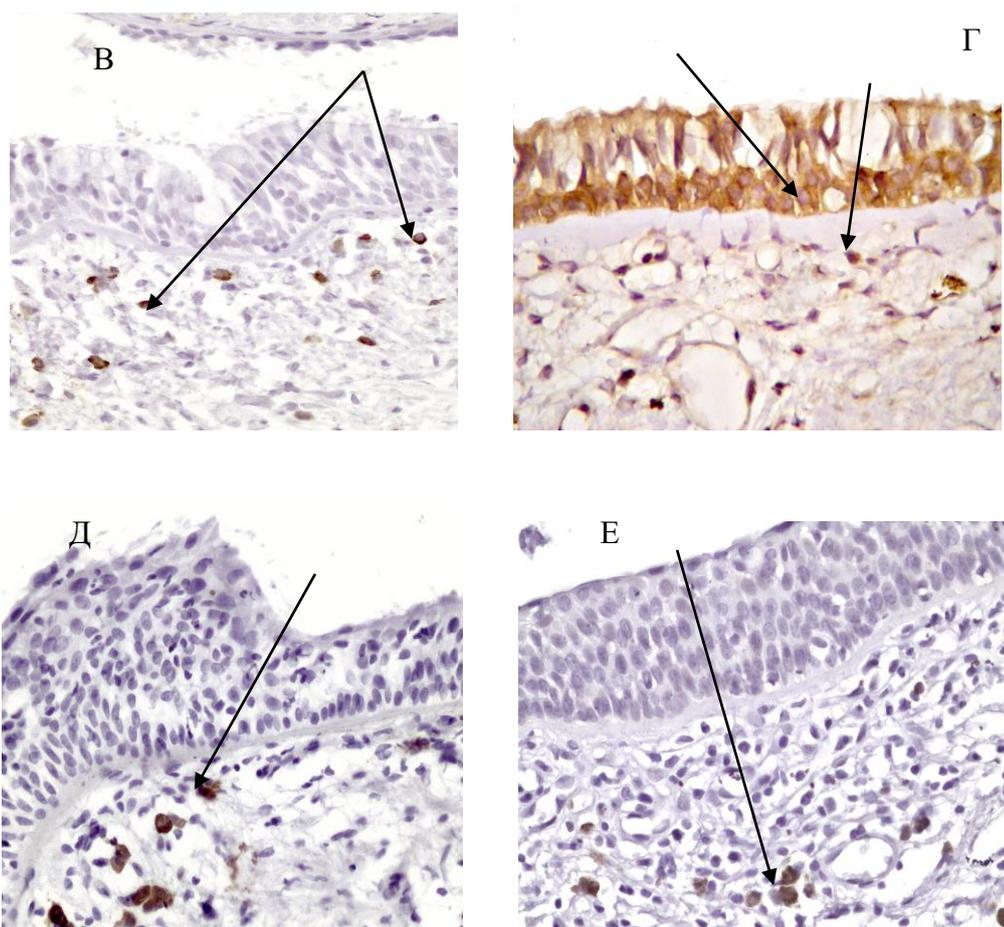


Рисунок 3. А – Редкие CD68+ макрофаги в воспалительном инфильтрате нормального бронхиального эпителия, х400; Б – выраженная инфильтрация CD68+ клетками при БКГ (БКГ+ПМ-Д-), х400; В – инфильтрация CD3+ Т-лимфоцитами при слабо выраженной БКГ (БКГ+ПМ-Д-), х400; Г – выраженная экспрессия CD138 в нормальном бронхиальном эпителии (стрелка 1) и CD138+ клетки в воспалительном инфильтрате (стрелка 2), х400; Д – инфильтрация CD68+ макрофагами при ПМ (БКГ+ПМ+Д-), х400; Е – инфильтрация CD20+ В-лимфоцитами при ПМ (БКГ-ПМ+Д+), х400.

Результаты иммуногистохимической реакции оценивали по процентному содержанию окрашенных клеток при любой степени положительной экспрессии маркера в разных участках бронхиального эпителия, соответствующих различным морфологическим процессам: базальноклеточной гиперплазии, плоскоклеточной метаплазии, дисплазии. Аналогичным образом оценивали экспрессию исследуемых маркеров в клетках воспалительного инфильтрата, отдельно под каждым участком того или иного варианта изменений бронхиального эпителия. Подсчитывали плотность воспалительного инфильтрата: количество лейкоцитов на  $1 \text{ мм}^2$ .

### *Генетическое исследование*

Для полнотранскриптомного профилирования были отобраны случаи «изолированной» БКГ (ИБКГ; БКГ+ПМ-Д-; n=2), БКГ, сочетающейся с ПМ (пБКГ; БКГ+ПМ+; n=2), плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с БКГ (бкгПМ; БКГ+ПМ+; n=2), ПМ, сочетающейся с дисплазией (дПМ; БКГ-ПМ+Д+; n=1) и дисплазии, сочетающейся с ПМ (пмД; БКГ-ПМ+Д+; n=1), а также морфологически нормального бронхиального эпителия (n=1). Свежезамороженные образцы ткани бронхиального эпителия подвергали криотомированию (Microm HM 525, Thermo Scientific, США), полученные срезы (5 мкм) окрашивали гематоксилином и эозином. С помощью лазерной микродиссекции (PALM, Carl Zeiss, Германия) из окрашенных срезов были выделены образцы нормального эпителия бронхов (n=1), БКГ (n=4: 2 ИБКГ + 2 пБКГ), ПМ (n=3: 2 бкгПМ + 1 дПМ) и дисплазии (пмД, n=1). Каждый выделенный вариант морфологически измененного эпителия, а также нормальный эпителий были представлены 30-50 микродиссектированными образцами, которые катапультировали в крышки пробирок, заполненные лизирующим буфером RLT (RNeasy Plus Micro Kit, Qiagen, США). Пробирки с микродиссектированными образцами хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до выделения РНК.

Образцы РНК (n=8) выделяли с помощью набора RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, США) с добавлением на этапе элюирования ингибитора РНКаз (Ribolock RNase inhibitor, Fermentas, Литва). Качество РНК оценивали с помощью показателя RIN (от англ. RNA integrity), рассчитываемого с помощью станции автоматического электрофореза 2200 TapeStation и набора реагентов High Sensitivity R6K ScreenTape (Agilent Technologies, Inc., США). Показатель RIN варьировал от 4,6 до 8,0 (средний 6,7). Образцы РНК подвергали полнотранскриптомной амплификации с помощью набора Ovation PicoSL WTA System V2 kit (NuGEN Technologies, Inc., США). Амплифицированные продукты (кДНК) очищали от невключенных олигонуклеотидов и нуклеозидтрифосфатов с помощью набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, США), имели концентрацию от 60 до 140 нг/мкл и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до микроматричного экспрессионного анализа.

Транскриптомное профилирование выполняли с помощью микроматриц SurePrint G3 Human GE v2, 8x60K (Agilent Technologies, Inc., США). Образцы кДНК метили флуоресцентным красителем Cy3 (SureTag DNA labeling kit, Agilent Technologies, Inc., США). Гибридизацию флуоресцентно-меченных образцов на микроматрицы, последующую отмывку и сушку стекол осуществляли согласно протоколу Agilent со следующими изменениями: 2 мкг меченой кДНК гибридизовали в течение 22 часов при температуре  $65^{\circ}\text{C}$ . Образцы кДНК не подвергали фрагментированию. Сканирование микроматриц выполняли, используя сканер SureScan Microarray, сигналы считывали и

экстрагировали с помощью программного обеспечения Feature Extraction v. 10.7.3.1 (Agilent Technologies, Inc., США). Полученные данные подвергали обработке в среде R (R Development Core Team, 2008) с помощью программного пакета limma (Siegel R, Naishadham D, Jemal A., 2013). Логарифм-трансформированные сигналы брали для анализа уровня экспрессии, нормализованного к нормальному бронхиальному эпителию.

Для VENN анализа и функционального аннотирования использовали только те гены, уровень экспрессии которых в разных вариантах морфологических бронхиальных изменениях составлял  $(\log\text{-fold-change}) \geq \log_2 1,5$  и был статистически значимым (Р-значение без поправки на множественные сравнения  $< 0,05$ ) по отношению к нормальному эпителию. В частности, VENN анализ (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) использовался для идентификации и демонстрации количества генов, общих и специфических для вариантов морфологических изменений бронхиального эпителия. Функциональное аннотирование или анализ выраженности биологических процессов (GO) и сигнальных путей (KEGG и Reactome) выполняли с помощью онлайн инструмента GO Enrichment Analysis (The Gene Ontology Consortium 2015). Обсуждали только процессы и сигнальные пути с уровнем статистической значимости (Р-значение с поправкой Бонферрони на множественные сравнения  $< 0,1$ ).

Кроме того, выделяли и обсуждали гены, гипо- и гиперэкспрессирующиеся только в каждом конкретном варианте морфологических изменений бронхиального эпителия на уровне статистической значимости или тенденции (Р-значение (FDR) с поправкой Бенджамини-Хохберга на множественные сравнения  $< 0,1$ ).

Обработка полученных данных выполняли с помощью пакета программ «Statistica for Windows 7,0». При анализе были применены методы описательной статистики. Для оценки различий между группами использовали параметрические и непараметрические критерии: t-критерий Стьюдента, при оценке различий между группами по частоте встречаемости признака критерий  $\chi^2$  с поправкой Йетса и точный критерий Фишера. Обсуждали результаты с достоверностью различий при  $p \leq 0,05$ .

## СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

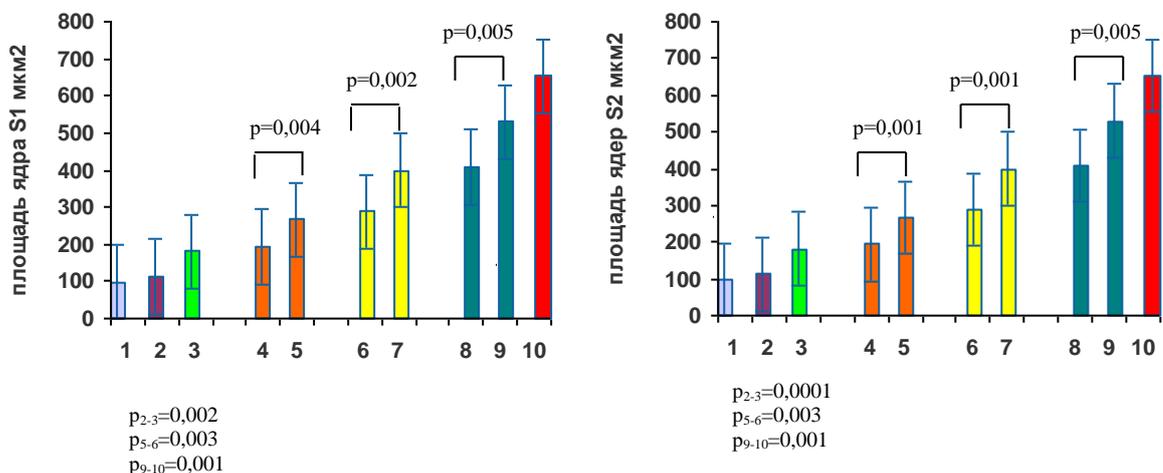
### **Морфометрические параметры плоскоклеточной метаплазии и диспластических изменений в сегментарных бронхах и вероятность их прогрессии**

Исследование биопсийного материала и цитологических мазков-отпечатков, взятых из сегментарных бронхов, показало, что дисплазия различной степени тяжести определялась у 73,9% (193/261) пациентов. Чаще всего развивалась дисплазия I и II

степени – 39,1% (102/261) и 29,1% (76/261) случаев соответственно ( $p=0,02$ ). Реже встречались диспластические изменения III степени – 5,7% (15/261,  $p=0,0002$  – сравнение с ДИ). В 33,7% (65/193) случаев в пределах одного бронха было найдено сочетание дисплазии различной степени тяжести с плоскоклеточной метаплазией (ДИ-III+ПМ+), в 66,3% (128/193) – дисплазия была «изолированной» (ДИ-III+ПМ-). Базальноклеточная гиперплазия и плоскоклеточная метаплазия, не сочетающаяся с дисплазией («изолированная» ПМ), отмечались в 9,7% (25/261) и 12,6% (33/261) случаев соответственно. В 3,8% (10/261) случаев при морфологическом исследовании каких-либо изменений в слизистой оболочке бронхов найдено не было (группа контроля). Кроме того, в исследование были включены 10 пациентов с плоскоклеточным раком легкого (изучались цитометрические параметры для сравнения с дисплазией тяжелой степени).

Исследование цитометрических параметров клеток и ядер (рисунок 4) при различных вариантах диспластических изменений бронхиального эпителия (ДИ-III+ПМ+ и ДИ-III+ПМ-) подтвердило известную закономерность о возрастании размеров клеток и ядер по мере прогрессии процесса от нормального эпителия к раку легкого (Трунова Т.В., 2003; Волченко Н.Н., 2004; Зиновьев С.В., 2006; Li G. 2012; Mijović Z., 2014, 2015). Однако нами было обнаружено, что в случаях сочетания дисплазии с плоскоклеточной метаплазией (Д+ПМ+) цитометрические параметры клеток и ядер были значительно больше по сравнению с «изолированной» (Д+ПМ-) дисплазией (рисунок 4).

Динамическое наблюдение в течение трех лет за пациентами с различными вариантами диспластических изменений показало, что в 87,7% (57/65) случаев сочетания дисплазии с плоскоклеточной метаплазией (Д+ПМ+) исход диспластического процесса был неблагоприятным. При «изолированной» дисплазии (Д+ПМ-) неблагоприятный исход последней был в 35,2% (45/128) случаев ( $\chi^2_{\gamma}=45,66$ ,  $p=0,0000$ ; OR= 13,14 (5,44-32,82)).



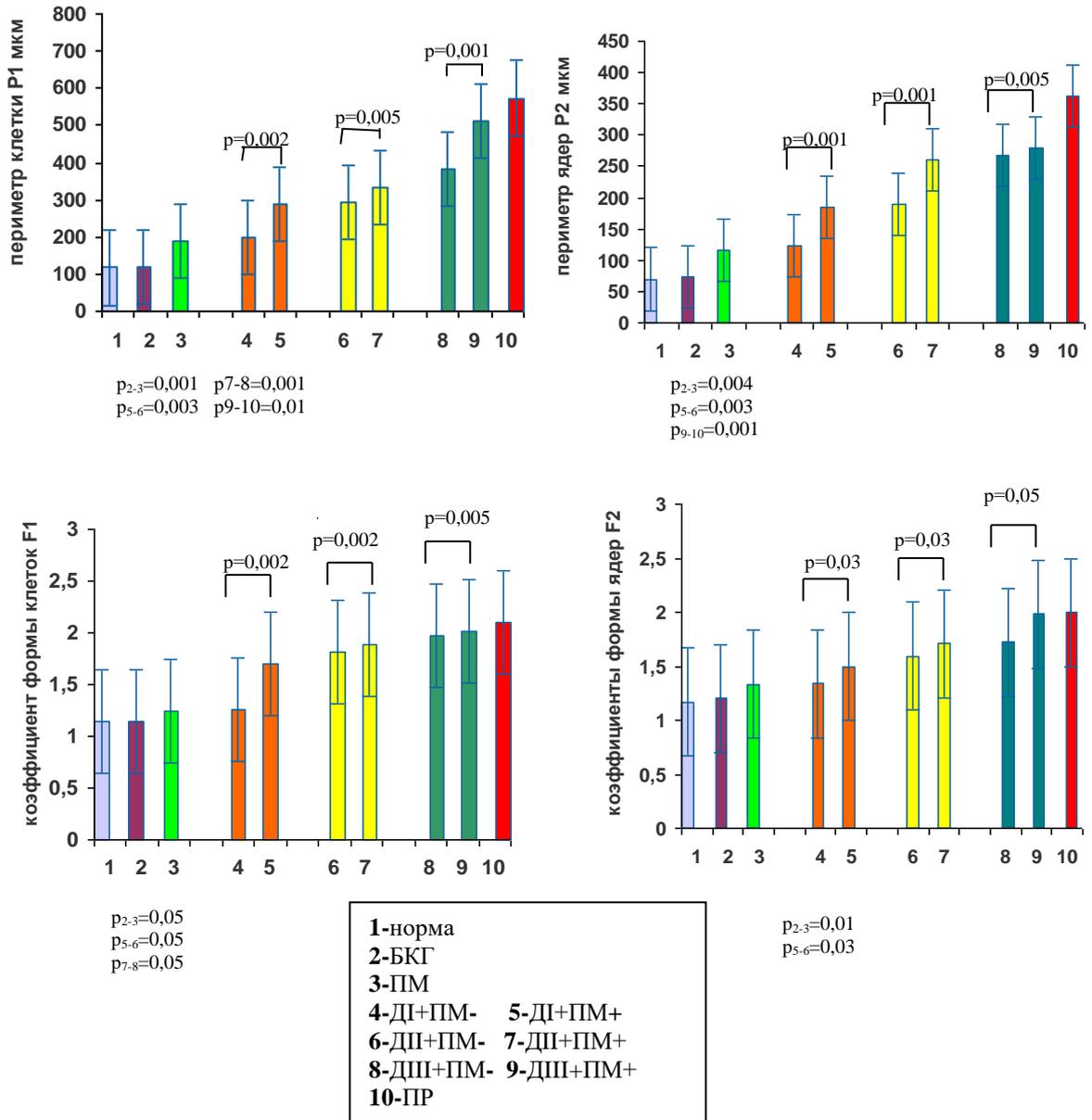


Рисунок 4 – Цитометрические параметры клеток и ядер при различных морфологических изменениях бронхиального эпителия.

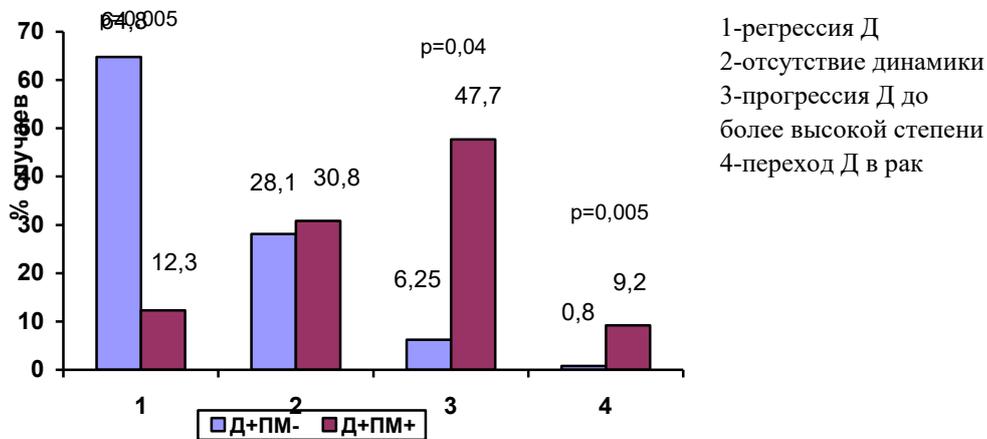


Рисунок 5 – Исход дисплазии в зависимости от ее сочетания с плоскоклеточной метаплазией.

Неблагоприятным исходом процесса считали его прогрессию или отсутствие динамики (стабилизация). При сочетании дисплазии с плоскоклеточной метаплазией (Д+ПМ+) в 47,7% (31/65) случаев дисплазия прогрессировала до более высокой степени, а 9,2% (6/65) – перешла в плоскоклеточный рак (рисунок 5). Без динамики процесс оставался в 30,8% (20/65) случаев (рисунок 5). Регрессия дисплазии отмечалась всего в 12,3% (8/65) случаев (рисунок 5).

В случаях «изолированной» дисплазии (Д+ПМ-) прогрессия последней до более высокой степени отмечалась в 6,25% (8/128) и в 0,8% (1/128) случаев – в плоскоклеточный рак (рисунок 5). В 28,1% (36/128) случаев процесс оставался в исходном состоянии на протяжении всего периода наблюдения (рисунок 5). У большинства пациентов (64,8% (83/128) случаев), дисплазия регрессировала полностью или до более низкой степени (рисунок 5).

Таким образом, при хроническом бронхите могут быть прогностически благоприятные и неблагоприятные варианты сочетания предопухолевых изменений бронхиального эпителия. Сочетание дисплазии бронхиального эпителия с плоскоклеточной метаплазией (Д+ПМ+) является неблагоприятным признаком, ассоциированным с необратимостью дисплазии и большей вероятностью ее прогрессии – 87,7% против 35,2% случаев при «изолированной» дисплазии ( $p=0,0000$ ).

### **Сравнительная характеристика морфологических изменений в эпителии бронхов мелкого калибра при немелкоклеточном раке легких**

Изучение частоты встречаемости морфологических изменений бронхиального эпителия при плоскоклеточном раке и аденокарциноме легких позволило установить, что наиболее часто наблюдаемым изменением, как при плоскоклеточном раке, так и при аденокарциноме легкого была «изолированная» базальноклеточная гиперплазия (БКГ+ПМ-Д-) – в 67,8% (95/140) случаев (рисунок 6). В 32,2% (45/140) случаев базальноклеточная гиперплазия сочеталась с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-) (рисунок 6). Плоскоклеточную метаплазию в отсутствие базальноклеточной гиперплазии (БКГ-ПМ+Д+) наблюдали в 7% (12/172) случаев (рисунок 6). У 11,6% (20/172) пациентов НМРЛ в отдаленных от опухоли бронхах ни БКГ, ни ПМ обнаружено не было (БКГ-ПМ-Д-), наблюдался неизменный бронхиальный эпителий.

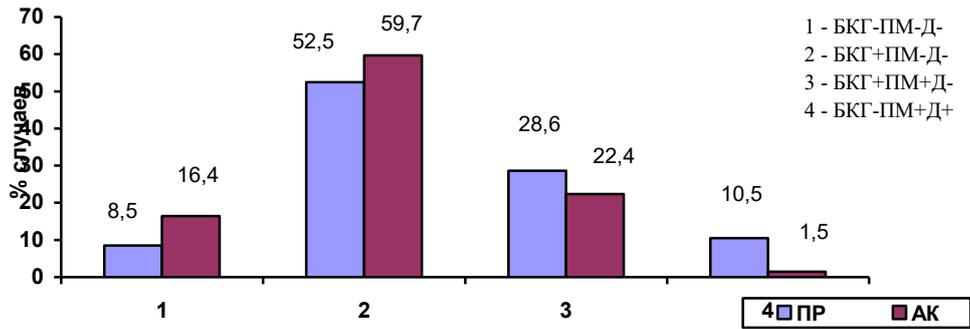


Рисунок 6 – Частота встречаемости различных вариантов морфологических изменений бронхиального эпителия при плоскоклеточном раке (PP) и аденокарциноме (AK) легкого.

Дисплазия бронхиального эпителия в нашем исследовании была выявлена только при плоскоклеточном раке легкого – в 9,5% (10/105) случаев, и чаще всего на фоне плоскоклеточной метаплазии в отсутствии базальноклеточной гиперплазии. При сочетании БКГ-ПМ+Д+ дисплазия отмечалась у 9 (81,8%) из 11 больных – против 1 (1,1%) из 94 случаев при других вариантах морфологических изменений бронхиального эпителия ( $\chi^2_{\gamma}=65,45$ ;  $p=0,00000$ ;  $OR=418,5$  (27,54-16213). Следует отметить, что из 9 случаев дисплазий, сочетающихся с плоскоклеточной метаплазией, в 7 (77,8%), дисплазия была II-III степени, в 2 (22,2%) – I степени.

У 79,7% (137/172) больных НМРЛ выявлен хронический бронхит курильщиков, 20,3% (35/172) больных были не курящие. Результаты исследования показали, что частота встречаемости изучаемых вариантов сочетаний морфологических изменений в мелких бронхах, как при плоскоклеточной карциноме, так и при аденокарциноме легких, не имела существенных различий у курящих и не курящих пациентов (рисунок 7).

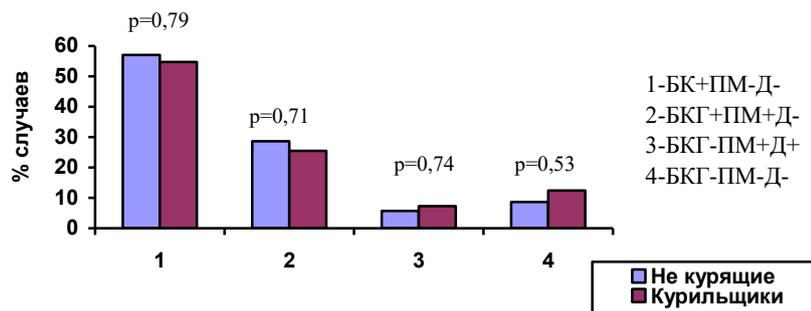


Рисунок 7 – Частота встречаемости различных вариантов морфологических изменений бронхиального эпителия при НМРЛ в зависимости от статуса курения.

Проведение больным неoadъювантной химиотерапии при НМРЛ не оказывало влияния на частоту встречаемости и вариант сочетания разных типов морфологических изменений эпителия мелких бронхов (рисунок 8).

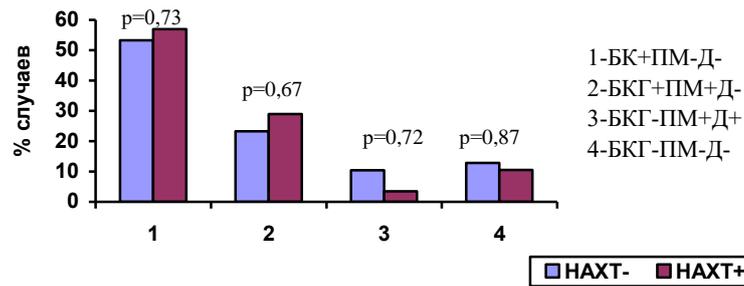


Рисунок 8 – Частота встречаемости различных вариантов морфологических изменений бронхиального эпителия в зависимости от проведения пациентам неoadъювантной химиотерапии при немелкоклеточном раке легкого.

Кроме того, не было выявлено значимых отличий в характере экспрессии маркеров пролиферативной активности, апоптоза, дифференцировки плоского эпителия, а также по выраженности и составу воспалительного инфильтрата между пациентами, получившими НАХТ, и без таковой при каждом из вариантов морфологических изменений бронхиального эпителия.

#### **Характеристика «изолированной» базальноклеточной гиперплазии эпителия бронхов мелкого калибра при немелкоклеточном раке легкого**

Группа пациентов, у которых в мелких бронхах наблюдалась «изолированная» базальноклеточная гиперплазия, была наиболее многочисленной и составляла 55,2% (95/172) случаев от всех наблюдений при немелкоклеточном раке легкого. В условиях хронического воспаления базальноклеточная гиперплазия развивается как проявление ускоренной регенерации и замедления дифференцировки эпителия. Среди всех вариантов морфологических изменений бронхиального эпителия для «изолированной» БКГ (БКГ+ПМ-Д-) характерны самые низкие значения показателей экспрессии маркеров пролиферативной активности и апоптоза. Однако в сравнении с нормальным эпителием (рисунок 9) в клеточных элементах данного варианта БКГ пролиферативная активность была значимо больше:  $(18,3 \pm 7,1)\%$  против  $(12,3 \pm 5,1)\%$  ( $p=0,005$ ) при плоскоклеточном раке и  $(17,2 \pm 4,8)\%$  против  $(12,5 \pm 4,8)\%$  ( $p=0,05$ ) при аденокарциноме. Отмечалось больше клеток с экспрессией p53 –  $(9,6 \pm 2,3)\%$  против  $(4,4 \pm 1,2)\%$  ( $p=0,01$ ) при ПР и  $(9,1 \pm 2,1)\%$  против  $(3,9 \pm 1,7)\%$  ( $p=0,001$ ) при АК, а также клеток с экспрессией Vcl-2 –  $(9,3 \pm 4,3)\%$  против  $(5,3 \pm 2,3)\%$  ( $p=0,05$ ) при ПР и  $(9,7 \pm 3,9)\%$  против  $(5,1 \pm 2,2)\%$  ( $p=0,02$ ) при АК. Эти наблюдения свидетельствуют о существенном нарушении физиологической регенерации эпителия. Базальные клетки с мутантным p53 и экспрессией Vcl-2 обладают большей

выживаемостью и в случаях появления онкогенных мутаций могут стать источником развития неопластического клона с вероятностью прогрессии до злокачественной опухоли. В пользу того, что в «изолированной» базальноклеточной гиперплазии нарушена дифференцировка и появляются менее зрелые клетки, свидетельствует и уменьшение при «изолированной» БКГ в сравнении с нормой эпителиальных клеток, экспрессирующих CD138 –  $(38,5 \pm 3,7)\%$  против  $(58,5 \pm 3,2)\%$  ( $p=0,001$ ) при ПР и  $(40,2 \pm 2,9)\%$  против  $(59,1 \pm 3,6)\%$  ( $p=0,0001$ ) при АК (рисунок10).

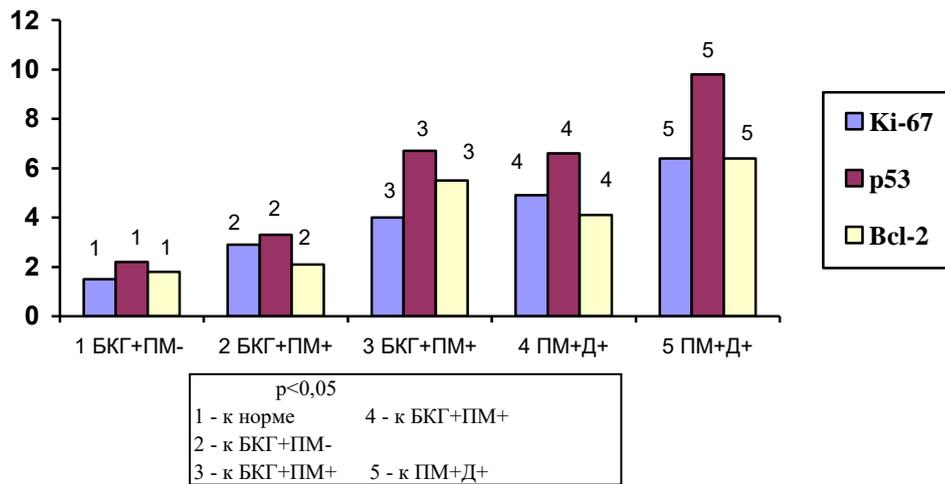


Рисунок 9 – Доля клеток с экспрессией Ki-67, p53 и Bcl-2 при разных вариантах сочетания морфологических изменений бронхиального эпителия, отдаленного от НМРЛ (относительно нормы). Заглавными буквами обозначены сравниваемые процессы.

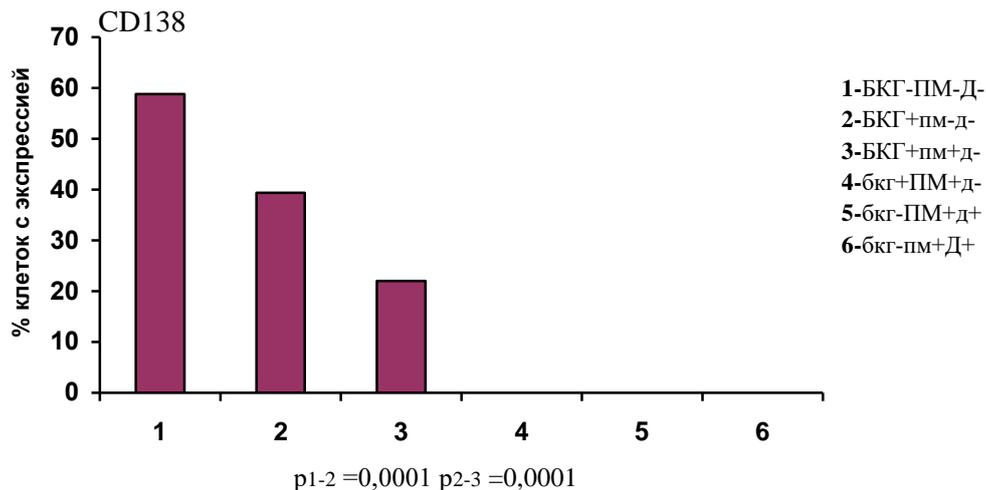


Рисунок 10 – Характер экспрессии CD138 при различных вариантах морфологических изменений бронхиального эпителия. (Заглавными буквами обозначены сравниваемые процессы)

Проявления хронического воспаления вблизи «изолированной» базальноклеточной гиперплазии были более выраженными, чем вблизи бронхиального эпителия с нормальной морфологией, и имели ряд отличий. В сравнении с воспалительным инфильтратом под неизменным бронхиальным эпителием, его плотность при «изолированной» базальноклеточной гиперплазии была в 2,4 раза выше ( $14,2 \pm 4,7$  против  $5,8 \pm 3,1$  клеток на  $\text{мм}^2$ ) при плоскоклеточном раке, и в 3,4 раза выше ( $13,8 \pm 4,03$  против  $4,1 \pm 2,3$  клеток на  $\text{мм}^2$ ) – при аденокарциноме легких. Клеточный инфильтрат характеризовался большей инфильтрацией всеми изучаемыми клеточными элементами: CD20+ В лимфоцитами – в 1,5 раза, CD3+ Т лимфоцитами – в 2,4 раза, CD68+ макрофагами – в 1,9 раза, CD138+ плазматическими клетками – в 1,4 раза (таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика воспалительного инфильтрата вблизи нормального бронхиального эпителия и «изолированной» базальноклеточной гиперплазии при немелкоклеточном раке легкого

M±SD	Плоскоклеточный рак			Аденокарцинома		
	БКГ-ПМ-Д- n=9	БКГ (БКГ+ПМ-Д-) n=55		БКГ-ПМ-Д- n=11	БКГ (БКГ+ПМ-Д-) n=40	
	M±SD, %			M±SD, %		
CD 138	9,2±1,4	13,3±3,4	p=0,0007	8,8±1,2	12,6±2,1	p=0,0001
CD 68	11,7±1,7	23,1±3,6	p=0,00001	10,2±1,9	20,9±3,1	p=0,0000
CD 3	12,2±1,3	28,8±4,6	p=0,00001	11,8±1,5	29,6±4,3	p=0,0000
CD 20	9,9±1,1	14,5±1,6	p=0,0000	9,1±1,7	13,8±2,3	p=0,0001

Подобные изменения наблюдались как при плоскоклеточной карциноме, так и при аденокарциноме легкого (таблица 2). Большая выраженность хронического воспаления, согласно современным представлениям, по-видимому, и является причиной реакции бронхиального эпителия в форме базальноклеточной гиперплазии.

В отличие от других вариантов морфологических изменений бронхиального эпителия, наблюдаемых при НМРЛ, воспалительный инфильтрат вблизи «изолированной» БКГ характеризовался наименьшим числом CD138+ плазматических клеток, но самым большим количеством CD68+ макрофагов.

Полнотранскриптомное профилирование образцов «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-), полученных с помощью лазерной микродиссекции, выявило 1221 гиперэкспрессированных генов, из которых 680 были специфическими. Гипоэкспрессированных генов было выявлено 1334, их них специфических – 530 (рисунок 11). При этом в «изолированной» БКГ отсутствовала связь гиперэкспрессированных генов с известными биологическими процессами и сигнальными путями. Обнаружены связи между гипоэкспрессированными генами и большим

количеством разнообразных биологических процессов и сигнальных путей, связанных с иммунным ответом. Среди биологических процессов выделяли «ответ на цитокины», «регуляция продукции цитокинов», «ответ на интерферон гамма», «иммунный ответ», «клеточный хемотаксис», «регуляция клеточной пролиферации». Гипоэкспрессированные гены были связаны с такими сигнальными путями как, «роль фосфолипидов в фагоцитозе», «иммунорегуляторные взаимодействия между лимфоидными и нелимфоидными клетками», «активация рецептора Fcγ», «формирование активаторов C4 и C2 компонентов комплемента», «каскад комплемента», «классический путь активации комплемента», «клеточный цикл».

Результаты оценки экспрессии генов при «изолированной» БКГ позволяют предположить, что в данной подгруппе пациентов с плоскоклеточным раком легкого важным компонентом реакции респираторного эпителия является гипоэкспрессия генов, имеющих отношение к поддержке иммунновоспалительной реакции в строме. Не исключено, что именно такой характер реагирования эпителия на цитокины воспалительного инфильтрата обуславливает в этой группе наблюдения отсутствие прогрессии базальноклеточной гиперплазии до плоскоклеточной метаплазии.

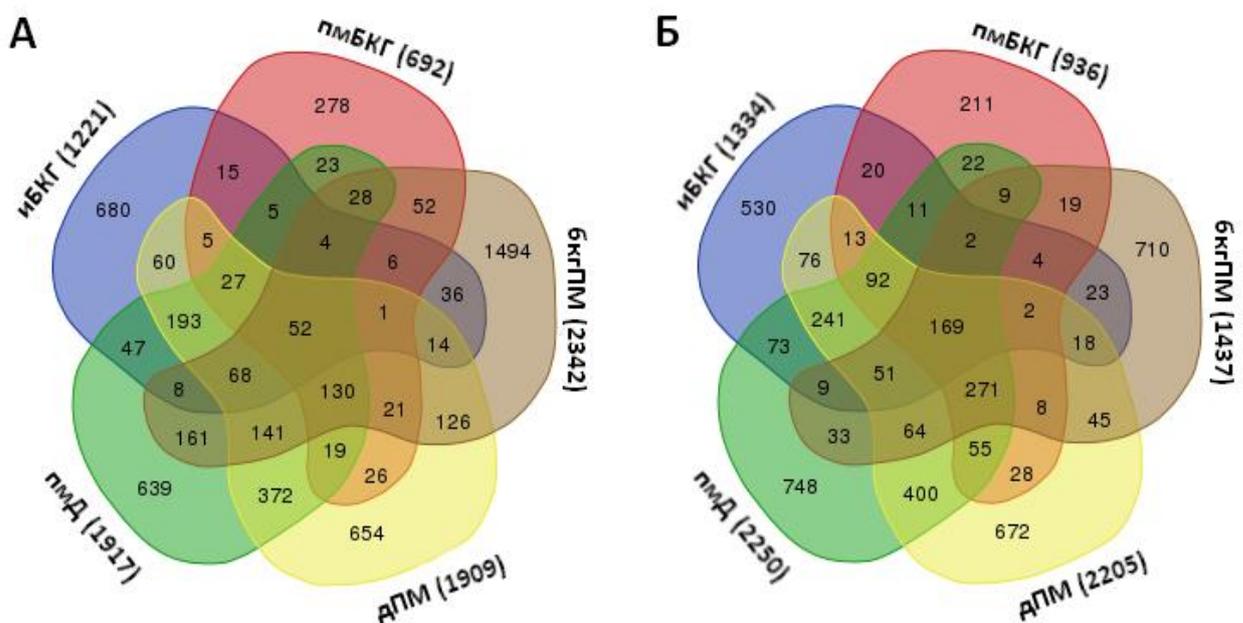


Рисунок 11 – Количество общих и специфических гипер- (А) и гипоэкспрессирующихся (Б) генов в различных вариантах морфологических изменений эпителия мелких бронхов, отдаленных от плоскоклеточного рака легкого.

### **Характеристика базальноклеточной гиперплазии, сочетанной с плоскоклеточной метаплазией, в бронхах мелкого калибра при немелкоклеточном раке легкого**

Группа пациентов, у которых в бронхах мелкого калибра наблюдалось сочетание базальноклеточной гиперплазии с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-), составляла 26,2% (45/172) случаев от всех наблюдений при немелкоклеточном раке легких. По гистологическим проявлениям базальноклеточная гиперплазия, которая сочетается с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-), неотличима от «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-). Однако результаты исследований экспрессии маркеров пролиферативной активности и некоторых белков, относящихся к апоптозу, демонстрируют значимые различия (рисунок 9). По сравнению с «изолированной» базальноклеточной гиперплазией, в участках сочетанной БКГ была выше пролиферативная активность – (34,9±1,7)% Ki-67+ клеток против (18,3±7,1)% (p=0,003) при плоскоклеточной карциноме и (33,6±1,5)% против (17,2±8,1)% (p=0,0001) при аденокарциноме. Подобные отличия обнаружены и относительно процента клеток в эпителии базальноклеточной гиперплазии, экспрессирующих p53. При сочетанной базальноклеточной гиперплазии таких клеток было больше, чем при «изолированной» базальноклеточной гиперплазии – (14,4±5,5)% против (9,6±2,3)% (p=0,0008) при плоскоклеточном раке и (13,9±5,1)% против (9,1±2,1)% (p=0,001) при аденокарциноме легких.

Процент клеток в участках сочетанной базальноклеточной гиперплазии, экспрессирующих Vcl-2, был на уровне тенденции больше – (11,0±3,8)% против (9,3±4,3)% (p=0,08), при плоскоклеточной карциноме и значимо больше – (17,2±3,5)% против (9,7±3,9)% (p=0,001), при аденокарциноме легких. Известно, что мутация p53 препятствует инициации апоптоза, а экспрессия Vcl-2 ингибирует апоптоз в случаях, когда возможна его инициация (Gu Q., Hu C., Chen Q., Xia Y., 2013; Khan, S., Jain, M., et al., 2015). Благодаря этому, по-видимому, возрастает вероятность выживания клеток с неблагоприятными мутациями.

Оценка экспрессии syndecan-1 (CD138), которая по данным литературы наблюдается в многослойном плоском эпителии и снижается в плоскоклеточных карциномах по мере уменьшения их дифференцировки (Jackson L.L., Wade Z., Hessler R.B., et al., 2007; Gharbaran R., 2014; Szatmári T., Ötvös R., Hjerpe A., et al., 2015), также свидетельствует о существовании различий между «изолированной» и сочетанной базальноклеточной гиперплазией бронхиального эпителия. В участках базальноклеточной гиперплазии, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией, процент клеток с экспрессией CD138 был меньше, чем при «изолированной» базальноклеточной гиперплазии – (21,8±2,6)% против

(38,5±2,7)% (p=0,003) при плоскоклеточном раке и (22,2±3,1)% против (40,2±2,9)% (p=0,002) при аденокарциноме легких (рисунок 10). Это значит, что при сочетанной базальноклеточной гиперплазии больше клеток теряют этот маркер дифференцировки.

Воспалительная инфильтрация вблизи участков сочетанной базальноклеточной гиперплазии на уровне тенденции была более выражена (15,7±4,5 лейкоцитов/мм<sup>2</sup> при плоскоклеточном раке и 15,8±4,7 лейкоцитов/мм<sup>2</sup> при аденокарциноме легких) по сравнению с «изолированной» БКГ (p=0,1). В отличие от «изолированной» базальноклеточной гиперплазии, при сочетанной БКГ (БКГ+ПМ+Д-) отмечалась более выраженная инфильтрация CD138+ плазматическими клетками – больше в 1,8 раза в случаях плоскоклеточного рака, а при аденокарциноме – в 1,6 раза; CD3+ Т-лимфоцитами – в 1,2 раза при НМРЛ (таблица 3). Процент же CD68+ макрофагов, напротив, был меньше в 1,3 раза при плоскоклеточном раке и в 1,2 раза при аденокарциноме легкого (таблица 3).

Таблица 3 – Характеристика воспалительного инфильтрата вблизи различных вариантов базальноклеточной гиперплазии при немелкоклеточном раке легкого

M±SD	Плоскоклеточный рак			Аденокарцинома		
	БКГ (БКГ+ПМ–Д-) n=55	БКГ (БКГ+ПМ+Д-) n=30		БКГ (БКГ+ПМ–Д-) n=40	БКГ (БКГ+ПМ+Д-) n=15	
	M±SD, %			M±SD, %		
CD 138	13,3±3,4	23,6±1,8	p=0,0002	12,6±2,1	19,7±5,3	p=0,0000
CD 68	23,1±3,6	18,1±4,9	p=0,004	20,9±3,1	18,2±3,3	p=0,02
CD 3	28,8±4,6	33,1±4,7	p=0,008	29,6±4,3	36,8±2,1	p=0,001
CD 20	14,5±1,6	17,3±2,1	p=0,0001	13,8±2,3	15,1±2,4	p=0,02

При базальноклеточной гиперплазии, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией, обнаружено 692 гиперэкспрессированных гена, из них – 278 специфических. Гипоэкспрессированных генов выявлено 936, среди них 211 специфических (рисунок 11). Связи гиперэкспрессированных генов с известными биологическими процессами и сигнальными путями при сочетанной базальноклеточной гиперплазии не найдено. Гипоэкспрессированные гены при данном варианте БКГ связаны с регуляцией процессов и путей, вовлеченных в организацию внеклеточного матрикса, продукцию молекул адгезии и клеточной пролиферации («интегриновыми взаимодействиями», «сборкой коллагеновых молекул, волокон и других многомерных структур» и «организацией внеклеточного матрикса»). В отличие от «изолированной» базальноклеточной гиперплазии, в БКГ сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией, среди гипоэкспрессированных генов отсутствуют гены, связанные с иммунновоспалительной реакцией. Не исключено, что экспрессия на «нормальном» уровне генов, имеющих

отношение к иммунным процессам, в сочетанной с плоскоклеточной метаплазией БКГ, делает ее «зависимой» от воспаления. С другой стороны, гипозэкспрессия генов, обеспечивающих взаимодействие с межклеточным матриксом, может нарушать нормальное эпителиально-стромальное взаимодействие. Можно допустить, что все это вместе взятое нарушает обратимость БКГ и способствует плоскоклеточной метаплазии, с которой она в этой группе сочетается.

### **Характеристика плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с базальноклеточной гиперплазией, эпителия бронхов мелкого калибра при немелкоклеточном раке легкого**

Плоскоклеточная метаплазия при таком варианте морфологических изменений, вероятно, развивается из базальноклеточной гиперплазии, а не возникает «de novo». Персистенция, как правило, обратимой базальноклеточной гиперплазии может быть обусловлена продолжающимся воздействием факторов ее вызывающих, например, ряда цитокинов клеток воспалительного инфильтрата.

Сравнение плоскоклеточной метаплазии с базальноклеточной гиперплазией из этого сочетания выявило в плоскоклеточной метаплазии большую выраженность пролиферативной активности –  $(48,9 \pm 9,8)\%$  против  $(34,9 \pm 1,7)\%$  соответственно ( $p=0,04$ ) при плоскоклеточной карциноме и  $(47,4 \pm 8,3)\%$  против  $(33,6 \pm 1,5)\%$  ( $p=0,01$ ) при аденокарциноме легкого (рисунок 8). В эпителии с плоскоклеточной метаплазией больше, чем в эпителии БКГ клеток, экспрессирующих p53:  $(29,4 \pm 7,6)\%$  против  $(14,4 \pm 5,5)\%$  ( $p=0,001$ ) при плоскоклеточном раке и  $(29,1 \pm 6,2)\%$  против  $(13,9 \pm 5,1)\%$  ( $p=0,0000$ ) при аденокарциноме; клеток с экспрессией Vcl-2 –  $(29,4 \pm 4,1)\%$  против  $(11,0 \pm 3,8)\%$  ( $p=0,0001$ ) в случаях плоскоклеточной карциномы, при аденокарциноме –  $(28,7 \pm 4,2)\%$  против  $(17,2 \pm 3,1)\%$  ( $p=0,0002$ ; рисунок 9). Экспрессия CD138 при плоскоклеточной метаплазии отсутствовала (рисунок 8). Отсутствие экспрессии CD138 может свидетельствовать о существенном нарушении дифференцировки клеток уже при данном процессе.

Воспалительная инфильтрация стромы вблизи плоскоклеточной метаплазии менее выраженная ( $12,9 \pm 4,4$  лейкоцитов/мм<sup>2</sup> при плоскоклеточном раке и  $9,6 \pm 3,1$  лейкоцитов/мм<sup>2</sup> – при аденокарциноме) по сравнению с сочетающейся с ней базальноклеточной гиперплазией ( $15,7 \pm 4,5$  лейкоцитов/мм<sup>2</sup>;  $p=0,003$  и  $15,8 \pm 4,7$  лейкоцитов/мм<sup>2</sup>;  $p=0,005$  соответственно). Отмечено уменьшение инфильтрации всеми типами лейкоцитов: CD3+ Т-лимфоцитами в 1,8 раза, CD20+ В-лимфоцитами – в 1,4 раза, CD68+ макрофагами – в 1,2 раза, CD138+ плазматическими клетками – в 1,5 раза при плоскоклеточной карциноме (таблица 4). В случаях аденокарциномы легкого в

воспалительном инфильтрате около плоскоклеточной метаплазии было в 2 раза меньше CD3+ Т-лимфоцитов и в 1,3 раза – В-лимфоцитов по сравнению с инфильтратом сочетающейся с ней базальноклеточной гиперплазией (таблица 4).

Таблица 4 – Характеристика воспалительного инфильтрата вблизи базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии при немелкоклеточном раке легкого

	Плоскоклеточный рак			Аденокарцинома		
	БКГ (БКГ+ПМ+Д-) n=30	ПМ (БКГ+ПМ+Д-) n=30		БКГ (БКГ+ПМ+Д-) n=15	ПМ (БКГ+ПМ+Д-) n=15	
	M±SD, %			M±SD, %		
CD 138	23,6±1,8	15,1±3,7	p=0,004	19,7±5,3	17,5±4,6	p=0,23
CD 68	18,1±4,9	15,2±4,9	p=0,03	18,2±3,3	15,3±5,7	p=0,07
CD 3	33,1±4,7	18,6±3,8	p=0,0001	36,8±2,1	18,1±2,9	p=0,0001
CD 20	17,3±2,1	12,3±3,4	p=0,0002	15,1±2,4	11,8±2,8	p=0,02

В плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с базальноклеточной гиперплазией, обнаружено значительно больше, чем при БКГ гипер- (2342) и гипоекспрессированных (1437) генов (рисунок 11). Специфическими из них были 1494 и 710 генов соответственно (рисунок 11). Среди гиперэкспрессированных отмечались гены, ассоциированные с «клеточным сигналингом». Аннотирование гипоекспрессирующихся генов выявило регуляцию двух процессов: транскрипции/экспрессии («регуляция транскрипции», «регуляция генной экспрессии», «регуляция биосинтеза РНК») и «дифференцировки эпителиальных клеток легкого». Связь гипоекспрессированных генов с процессом «дифференцировки эпителиальных клеток легкого», по-видимому, в какой-то степени отражает трансформацию респираторного эпителия бронхов в плоский эпителий.

#### **Характеристика плоскоклеточной метаплазии, сочетающаяся с дисплазией, в бронхах мелкого калибра при немелкоклеточном раке легкого**

Данный вариант морфологических изменений встречается значительно реже, чем другие типы морфологических изменений бронхов – в группе больных составляет 5,2% (9/172) от исследованных случаев и только при плоскоклеточной карциноме. Не исключено, что в такой ситуации этиологический фактор прекращает воздействие на эпителий, новые фокусы базальноклеточной гиперплазии не возникают, а имеющиеся регрессируют или полностью переходят в плоскоклеточную метаплазию. Плоскоклеточная метаплазия персистирует и трансформируется в дисплазию.

Значения показателей пролиферативной активности и апоптоза в клеточных элементах плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с дисплазией (БКГ-ПМ+Д+), не

имеют значимых отличий от варианта плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ+Д-). Экспрессия маркера дифференцировки плоского эпителия CD138 в участках данного варианта плоскоклеточной метаплазии также отсутствует (рисунок 10).

Выраженность воспалительной инфильтрации около участков плоскоклеточной метаплазии ( $14,2 \pm 6,3$  лейкоцитов/ $\text{мм}^2$ ), которая сочеталась с дисплазией, и клеточный состав инфильтрата не отличались от инфильтрата вблизи плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с базальноклеточной гиперплазией ( $12,9 \pm 4,4$  лейкоцитов/ $\text{мм}^2$ ,  $p=0,53$ ). Исключение составило число CD68+ макрофагов. Их количество в инфильтрате вблизи плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с дисплазией (БКГ-ПМ+Д+), было значимо меньше – ( $15,2 \pm 4,9$ )%, чем вблизи плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ+Д-) – ( $21,3 \pm 8,9$ )% ( $p=0,01$ ; таблица 5).

Таблица 5 – Характеристика воспалительного инфильтрата вблизи различных вариантов плоскоклеточной метаплазии при немелкоклеточном раке легкого

	Плоскоклеточный рак			Аденокарцинома
	1. ПМ (БКГ+ПМ+Д-) n=30	2. ПМ (БКГ+ПМ+Д+) n=7		3. ПМ (БКГ+ПМ+Д-) n=15
	M±SD, %			M±SD, %
CD 138	15,1±3,7	16,6±5,1	p=0,33	17,5±4,6
CD 68	15,2±4,9	21,3±8,9	p=0,01	15,3±5,7
CD 3	18,6±3,8	17,4±4,2	p=0,42	18,1±2,9
CD 20	12,3±3,4	11,5±3,4	p=0,53	11,8±2,8

При плоскоклеточной метаплазии, которая сочеталась с дисплазией, отмечена гиперэкспрессия 1909 генов, из которых 654 были специфическими (рисунок 11). Из 2205 гипозэкспрессированных генов специфическими являлись 672 (рисунок 11). Гиперэкспрессированные гены имели отношение к клеточному делению и ответу на ксенобиотики. Кроме этого был гиперэкспрессирован ген *KHK*, описанный в связи с патогенезом и метастазированием рака легкого (Dat et al., 2012). Последнее, особенно примечательно, поскольку именно в обсуждаемой группе больных с плоскоклеточной карциномой легкого отмечена более высокая частота гематогенного метастазирования. Гипозэкспрессированные гены, отражающие потерю способности к дифференцировке реснитчатого эпителия, подчеркивают, по-видимому, определенную степень необратимости плоскоклеточной метаплазии. Гипозэкспрессированными были также гены, связанные с организацией внеклеточного матрикса, хемотаксисом и миграцией лейкоцитов. При данном варианте плоскоклеточной метаплазии гипозэкспрессируются

гены, ассоциированные с сигнальными путями различных заболеваний, в основе которых лежит воспалительный процесс (малярия, коклюш, легионеллез, ревматоидный артрит). Эти результаты позволяют предположить, что клеточные элементы плоскоклеточной метаплазии, сочетающиеся с дисплазией, не обладают заметными способностями к стимуляции воспаления.

**Характеристика дисплазии бронхиального эпителия, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией, в бронхах мелкого калибра при плоскоклеточном раке легкого**

В слизистой бронхов мелкого калибра, расположенных в отдалении от плоскоклеточного рака, очаги диспластических изменений были выявлены преимущественно в тех случаях, когда отсутствовала базальноклеточная гиперплазия, но определялась плоскоклеточная метаплазия (БКГ-ПМ+Д+) – 8,6% (9/105) случаев. Частота обнаружения дисплазии бронхиального эпителия при других вариантах морфологических изменений составляла 0,95% (1/105) случаев ( $p=0,03$ ). В наших наблюдениях дисплазия не выявлена в бронхах такого калибра при аденокарциномах. Обнаружение дисплазии в случаях с плоскоклеточными карциномами свидетельствует о том, что в данной подгруппе пациентов, в отличие от подгруппы с аденокарциномой легких, существуют условия для прогрессии предопухолевых изменений вплоть до малигнизации.

Значения показателей пролиферативной активности и апоптоза в клеточных элементах дисплазии II-III степени значимо выше по сравнению с другими вариантами морфологических изменений бронхиального эпителия, в том числе относительно сочетающейся с ней плоскоклеточной метаплазии (рисунок 9). Процент клеток с экспрессией Ki-67 составил  $(77,1 \pm 10,7)\%$  против  $(59,2 \pm 9,1)\%$  ( $p=0,03$ ) при плоскоклеточной метаплазии (БКГ-ПМ+Д+), p53 –  $(42,1 \pm 1,3)\%$  против  $(29,3 \pm 8,8)\%$  ( $p=0,02$ ) и Vcl-2 –  $(33,0 \pm 11,3)\%$  против  $(21,1 \pm 7,1)\%$  ( $p=0,02$ ) соответственно (рисунок 9). Экспрессия CD138 в клетках с диспластическими изменениями, как и в случаях плоскоклеточной метаплазии, отсутствовала.

Воспалительная инфильтрация стромы вблизи дисплазии II-III степени наиболее слабо выражена по сравнению с другими вариантами морфологических изменений эпителия бронхов –  $11,4 \pm 6,1$  лейкоцитов/ $\text{мм}^2$ . Это связано с уменьшением в составе воспалительного инфильтрата CD3+ Т-лимфоцитов  $(9,6 \pm 3,3)\%$  и CD20+ В- лимфоцитов  $(8,1 \pm 4,6)\%$ , которых в инфильтрате вблизи дисплазии намного меньше по сравнению с другими вариантами морфологических изменений бронхиального эпителия (таблица 6). Содержание в воспалительном инфильтрате вблизи дисплазии CD138 + плазматических

клеток было одинаковым с сочетающейся с ней плоскоклеточной метаплазией, а CD68+ макрофагов меньше на уровне тенденции (таблица 6). Такие различия проявления хронического воспаления в мелких бронхах вблизи дисплазии и плоскоклеточной метаплазии в одном и том же бронхе, подчеркивают существенные связи между характером изменений эпителия и воспалением. Причем эти связи имеют, по-видимому, причинно-следственный характер.

Таблица 6 – Характеристика воспалительного инфильтрата вблизи плоскоклеточной метаплазии и дисплазии при плоскоклеточном раке легкого

	Плоскоклеточный рак		p
	ПМ (БКГ+ПМ+Д+) n=7	Д (БКГ+ПМ+Д+) n=7	
	M±SD, %		
CD 138	16,6±5,1	18,6±6,5	p=0,5
CD 68	21,3±8,9	15,02±8,7	p=0,07
CD 3	17,4±4,2	9,6±3,3	p=0,002
CD 20	11,5±3,4	8,1±4,6	p=0,05

При дисплазии эпителия II-III степени, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией, наблюдалась гиперэкспрессия 1917 генов и гипоекспрессия 2250 генов. Специфическими из них были 639 гипер- и 748 гипоекспрессированных генов (рисунок 11). Среди специфических гиперэкспрессированных генов определяются гены, ассоциированные с биологическими процессами и сигнальными путями, участвующими в клеточном делении и процессе старения клеток. Отмечена гиперэкспрессия генов (*MS4A3*, *KCNJ3*, *SYNPO2L*), причастных к развитию немелкоклеточного рака легких (Rauch et al., 2012; Zheng et al., 2013; Gottschling et al., 2013). Эти данные подтверждают существующие представления о том, что молекулярные изменения, приводящие в конечном итоге к развитию опухоли, могут выявляться уже в предопухолевых процессах (Lantuejoul S., Salameire D., et al., 2009; Aik T. Ooi, Adam C. Gower, et al., 2014). Гипоекспрессированными были гены, связанные с биологическими процессами и сигнальными путями, вовлеченными в воспаление и иммунный ответ («регуляция продукции цитокинов», «клеточный хемотаксис», «положительная регуляция миграции лейкоцитов», «хемокин-рецепторное связывание», «положительная регуляция иммунного ответа» «гуморальный ответ», «острый воспалительный ответ», «воспалительный ответ», «каскад комплемента»). Кроме того, как и при плоскоклеточной метаплазии, при дисплазии были гипоекспрессированы гены, связанные с дифференцировкой бронхиального эпителия

(биологические процессы: «клеточная дифференцировка», «сборка реснитчатого эпителия»).

Таким образом, в эпителии бронхов мелкого калибра, отдаленном от НМРЛ, возникают различные варианты сочетаний морфологических изменений эпителия. Базальноклеточная гиперплазия, плоскоклеточная метаплазия и дисплазия бронхиального эпителия в бронхах, отдаленных от опухоли, в зависимости от варианта их сочетания друг с другом, характеризуются неодинаковыми морфофункциональными характеристиками. Каждому из процессов свойственны свои особенности воспалительной реакции, а также экспрессия специфических генов. Проведение больным НАХТ при немелкоклеточном раке легкого не оказывает существенного влияния на частоту встречаемости и морфофункциональные характеристики базальноклеточной гиперплазии, плоскоклеточной метаплазии и диспластических изменений, возникающих в слизистой бронхов мелкого калибра, отдаленных от опухоли.

#### **Связь различных вариантов сочетания морфологических изменений в эпителии бронхов мелкого калибра с рецидивированием и гематогенным метастазированием немелкоклеточного рака легких**

Представленные выше результаты исследования позволяют сделать предположение о существовании различий эпителиально-стромальных отношений при разных вариантах сочетания морфологических изменений, которые могут быть сопряжены с тем или иным вариантом паренхиматозно-стромальных отношений в карциномах, при которых мы изучали изменения в мелких бронхах. Поскольку стромально-паренхиматозные отношения существенно влияют на прогрессию опухоли (McMillan D.C. 2012; Qiang G., Liang C., Xiao F., et. al. 2015; Müller P., Rothschild S.I, Arnold W., et. al. 2016), можно предполагать, что в условиях хронического воспаления эпителиально-стромальные отношения в бронхах мелкого калибра, расположенных в отдалении от опухоли, могут в определенной степени отражать конститутивные особенности развития воспаления в соответствующей группе пациентов и быть опосредовано связанными с паренхиматозно-стромальными отношениями в самой опухоли, и с ее прогрессией. Исходя из этого, анализировалась связь характера морфологических изменений бронхиального эпителия, отдаленного от НМРЛ, с развитием рецидивов, лимфогенных и гематогенных метастазов. Пациенты после оперативного лечения наблюдались в динамике на протяжении 60 месяцев. В группе больных плоскоклеточным раком легкого (n=105), один пациент, у которого в отдаленном от опухоли эпителии бронхов была выявлена плоскоклеточная метаплазия, сочетающаяся с дисплазией (БКГ-ПМ+Д+) умер через 3 месяца после

оперативного лечения, поэтому при дальнейшем исследовании наблюдалось 104 пациента.

На момент проведения оперативного лечения у 42,7% (73/171) больных НМРЛ определялись синхронные лимфогенные метастазы. Связи между вариантами сочетаний морфологических изменений, наблюдаемых в бронхиальном эпителии при НМРЛ, с развитием синхронных лимфогенных метастазов выявить не удалось.

Рецидивы НМРЛ в нашем исследовании определялись в 12,8% (22/171) случаев, из них при плоскоклеточном раке – 14,4% (15/104), при аденокарциноме легкого – 10,5% (7/67). Причем, в 81,8% (18/22) это были отсроченные лимфогенные метастазы, в 18,2% (4/22) – рецидивы в культе бронха. Вероятность рецидивирования была сопряжена с сочетанием базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии (БКГ+ПМ+Д-). Подавляющее число рецидивов возникло в этой группе – 46,7% (21/45) случаев. При других вариантах морфологических изменений бронхиального эпителиа рецидив НМРЛ был найден только в 0,8% (1/126) случаев ( $\chi^2_{\gamma}=58,22$ ,  $p=0,0000$ ,  $OR=109,38$ , 95% CI (14,35-2287,02)).

При плоскоклеточном раке легкого рецидивы в большинстве случаев [93,3% (14/15)] были выявлены при сочетании базальноклеточной гиперплазии с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-) и лишь в 6,7% (1/15) случаев – при «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-). Рецидивы аденокарциномы легкого наблюдались только при сочетании базальноклеточной гиперплазии с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-) – 100% (7/7).

Характер экспрессии маркеров пролиферативной активности, апоптоза и клеточной дифференцировки в фокусах базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии (БКГ+ПМ+Д-) – группа, в которой зарегистрированы рецидивы, не зависел от наличия проявления прогрессии. Воспалительный инфильтрат вблизи базальноклеточной гиперплазии у пациентов с рецидивами плоскоклеточного рака легкого характеризовался меньшим числом CD3+ Т-лимфоцитов – (26,6±3,8)% против (33,9±3,7)% ( $p=0,03$ ) в случаях отсутствия рецидивов. При аденокарциноме легкого, в случаях наличия рецидивов, в воспалительном инфильтрате базальноклеточной гиперплазии отмечалось меньше CD138+ плазматических клеток – (16,3±3,5)% против (23,1±5,4)% ( $p=0,04$ ). По другим типам лейкоцитов состав воспалительного инфильтрата в случаях наличия рецидивов существенно не отличался от случаев с их отсутствием.

Гематогенные метастазы НМРЛ были выявлены в 28,1% (48/171) случаев, из них 29,8% (31/104) – при плоскоклеточном раке; 25,4% (17/67) – при аденокарциноме легкого и регистрировались в основном при отсутствии рецидивов – 97,9% (47/48), а не при их

наличии – 2,1% ((1/48);  $\chi^2_{\gamma}=4,11$ ,  $p=0,04$ ). Только в одном случае плоскоклеточной карциномы легкого были обнаружены рецидив и наличие гематогенного метастаза. Чаще всего ГМ наблюдались в тех случаях, когда в отдаленных от опухоли мелких бронхах определялась «изолированная» базальноклеточная гиперплазия (БКГ+ПМ-Д-) – 43,2% (41/95). При других вариантах морфологических изменений бронхиального эпителия гематогенные метастазы отмечались у 9,2% (7/76) пациентов ( $\chi^2_{\gamma}=22,45$ ,  $p=0,0000$ , OR=109,38 95% CI (2,93-19,93)).

При плоскоклеточном раке легкого гематогенные метастазы диагностировались в 80,6% (25/31) случаев при «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-), в 19,4% (6/31) – при дисплазии, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией (БКГ-ПМ+Д+). По частоте встречаемости гематогенных метастазов группы БКГ+ПМ-Д- [45,5% (25/55)] и БКГ-ПМ+Д+ [60% (6/10)] не имели между собой статистически значимых отличий ( $\chi^2_{\gamma}=0,25$ ,  $p=0,61$ ). Гематогенные метастазы аденокарциномы легкого также чаще всего наблюдались у пациентов с «изолированной» базальноклеточной гиперплазией бронхиального эпителия (БКГ+ПМ-Д-) – 94,1% (16/17) случаев. В 5,9% (1/17) случаев гематогенные метастазы были выявлены в группе пациентов с сочетанием БКГ+ПМ+Д- в эпителии бронхов. При отсутствии морфологических изменений в слизистой оболочке бронхов (БКГ-ПМ-Д-), отдаленных от НМРЛ, не было выявлено ни гематогенных метастазов, ни рецидивов (0/20).

Результаты исследования характера экспрессии маркеров пролиферативной активности, апоптоза и клеточной дифференцировки показали, что в случаях наличия ГМ отмечался более высокий уровень экспрессии белка p53 в клетках «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-), чем при их отсутствии: (9,1±4,5)% против (6,3±4,8)% ( $p=0,04$ ) при плоскоклеточном раке; (10,8±3,8)% против (7,2±5,9)% при аденокарциноме легкого ( $p=0,04$ ). Отличия воспалительной инфильтрации при «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-) у пациентов с возникшими гематогенными метастазами аденокарциномы легкого проявились снижением числа CD68+ макрофагов с (21,8±3,3)% до (19,5±2,0)% ( $p=0,02$ ).

В группе БКГ-ПМ+Д+ (плоскоклеточный рак легкого), уровень экспрессии маркеров пролиферативной активности и апоптоза в очагах ПМ и Д был одинаков при наличии и отсутствии ГМ. Характер воспалительной инфильтрации в участках плоскоклеточной метаплазии и дисплазии у пациентов с гематогенными метастазами и без таковых не имел отличий.

Следует отметить отсутствие разницы по частоте встречаемости рецидивов и гематогенных метастазов при различных вариантах сочетаний морфологических изменений в мелких бронхах у курящих и не курящих пациентов (таблица 7).

Таблица 7 – Связь частоты рецидивирования и гематогенного метастазирования с вариантами сочетания морфологических изменений эпителия мелких бронхов и статусом курения при немелкоклеточном раке легкого

Вариант сочетания изменений в бронхах	Вариант прогрессии n (%)	Курящие n (%)	Не курящие n (%)	Уровень достоверности
БКГ+ПМ+Д- n=30 (ПР)	Рец+	10/25(40)	4/5 (80)	$\chi^2 \nu=1,31$ p=0,25
	Рец-	15/25(60)	1/5 (20)	
БКГ+ПМ-Д- n=55 (ПР)	ГМ+	21/46 (45,7)	4/9 (44,4)	$\chi^2 \nu=0,09$ p=0,76
	ГМ-	25/46 (54,3)	5/9 (55,6)	
БКГ+ПМ+Д- n=15 (АК)	Рец+	6/10 (60)	1/5 (20)	$\chi^2 \nu=0,84$ p=0,36
	Рец-	4/10 (40)	4/5 (80)	
БКГ+ПМ-Д- n=40 (АК)	ГМ+	12/29 (41,4)	4/11 (36,4)	$\chi^2 \nu=0,01$ p=0,94
	ГМ-	17/29 (58,6)	7/11 (63,6)	

Таким образом, базальноклеточная гиперплазия, плоскоклеточная метаплазия и дисплазия бронхиального эпителия, развившиеся в условиях хронического воспаления в сегментарных бронхах или бронхах мелкого калибра, отдаленных от опухоли, в зависимости от варианта сочетания этих изменений друг с другом, характеризуются разной степенью связи с прогрессией дисплазии и немелкоклеточного рака легкого.

Сочетание плоскоклеточной метаплазии и дисплазии респираторного эпителия (БКГ-ПМ+Д+) в условиях хронического воспаления в сегментарных бронхах связано с прогрессией дисплазии, а в мелких бронхах с гематогенным метастазированием рака легкого. Результаты проведенного исследования позволяют предположить, что плоскоклеточная метаплазия, сочетающаяся с базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ+Д-), скорее обратима. Об этом можно судить по «нормальной» экспрессии (отсутствию гипоекспрессии) генов, связанных со «сборкой реснитчатого эпителия». Напротив, о необратимости плоскоклеточной метаплазии, сочетанной с дисплазией (БКГ-ПМ+Д+), свидетельствует гипоекспрессия этих генов. Плоскоклеточная метаплазия в таких условиях не только скорее необратима, но и имеет склонность к прогрессии в дисплазию, поэтому и сочетается с ней.

Базальноклеточная гиперплазия, сочетающаяся с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-), связана с развитием рецидивов. Наличие дисплазии в случаях отсутствия сочетания БКГ+ПМ+ при плоскоклеточном раке легкого не увеличивает риск развития

рецидивов. «Изолированная» базальноклеточная гиперплазия (БКГ+ПМ-Д-) связана с развитием гематогенных метастазов.

Объяснить связь между вариантом сочетания морфологических изменений в эпителии бронхов, отдаленных от опухоли, с прогрессией НМРЛ, по-видимому можно обнаруженными нами молекулярно-генетическими различиями между «изолированной» базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ-Д-) и сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-). Не исключено, что вариант воспаления в стенке бронха и тип реагирования бронхиального эпителия на цитокины отражают индивидуальные особенности иммунной системы пациента, и могут в какой-то степени коррелировать с характером воспалительного микроокружения в строме карциномы. Действительно, мы обнаружили различия в проявлениях воспаления при наличии и отсутствии гематогенных метастазов. Изучение различных субпопуляций Т-лимфоцитов (хелперов, Treg), субпопуляций макрофагов, с определением в каждом случае преобладающего типа иммуновоспалительных реакций, позволит проверить эту гипотезу. Исходя из нее, при сочетании базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии (БКГ+ПМ+Д-) возникает конститутивно обусловленный вариант иммуновоспалительной реакции, который отражает существенные особенности интратуморальной реакции, способствующей рецидивированию. В случаях «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-), по-видимому, развивается вариант иммуновоспалительной реакции, коррелирующий с гематогенным метастазированием. Следует отметить, что только при «изолированной» базальноклеточной гиперплазии и дисплазии, сочетанной с плоскоклеточной метаплазией, которые являются прогностическими факторами высокого риска развития гематогенных метастазов, наблюдается схожий характер экспрессии генов (гипоэкспрессия), имеющих отношение к иммунным реакциям и воспалению. Это предполагает не только низкую чувствительность эпителия к цитокинам, продуцируемым клетками воспалительного инфильтрата, но и меньшее влияние эпителия на воспалительный процесс. Действительно, именно при таком сочетании процессов вблизи участков базальноклеточной гиперплазии и дисплазии отмечена наименьшая степень воспалительной инфильтрации.

Существенные различия генетических и морфофункциональных характеристик базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии в зависимости от варианта их сочетания друг с другом, а также сопряженность варианта сочетаний с развитием рецидивов или гематогенных метастазов, можно объяснить следующим образом. В соответствии с мультистадийной молекулярной гипотезой патогенеза плоскоклеточной карциномы (Kadara H, Wistuba I., 2014) генетические нарушения в

процессе канцерогенеза выявляются уже в нормальном эпителии и увеличиваются от базальноклеточной гиперплазии к плоскоклеточной метаплазии и дисплазии/раку *in situ*. Но как описанные морфологические процессы не обязательно следуют друг за другом, вплоть до развития дисплазии (Melamed M.R. 2000; Kerr K.M., Popper H.H. 2007), так и генетические нарушения не нарастают линейно. Результаты исследования свидетельствуют о том, что в каждом случае развития плоскоклеточной карциномы и обнаружения в мелких бронхах, отдаленных от опухоли, определенного сочетания предопухолевых процессов мы имеем дело с дивергентным характером прогрессии генетических и морфологических изменений, когда в одном из участков бронхиального дерева процесс достиг конечного этапа – развития опухоли, а в другом (в других) приостановлен на каком-то этапе на неопределенное время. В этой связи мы обнаруживаем в слизистой мелких бронхов, отдаленных от НМРЛ, достаточно устойчивые различные варианты сочетания морфологических изменений эпителия. Такой «сценарий» событий соответствует теории опухолевой прогрессии L. Foulds (1969) о независимости канцерогенеза в разных локусах «опухолевого поля». Определяя в конкретном случае тот или иной вариант сочетания морфологических изменений в бронхиальном эпителии, мы фиксируем результат неопределенного по длительности воздействия причинных факторов. По сути, в каждом случае обнаруженное сочетание морфологических изменений эпителия бронхов является конкретным проявлением стромально-паренхиматозных отношений, отражающих не только характер и выраженность флогогенного воздействия, но и конститутивные особенности развития иммунно-воспалительных реакций. Морфологические изменения с одной стороны лабильны, поскольку каждое из них может либо подвергнуться обратному развитию, либо прогрессировать до следующего, «более тяжелого». С другой стороны, выявляемые в реальных условиях сочетания морфологических изменений в мелких бронхах, по-видимому, во времени достаточно стабильны, благодаря чему отражают сущностные конститутивные и индивидуальные особенности иммунно-воспалительных реакций и характера реагирования бронхиального эпителия на цитокины.

Таким образом, результаты исследования позволяют заключить, что вариант сочетания разных типов морфологических и молекулярных изменений бронхиального эпителия в условиях хронического воспаления (при хроническом бронхите или НМРЛ), является устойчивым состоянием, отражающим конститутивные особенности стромально-паренхиматозных отношений в процессе воспаления и дивергентный характер прогрессии предопухолевых изменений.

## ВЫВОДЫ

1. При хроническом бронхите в сегментарных бронхах цитометрические показатели (площадь, периметр ядра и клетки) дисплазии I-III, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией (Д+ПМ+), превышают аналогичные параметры «изолированной» дисплазии I-III степени (Д+ПМ-). Сочетание плоскоклеточной метаплазии с дисплазией является неблагоприятным прогностическим признаком прогрессии дисплазии: в 47,7% (31/65) случаев она прогрессировала до более высокой степени, в 9,2% (6/65) – перешла в плоскоклеточный рак.
2. В слизистой оболочке бронхов мелкого калибра, расположенных в отдалении от плоскоклеточного рака, дисплазия выявлена в тех случаях, когда отсутствовала базальноклеточная гиперплазия, но определялась плоскоклеточная метаплазия (БК-ПМ+Д+). Особенностью морфологических изменений эпителия бронхов мелкого калибра при аденокарциноме легкого, в отличие от плоскоклеточной карциномы, являлась меньшая частота встречаемости плоскоклеточной метаплазии в отсутствии базальноклеточной гиперплазии (БКГ-ПМ+Д-: 1/67 (1,5%) против 11/105 (10,5%),  $p=0,02$ ).
3. Базальноклеточная гиперплазия, плоскоклеточная метаплазия и дисплазия эпителия в бронхах мелкого калибра, отдаленных от опухоли, в зависимости от варианта сочетания друг с другом, характеризуются различными морфофункциональными характеристиками и разной степенью связи с прогрессией немелкоклеточного рака. Неоадьювантная химиотерапия, проведенная по поводу НМРЛ, не оказывает существенного влияния на частоту встречаемости и морфофункциональные характеристики морфологических изменений в слизистой оболочке бронхов мелкого калибра, отдаленных от опухоли.
4. В условиях хронического воспаления, по мере нарастания выраженности изменений в эпителии бронхов, снижается уровень экспрессии syndecan-1 (CD138). Максимальные значения этого показателя определяются при «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-). В участках базальноклеточной гиперплазии, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-), уровень экспрессии CD138 значимо ниже – ( $38,5\pm 2,7$  и  $21,8\pm 2,6$ )%;  $p=0,003$  при плоскоклеточной карциноме; ( $40,2\pm 2,9$ % и  $22,2\pm 3,1$ )%,  $p=0,002$  – при аденокарциноме). В очагах плоскоклеточной метаплазии и дисплазии экспрессия syndecan-1 отсутствует.
5. Характер экспрессии маркеров пролиферативной активности и апоптоза зависит от варианта сочетания морфологических изменений бронхиального эпителия. Доля пролиферирующих клеток и экспрессирующих p53 и Bcl-2 в ряду «изолированная»

- базальноклеточная гиперплазия – сочетанная БКГ – плоскоклеточная метаплазия – дисплазия достоверно возрастает. По сравнению с «изолированной» базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ-Д-) в участках сочетанной БКГ (БКГ+ПМ+Д-) выше пролиферативная активность Ki-67+ (34,9±1,7)% против (18,3±7,1)%, p=0,003 при плоскоклеточной карциноме и (33,6±1,5)% и (17,2±8,1)%, p=0,0001 при аденокарциноме, количество p53+ клеток (14,4±5,5)% против (9,6±2,3)%, p=0,0008 при плоскоклеточной карциноме и (13,9±5,1)% и (9,1±2,1)%, p=0,001 при аденокарциноме и Vcl-2+ (17,2±3,5)% против (9,7±3,9)%, p=0,001 при аденокарциноме легких.
6. Состав воспалительного инфильтрата в бронхах мелкого калибра вне очагов немелкоклеточного рака легкого связан с вариантом морфологических изменений респираторного эпителия. В воспалительном инфильтрате «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-) значимо больше количество CD138+ плазматических клеток, CD3+ Т- и CD20+ В- лимфоцитов и значимо меньше CD68+ макрофагов, по сравнению с сочетанной базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ+Д-). При плоскоклеточной метаплазии, сочетанной с базальноклеточной гиперплазией, вблизи первой меньше инфильтрация CD3+ Т- и CD20+ В- лимфоцитами, CD68+ макрофагами, CD138+ плазматическими клетками. По сравнению с плоскоклеточной метаплазией, сочетающейся с базальноклеточной гиперплазией, вблизи плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с дисплазией, больше инфильтрация CD68+ макрофагами. При дисплазии II-III степени, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией, вблизи первой меньше инфильтрация CD3+ Т- и CD20+ В- лимфоцитами.
  7. Для каждого из вариантов сочетания базальноклеточной гиперплазии, плоскоклеточной метаплазии и дисплазии характерен индивидуальный набор генов. Различия определяются на уровне количества дифференциально гипер- и гипозэкспрессирующихся генов и сигнальных путей, регулирующих специфические биологические процессы. Гипозэкспрессия генов, имеющих отношение к иммуновоспалительным реакциям в эпителии «изолированной» БКГ и дисплазии, сочетается с уменьшением выраженности иммуновоспалительной реакции вблизи этих процессов и с высоким риском гематогенного метастазирования немелкоклеточного рака легкого.
  8. Рецидивы немелкоклеточного рака легкого чаще наблюдаются при наличии в эпителии бронхов мелкого калибра, отдаленных от опухоли, сочетания базальноклеточной гиперплазии с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-). Не

обнаружено связи варианта сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия при НМРЛ с синхронным лимфогенным метастазированием.

9. Развитие гематогенных метастазов немелкоклеточного рака легкого сопряжено с наличием в эпителии бронхов мелкого калибра, отдаленных от опухоли, «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-). Связь гематогенного метастазирования с наличием дисплазией бронхиального эпителия (БКГ-ПМ+Д+) наблюдается только при плоскоклеточном раке легкого.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. У пациентов с хроническим бронхитом, в случаях выявления при морфологическом исследовании в сегментарных бронхах сочетания дисплазии любой степени с плоскоклеточной метаплазией, следует прогнозировать высокий риск необратимости и прогрессии диспластических изменений. Чувствительность – 92%; специфичность – 87% ( $\chi^2_{\gamma}=45,66$ ,  $p=0,0000$ ;  $OR= 13,14$  (5,44-32,82)).
2. Для оценки риска развития в бронхах мелкого калибра плоскоклеточной метаплазии на фоне базальноклеточной гиперплазии рекомендуется определять уровень экспрессии маркеров пролиферативной активности Ki-67 и дифференцировки плоского эпителия CD138 в очагах базальноклеточной гиперплазии. В случаях, когда при базальноклеточной гиперплазии уровень экспрессии  $Ki-67 \geq 25\%$ , а  $CD138 \leq 20\%$ , прогнозируется высокий риск развития плоскоклеточной метаплазии. Чувствительность – 91%; специфичность – 93% .
3. В случаях выявления в бронхах мелкого калибра при морфологическом исследовании эпителия плоскоклеточной метаплазии, в отсутствии базальноклеточной гиперплазии, следует прогнозировать высокий риск развития дисплазии. Чувствительность – 90%; специфичность – 95% ( $\chi^2_{\gamma}=65,45$ ;  $p=0,00000$ ;  $OR=418,5$  (27,54-16213)).
4. В случаях выявления при морфологическом исследовании в бронхах мелкого калибра, отдаленных от немелкоклеточного рака легкого, сочетания базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазией, следует прогнозировать высокий риск развития рецидива опухоли. Чувствительность – 90%; специфичность – 80% ( $\chi^2_{\gamma} =58,22$ ;  $p=0,0000$ ;  $OR = 109,38$ ; 95% CI (14,35 2287,02)).
5. Высокую вероятность развития гематогенных метастазов НМРЛ можно прогнозировать в случаях выявления при морфологическом исследовании в бронхах мелкого калибра, отдаленных от опухоли, «изолированной»

базальноклеточной гиперплазии. Чувствительность – 90%; специфичность – 81% ( $\chi^2_{\text{Y}}=22,45$ ;  $p=0,0000$ ; OR = 109,38; 95% CI (2,93-19,93).

6. Прогнозировать высокий риск развития гематогенных метастазов плоскоклеточного рака легкого возможно в случаях выявления при морфологическом исследовании в бронхиальном эпителии, отдаленном от опухоли, сочетания плоскоклеточной метаплазии с дисплазией. Чувствительность – 90%; специфичность – 85% ( $\chi^2_{\text{Y}}=21,37$ ;  $p=0,00002$ ).

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Панкова О.В. Клинико-морфологические результаты лечения больных с предопухолевыми изменениями слизистой оболочки бронхов [текст] / О.В. Панкова, О.В. Черемисина // Вопросы диагностики и лечения злокачественных опухолей. – Владивосток. – 2000. – С. 119-121.
2. Панкова О.В. Морфологический анализ результатов применения внутрисосудистого облучения крови у больных с диспластическими изменениями слизистой оболочки бронхов [текст] / О.В. Панкова, О.В.Черемисина, М.Ф. Ялова // Актуальные вопр. онкологии. – Кызыл. – 2001. – С. 87-88.
3. Панкова О.В. Возможности эндоскопической лазеротерапии в лечении предопухолевых заболеваний легких [текст] / О.В. Черемисина, О.В. Панкова, В.А. Евтушенко // Материалы V Российской онкологической конференции. – Москва. – 2001. – С. 160.
4. Панкова О.В. Сравнительная оценка методов лечения хронического бронхита с предопухолевыми изменениями слизистой оболочки бронхов [текст] / О.В. Черемисина, О.В. Панкова // Бюллетень СО РАМН. – 2002. – №4. – С.44-47.
5. **Панкова О.В. Оценка эффективности различных методов лечения предопухолевых изменений бронхиального эпителия [текст] / О.В. Черемисина, О.В. Панкова, М.Ф. Ялова, В.А. Евтушенко // Сибирский онкологический журнал. – 2002. - №3-4. – С.123-127.**
6. Панкова О.В. Отдаленные результаты коррекции диспластических изменений бронхиального эпителия [текст] / О.В. Черемисина, Е.Л. Чойнзонов, О.В. Панкова // Материалы VII онкологического конгресса. – Москва. – 2003. – С. 257.
7. **Панкова О.В. Оценка эффективности различных методов лечения бронхиальной дисплазии с использованием комплексного цитоморфометрического исследования [текст] / О.В. Панкова, О.В. Черемисина // Сибирский онкологический журнал. – 2003. – №4. – С. 9-11.**
8. Панкова О.В. Цитометрические критерии оценки дисплазии бронхиального эпителия при различных видах лечения [текст] / О.В. Панкова, О.В. Черемисина // Клиническая и лабораторная диагностика. – 2004. – №1. – С. 42-43.
9. Панкова О.В. Внутривенная лазерная терапия у больных ХНЗЛ с дисплазией бронхиального эпителия [текст] / О.В. Черемисина, О.В. Панкова // Клиническая медицина. – 2004. – №5. – С. 39-41.
10. **Панкова О.В. Цитокиновый профиль у больных простым хроническим бронхитом с диспластическими изменениями бронхиального эпителия [текст] / Л.В. Гердт, О.В. Черемисина, М.Н. Стахеева, О.В. Панкова и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2004. – №4. – С. 48-52.**
11. Панкова О.В. Иммунологические показатели у больных хроническим бронхитом с диспластическими изменениями бронхиального эпителия [текст] / О.В. Черемисина, Е.Ц. Чойнзонов, Л.В. Гердт, М.Н. Стахеева, О.В. Панкова // Бюллетень СО РАМН. – 2004. – №4. – С. 98-102.
12. Панкова О.В. Морфометрические критерии оценки бронхиальной дисплазии при различных видах лечения [текст] / О.В. Панкова, О.В. Черемисина // III съезд онкологов и радиологов СНГ: Материалы съезда. – Минск, 2004. – Ч. 1. – С.316-317.
13. Панкова О.В. Отдаленные результаты лечения хронического бронхита с диспластическими изменениями бронхиального эпителия [текст] / О.В. Черемисина, Е.Л. Чойнзонов, О.В. Панкова, В.А. Евтушенко // III съезд онкологов и радиологов СНГ: Материалы съезда. – Минск. – 2004. – Ч. 2. – С. 113.

14. Панкова О.В. Показатели гуморального местного иммунитета у больных хроническим бронхитом с диспластическими изменениями бронхиального эпителия [текст] / Л.В. Гердт, О.В. Черемисина, О.В. Панкова, М.Н. Стахеева // Современное состояние и перспективы развития экспериментальной и клинической онкологии: Материалы Российской научно-практической конференции, посвященной 25 - летию НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН 24 - 25 июня 2004 г. В 2 - х частях/ Ред. Е. Л.Чойнзонов. – Томск. – 2004 – ч. I. – С. 101-102.
15. Панкова О.В. Морфометрические критерии оценки эффективности лечения бронхиальной дисплазии [текст] / О.В. Панкова // Современное состояние и перспективы развития экспериментальной и клинической онкологии: Материалы Российской научно - практической конференции, посвященной 25 - летию НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН ( 24 - 25 июня 2004 г. ). В 2 - х частях / Ред. Е. Л. Чойнзонов. – Томск. – 2004. – ч. I. – С.174-175.
16. Панкова О. В. Морфометрические критерии оценки бронхиальной дисплазии при различных видах лечения [текст] / О. В. Панкова // Материалы III съезда онкологов и радиологов СНГ: В 2-х частях. – Минск: ОДО "Тонпик". – 2004. – ч. 1. – С.316-317.
17. Панкова О.В. Диагностическая фибробронхоскопия при выявлении предопухоловой патологии трахео-бронхиального дерева [текст] / О.В.Черемисина, О.В. Панкова, Л.И. Волкова, В.С. Богомятков // Паллиативная медицина и реабилитация. – 2005. – N 2. – С. 50.
18. **Панкова О.В. Морфометрические критерии обратимости дисплазии бронхиального эпителия II степени при различных видах лечения [текст] / О.В. Панкова, В.М. Перельмутер, О.В. Черемисина // Сибирский онкологический журнал. – 2005. - № 3. – С. 44-47.**
19. Панкова О.В. Отдаленные результаты лечения предопухоловых изменений бронхиального эпителия [текст] / О.В. Черемисина, О.В. Панкова // Актуальные проблемы онкологии: Тезисы докладов I конгресса онкологов республики Узбекистан. – Ташкент. – 2005. – С.454-456.
20. Панкова О.В. Морфометрические критерии прогноза дисплазии бронхиального эпителия II степени [текст] / О.В. Панкова, В.М. Перельмутер, О.В. Черемисина // Новые технологии в онкологической практике: материалы Российской научно - практической конференции с международным участием. – Барнаул – 2005. – С. 266-267.
21. Панкова О.В. Плоскоклеточная метаплазия и прогноз течения диспластических изменений бронхиального эпителия [текст] / О.В. Панкова, В.М. Перельмутер, О.В. Черемисина // Тезисы Российской научно-практической конференции «Актуальные вопросы морфологической, иммуногистохимической и цитологической диагностики злокачественных новообразований». Сибирский онкологический журнал. – 2006. – № 3 (19). – С. 121-122.
22. Панкова О.В. Результаты коррекции и алгоритм динамического наблюдения предопухоловых (диспластических) изменений бронхиального эпителия у больных хроническим бронхитом [текст] / О.В Черемисина, О.В. Панкова, В.А. Евтушенко // Мат. Сибирского конгресса: «Здоровье человека как основа национальной безопасности» (Первый съезд врачей первичной медико-санитарной помощи Сибирского Федерального округа). – Красноярск, 2006. – С. 378-380.
23. Панкова О.В. Взаимосвязь плоскоклеточной метаплазии с характером течения диспластического процесса в респираторном эпителии [текст] / О.В. Панкова, В.М. Перельмутер, М.Ф. Ялова, О.В. Черемисина // Материалы IV съезда онкологов и радиологов СНГ. – Баку. – 2006. – С. 63 (245).

24. Панкова О.В. Низкоинтенсивная лазерная терапия как метод лечения хронического бронхита с предопухолевыми изменениями слизистой оболочки бронхов [текст] / О.В. Черемисина, О.В. Панкова, В.А. Евтушенко // Лазерная медицина. – 2006. – Т. 10, вып.1. – С. 9-14.
25. Панкова О.В. Взаимосвязь плоскоклеточной метаплазии с характером течения диспластического процесса в респираторном эпителии [текст] / О.В. Панкова, В.М. Перельмутер, О.В. Черемисина // Клиническая лабораторная диагностика. – 2008. – №4. – С. 46-48.
26. Панкова О.В. Плоскоклеточная метаплазия и исход диспластического процесса в бронхиальном эпителии [текст] / О.В. Панкова, В.М. Перельмутер, О.В. Черемисина // Материалы V съезда онкологов и радиологов СНГ. – Ташкент. – 2008. – С. 82.
27. Панкова О.В. Оценка взаимосвязи иммунологических показателей с критериями обратимости дисплазии бронхиального эпителия [текст] / Л.В. Гердт, О.В. Черемисина, О.В. Панкова, В.А. Евтушенко // Материалы V съезда онкологов и радиологов СНГ. – Ташкент. – 2008. – С. 92.
28. Панкова О.В. Аутофлюоресценция в комплексной эндоскопической диагностике рецидивов рака легкого [текст] / Н.В. Полякова, В.А. Евтушенко, О.В. Черемисина, О.В. Панкова // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – № 6. – С. 52-56.
29. Панкова О.В. Характеристика неопластических изменений бронхиального эпителия в участках, пограничных со злокачественными опухолями легкого [текст] / О.В. Панкова, В.М. Перельмутер, О.В. Савенкова // Материалы Российской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 30-летию НИИ онкологии СО РАМН «Современная онкология: достижения и перспективы развития». – Сибирский онкологический журнал. – 2009. – Прил. № 2. – С. 152-153.
30. Панкова О.В. Характеристика экспрессии маркеров пролиферации и регуляции апоптоза в зависимости от характера дисрегенераторных изменений в эпителии бронхов при плоскоклеточном раке легкого [текст] / О.В. Панкова, В.М. Перельмутер, О.В. Савенкова // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – №5. – С. 36-41.
31. Панкова О.В. Взаимосвязь экспрессии Syndecan-1 с характером неопластических изменений бронхиального эпителия [текст] / О.В. Панкова, В.М. Перельмутер, О.В. Савенкова // VI съезда онкологов и радиологов стран СНГ. – Душанбе. – 2010. – А. 280.
32. Панкова О.В. Взаимосвязь экспрессии маркеров пролиферации, апоптоза и эпителиальной дифференцировки с характером неопластических изменений бронхиального эпителия [текст] / О.В. Панкова, В.М. Перельмутер, О.В. Савенкова // Актуальные вопросы онкологии: материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 65-летию онкологической службы Красноярского края, 17 декабря 2010 г. – Красноярск. – 2010. – С. 151-153.
33. Панкова О.В. Взаимосвязь неопластических изменений с базальноклеточной гиперплазией бронхиального эпителия при плоскоклеточном раке и аденокарциноме легкого [текст] / О.В. Панкова, В.М. Перельмутер, Н.В. Литвяков, Е.В. Денисов, Л.В. Гердт // Сибирский онкологический журнал. – 2011. – №5. – С. 57-60.
34. Панкова О.В. Влияние неоадьювантной химиотерапии на спектр и экспрессионный профиль дисрегенераторных изменений в слизистой бронха при немелкоклеточном раке легкого [текст] / О.В. Панкова, В.М.

- Перельмутер, С.А. Тузиков, О.В. Савенкова // Сибирский онкологический журнал. – 2012. – №3. – С. 79-83.**
35. Панкова О.В. Экспрессия маркеров пролиферативной активности, апоптоза и дифференцировки плоского эпителия в зависимости от характера дисрегенерации при плоскоклеточном раке легкого [текст] / О.В. Панкова, В.М. Перельмутер, О.В. Савенкова // Седьмой съезд онкологов и радиологов стран СНГ / Казахский НИИ онкологии и радиологии. – Астана. – 2012. – С. 229-230.
36. Панкова О.В. Особенности воспалительной реакции в слизистой бронха в участках базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии на фоне плоскоклеточного рака легкого [текст] / О.В. Панкова, В.М. Перельмутер, О.В. Савенкова, Е.В. Денисов, С.А. Васильев, Н.А. Скрябин, С.А. Тузиков // Сибирский онкологический журнал. – 2012. – № 5. – С.28-33.
37. Панкова О.В. Влияние комбинированного лечения на морфофункциональное состояние бронхиального эпителия у больных раком легкого [текст] / А.Ю. Добродеев, О.В. Панкова, А.А. Завьялов, С.А. Тузиков, О.В. Черемисина // Сибирский онкологический журнал. – 2013. – № 5. – С. 34-38.
38. Панкова О.В. Взаимосвязь характера дисрегенераторных изменений при немелкоклеточном раке легкого с прогрессией опухоли [текст] / О.В. Панкова, В.М. Перельмутер, С.А. Тузиков // Современные аспекты диагностики и лечения рака легкого: Российская научно-практическая конференция. – Сибирский онкологический журнал. – 2013. – Прил. № 2. – С. 58-59.
39. Панкова О.В. Особенности базальноклеточной метаплазии бронхиального эпителия при плоскоклеточном раке легкого [текст] / О.В. Панкова, В.М. Перельмутер, О.В. Савенкова, С.А. Тузиков, С.А. Васильев // Вопросы онкологии. – 2013. – Том 59, Прил. к № 3, том 1. – С. 391-392.
40. Панкова О.В. Состояние слизистой оболочки бронхиального дерева у больных раком легкого на этапах комбинированного лечения [текст] / А.Ю. Добродеев, О.В. Панкова, А.А. Завьялов, С.А. Тузиков // Новые методы в онкологической практике: материалы Российской научно-практической конференции с международным участием. 25-26 июня 2013 г. / под ред. А. Ф. Лазарева. – Барнаул: Азбука, 2013. – С. 191-192.
41. Панкова О.В. Связь рецидивирования плоскоклеточной и железистой карциномы легкого с характером дисрегенераторных изменений в респираторном эпителии бронхов вблизи опухоли [текст] / О.В. Панкова, В.М. Перельмутер, Е.В. Денисов, С.А. Тузиков, С.В. Миллер, С.А. Васильев, Н.А. Скрябин // Сибирский онкологический журнал. – 2013. – № 6. – С. 26-30.
42. Панкова О.В. Особенности базальноклеточной гиперплазии при плоскоклеточном раке легкого [текст] / О.В. Панкова, В.М. Перельмутер, О.В. Савенкова, С.А. Тузиков // Евразийский онкологический журнал. Тезисы VIII съезда онкологов и радиологов СНГ и Евразии 16-18 сентября 2014 г. – Казань. – 2014. – №3. – С.376.
43. Панкова О.В. Пре- и неопластические изменения бронхиального эпителия при плоскоклеточном раке и аденокарциноме легкого [текст] / О.В. Панкова, В.М. Перельмутер, С.А. Тузиков, Е.В. Денисов // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – том 13, № 3. – С. 100–110.
44. Панкова О.В. Комплексная эндоскопическая диагностика ранних рецидивов у больных, оперированных по поводу рака легкого [текст] / О. В. Черемисина, М. В. Былин, О.В. Панкова, И. Г. Фролова // Сибирский онкологический журнал. – 2016. – Т.15, № 3. – С. 49-55.

45. Панкова О.В. Особенности базальноклеточной пролиферации на фоне плоскоклеточного рака легкого [текст] / О.В. Панкова, Е.В. Денисов, С.А. Тузиков, В.М. Перельмутер // Актуальные вопросы патологоанатомической практики. п/р проф. Е.Л. Казачкова Материалы научно-практической конференции. Челябинск — 2015. — С. 73-76.
46. **O. V. Pankova. Recurrence of squamous cell lung carcinoma is associated with the co-presence of reactive lesions in tumor-adjacent bronchial epithelium [текст] / Olga V. Pankova, Evgeny V. Denisov, Anastasia A. Ponomaryova, Tatiana S. Gerashchenko, Sergey A. Tuzikov, Vladimir M. Perelmuter. Tumor Biology. — 2016. — 37 (3). — p. 3599-3607.**
47. Панкова О.В. Предопухолевые изменения в бронхолегочном эпителии больных раком легкого: клинические аспекты и экспрессионные особенности [текст] / Е.В. Денисов, О.В. Панкова, В.Л. Якушина, Т.С. Геращенко, Л.А. Таширева, С.А. Тузиков, В.М. Перельмутер / Материалы 2-й Всероссийской конференции по молекулярной онкологии. 6-8 декабря 2016 г., г. Москва // Успехи молекулярной онкологии. — 2016. — Том 3, № 4. — С. 15-16.

#### ПАТЕНТЫ

1. Патент РФ № 2293323 от 10 февраля 2007г. «Способ прогнозирования течения диспластического процесса в респираторном эпителии». **Панкова О.В., Перельмутер В.М., Ялова М.Ф.**
2. Патент РФ №2489718 от 10.08.2013 «Способ прогнозирования возникновения гематогенных метастазов при плоскоклеточном раке легкого». Перельмутер В.М., **Панкова О.В.**
3. Патент РФ №2498305 от 10.11.2013 «Способ прогнозирования рецидивов при немелкоклеточном раке легкого». **Панкова О.В., Перельмутер В.М.**
4. Патент РФ №2538642 от 21.11.2014 «Способ прогнозирования риска развития плоскоклеточной метаплазии в респираторном эпителии бронхов с наличием изолированной базальноклеточной гиперплазии». **Панкова О.В., Перельмутер В.М.**
5. **Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2014620055 от 09.01.2014 «База данных клинико-патологических параметров и эпигенетических маркеров пациентов с диагнозом рак легкого». Пономарева А.А., Добродеев А.Ю., Литвяков Н.В., Завьялов А.А., Тузиков С.А., Перельмутер В.М., Панкова О.В., Черемисина О.В., Чердынцева Н.В.**

#### СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АК** – Аденокарцинома  
**БКГ** – Базальноклеточная гиперплазия  
**ГМ** – Гематогенные метастазы  
**Д** – Дисплазия  
**НМРЛ** – Немелкоклеточный рак легкого  
**НАХТ** – Неoadьювантная химиотерапия  
**ПМ** – Плоскоклеточная метаплазия  
**ПР** – Плоскоклеточный рак  
**ФБС** – Фибробронхоскопия  
**ХБ** – Хронический бронхит