

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ОНКОЛОГИИ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ «ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК»
На правах рукописи

Панкова Ольга Владимировна

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РЕСПИРАТОРНОГО
ЭПИТЕЛИЯ ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО И
ХРОНИЧЕСКОМ ВОСПАЛЕНИИ И ИХ СВЯЗЬ С ПРОГРЕССИЕЙ
ОПУХОЛЕВОГО И ПРЕДОПУХОЛЕВЫХ ПРОЦЕССОВ

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени доктора биологических наук

14.01.12 – онкология

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор

Перельмутер Владимир Михайлович

доктор медицинских наук, профессор

Тузиков Сергей Александрович

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. ПРЕДОПУХОЛЕВЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ И АДЕНОКАРЦИНОМЕ ЛЕГКОГО (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	18
1.1. Предопухолевые изменения эпителия при плоскоклеточном раке легкого.....	20
1.1.1. Хроническое воспаление и предопухолевые изменения легких.....	20
1.1.2. Классификация и морфологическая характеристика предраковых изменений респираторного эпителия, предшествующих плоскоклеточному раку легкого	22
1.1.3. Цитометрический метод оценки предраковых изменений бронхиального эпителия	29
1.1.4. Частота встречаемости и последовательность возникновения предраковых изменений бронхиального эпителия	32
1.1.5. Обратимость предраковых изменений бронхиального эпителия	34
1.2. Предопухолевые изменения эпителия при аденокарциноме легкого	37
1.2.1. Частота встречаемости атипической аденоматозной гиперплазии	38
1.3. Молекулярно-генетические аспекты предрака легкого	40
1.3.1. Молекулярно-генетические изменения, ассоциированные с плоскоклеточным раком легкого	41
1.3.2. Молекулярно-генетические нарушения, ассоциированные с аденокарциномой легкого	45
1.3.3. Характер экспрессии маркеров регуляции апоптоза при предопухолевых процессах	47
1.3.4. Характер экспрессии маркеров пролиферативной активности при	

предопухолевых процессах	51
1.3.5. Характер экспрессии маркеров клеточной дифференцировки при предопухолевых процессах	54
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	60
2.1. Клиническая характеристика материала	60
2.2. Морфологические методы исследования	63
2.3. Микроскопическое исследование	65
2.4. Иммуногистохимическое исследование	78
2.5. Экспрессионное профилирование.....	80
2.5.1. Лазерная микродиссекция	80
2.5.2. Выделение РНК и полнотранскриптомная амплификация	81
2.5.3. Микроматричный экспрессионный анализ	82
2.5.4. Функциональное аннотирование экспрессирующихся генов	82
2.6. Статистический анализ	83
ГЛАВА 3. ПРЕДОПУХОЛЕВЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ БРОНХИТЕ	84
3.1. Морфологические изменения бронхиального эпителия на фоне хронического бронхита в сегментарных бронхах.....	84
3.2. Цитометрические параметры различных вариантов реактивных и диспластических изменений бронхиального эпителия	87
3.3. Связь плоскоклеточной метаплазии с прогрессией дисплазии при хроническом бронхите	93
ГЛАВА 4. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭПИТЕЛИЯ БРОНХОВ МЕЛКОГО КАЛИБРА ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО И ИХ СВЯЗЬ С ПРОГРЕССИЕЙ ОПУХОЛИ	100
4.1. Частота встречаемости различных вариантов сочетаний морфологических изменений эпителия бронхов мелкого калибра при плоскоклеточном раке легкого	101

4.1.1. Частота встречаемости различных вариантов сочетаний морфологических изменений эпителия бронхов мелкого калибра при аденокарциноме легкого	104
4.2. Особенности характера экспрессии маркеров пролиферативной активности, апоптоза и клеточной дифференцировки при различных вариантах сочетаний морфологических изменений эпителия бронхов мелкого калибра при немелкоклеточном раке легкого	108
4.2.1. Морфофункциональная характеристика различных вариантов базальноклеточной гиперплазии при плоскоклеточном раке легкого	108
4.2.2. Сравнительная характеристика иммунофенотипов базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии при плоскоклеточном раке легкого	115
4.2.3. Иммунофенотипическая характеристика различных вариантов плоскоклеточной метаплазии при плоскоклеточном раке легкого	117
4.2.4. Иммунофенотипическая характеристика дисплазии	118
4.2.5. Иммунофенотипическая характеристика различных вариантов сочетаний морфологических изменений эпителия бронхов мелкого калибра при аденокарциноме легкого	119
4.3. Особенности воспалительной реакции вблизи различных вариантов сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия при немелкоклеточном раке легкого	125
4.3.1. Сравнительная характеристика воспалительного инфильтрата вблизи различных вариантов базальноклеточной гиперплазии при плоскоклеточном раке легкого	125
4.3.2. Сравнительная характеристика воспалительного инфильтрата вблизи базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии при плоскоклеточном раке легкого	129

4.3.3. Сравнительная характеристика воспалительного инфильтрата вблизи различных вариантов плоскоклеточной метаплазии при плоскоклеточном раке легкого	130
4.3.4. Сравнительная характеристика воспалительного инфильтрата вблизи участков плоскоклеточной метаплазии и дисплазии бронхиального эпителия при плоскоклеточном раке легкого	130
4.3.5. Сравнительная характеристика воспалительного инфильтрата вблизи различных вариантов сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия при аденокарциноме легкого	132
4.4. Влияние неоадьювантной химиотерапии на частоту встречаемости и экспрессионный профиль вариантов сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия при немелкоклеточном раке легкого.....	138
4.5. Характер экспрессии генов при различных вариантах сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия при плоскоклеточном раке легкого	147
4.5.1. Экспрессионная характеристика различных вариантов базальноклеточной гиперплазии	149
4.5.2. Экспрессионная характеристика различных вариантов плоскоклеточной метаплазии	153
4.5.3. Экспрессионная характеристика дисплазии, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией	160
ГЛАВА 5. СВЯЗЬ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ СОЧЕТАНИЙ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ЭПИТЕЛИЯ БРОНХОВ МЕЛКОГО КАЛИБРА С ПРОГРЕССИЕЙ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО	167
5.1. Связь вариантов сочетаний морфологических изменений эпителия бронхов мелкого калибра с синхронным лимфогенным метастазированием при немелкоклеточном раке легкого	168

5.2. Связь рецидивирования с клинико-морфологическими параметрами НМРЛ	170
5.2.1. Связь рецидивирования с вариантом сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия, отдаленного от плоскоклеточного рака легкого.....	173
5.2.2. Связь рецидивирования с вариантом сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия, отдаленного от аденокарциномы легкого	177
5.3. Связь гематогенного метастазирования с клинико-морфологическими параметрами НМРЛ	180
5.3.1. Связь гематогенного метастазирования с вариантом сочетаний морфологических изменений бронхов мелкого калибра, отдаленных от плоскоклеточного рака легкого	183
5.3.2. Связь гематогенного метастазирования с вариантом сочетаний морфологических изменений бронхов мелкого калибра, отдаленных от аденокарциномы легкого	188
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	197
ВЫВОДЫ	228
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	232
СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ	234

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- ААГ** – Атипическая аденоматозная гиперплазия
- АК** – Аденокарцинома
- БА** – Бронхиальная астма
- БКГ** – Базальноклеточная гиперплазия
- бкгПМ** – Плоскоклеточная метаплазия, сочетающаяся с базальноклеточной гиперплазией
- ГМ** – Гематогенные метастазы
- Д** – Дисплазия
- дПМ** – Плоскоклеточная метаплазия, сочетающаяся с дисплазией
- иБКГ** – «Изолированная» базальноклеточная гиперплазия
- ИН** – Интраэпителиальная неоплазия
- НМРЛ** – Немелкоклеточный рак легкого
- НАХТ** – Неoadъювантная химиотерапия
- ПМ** – Плоскоклеточная метаплазия
- пмБКГ** – Базальноклеточная гиперплазия, сочетающаяся с плоскоклеточной метаплазией
- пмД** – Дисплазия, сочетающаяся с плоскоклеточной метаплазией
- ПР** – Плоскоклеточный рак
- ФБС** – Фибробронхоскопия
- ХБ** – Хронический бронхит
- ХОБЛ** – Хроническая обструктивная болезнь легких

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Рак легкого в структуре онкологических заболеваний занимает одно из первых мест в мире [10, 255]. На долю немелкоклеточного рака легкого приходится ~ 80–85% новообразований данной локализации [14, 37, 137, 359, 378]. На момент постановки диагноза лишь у 20-25% больных опухоль оказывается резектабельной [21]. Несмотря на постоянное совершенствование методов диагностики, проведение радикального хирургического, химиотерапевтического и лучевого лечения 5-летняя выживаемость составляет ~30% [157]. 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 [135, 255]. 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 [101, 109, 157].

Закономерности развития предопухолевых процессов в бронхиальном эпителии остается 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 [200, 251]. 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 [108, 123, 155,

213]. 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 [237, 294].. 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 [210, 211, 234, 237]. Какие характеристики базальноклеточной гиперплазии, плоскоклеточной метаплазии и дисплазии связаны с их трансформацией из одного состояния в другое и делают процесс 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 [277]. Известно, что предопухолевые изменения развиваются в условиях хронического воспаления как проявления ускоренной регенерации и замедления дифференцировки эпителия [225]. 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, генетическими или эпигенетическими нарушениями в самих клетках эпителия [248], 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 не случайный, 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 дифференцировки 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 неoadьювантной 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 клиниках 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 метаплазии и дисплазии 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. 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.

ГЛАВА 1

ПРЕДОПУХОЛЕВЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ И АДЕНОКАРЦИНОМЕ ЛЕГКОГО

(обзор литературы)

Канцерогенез в бронхиальном эпителии – сложный, многоступенчатый процесс, характеризующийся последовательным накоплением генетических и молекулярных нарушений, идущий параллельно с морфологическими изменениями от нормального эпителия к дисплазии, а затем к развитию опухоли. Риск и скорость прогрессирования диспластических поражений в инвазивный рак, а также механизм их прогрессии или регрессии еще не полностью понятны.

Согласно классификации ВОЗ (2004, 2015) к процессам, предшествующим раку легкого, относят: плоскоклеточную дисплазию/рак *in situ*, атипическую аденоматозную гиперплазию/аденокарциному *in situ* и диффузную идиопатическую легочную нейроэндокринноклеточную гиперплазию. Плоскоклеточная дисплазия/рак *in situ* предшествуют инвазивному плоскоклеточному раку, соответственно ААГ – периферической аденокарциноме легкого. Диффузная идиопатическая легочная нейроэндокринноклеточная гиперплазия – вероятный предшественник карциноида [200, 379, 381]. Предопухолевые изменения для мелкоклеточного рака пока не определены [200].

Для морфологического описания предраковых изменений используют различную терминологию. В большинстве случаев применяется давно используемый термин «дисплазия», включающий в себя такие морфологические изменения, как клеточная атипия и нарушение клеточной дифференцировки. В некоторых публикациях встречается термин «интраэпителиальная неоплазия», предложенный еще в 1960-е гг. Richart для описания дисплазии шейки матки, и введенный в третьей

классификации ВОЗ 2000 года в качестве синонима для процессов, морфологически определяемых как дисплазии [45]. Интраэпителиальная неоплазия – это эпителиальное поражение, характеризующееся цитологическими и гистологическими изменениями, сопровождается нарушениями пролиферации и дифференцировки клеток. Она делится на две степени: низкую (low grade) и высокую (high grade). В первом случае, ИН характеризуется слабыми обратимыми эпителиальными изменениями, соответствующими дисплазии I-II степени. ИН высокой степени соответствуют дисплазия III степени и раку in situ, с большим риском дальнейшей прогрессии [234]. Таким образом, термин интраэпителиальная неоплазия используется для описания пролиферативных, не воспалительных/репаративных и опухолевых поражений, т.к. высокая степень ИН включает не только предопухолевые изменения, но также изменения опухолевой морфологии, но без инвазии [234]. По мнению М. Lai, «было бы более целесообразно думать о интраэпителиальной неоплазии как преинвазивном или неинвазивном поражении, отличающимся от нормального эпителия, цитологические и молекулярно-генетические изменения которого при высокой степени, сходны с соответствующим инфильтративным раком» [234].

В последние годы, большинством зарубежных исследователей для обозначения процессов, предшествующих раку легкого часто используется термин пренеоплазия (preneoplasia). При этом под данным термином объединяются процессы, предшествующие дисплазии (гиперплазия, метаплазия) и сама дисплазия [200, 207, 209,211].

1.1. Предопухолевые изменения эпителия при плоскоклеточном раке легкого

1.1.1. Хроническое воспаление и предопухолевые изменения легких

Важную роль в патогенезе предопухолевых изменений респираторного эпителия и рака легкого играет хроническое воспаление. Во многих обзорах демонстрируется прямая связь между продолжительностью хронического воспаления и развитием рака [49, 62, 67, 75, 81, 111, 134, 138, 249, 243, 258]. Это связывают с тем, что покровный эпителий первым подвергается воздействию различных инфекций, канцерогенов и впоследствии, в зоне хронического воспаления, может развиться карцинома [44, 294]. Одним из примеров, является взаимосвязь между курением табака или действием асбеста, вызывающим хронический асбестоз, и развитием рака легкого [44, 113, 152, 256, 257, 269]. В пользу связи воспаления с канцерогенезом свидетельствуют также исследования, в которых показано, что длительное применение нестероидных противовоспалительных препаратов приводит к снижению риска рака легкого [65, 85, 146].

Длительно существующие воспалительные процессы являются проявлением хронических заболеваний (хронического бронхита, хронической обструктивной болезни легких), патогенетически связанных с раком легких [8, 121, 333, 355]. Роль хронического воспаления в канцерогенезе обусловлена секрецией клетками воспалительного инфильтрата, а также фибробластами различных цитокинов и факторов роста, способствующих пролиферации эпителия [29, 263, 271, 277]. В результате хронического воспаления увеличивается продолжительность стадии регенерации. Это сопровождается индукцией регенерационного «предопухолевого» микроокружения, подобного опухолевому, и развитием гиперплазии, метаплазии или дисплазии [346, 347, 362, 382].

По данным эпидемиологического исследования наиболее высокий риск развития рака легкого связан с хронической обструктивной болезнью легких [29, 48, 75, 218, 219, 256, 257, 290, 301, 367]. Наличие ХОБЛ у курильщиков со стажем, увеличивает вероятность развития рака легких в 4,5 раза [69, 257, 303, 314, 315, 355, 359]. У 50-90% больных раком легкого выявляется ХОБЛ [301, 419, 423]. Пока не установлено, обусловлена ли эта взаимосвязь общими факторами риска (например, курением), участием генов, определяющих склонность к заболеваниям, или нарушением выведения канцерогенов [65]. На фоне ХОБЛ чаще всего происходят гиперпластические процессы, плоскоклеточная метаплазия [29]. Так, по данным некоторых авторов эти морфологические изменения эпителия были обнаружены у 70% больных ХОБЛ [90, 106, 193]. Гиперплазия и плоскоклеточная метаплазия, как правило, являются основой для развития дисплазии и рака легких [48, 106, 300, 346, 347, 383, 388]. У больных ХОБЛ, имеющих большой стаж курения, отмечается высокая частота встречаемости тяжелой дисплазии и рака *in situ* – 24 – 48% случаев [200, 210]. Кроме того, с ХОБЛ связывают и неблагоприятный исход немелкоклеточного рака легкого после лечения [325, 418].

С риском развития рака легкого сопряжены такие заболевания, как туберкулез и интерстициальная болезнь при которых также происходит нарушения регенерации эпителия [29, 34, 75, 173, 350].

Бронхиальная астма в меньшей степени ассоциирована с раком легкого, поскольку один из основных факторов риска развития последнего – курение [78, 147, 148]. Однако, есть сведения о том, что 10% случаев рака легкого не связаны с курением [147, 148, 399]. В качестве возможного фактора риска развития рака легкого у таких пациентов, может быть «атопическая конституция» [148, 160, 398, 401]. Другими же исследователями такая точка зрения не поддерживается [133, 345, 385].

При БА структурные изменения эпителия связаны с ремоделированием бронхов. В результате, нарушаются пролиферация, миграция, дифференцировка и барьерная функция эпителия [27, 120, 174, 175, 193]. Частыми признаками проявления ремоделирования бронхов являются утолщение и гиалиноз базальной мембраны, десквамация эпителия, эпителиальная гиперплазия и плоскоклеточная метаплазия [16, 27]. Сведений в литературе о развитии дисплазии бронхиального эпителия при БА нам не встретилось.

1.1.2. Классификация и морфологическая характеристика предраковых изменений респираторного эпителия, предшествующих плоскоклеточному раку легкого

В зависимости от интенсивности и длительности воспаления в эпителии бронхов наблюдается ряд последовательных изменений. Увеличивается число бокаловидных клеток в состоянии повышенной секреции, вплоть до полного замещения ими реснитчатых клеток [30]. Усиливается пролиферативная активность эпителия. Делящиеся базальные клетки в зоне дефектов эпителиальной выстилки гиперплазируются, и могут подвергаться метаплазии в многослойный плоский эпителий [30, 313]. Именно клетки с морфологией базального эпителия являются стволовыми клетками – источниками плоскоклеточной метаплазии и дисплазии [200]. Плоскоклеточная метаплазия ухудшает мукоцилиарный клиренс и способствует повышенному риску развития плоскоклеточного рака [48, 301].

При описании предопухолевых изменений в респираторном эпителии, возникающих на фоне хронического воспаления в настоящее время наметилось два подхода. В первом случае, большой группой исследователей в соответствии с концепцией, положенной в основу классификации ВОЗ, описываются более ранние изменения, возникающие

еще до развития плоскоклеточной дисплазии/рака *in situ* – эпителиальная гиперплазия и плоскоклеточная метаплазия [162, 208, 209, 210, 211, 300, 377, 379]. Во втором случае, авторы предлагают классифицировать все предшествующие раку легкого изменения бронхиального эпителия как варианты дисплазий: «базальноклеточная дисплазия», «плоскоклеточная дисплазия», «дисплазия переходного типа» [234, 397].

В соответствии с первой точкой зрения, эпителиальная гиперплазия – одно из первоначальных морфологически идентифицируемых изменений бронхиального эпителия, возникающих на фоне хронического воспаления. Выраженная пролиферация эпителия часто предшествует возникновению опухоли. Генетические изменения, такие как делеции хромосомных регионов, транслокации или генные мутации могут возникать в гистологически нормальном эпителии и при гиперпластических процессах, а их число или выраженность увеличиваются по мере прогрессирования тяжести предопухолевых изменений [114, 185, 209, 211, 409, 410]. Понятие эпителиальной гиперплазии включает в себя бокаловидноклеточную гиперплазию и базальноклеточную гиперплазию [237].

При морфологическом исследовании бокаловидноклеточная гиперплазия характеризуется увеличением числа бокаловидных клеток в слизистой оболочке бронха при наличии реснитчатых клеток. Бокаловидные клетки часто примыкают друг к другу, может появиться многослойность, ядро располагается базально, хроматин плотный, а цитоплазма обильная. Признаки клеточной атипии отсутствуют [114, 209, 210, 211]

Базальноклеточная гиперплазия характеризуется наличием трех или более слоев базальных клеток [210, 211]. Ядра, как правило, мелкие, округлые, цитоплазма скудная. Цилиндрические реснитчатые клетки присутствуют на поверхности. Дифференциальная диагностика БКГ бывает затруднительна. Иногда базальная мембрана может быть сильно

утолщена, а базальные клетки заменяют весь эпителиальный слой. В этих случаях необходимо не путать БКГ не только с дисплазией, но и раком *in situ* [114, 209]. Как отмечает Keith M. Kerr, при базальноклеточной гиперплазии обычно нет ороговения, клетки не формируют межклеточных мостиков, признаки атипии отсутствуют. При этом автором подчеркивается, что не редки случаи, когда при БКГ имеются межклеточные мостики, но сохраняются дифференцированные реснитчатые клетки на поверхности. Данная картина напоминает незрелую плоскоклеточную метаплазию шейки матки, которая не описывается классификацией ВОЗ для изменений респираторного эпителия [209, 211]. Такая незрелая плоскоклеточная метаплазия, по описанию S. Dasic, похожа на базальноклеточную гиперплазию [114]. При этом метапластический эпителий занимает почти всю толщину эпителия. По сравнению со зрелой плоскоклеточной метаплазией, цитоплазма клеток скудная и не кератинизирована. Реснитчатые клетки могут удерживаться на поверхности эпителия, но бокаловидные клетки, как правило, отсутствуют.

Плоскоклеточная метаплазия (зрелая ПМ) характеризуется заменой цилиндрического мерцательного респираторного зрелым плоским эпителием. Наблюдается созревание эпителиальных клеток базального слоя, зона промежуточных клеток типа шиповатых, четко определена. Эпителиальные клетки поверхностного слоя ориентированы параллельно базальной мембране. Характерны межклеточные мостики. Клеточная атипия отсутствует или незначительна [114, 210, 237].

Плоскоклеточная дисплазия/рак *in situ* предшествуют плоскоклеточному раку легкого [379, 381]. Дифференциальные морфологические критерии каждого из этих процессов определены ВОЗ, однако, как отмечается многими патологами, остаются довольно сложными [114, 162, 210, 211, 300]. Плоскоклеточную дисплазию подразделяют на степени, в зависимости от тяжести патологических

изменений. Плоскоклеточная дисплазия слабой степени характеризуется минимальными архитектурными и клеточными нарушениями, ограниченными нижней третью эпителиального слоя. Наблюдается умеренный анизоцитоз и полиморфизм клеток. Промежуточная зона интактна и различима. Ядерно-цитоплазматическое соотношение существенно не изменяется. Хроматин мелкозернистый. Ядрышки отсутствуют или незаметны. Митозов нет или встречаются крайне редко [114, 209, 237, 379].

При умеренной плоскоклеточной дисплазии нарушается дифференцировка клеток, отмечается умеренный полиморфизм. Изменения охватывают две трети эпителиального пласта. Ядерно-цитоплазматическое соотношение сдвинуто в сторону ядра. Хроматин мелкозернистый. Ядрышки, как правило, отсутствуют. Митозы находятся в нижней трети эпителиального пласта [210, 237, 379].

Для тяжелой степени дисплазии свойственна выраженная клеточная атипия, распространяющаяся вплоть до верхнего эпителиального слоя. Отмечается ядерный полиморфизм, могут быть видны ядрышки. Митозы наблюдаются в двух нижних эпителиальных слоях. Для рака *in situ*, характерна полная потеря клеточной ориентации, клеточная «скученность», выраженный клеточный и ядерный полиморфизм. Митозы наблюдаются по всей толщине эпителиального пласта [209, 379].

Таким образом, суть классификации и критерии для микроскопического диагноза плоскоклеточной дисплазии и рака *in situ* основаны на делении эпителия на слои: нижний, средний и верхний, а также распределении некоторых морфологических признаков в пределах этих трех слоев. Оценка толщины эпителиального слоя, размера клеток, изменения в их созревании и ориентации, а также ядерных параметров неизбежно связаны с некоторым субъективизмом. Применение правила «трети» может быть проблематичным [209]. Плоскоклеточная метаплазия

нередко возникает при длительно существующем воспалении дыхательных путей, и в таком эпителии наблюдаются атипичные клетки. Такая реактивная атипия может быть ошибочно истолкована патологом как дисплазия [209, 211]. Плоскоклеточные изменения могут произойти в нижней части бронхиального эпителия, в базальной зоне, и дифференцированные цилиндрические клетки сохраняются в метапластическом или диспластическом эпителии. В связи с этим, подчеркивается Keith M. Kerr (2008), плоскоклеточная метаплазия и базальноклеточная гиперплазия могут быть неправильно оценены как дисплазия. В то же время, дисплазию III степени и рак *in situ*, зачастую сложно дифференцировать друг от друга [210, 237].

Как отмечалось выше, существует еще один вариант трактовки предшествующих раку легкого изменений респираторного эпителия. По мнению G. F.Wang (2006) и M. D.Lai (2009), изменения бронхиального эпителия, предшествующие раку легкого следует классифицировать как: «базальноклеточная дисплазия», «цилиндрическая дисплазия», «плоскоклеточная дисплазия» и «бронхиальная эпителиальная дисплазия переходного типа» («Bronchial epithelial dysplasia TD-type» (transitional differentiation)). Последняя, по мнению авторов, сочетает в себе морфологические особенности дифференцировки базальных, цилиндрических клеток и/или плоского эпителия [234, 397]. Авторы предлагают двухуровневую систему градации каждого типа дисплазии (низкая и высокая степень), основываясь на таких параметрах как «степень ядерной атипии и неравномерность расположения клеток» [234, 397]. В случаях низкой степени «базальноклеточной дисплазии», например, отмечаются несколько увеличенные в размере клетки округлой формы, межклеточные мостики отсутствуют. Диаметр ядра несколько больше размера малого лимфоцита, хроматин в ядрах более плотный, ядрышки не определяются, ядерный полиморфизм не выражен. Реснитчатые

цилиндрические клетки сохраняются на поверхности эпителиального пласта. При высокой степени «базальноклеточной дисплазии» наблюдается неупорядоченное расположение клеток. Ядра диаметром вдвое больше размера малого лимфоцита, характерен ядерный полиморфизм, хроматин грубый. В ядрах выявляются ядрышки [397]. По мнению Е.А. Коган (2003), случаи, когда наблюдается выраженная базальноклеточная гиперплазия с появлением атипичных клеток, и отсутствуют признаки ороговения, следует относить к атипической базальноклеточной гиперплазии. Атипическая базальноклеточная гиперплазия может расцениваться как вариант дисплазии бронхиального эпителия [17]. Согласно классификации G. F.Wang (2006), при «плоскоклеточной дисплазии» низкой степени диспластические клетки занимают нижнюю половину эпителиального пласта. Ядра увеличены в размерах, полиморфизм слабо выражен, ядрышки не определяются. При высокой степени дисплазии вся толщина эпителия вовлечена в процесс, имеются признаки клеточной и ядерной атипичности [397]. По аналогичным критериям оценивается авторами «цилиндрическая дисплазия» и «дисплазия переходного типа». Что касается отличия «цилиндрической дисплазии» от реактивной гиперплазии то, как правило, последняя происходит во время острого и хронического воспаления слизистой бронхов, характеризуется только увеличением количества клеток, а плотное расположение клеток и минимальная ядерная атипичность - отличительные признаки дисплазии [397]. По мнению G. F.Wang (2006) и M. D.Lai (2009), дисплазия, является предпочтительным термином для описания поражений с характеристиками гиперплазии потому, что гиперпластические изменения, определялись в случаях первичного рака легкого, и показали наличие ядерной атипичности. Кроме того, при этих процессах часто отмечалась повышенная экспрессия Ki-67 и p53 [397]. Однако, морфологическая дифференциация предложенных авторами

различных вариантов «дисплазий» крайне сложна и основана в большей степени на данных морфометрической оценки ядер. При этом, в публикациях этих авторов не говорится о базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии без признаков диспластических изменений – процессах, которые чаще всего встречаются на фоне хронического воспаления. Фактически классификация G. F.Wang (2006) под термином дисплазия объединяет два разных типа патологических процессов: реактивные и диспластические. Низкая степень бронхиальной дисплазии по морфологическим признакам на самом деле соответствует реактивным изменениям, либо гиперплазии, либо плоскоклеточной метаплазии. Высокая степень – истинным диспластическим изменениям.

В литературе описан еще один подтип диспластических изменений в бронхиальном эпителии – ангиогенная плоскоклеточная дисплазия. В этих случаях, происходит процесс васкуляризации, приводящий к образованию папиллярных образований («капиллярных петель»). Данные образования выступают вверх, в метапластический/диспластический эпителий, не повреждая при этом базальной мембраны, которая иногда может быть утолщена [202, 205, 300, 386]. В нормальном бронхиальном эпителии ангиогенная плоскоклеточная дисплазия, как правило, не наблюдаются. Ангиогенную плоскоклеточную дисплазию в большей степени связывают с плоскоклеточным раком легкого и курением [202]. Эти изменения могут быть мультифокальными и сохранятся на одном и том же месте на протяжении нескольких лет [202, 205, 386]. По мнению L. Bubendorf (2011) данный подтип дисплазии не имеет особого прогностического значения [87]. Однако, по мнению других авторов, обнаружение очагов ангиогенной плоскоклеточной дисплазии у курильщиков с помощью флуоресцентной бронхоскопии в 59%, и сохранение этих изменений в 45% случаях через год, предполагает, что микроваскуляризация (ангиогенез) происходит уже на данном этапе канцерогенеза [200, 202].

1.1.3. Цитометрический метод оценки предраковых изменений бронхиального эпителия

Как было сказано выше, применяемые в морфологической практике критерии градации диспластических изменений/рака *in situ*, основанные на делении эпителия на слои и цитометрических параметрах клеток и ядер, связаны с некоторым субъективизмом. Во многом правильный морфологический диагноз той или иной степени диспластических изменений зависит от опыта гисто- или цитопатолога. Использование в диагностических целях вспомогательных методов исследования, например иммуногистохимии, невозможно, поскольку надежные биологические маркеры дифференциальной диагностики дисплазии в настоящее время не определены. Поэтому предпринимаются попытки создать объективные и воспроизводимые системы диагностики, учитывая количественные характеристики клеток и ядер [6, 7, 13, 164]. На основании различий в размере, форме и структуре хроматина ядер злокачественных и нормальных клеток были предприняты усилия для использования морфометрии в диагностических и прогностических целях.

Морфометрический метод особенно широко использовался в конце XX века и имеется много публикаций. С помощью цитофотометрического исследования определялось содержание ДНК в ядрах, плоидность клеток. Было показано увеличение индекса накопления ДНК по мере перехода от нормального эпителия – 2,3-2,8 С (С – единица плотности) к гиперплазии – 3,6 С и дисплазии тяжелой степени – 4,9-6,5 С. При опухолевом процессе индекс накопления ДНК достигал 9,9-10,8 С [103, 334, 335]. Анализ содержания ДНК ядер клеток бронхиального эпителия с признаками тяжелой дисплазии, выявил у одних пациентов признаки полиплоидии, а у других – анеуплоидии ядер. Длительное динамическое наблюдение за пациентами в первом случае подтвердило наличие реактивных изменений в бронхах, во втором – рака легкого [103].

Однако, наиболее часто используемым количественным методом исследования, была и остается цито-/кариометрия. Показаны существенные различия в размерах площади клеток и ядер между раком легкого и доброкачественными образованиями. В первом случае эти параметры были вдвое выше, чем во втором [4, 275]. Диаметр клеток также менялся в зависимости от характера процесса. При тяжелой дисплазии он значительно был меньше, чем при инвазивном плоскоклеточном раке легкого. Ядерно-цитоплазматическое соотношение возрастало по мере прогрессии дисплазии и выше всего, было при раке *in situ* и инвазивном раке [275].

В настоящее время применяют автоматизированный цитометрический анализ изображений клеток и ядер. M. Guillaud et. al. (2005) определив такие параметры как форма, объем, площадь ядер и статус пloidности при различных вариантах предопухолевых изменений и плоскоклеточном раке легкого с помощью дискриминантного анализа разработали так называемый ядерный морфометрический индекс. Показаны различия по данному параметру между раком *in situ* и плоскоклеточным раком легкого ($p=0,00003$), карциномой *in situ* и дисплазией II-III степени ($p=0,0003$), тяжелой дисплазией и гиперпластическими/метапластическими процессами ($p=0,0004$). Однако, значимых различий по морфометрическому индексу между умеренной/тяжелой дисплазией, а также умеренной дисплазией/плоскоклеточной метаплазией не наблюдалось. На основании результатов морфометрического исследования авторы пришли к выводу, что классификацию изменений бронхиального эпителия можно упростить с восьми до пяти категории: нормальный эпителий/гиперплазия, плоскоклеточная метаплазия/дисплазия I степени, умеренная/тяжелая дисплазия, карцинома *in situ*, инвазивный рак [164].

Согласно данным Ž. Mijović (2014), диаметр, площадь и объем эквивалентной сферы ядер плоскоклеточного рака легкого, были

значительно больше, чем умеренной/тяжелой дисплазии. Размеры ядер плоскоклеточной метаплазии и нормального эпителия слизистой оболочки бронхов при хроническом бронхите соответственно меньше, чем при дисплазии. Эти же показатели размеров ядер нормального эпителия слизистой, окружающей карциному, оказались значительно больше, по сравнению с нормальной слизистой больных с хроническим бронхитом. Никаких существенных различий между нормальным эпителием бронхов, смежных с плоскоклеточным раком и плоскоклеточной метаплазией, найдено не было [274].

S. Rao et. al. (2014) сравнили диаметр клеток и ядер, ядерно-цитоплазматическое соотношение при реактивных, диспластических изменениях эпителия бронхов и раке легкого. Исследование проводилось на цитологических мазках, взятых при бронхоскопии у 176 пациентов. Отмечено увеличение диаметра ядер в ряду норма (7,4 мкм) – гиперплазия (11,7 мкм) – метаплазия (13,0 мкм) – дисплазия (13,9 мкм). При этом значимых различий между плоскоклеточной метаплазией и дисплазией, не было отмечено. В случаях немелкоклеточного рака легкого, средний диаметр ядер составил всего 10,7 мкм. Ядерно-цитоплазматическое соотношение при метаплазии, дисплазии и НМРЛ находилось в соотношении 1:2 [321].

В последнее время появились публикации, в которых морфометрическое исследование проводится параллельно с молекулярным анализом. Это позволяет более точно классифицировать предопухолевые изменения и лучше определить те из них, которые являются биологически более агрессивными [185, 274]. Показано наличие корреляции между размером ядер и уровнем экспрессии маркера пролиферативной активности Ki-67. Значения этих параметров возрастают при переходе от нормального бронхиального эпителия к плоскоклеточной метаплазии, дисплазии различной степени тяжести и плоскоклеточному раку легкого

[275]. Guillaud et al. отмечают наличие связи между морфометрическими показателями, потерей гетерозиготности (LOH) и развитием рака. Ядерной переменной, которая отличает клетки с LOH и без LOH, в хромосомных регионах, важных в патогенезе рака легких, является размер ядра [164].

Таким образом, морфометрия может быть полезным дополнительным методом к морфологии для определения различий между плоскоклеточной метаплазией, дисплазией II-III степени и плоскоклеточным раком легкого.

1.1.4. Частота встречаемости и последовательность возникновения предраковых изменений бронхиального эпителия

Базальноклеточная гиперплазия и плоскоклеточная метаплазия, наиболее распространенные реактивные изменения бронхиального эпителия. Данные процессы найдены в бронхиальном эпителии большинства курильщиков – 75-80% случаев [58, 162, 209]. Чаще всего базальноклеточную гиперплазию и плоскоклеточную метаплазию описывают в бронхах крупного и среднего калибра [200, 210, 397]. Однако, они могут быть найдены и в других отделах бронхиального дерева [211, 237, 388].

Дисплазия бронхиального эпителия в 40% случаев определяется у лиц с большим стажем курения [162, 265, 408, 411]. Согласно исследованиям Agaritos, частота встречаемости плоскоклеточной метаплазии и дисплазии возрастала, по мере увеличения продолжительности воздействия табачного дыма [266, 272]. Причем у мужчин она выше, чем у женщин [210]. При воздействии радиации у 48% пациентов отмечалась дисплазия слабой степени, умеренная/тяжелая дисплазия – у 26%. В тоже время, у лиц, которые не подвергались воздействию радиации, выраженные диспластические изменения (Д 2-3) отмечались только в 3,5% случаев [210]. Кроме того, показано, что дисплазия, диагностируется и на фоне

рака легкого [208, 211, 275, 320]. По результатам исследований, проведенных S.Lantuejoul (2009), у одной трети пациентов с плоскоклеточным раком, в операционном материале обнаруживаются очаги бронхиальной дисплазии тяжелой степени [237].

Дисплазия в интерпретации G. F.Wang, наиболее часто встречается в сегментарных и субсегментарных бронхах, особенно в проксимальных отделах. В долевых бронхах и бронхиолах она наблюдается значительно реже. Причем авторы, изучавшие диспластические изменения в бронхах вблизи с опухолевым процессом, отмечают, что частота встречаемости дисплазии была выше в случаях плоскоклеточного рака (66,7%), нежели аденокарциномы легкого (36,4%). Локализация и степень диспластических изменений не были связаны с расстоянием от первичной карциномы легкого. Наиболее выраженные диспластические изменения чаще встречались в случаях плоскоклеточной карциномы – 18,9%, чем при аденокарциноме легкого – 9,1% [397].

Различные варианты сочетаний предопухолевых изменений могут быть найдены в одном и том же бронхе, или гистологическом фрагменте. Иногда, они отделяются друг от друга участками нормального эпителия. Дисплазия высокой степени редко бывает «изолированной» и, как правило, сочетается с дисплазией низкой степени [237, 397].

В описании последовательности возникновения предшествующих раку легкого изменений бронхиального эпителия, также существуют разные точки зрения. Одна из них, предполагает последовательное развитие изменений бронхиального эпителия от нормального через гиперплазию, плоскоклеточную метаплазию и дисплазию, к раку легкого. По данным W. Pankiewicz (2007), морфологические изменения эпителия, ведущие к плоскоклеточному раку, «прогрессируют от «эпителиально-

клеточной» гиперплазии, через плоскоклеточную метаплазию и сопровождающую ее дисплазию, к карциноме «in situ». Метаплазия, происходит в основном в том месте, где уже есть пролиферация базальных клеток. Эти клетки, в результате процесса дифференциации, создают слои, характерные для многослойного плоского эпителия [300]. Другими авторами, поддерживается концепция не линейной трансформации эпителия. В ответ на неспецифическое и специфическое канцерогенное воздействие (например: табачный дым), базальноклеточная гиперплазия и плоскоклеточная метаплазия могут возникнуть независимо друг от друга в различных участках бронха. Базальноклеточная гиперплазия не обязательно предшествует плоскоклеточной метаплазии. Бокаловидные клетки могут преобразовываться в плоские клетки непосредственно, или же через промежуточную форму слизистых клеток. Каждый из этих процессов может развиваться в дисплазию или рак «in situ». Рак «in situ» может возникнуть изначально без предшествующих изменений, на месте нормальной слизистой бронха [209, 272, 383]. В одних случаях, участки плоскоклеточной дисплазии/рака in situ имеют признаки плоскоклеточной дифференциации, в других, базальноклеточную морфологию [209].

1.1.5. Обратимость предраковых изменений бронхиального эпителия

Вопрос об обратимости предопухолевых процессов остается открытым. По данным Keith M. Kerr (2008), в течение 2 лет гиперпластические и метапластические изменения бронхиального эпителия в 30% случаев стали дисплазией легкой или умеренной степени, в 2% – раком «in situ», а одно поражение – инвазивным плоскоклеточным раком. В тот же период времени лишь 3,5% слабых/умеренных дисплазий перешло в тяжелую степень. Большинство раков «in situ» – оказались стабильными поражениями. Ни в одном случае не было инвазии, и через некоторое время они регрессировали [210].

Vota et. al. (2001) исследовали 416 очагов бронхиальной «интраэпителиальной неоплазии». В 6 из 36 (16,7%) случаев, нормальный бронхиальный эпителий превратился за 2 года наблюдения в «интраэпителиальную неоплазию». Из 152 (30,9%) случаев плоскоклеточной метаплазии, в 47 – развилась «интраэпителиальная неоплазия» низкой степени, в двух – рак «in situ» и 1 – инфильтрирующий рак. Из 169 (3,6%) наблюдений «интраэпителиальной неоплазии» слабой степени, 6 прогрессировали в более тяжелую степень. При этом, 10 (37%) из 27 «интраэпителиальных неоплазий» высокой степени и 28 (87,5%) из 32 карцином «in situ», оставались в стабильном состоянии [79].

Hoshino et. al. (2004) исследовали 99 случаев «интраэпителиальной неоплазии». В трех, в дальнейшем, был обнаружен плоскоклеточный рак. В 41 случае, процесс оставался стабильным, в 6 – изменения трансформировались в метапластические, в 14 стали простой гиперплазией, а в 35 – была зафиксирована регрессия ИН [177].

Banerjee et. al. (2009) сообщили, что из 17 пациентов с раком «in situ» у пяти, процесс прогрессировал в инвазивный рак в течение 6 – 48 месяцев, а у 12 – остался стабильным [63]. Ponticiello et.al. (2000) также обнаружили, что за 4-х летний период слабая, умеренная и тяжелая дисплазии в 25%, 50% и 75% случаев соответственно, прогрессировали в инвазивный плоскоклеточный рак [310]. Moro-Sibilot et. al. (2004), в проспективном исследовании 27 больных с тяжелой дисплазии или раком «in situ» установили прогрессию в 17% случаях за один год, и 63% – за три года наблюдения [280].

A.Venmans et. al. (2000), наблюдали за 6 пациентами с раком «in situ» в период от 6 до 60 месяцев (1978-83 гг.). Показано, что в двух случаях, пациенты погибли от другой патологии. У 4 больных, многократный забор биопсийного материала при бронхоскопии в течение пяти лет, не выявил развития инвазивного рака, и даже отмечалось восстановление слизистой

«до нормальной ткани». Тем не менее, авторы проследили за судьбой этих пациентов и показали, что впоследствии, через 17-20 лет, у всех развилась инвазивная карцинома [394].

Roderick H. Breuer (2005) исследовал 134 случая «preneоплазии». Из них, 52 – плоскоклеточной метаплазии/ дисплазии слабой степени, 44 – умеренной/тяжелой дисплазии и 38 случаев рака «in situ». При плоскоклеточной метаплазии/слабой дисплазии прогрессирование до тяжелой дисплазии, отмечалось у 12 человек, регрессия – у 31, а в 9 случаях – процесс оставался стабильным за 10 летний период наблюдения. Тяжелая дисплазия прогрессировала в инвазивный рак в трех случаях. Регрессия наблюдалась у 5 пациентов, у остальных же, какой-либо динамики отмечено не было. Рак «in situ» прогрессировал в инвазивный рак только в одном случае. На основании проведенных исследований автор делает вывод о том, что прогрессирование диспластических процессов в инвазивный рак происходит, но вероятно этот процесс может занимать от 10 лет и более [83].

Таким образом, базальноклеточная гиперплазия и плоскоклеточная метаплазия, наиболее часто встречаемые изменения бронхиального эпителия в условиях хронического воспаления. В большинстве случаев эти процессы обратимы. По частоте встречаемости диспластических процессов преобладают слабо и умеренно выраженные изменения. Тяжелая дисплазия встречается значительно реже. Как правило, описанные выше предопухолевые изменения бронхиального эпителия, чаще всего наблюдаются в сегментарных и субсегментарных бронхах и значительно реже – в мелких бронхах. Кроме того, различные варианты сочетаний реактивных и диспластических процессов могут быть найдены в пределах одного бронха.

Каждое из предшествующих раку легкого изменений (базальноклеточная гиперплазия, плоскоклеточная метаплазия, дисплазия)

может оставаться без динамики (стабилизация), частично или полностью регрессировать. Прогрессия по времени занимает период от нескольких месяцев до нескольких десятков лет, но скорость прогрессирования увеличивается с нарастанием степени тяжести процесса. Когда процесс переходит в более высокую степень (тяжелая дисплазия/рак *in situ*), регрессия менее вероятна, а более вероятно прогрессирование.

1.2. Предопухолевые изменения эпителия при аденокарциноме легкого

Считают, что периферическая аденокарцинома легкого возникает из клеток Клара или пневмоцитов 2 типа [237]. Предшественником данного варианта аденокарциномы является атипическая аденоматозная гиперплазия.

Атипическая аденоматозная гиперплазия наблюдается как одиночное или множественное повреждение, локализованное в периферических отделах респираторных бронхиол. Микроскопически, ААГ представляет пролиферацию клеток со слабо или умеренно выраженными признаками атипии. Размер ААГ колеблется от 1-7 мм в диаметре, обычно менее 3 мм [300]. ААГ имеет вид одного слоя кубических или призматических клеток с признаками атипии, аналогичных клеткам Клара или пневмоцитам 2 типа, покрывающих альвеолы и респираторные бронхиолы. Межклеточные соединения, в большинстве случаев сохраняются, иногда имеются небольшие пространства между клетками. Ядра гиперхромные, их размер и форма варьируют. Митозы редки. При прогрессии ААГ, можно наблюдать небольшое утолщение альвеолярных перегородок, увеличение концентрации клеток и их наложение с образованием сосочков, нарастают признаки клеточной атипии.

Отличием атипической аденоматозной гиперплазии от реактивной аденоматозной гиперплазии является размер клеток, который в два раза

больше нормального альвеолярного эпителия, и отсутствие признаков клеточной атипии у последней. Кроме того, при ААГ, как правило, отсутствуют интерстициальное воспаление и фиброз [237, 285, 288, 300].

Таким образом, несмотря на наличие морфологических признаков, характеризующих атипическую аденоматозную гиперплазию, критерии ее градации на степени отсутствуют. В ряде случаев могут возникнуть сложности в дифференциальной диагностике ААГ и высокодифференцированной аденокарциномой легкого.

1.2.1. Частота встречаемости атипической аденоматозной гиперплазии

Согласно данным литературы ААГ отмечается в 23,2 – 34,5 % случаев аденокарцином легкого [94, 204, 222, 254, 285, 351]. В 4,4 – 9,6 % случаев она была найдена в легких, удаленных по поводу доброкачественных заболеваний или метастазов. Есть сведения о наблюдении атипической аденоматозной гиперплазии при плоскоклеточном раке легкого – 3,3 – 11,1 % случаев [162]. По мнению ряда исследователей, частота встречаемости ААГ у пациентов с аденокарциномой легкого значительно выше, 4% – 40%, чем у пациентов «без рака» – 4 – 10% случаев [114, 237]. Очаги ААГ могут быть множественными в пределах одного легкого, но с прогнозом основного заболевания это не связано.

Z. Kosjerina et. al. (2002) проанализировали фрагменты ткани легкого 75 больных, перенесших пульмонэктомию. ААГ была обнаружена у 9 (12%) пациентов с периферическим раком легкого, причем у 5 (11,1%) из них, была верифицирована аденокарцинома. Корреляции между полом и клинической стадией заболевания не выявлено. Однако отмечается, что пациенты с ААГ старше, чем без таковой. Эти данные, по мнению авторов, могут указывать, на то, что атипическая аденоматозная гиперплазия является не только предопухолевым изменением, но и связана с

возрастными параметрами или более длительным периодом экспозиции токсичных веществ [224].

Морфологическое исследование материала 508 больных, прооперированных по поводу первичного рака легкого, еще в дооперационном периоде (биопсийный материал) позволило выявить ААГ в 118 (23,2%) случаях. В операционном материале удаленного легкого ААГ была обнаружена у 311 больных [285]. С другой стороны, Charman и Kerr, исследовав материал 582 больных, также прооперированных по поводу первичного рака легкого, нашли ААГ всего у 67 (12%) больных [102].

В группе пациентов (n=554) после пульмонэктомии легкого, последующее морфологическое исследование позволило сделать следующее заключение. Атипичная аденоматозная гиперплазия была обнаружена всего в 67 случаях. Чаще ААГ наблюдалась у женщин (30,2%), чем у мужчин (18,8%) с аденокарциномой легкого. Число очагов ААГ в одном легком колебалось от 1 до 42. Частота встречаемости ААГ одновременно со злокачественной опухолью была значительно выше, чем без опухоли. Данный факт, может свидетельствовать в пользу того, что ААГ является предшественником аденокарциномы легких [234].

Таким образом, заболеваемость ААГ не высока. Чаще всего она встречается при аденокарциноме (до 40% случаев), чем при плоскоклеточном раке (около 9%) легкого. При других патологических процессах или без таковых, ААГ встречается крайне редко. Сведения об обратимости ААГ в литературе отсутствуют.

В 2003 году R. Ullman и M. Bongiovanni описали новый, еще полностью не изученный тип морфологических изменений, предшествующих раку легкого - "Bronchiolar Columnar Cell Dysplasia" (BCCD). В отличие от атипичной аденоматозной гиперплазии, которую можно наблюдать макроскопически, BCCD выявляется только при микроскопии. BCCD характеризуется нарушением в организации

эпителиальных слоев бронхиол. Нормальные цилиндрические клетки, а также резервные клетки, заменяются скоплением атипичных «колончатых» кубических или полигональных клеток, которые могут образовывать несколько слоев. С цитологической точки зрения, атипия этих клеток проявляется отсутствием диагональной ориентации ядра, появлением гиперхромных ядрышек. Кроме того, отмечается наличие многоядерных клеток [300, 387]. Предполагается, что BCCD может предшествовать развитию периферической аденокарциномы легкого. В пользу этого, свидетельствует сходство BCCD с уже описанными изменениями эпителия, предшествующих развитию аденокарциномы в других органах (простата, поджелудочная железа).

Следует отметить, что базальноклеточная гиперплазия и плоскоклеточная метаплазия, описанные в качестве предопухолевых изменений плоскоклеточной карциномы легкого, также могут предшествовать аденокарциноме легкого, особенно в случаях ее центрального происхождения [209, 211, 237].

1.3. Молекулярно-генетические аспекты предрака легкого

Многочисленные исследования подтвердили, что изменение экспрессии генов, регулирующих основные биологические процессы, такие как клеточный цикл, дифференциация, созревание, старение и апоптоз имеет решающее значение не только для развития рака, но и диспластических изменений [288, 104]. Дисбаланс процессов пролиферации, дифференцировки и гибели клеток является следствием генетических – мутации, делеции и эпигенетических нарушений – гиперэкспрессия, метилирование [107, 114, 162, 185]. В результате, происходит активация онкогенов и инактивация генов-супрессоров, а малигнизированная клетка получает преимущества к росту и выживанию [104, 236, 237]. В настоящее время, установлены различные молекулярно-

генетические изменения, характерные для немелкоклеточного рака легкого [61, 70, 73, 84, 91, 95, 117, 127]. Однако, малоизвестно о молекулярных событиях, предшествующих его развитию [191, 200, 287].

1.3.1. Молекулярно-генетические изменения, ассоциированные с плоскоклеточным раком легкого

Существующая в настоящее время модель последовательных молекулярных нарушений в патогенезе рака легкого, свидетельствует о том, что генетические аномалии, обнаруживаются уже в морфологически неизменном эпителии [61, 64, 80, 140, 150, 158, 197, 200, 236]. Их число возрастает с увеличением степени тяжести предопухолевых процессов [104, 150, 200, 204, 235, 236, 332]. Молекулярные изменения в бронхиальном эпителии являются обширными и мультифокальными по всему бронхиальному дереву, происходят с определенной последовательностью [200, 304].

Наиболее ранние нарушения – это аллельные потери 3p хромосомы (3p21, 3p14, 3p22-24, 3p12), 9p21 (p16INK4a) и 8p21-23. Потеря и инактивация 13q14 (Rb) и 17q13 (TP53) генов – промежуточный этап, а более поздние изменения происходят в 5q хромосоме [171, 172, 185, 410].

Различные 3p гены участвуют в патогенезе рака легкого, включая RAR β на 3p24, FHIT на 3p14.2, RASSF1A, BLU, FUS1, и SEMA3B, расположенные на 3p21.3, и вероятно Robo1 на 3p12 [200, 210, 330, 339, 384]. S Lantuejoul et. al. (2009) отмечают, что потеря аллеля в области 3p хромосомы встречается в 90% случаев НМРЛ, и 78% – предопухолевых изменений бронхиального эпителия. Делеции 3-й хромосомы связаны с прогрессией предопухолевых изменений [237]. Дисперсные потери гетерозиготности (loss of heterozygosity (LOH)) в 3p-хромосоме были обнаружены при гиперпластических и диспластических процессах в бронхиальном эпителии [104, 332]. M Salaun et. al. (2008, 2009),

исследовали 31 случай рака «in situ» и 23 – тяжелой дисплазии. Авторами было показано, что потеря гетерозиготности 3p хромосомы значительно чаще встречалась при раке «in situ». В 91% случаев рака «in situ», устойчивого к лечению или прогрессирующего до инвазивного рака в течение 12 лет наблюдения, были выявлены LOH в 3p. В четырех случаях, отмечалась спонтанная регрессия рака «in situ». LOH в 3p, при этом, была обнаружена только у одного пациента [337, 338]. Согласно результатам исследования J. J. Hung et.al. (2010), LOH в 3p была найдена в 76% гиперплазий бронхиального эпителия, 86% дисплазий и 100% случаях рака «in situ» [178, 210, 267]. В работах I. Wistuba (2006), LOH в 3p отмечаются в нормальном эпителии в 31%, гиперплазированном – 42%, при диспластических изменениях – 78% и в 95% случаев при плоскоклеточном раке легкого [409, 410]. Генетический анализ в группе больных с ангиогенной плоскоклеточной дисплазией показал LOH в 3p в 53% случаев, по сравнению с нормальным эпителием [171, 172].

В коротком плече 3p (3p14.2) хромосомы имеется предполагаемый ген-суппрессор FHIT – ген хрупкой триады гистидина, функция которого связана с апоптозом и контролем клеточной пролиферации. Считают, что LOH в 3p14.2 бывает крайне редко, и если выявляется, то уже на более поздних этапах канцерогенеза, при раке ««in situ»» [140]. Однако в других исследованиях, отмечается FHIT LOH в бронхобиопсиях курильщиков на ранних стадиях – гиперплазии, метаплазии и дисплазии бронхиального эпителия [200]. A. Ooi et. al. (2014) говорят о том, что наличие аномалий 3 хромосомы в течение поздней стадии канцерогенеза, указывает на возможность их возникновения (3p потери и 3q увеличения) в любой момент времени во время перехода от плоскоклеточной метаплазии к карциноме [295].

Ген-суппрессор Rb – ретиный кислотный рецептор b (3p24), также может быть связан с бронхиальным канцерогенезом. LOH Rb

выявляют при плоскоклеточной дисплазии и раке «in situ» [263].

ЛОН при гиперпластических и диспластических изменениях в бронхах найдены в 9p21 (p16), 8p21-23, 13q14 (Rb) и 17p13 (p53) участках хромосом [104, 150, 237]. По данным исследования L. Мао (2002), ЛОН обнаружены в 3p14, 9p21 и 17p13 участках хромосом в 75%, 57% и 18% случаев соответственно, у курящих пациентов с гиперпластическими, метапластическими и диспластическими процессами в бронхах. Отмечается, что существует связь между увеличением степени тяжести морфологических изменений и ЛОН [332]. Y., K. Kishimoto et. al. (1995), обнаружили ЛОН 9p в смежных с опухолью очагах гиперплазии в 38%, дисплазии – 80% и рака «in situ» в 100% случаях [220]. Исследования, проведенные Thiberville et. al., свидетельствуют о потере гетерозиготности в 9p в 31% дисплазии и 83% случаев рака «in situ». Однако, ни в одном из случаев гиперпластических/метапластических изменений, ЛОН не было выявлено [210]. По данным Wistuba (2006), ЛОН в 9p найдены в морфологически неизменном эпителии – 15% случаев, в 20% – при гиперпластических/метапластических процессах, 35% дисплазий и 80% случаев рака «in situ» [410].

Активация теломеразы является ранним событием бронхиального канцерогенеза [374, 410, 419]. Укорочение теломера – генетическая аномалия, предшествующая экспрессии теломеразы и p53/Rb инактивации, которые преобладают уже в плоскоклеточных предраковых изменениях [198, 200].

На ранней стадии канцерогенеза было обнаружено метилирование p16INK4a [197, 200, 282, 368]. При этом, его частота увеличивалась от 24% в плоскоклеточной метаплазии до 50% при раке «in situ» [196]. Подчеркивается, что множество клональных и субклональных участков молекулярных аномалий, не больше размера бронхиальной биопсии и оцениваемой примерно в 40 000 – 360 000 клеток, могут быть обнаружены

в нормальном и гиперплазированном бронхиальном эпителии пациентов с НМРЛ [267].

При бронхиальной дисплазии происходят делеции 4q, 5q, 8p, 9p, 10q, 11p, 13q, 17p, 18q, 21q и инсерции в 5p, 8q, 11q13, 12p [61]. Делеции в 8p. 21-23 появляются уже при бронхиальной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии [150, 211, 410]. Кроме того, S. Jonsson (2008) выявили хромосомные анеусомии, включающие последовательности центромеры 6, 5p15.2, 7p12 (рецептор эпидермального фактора роста (EGFR)) и 8q (MYC) в 22% случаев умеренной дисплазии, 41,7% – тяжелой дисплазии и 75% – карциномы «in situ» [196].

Исследования, проведенные Aik T. Ooi (2014), свидетельствуют о том, что активность MYC усиливается не только в опухоли, но и в предраковых изменениях (метаплазия, дисплазия). Это может быть важным событием, способствующим дизрегуляции клеточного цикла в канцерогенезе плоскоклеточного рака легкого [50].

У 2-70% больных немелкоклеточным раком легкого, в гистологически неизменном бронхиальном эпителии отмечается микросателлитная нестабильность, которая вероятно имеет значение в бронхиальном канцерогенезе [237]. Наличие микросателлитной нестабильности свидетельствует о дефиците системы репарации ДНК в клетке и высокой вероятности возникновения трансформирующих мутаций по всему геному [77, 199].

Исследование эпителиальной ткани бронхов больных раком легкого, а также настоящих и бывших курильщиков с предопухолевыми изменениями, с последующим типированием аллелей, позволило выявить множественные повреждения – «клоновые потери аллеля», происходящие в гистологически нормальном эпителии, при гиперплазии, плоскоклеточной метаплазии и дисплазии [267]. Причем эти изменения фактически не определялись у некурящих [397, 410], и сохранялись в

течение десятилетий после прекращения курения [397].

Профилирование микроРНК показало значительное снижение экспрессии подавляющего большинства микроРНК на самых ранних стадиях бронхиального канцерогенеза, включая гиперплазию, метаплазию, легкую и умеренную дисплазии [88, 260, 264, 266, 279, 403]. Аналогичные результаты получены при профилировании микроРНК в последовательности «норма» – аденокарцинома «in situ» – инвазивная аденокарцинома [127, 281, 286, 287, 302, 323, 343]

Выделение и транскриптомное профилирование популяции клеток-предшественников нормального бронхиального эпителия, предопухолевых процессов и плоскоклеточного рака легкого от одного пациента, показало увеличение убиквитинирования белка и прогрессию клеточного цикла на ранних этапах канцерогенеза (плоскоклеточная метаплазия, дисплазия). Кроме того, на ранней стадии выявлена экспрессия генов CEACAM5 (играет важную роль в клеточной адгезии и внутриклеточной сигнализации), SLC2A1 (транспортер глюкозы), PTBP3 (играет важную роль в регуляции клеточной пролиферации и дифференцировки) ассоциированных с курением и которые активируются в опухоли легкого [50].

1.3.2. Молекулярно-генетические нарушения, ассоциированные с аденокарциномой легкого

В патогенезе периферической аденокарциномы легкого определяют два молекулярных пути: у курящих – связанный с активацией RAS сигнализации, у некурящих – EGFR [125, 353, 410, 413]. Считают, что KRAS и EGFR мутации являются взаимоисключающими [417, 422]. KRAS мутации, вызванные канцерогенными веществами табака, происходят чаще всего в кодоне 12, реже в кодонах 13 и 61 [237]. По данным различных авторов, активация KRAS мутаций наблюдается в 15 – 39%

случаев ААГ, примерно в 10% рака «in situ», в 8–70% случаев аденокарцином легкого и очень редки в бронхиальной дисплазии [200, 237, 336, 410, 420]. Отмечается, что при прогрессии атипической аденоматозной гиперплазии в аденокарциному легкого, снижается активация KRAS мутации с 33% до 8% [372, 373]. Исследования, проведенные С.А. Соопер et. al. (1997), не выявили KRAS мутаций в нормальном и гиперплазированном бронхиальном эпителии. Авторы отмечают, что центральный тип аденокарцином легкого может возникнуть в результате трансформации бронхиального эпителия. Данный тип аденокарциномы, в отличие от периферической, не имел KRAS мутаций [209]. Не было найдено каких-либо доказательств наличия KRAS мутаций в бронхиальной дисплазии в исследовании, проведенном Sugio et.al. [210]

Мутации рецепторов семейства EGFR при раке легкого, отвечают за их онкогенетическую активацию, способствуя процессам пролиферации и дифференцировки, а также апоптозу и ангиогенезу [74, 132]. EGFR мутации, ассоциированные с не курящими представительницами женского пола Восточной Азии, представлены делециями в экзоне 19 (44%) и L858R и L861Q в экзоне 21 (41%) [200, 237, 278, 421]. EGFR мутации обнаружены в нормальном бронхиальном и бронхиолярном эпителии, причем в процессе патогенеза аденокарциномы, показано увеличение числа копий онкогена [200, 422]. EGFR мутации происходят в 5–25% ААГ и у 40% пациентов с аденокарциномой легкого, редко встречаются или отсутствуют в бронхоальвеолярной карциноме [421]. Кроме того, данные мутации найдены в нормальном бронхиальном эпителии, смежном с опухолью [373, 420]. EGFR мутаций крайне редко происходят при плоскоклеточном раке легкого – менее 10% [236, 237].

1.3.3. Характер экспрессии маркеров регуляции апоптоза при предопухолевых процессах

К белкам, контролирующим процессы пролиферации и дифференцировки, относят белки – регуляторы апоптоза. Это ген-супрессор p53, подавляющий пролиферацию клеток и индуцирующий апоптоз при обнаружении повреждений ДНК в фазе G2 клеточного цикла. Кодированный им белок с одноименным названием обнаруживается в ядре в S и G2 фазах клеточного цикла. Нормальный p53 – короткоживущий белок, только в случаях возникновения сбоя происходит стабилизация молекулы, сопровождаемая увеличением его экспрессии. Повреждения гена p53 полностью его преобразовывают, и мутированный белок перестает останавливать клетки с поврежденной ДНК в G1-фазе, и они начинают репликацию ДНК на поврежденной матрице. Это увеличивает возможность злокачественной трансформации клеток [261].

Ген-супрессор опухоли p53 находится в 17p13. Считают, что мутации p53 ассоциированы в основном с более тяжелыми изменениями в канцерогенезе легких. Так, например, точечные мутации или делеции данного гена найдены в 45–70% случаев НМРЛ, а также при раке «in situ» и тяжелой дисплазии [210, 237]. В исследовании, проведенном Н. Kohno (1999), мутации p53 при дисплазии бронхиального эпителия были найдены только в 2 (9%) случаях из 22. При плоскоклеточной метаплазии мутации p53 отсутствовали [209]. Л.А. Шестакова и др. (2011), изучая делеции гена p53 в различных морфологических участках бронхиального эпителия у больных с врожденной кистозной аденоматоидной мальформацией (ВКАМ) на фоне рака легкого и ХОБЛ, выявили в обоих случаях ВКАМ потерю гетерозиготности в участках атипической аденоматозной гиперплазии, атипической базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии с дисплазией. Наличие делеций гена p53 при ААГ, атипической базальноклеточной гиперплазии, плоскоклеточной

метаплазии и дисплазии, свидетельствует, по мнению авторов, о потенциальной злокачественности этих процессов [46].

Точечные мутации в гене p53 изменяют конформацию белка, увеличивая время его полужизни. Это позволяет его идентифицировать иммуногистохимическим методом. Используемые для идентификации p53 антитела связывают дикую и мутантную формы белка. В настоящее время накоплено много сведений о характере экспрессии белка p53 на различных этапах бронхиального канцерогенеза [2, 108, 210]. Большинство данных свидетельствует об отсутствии экспрессии p53 в морфологически неизменном эпителии [82, 210, 234, 248, 297]. Считают, что ядерная экспрессия p53 выявляется в участках неизменного бронхиального эпителия и эпителия, с предраковыми изменениями, пограничных с раком легкого [236, 274, 310, 319]. Тем не менее, Walker et al. (1994) описывают одиночные p53-позитивные базальные клетки в нормальном бронхиальном эпителии у пациентов без рака легкого. Авторы подчеркивают, что у больных раком легкого, уже в 53% случаев в морфологически нормальном бронхиальном эпителии была найдена экспрессия p53. Однако в 25% плоскоклеточной дисплазии/рака «in situ», ассоциированных с инвазивным плоскоклеточным раком легкого, экспрессия p53 отсутствовала [396].

Согласно данным V. Sousa et. al. (2011), экспрессия p53 значительно выше при дисплазии, по сравнению с гиперплазией и метаплазией. Различия в интенсивности экспрессии p53 между вариантами диспластических изменений и плоскоклеточным раком, может быть одним из биомаркеров канцерогенеза легких [365].

По результатам исследования S. Lantuejoul (2009), высокий уровень экспрессии p53 отмечается при умеренной дисплазии в 25%, раке «in situ» – 75% случаев [237]. Наличие ядерной экспрессии p53 в «предзлокачественных поражениях», по мнению Z.Vukobrat-Bijedic et. al. (2007), может рассматриваться как индикатор канцерогенеза [416].

В. Martin (2002) отмечает в 28% случаев экспрессию белка p53 в клетках нормального эпителия бронхов у пациентов без рака легкого, но имеющих в анамнезе опухоли головы/шеи или большой стаж курения. По мере прогрессирования степени тяжести предопухолевых изменений, число случаев с позитивной экспрессией возрастает, достигая 71% при дисплазии I степени. Интересно, что при раке «in situ» и инвазивном раке, количество случаев с положительной реакцией p53 в клетках снижается до 64% [262].

А. Ponticiello et al. (2000) в течение 4 лет наблюдали за 22 злостными курильщиками, у которых по результатам фибробронхоскопии были найдены плоскоклеточная дисплазия/CIS. В 9 (41%) случаях при иммуногистохимическом исследовании отмечалась позитивная экспрессия p53. Из них, у 7 (78%) больных предопухолевые изменения, за период наблюдения, прогрессировали в инвазивный плоскоклеточный рак. У 13 пациентов экспрессия p53 в предопухолевых изменениях была негативной. Из них, у трех больных отмечена прогрессия до рака легкого, причем в двух случаях, это была аденокарцинома легкого [310].

Баланс между белковыми продуктами генов p53 и Bcl-2 определяет равновесие между пролиферацией и апоптозом. Bcl-2 подавляет апоптоз, усиливает пролиферацию и способствует дифференцировке клеток. Е. Brambilla et. al. (1998) связывают экспрессию p53 и Bcl-2 с наличием опухоли. При морфологическом исследовании операционного материала ими выявлена положительная реакция p53 и Bcl-2 во всех случаях дисплазии и рака «in situ», наблюдаемых в смежном с опухолью бронхиальном эпителии. Исследователями отмечается, что важным фактором, который повлиял на частоту положительных реакций, является расстояние между предраковым изменением и опухолью. В материале, полученном от «пациентов без рака» накопления p53 в изменениях, которые рассматриваются как предопухолевые, не было найдено [80].

W. Pankiewicz et. al. (2007), проанализировав данные литературы о характере экспрессии p53 и Vcl-2 при предопухолевых изменениях и раке легкого, пришли к заключению, о существовании восходящей тенденций аккумуляции этих белков по мере прогрессирования степени тяжести процесса. Например, экспрессия белка p53, в случае плоскоклеточной метаплазии, составляла 5%, а при тяжелой дисплазии достигала уже 60% клеток. Экспрессия Vcl-2 происходила аналогичным образом. Не высокий уровень экспрессии этого белка наблюдался при плоскоклеточной метаплазии, резко возрастал при тяжелой дисплазии/раке «in situ» [300]. Об увеличении числа клеток, экспрессирующих Vcl-2 по мере нарастания степени тяжести диспластических изменений, свидетельствуют результаты исследования К. М. Керг, 2001 [209].

При процессах, предшествующих периферической аденокарциноме легкого, также отмечалась экспрессия p53 и Vcl-2. При аденоматозной гиперплазии экспрессия Vcl-2 слабая, а в случаях атипической аденоматозной гиперплазии наблюдалась в 70% случаев [300, 319]. По данным К. М. Керг (2007) накопление белка p53 происходило в 28% случаев атипических аденоматозных гиперплазий [209], тогда как исследования, проведенные Kitamura et.al.(2000) указывают на экспрессию p53 всего в 5–8% случаев ААГ и 8–62% случаях бронхоальвеолярной карциномы [222].

F. Demirag et. al. (2013), изучая экспрессию Vcl-2 при плоскоклеточном раке и аденокарциноме легкого, а также в предшествующих им предопухолевых изменениях (ААГ, базальноклеточной дисплазии, плоскоклеточной дисплазии и «бронхиально-эпителиальной дисплазии переходного типа»), отметили наличие корреляции между уровнем экспрессии маркера и степенью тяжести процесса. При предопухолевых изменениях наибольшее число

Vcl-2 позитивных клеток было найдено в случаях атипической аденоматозной гиперплазии и плоскоклеточной дисплазии [123].

G. Wang et. al. (2006) выявили повышение уровня экспрессии p53 вместе с маркером пролиферативной активности Ki-67 в ряду: «норма» – гиперплазия – дисплазия, отмечая при этом, что в случаях тяжелой дисплазии наблюдается «гиперэкспрессия» данных маркеров [397]. В тоже время, U. Tormanen et. al. (2001) считают, что последовательность: метаплазия – дисплазия – карцинома легкого, ассоциируется только с высокой пролиферативной активностью, и не зависит от экспрессии p53 и Vcl-2 [377]. Также в ряде публикаций, говорится об отсутствие корреляции между уровнями экспрессии p53 и Ki-67, что может свидетельствовать о связи мутации p53 с апоптозом, а не с клеточной пролиферацией [53, 83, 92, 102].

1.3.4. Характер экспрессии маркеров пролиферативной активности при предопухолевых процессах

Проллиферативная активность является ведущим фактором в механизме злокачественной трансформации клеток. Традиционный подсчет митотической активности не отражает пролиферативный потенциал процесса, так как собственно митоз занимает несколько часов, а подготовка к нему – около 24 часов. Поэтому в настоящее время, оценка пролиферативной активности опухоли, изучается с использованием маркеров Ki-67 и PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen).

PCNA участвует в репликации и репарации ДНК, присутствует в делящихся (G1, G2, M) и находящихся в покое (G0) клетках. Период его полураспада около 20 часов, поэтому он может накапливаться в клетках, закончивших деление и давать более высокие показатели пролиферации [18, 86, 194]. Khuri et al. (2007), исследовав материал бронхобиопсий от 86 пациентов, отметили увеличение уровня экспрессии PCNA по мере

перехода от нормального бронхиального эпителия к эпителию с признаками гиперплазии, плоскоклеточной метаплазии и дисплазии [230]. Hirano et al. (2006), выявили экспрессию PCNA в 25% клеток неизменной слизистой бронха, в случаях слабо выраженной дисплазии количество клеток с позитивной экспрессией составило 35%, при тяжелой степени дисплазии – 40%, а при инвазивном раке легкого – 85-90% [223]. Аналогичные результаты были получены и другими исследователями [181, 210].

Более широко используемый для изучения пролиферативной активности иммуногистохимический маркер – протеин Ki-67 [214, 371]. В отличие от PCNA, Ki-67 не участвует в репарации ДНК и присутствует в ядрах делящихся клеток. Его содержание характеризует только пролиферативный пул ткани, а период полураспада составляет 60-90 минут [86, 270, 362, 406].

I. Cavarga et. al. (2009), сопоставив экспрессию Ki-67 и PCNA при диспластических изменениях бронхиального эпителия (Д2 – n=13, Д3 – n=12) и плоскоклеточном раке легкого (n=11) отметили, что при предраковых изменениях средний процент Ki-67 ($37,4 \pm 5,8\%$ - Д3) позитивных клеток ниже, по сравнению с инвазивной карциномой ($58,6 \pm 8,4\%$, $p = 0,043$). При этом никаких различий по числу PCNA+ клеток между диспластическими процессами и плоскоклеточным раком легкого не наблюдалось [92].

Сведения о характере экспрессии маркера пролиферативной активности при предопухолевых изменениях бронхиального эпителия противоречивы. В исследованиях, проведенных Е.А.Коган с соавторами (2003), отмечаются единичные Ki-67-положительные клетки при бокаловидноклеточной гиперплазии. При базальноклеточной гиперплазии уровень экспрессии Ki-67 составлял 1,9%, а при появлении признаков атипии – 4,1%. В очагах дисплазии III степени уровень Ki-67 был самым

высоким и достигал 9% [17].

Значительные различия в экспрессии Ki-67 были найдены между базальноклеточной гиперплазией, плоскоклеточной метаплазией и дисплазией бронхиального эпителия. Экспрессия маркера возрастала от 6,25% клеток при базальноклеточной гиперплазии до 22,5% при плоскоклеточной метаплазии ($p=0,001$). Наибольшее число позитивных клеток – 57,6%, было обнаружено при дисплазии ($p=0,0002$). Однако никаких существенных различий между слабой, умеренной и выраженной дисплазией получено не было [365].

А. Meert (2004) показано, что экспрессия Ki-67 зависит от степени тяжести предраковых изменений и значительно увеличивается по мере прогрессии от слабо выраженной дисплазии к раку «in situ» [270].

Сравнивая процентное соотношение Ki-67 положительных клеток при диспластических процессах и раке легкого, S Lantuejoul et. al. (2005), указывают на существенное различие между ними по данному показателю. При слабо выраженной дисплазии он составил 47% позитивно окрашенных клеток, умеренной – уже 67%, тяжелой дисплазии/CIS – 91–100%. Это, по мнению авторов, ясно показывает, что пролиферативная активность, в ходе развития плоскоклеточного рака, напрямую связана с увеличением клеточной атипии. Кроме того, этими авторами отмечено, что в ходе развития аденокарциномы легкого, индекс пролиферации растет вместе с увеличением тяжести изменений от атипической аденоматозной гиперплазии к дисплазии, далее, к бронхоальвеолярному и инвазивному раку [237].

По данным исследования М. Lai (2009), у больных с бронхиальной интраэпителиальной неоплазией выявлена «аномальная пролиферация», заключающаяся в «гиперэкспрессии» Ki-67 [234].

1.3.5. Характер экспрессии маркеров клеточной дифференцировки при предопухолевых процессах

Основные функции syndecan-1 (CD138) – установление контроля над ростом, дифференцировкой клеток, а также поддержание клеточной адгезии и миграции клеток. Высокая экспрессия CD138 ингибирует рост клеток и миграцию пораженных клеток. В экспериментальных условиях показано, что при отсутствии экспрессии CD138 в нормальных клетках эпителия молочной железы последние, приобретают фенотип фибробластов, а индуцированная экспрессия белка оказывает противоположное влияние на морфологию клеток. Изучение прогностической значимости syndecan-1 связано в основном с опухолевыми процессами. Экспрессия CD138 зависит от типа опухоли и степени ее дифференцировки. Уровень экспрессии снижается при плоскоклеточном канцерогенезе и коррелирует с плохим прогнозом в случаях рака головы/шеи и плоскоклеточного рака шейки матки [105, 291]. Также есть данные о том, что реактивность CD138 уменьшается по мере снижения степени дифференцировки почечно-клеточной карциномы [156]. С другой стороны, отмечается связь между высокой экспрессией CD138 и менее благоприятным прогнозом аденокарциномы поджелудочной железы [201]. L. Shah et al. (2004), при оценке связи характера экспрессии CD138 в эпителии немелкоклеточного рака легкого с выживаемостью, отметили снижение последней, в случаях отсутствия эпителиальной экспрессии белка [354]. Аналогичные исследования, проведенные K. Al-Shibli et al. (2010), подобной закономерности не выявили. При этом авторы подчеркнули, что при плоскоклеточном раке экспрессия CD138 была более выраженная, чем при аденокарциноме легкого [52].

Оценка значимости маркера дифференцировки плоского эпителия в прогрессии предопухолевых процессов в легких не проводилась. Имеющиеся в литературе сведения об экспрессии CD138 касаются

предопухолевого патологического шейке матки и ротовой полости. Так, Inki P., et.al (2007) наблюдали позитивную экспрессию CD138 в неизменном и метапластическом плоском эпителии шейки матки. По мере прогрессирования степени тяжести цервикальной интраэпителиальной неоплазии уровень экспрессии CD138 снижался. При низкокодифференцированном плоскоклеточном раке экспрессия syndecan-1 отсутствовала [183]. Jackson L., et.al. (2000) отметили, что в нормальном эпителии ротовой полости экспрессия CD138 в несколько раз выше, чем при диспластических изменениях, но статистически значимой разницы в ряду дисплазия (I-III) – рак «in situ» – инвазивный рак авторами не показано [186]. Kurokawa H., et.al. (2013) изучали экспрессию syndecan-1, p53 и Ki-67 в нормальном эпителии ротовой полости, очагах лейкоплакии и дисплазии. Авторами было установлено, что в нормальном эпителии наблюдалась выраженная экспрессия CD138 и слабая – белка p53 и Ki-67. При лейкоплакии становилось меньше иммунопозитивных CD138 клеток и больше p53+ и Ki-67+ клеток. По мере прогрессии дисплазии от слабой степени к тяжелой уровень экспрессии маркеров p53 и Ki-67 возрастал, а syndecan-1 снижался, вплоть до отсутствия экспрессии в случаях дисплазии тяжелой степени [231].

В настоящее время в качестве биомаркера НМРЛ изучается белок С4.4А, являющийся маркером плоскоклеточной дифференцировки [227, 228]. Экспрессия С4.4А в многослойном плоском эпителии определяется в основном в супрабазальных слоях и отсутствует в нормальной ткани легкого [188, 189, 190]. Исследование С4.4А при предопухолевых изменениях в эпителии легких показало следующие результаты. Экспрессия маркера не отмечалась не только в нормальном эпителии, но и в случаях бокаловидноклеточной гиперплазии. Слабовыраженной она была при базальноклеточной гиперплазии, однако резко возрастала при плоскоклеточной метаплазии и дисплазии. При раке «in situ» и инвазивном

плоскоклеточном раке легкого экспрессия C4.4A была умеренной. Индукция C4.4A уже на стадии гиперплазии может означать, что этот белок является маркером очень ранней плоскоклеточной дифференциации [188].

Нормальный альвеолярный эпителий также был отрицательным в отношении данного маркера. Слабая или умеренная очаговая экспрессия наблюдалась при атипической аденоматозной гиперплазии. Только 10% случаев ААГ имели сильно выраженное иммуногистохимическое окрашивание. Большинство бронхоальвеолярных и инвазивных аденокарцином легкого были негативны для C4.4.A. Данный факт, по мнению авторов, позволяет предположить, что C4.4A может быть ранним биомаркером более злокачественного подтипа заболевания, высокая экспрессия (маркера) которого в аденокарциноме легкого коррелирует с плохой выживаемостью пациентов [189, 190, 228].

Резюме

Несмотря на многочисленные усилия, направленные на улучшение понимания биологии рака легких и достижения в персонализированной терапии НМРЛ, смертность от этого заболевания остается наиболее распространенной в мире [10, 14, 19, 25, 31, 36, 100, 112]. Одной из причин такой ситуации является отсутствие эффективной стратегии раннего выявления и химиопрофилактики предшествующих раку легкого процессов [32, 33, 60, 176, 312]. Поэтому условия, механизм возникновения, развития и прогрессирования предопухолевых изменений легких по-прежнему вызывают исследовательский интерес. Традиционный морфологический метод для идентификации предопухолевых изменений имеет ограничения. Попытки более точного определения этих процессов затруднены относительной «невидимостью» ранних клеточных повреждений и их случайным распределением по всем дыхательным путям [200]. В этой связи активно изучаются молекулярно-генетические

изменения в респираторном эпителии при предраке легкого. Известно, что плоскоклеточный рак и аденокарцинома легких являются результатом нескольких сложных комбинаций морфологических, молекулярных и генетических изменений [119, 200, 237, 248, 337, 339]. Многие из молекулярных изменений, такие как инактивация мутации генов-супрессоров, активация мутации онкогенов, потеря гетерозиготности (LOH) и амплификация хромосомных участков были обнаружены в гистологически нормальной и гиперплазированной слизистой оболочке, особенно у лиц с большим стажем курения [96, 200, 235, 237, 296]. При предопухолевых изменениях отмечена дисрегуляция важных сигнальных путей, которые прослеживаются при раке легкого. В том числе пути, связанных с Ras, EGFR, фосфоинозитид 3-киназой (PI3K)/АКТ, инсулин-подобным фактором роста (IGF) [200, 233]. Тем не менее, полной ясности о молекулярных событиях, предшествующих развитию рака легких и генетической основе его канцерогенеза до сих пор нет. По ряду вопросов, касающихся предрака легкого, сведения в литературе противоречивы, а сведения о характере экспрессии генов при различных вариантах предопухолевых изменений, практически отсутствуют.

Основное противоречие трактовки предопухолевых изменений респираторного эпителия состоит в объединении всех вариантов нарушений нормального состояния эпителия термином «дисплазия» [234, 397]. Противоположная точка зрения предполагает наличие наряду с диспластическими, подлинно предраковым процессом, менее выраженных реактивных изменений [107, 114, 162, 208, 210, 237, 300].

Нам представляется более правильной точка зрения, предполагающая последовательное или независимое возникновение на фоне хронического воспаления бокаловидноклеточной гиперплазии, базальноклеточной гиперплазии, плоскоклеточной метаплазии, дисплазии I, II и III степени. Следует считать установленным феномен одновременного наличия в

респираторном эпителии разных вариантов гиперпластических состояний, плоскоклеточной метаплазии и дисплазии. Обратимость этих состояний возможна, хотя ее механизмы не ясны, а попытки прогнозирования не эффективны.

В качестве прогностических параметров динамики процессов в морфологически измененном эпителии, исследуются маркеры пролиферативной активности, апоптоза, клеточной адгезии и дифференцировки. Изучаются также морфометрические показатели процессов, предшествующих раку легкого. Однако значение молекулярных и количественных параметров в дифференциальной диагностике и прогнозе течения предопухолевых изменений трактуется не однозначно. Надежные биомаркеры, предсказывающие биологическое поведение предшествующих раку легкого процессов, отсутствуют [184, 300].

В ряде исследований сообщается о том, что в гистологически нормальной ткани и предопухолевых изменениях респираторного эпителия, прилегающих к опухоли, могут быть схожие с последней молекулярные нарушения [287, 304]. То есть, для рака легкого характерен эффект поля «cancerization» [200]. Не исключено, что характер и выраженность морфологических изменений, развивающихся в смежном с опухолью респираторном эпителии, коррелирует с клиническим течением реализовавшегося злокачественного процесса. Однако сведения в литературе о наличии какой-либо связи фоновых изменений бронхиального эпителия с процессами метастазирования и возникновения локорегионарных рецидивов плоскоклеточного рака и аденокарциномы легкого отсутствуют.

Таким образом, изучение закономерностей развития предопухолевых изменений респираторного эпителия в участках отдаленных от опухоли, оценка прогностической значимости различных молекулярно-

генетических маркеров на этапах развития этих процессов, а также связи варианта сочетания морфологических процессов с прогрессией немелкоклеточного рака легкого, является актуальной проблемой, что позволило провести представленное исследование.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Клиническая характеристика материала

Цитометрические параметры и прогноз дисплазии бронхиального эпителия изучали в группе больных хроническим бронхитом. Материалом для исследования послужили бронхобиоптаты и мазки-отпечатки с них, взятые при фибробронхоскопии. Следует отметить, что для данного этапа исследования специально проводился отбор пациентов, у которых в слизистой сегментарных бронхов выявлялись диспластические изменения. ФБС проводилась всего 527 пациентам с ХБ, проходивших обследование на базе эндоскопического отделения НИИ онкологии Томского НИМЦ. Из них в исследование вошел 261 человек, у которых в большинстве случаев (193) наблюдалась дисплазия различной степени тяжести и была возможность проследить в динамике характер выявленных морфологических изменений бронхиального эпителия.

Для сравнения цитометрических параметров клеток и ядер дисплазии тяжелой степени с аналогичными параметрами опухоли, в исследовании использовался также биопсийный материал 10 больных с плоскоклеточным раком легкого.

Из 261 пациента с ХБ в возрасте от 32 до 67 лет (средний возраст $47,8 \pm 8,6$) было 87 (33,3%) женщин и 174 (66,7%) мужчины.

На этапах динамического наблюдения пациентам с различными вариантами реактивных и диспластических изменений бронхиального эпителия, выявленных на фоне ХБ, проводилось контрольное эндоскопическое и морфологическое исследования через 6, 12, 18, 24 и 36 месяцев.

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 T₁₋₄N₀₋₃M₀, находящихся на лечении в торакоабдоминальном отделении НИИ онкологии Томского НИМЦ с 2008 по 2015 годы. Из них 105 (61,1%) человек имели диагноз плоскоклеточного рака, а 67 (38,9%) – аденокарциномы легкого. Возраст больных составил от 41 до 76 лет (средний возраст 58,4±8,2 лет). В выборку вошли 147 (85,5%) мужчин и 25 (14,5%) женщин. Чаще всего у женщин диагностировалась аденокарцинома легкого – 22/25 (88%), плоскоклеточный рак был выявлен всего у 3/25 (22%) из них.

Плоскоклеточный рак в большинстве случаев – 83 (79%) имел центральную локализацию. Соответственно периферический плоскоклеточный рак был у 22 (21%) пациентов. В случаях аденокарциномы легкого преобладал периферический рак – 49 (73,1%), соответственно центральная локализация процесса была у 18 (26,9%) больных.

Распространенность опухолевого процесса определяли согласно международной классификации по системе TNM [363]. Следует отметить, что большинство пациентов НМРЛ, вошедших в исследование, имели III стадию заболевания – 66,3% (114/172) всех случаев (63,8% (67/105) при плоскоклеточном раке и 70,1% (47/67) при аденокарциноме легкого). Случаев с I и II стадией процесса было 8,1% и 25,6% соответственно (таблица 1).

Необходимо отметить, что 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.

В предоперационном периоде 86/172 больных (50,0%) получали неоадьювантную химиотерапию (НАХТ) по схеме: паклитаксел 175 мг/м² внутривенно 1 день/карбоплатин АУС 6 внутривенно 1 день. Проводилось 2–3 курса с интервалом в 3 недели. Во время проведения радикальной

операции 39/86 (45,4%) пациентам однократно получали 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 представлена в таблице 2.

Таблица 1 – Характеристика пациентов с немелкоклеточным раком легкого

Параметр	Количество больных n, (%)			p
	ПР	АК	НМРЛ	
Стадия				
I	8 (7,6)	6 (9,0)	14 (8,1)	$p_{1-2}=0,17$
II	30 (28,6)	14 (20,9)	44 (25,6)	$p_{1-3}=0,005$
IIIА	51 (48,6)	33 (49,2)	84 (48,8)	$p_{1-4}=0,41$
IIIВ	16 (15,2)	14 (20,9)	30 (17,5)	$p_{2-3}=0,01$ $p_{2-4}=0,39$ $p_{3-4}=0,004$
Размер опухоли				
T ₁₋₂	32 (30,5)	24 (35,8)	56 (32,6)	$p=0,0000$
T ₃₋₄	73 (69,5)	43 (64,2)	116 (67,4)	
Степень дифференцировки				
Высокая	6 (5,7)	4 (6,0)	10 (5,8)	$p_{1-2}=0,0009$ $p_{1-3}=0,05$ $p_{2-3}=0,0006$
Умеренная	63 (60,0)	42 (62,7)	105 (61,6)	
Низкая	36 (34,3)	21 (31,3)	57 (33,1)	
Синхронные лимфогенные метастазы				
Есть	42 (40,0)	34 (50,7)	76 (44,2)	$p=0,13$
Нет	63 (60,0)	33 (49,3)	96 (55,8)	
НАХТ				
Есть	57 (54,3)	29 (43,3)	86 (50,0)	$p=1,0$
Нет	48 (45,7)	38 (56,7)	86 (50,0)	

При изучении связи варианта сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия с прогрессией НМРЛ анализировали первичные документы – истории болезни и амбулаторные карты больных. Сроки наблюдения за больными составили до 5 лет. Следует отметить, что синхронными лимфогенными метастазами считали метастазы в регионарные лимфоузлы, которые были выявлены при оперативном

лечении. К локорегионарным рецидивам относили отсроченные лимфогенные метастазы и рецидивы в культе [40].

Таблица 2 – 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 ₁₋₂	23 (26,7)	34 (39,5)	0,32
T ₃₋₄	63 (73,3)	52 (60,5)	0,15
Степень дифференцировки			
Высокая	4 (4,6)	6 (7,0)	0,69
Умеренная	51 (59,3)	54 (62,8)	0,71
Низкая	31 (36,1)	26 (30,2)	0,64
Синхронные лимфогенные метастазы			
Есть	39 (45,3)	37 (43,0)	0,84
Нет	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

2.2. Морфологические методы исследования

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

Для изучения вариантов морфологических изменений бронхиального эпителия при НМРЛ и их связи с прогрессией опухоли, материалом для морфологического 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 мелкие бронхи ($d=2-0,5\text{мм}$), реже встречались сегментарные и субсегментарные бронхи ($d=2-5\text{мм}$).

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. Подсушенные на воздухе цитологические препараты в течение 3 минут окрашивали в красителе–фиксаторе Лейшмана. Далее микропрепараты промывали водопроводной водой и окрашивались основным красителем азур – эозином, приготовленным по стандартной методике [43]. 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 каждом мазке–отпечатке измеряли не менее 100 клеток (использовался иммерсионный объектив, х100). 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:

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

2.3. Микроскопическое исследование

Микроскопическую оценку базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии проводили по общепринятым критериям [162]. Необходимо отметить следующую особенность. Гиперплазия базальных клеток в респираторном эпителии наблюдается при разных приспособительных и патологических состояниях. К ним относятся реактивные изменения при хроническом воспалении. Эти изменения проявляются увеличением количества базальных клеток. Реснитчатые и бокаловидные клетки при этом сохраняются [100, 114, 149, 162, 181, 207, 211, 252, 318, 397]. Базальноклеточная гиперплазия проявляется выраженной пролиферацией базальных клеток и формированием нескольких слоев. Количество бокаловидных клеток уменьшается, или они исчезают. Реснитчатые клетки сохраняются. Так называемая незрелая плоскоклеточная метаплазия, цитологически практически неотличима от выраженной базальноклеточной пролиферации [114, 207, 211]. Дифференциация обсуждаемых процессов субъективна, поскольку нет согласованных критериев их диагностики. В этой связи, под термином «базальноклеточная гиперплазия» мы рассматривали состояния, при которых наблюдалась гиперплазия базальных клеток, от начальных до выраженных, но сохранялись реснитчатые клетки (рисунок 3–5). Плоскоклеточной метаплазией считали изменения, когда при наличии

признаков базальноклеточной пролиферации наблюдалась отчетливая тенденция к плоскоклеточной дифференцировке и появлению клеток типа шиповатых. Реснитчатые клетки при этом отсутствовали (рисунок 5–6).

Оценку дисплазии бронхиального эпителия различной степени выраженности проводили согласно критериям, описанным в «Гистологической классификации опухолей легких» ВОЗ 2015 [363]. Морфологический диагноз плоскоклеточного рака и аденокарциномы легкого устанавливался согласно «Гистологической классификации опухолей легкого» ВОЗ 2015 [363] и «International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma» [380, 405].

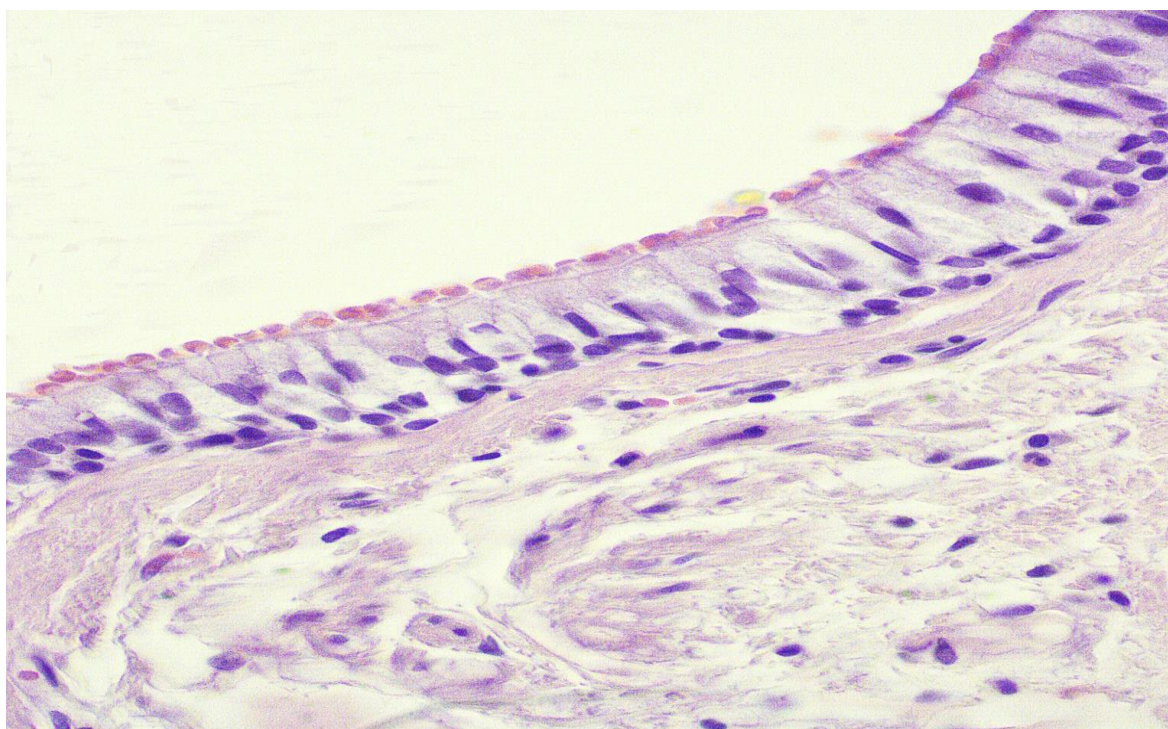


Рисунок 1 – Нормальный бронхиальный эпителий. Окраска гематоксилином и эозином, x200

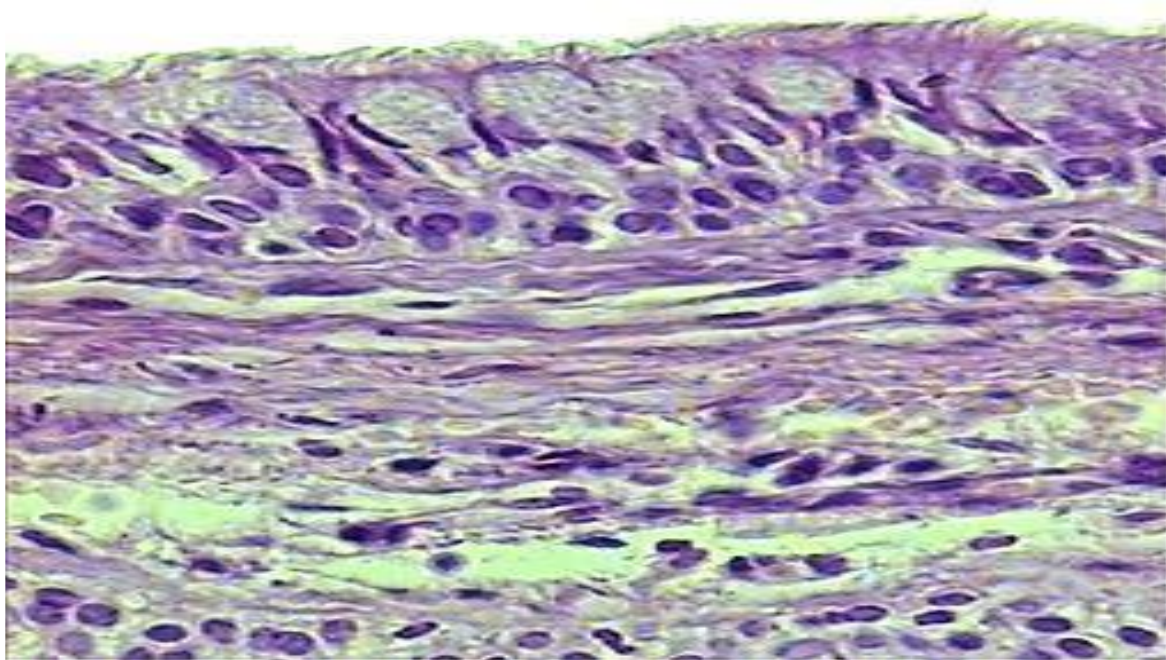


Рисунок 2 – Гиперплазия бокаловидных клеток. Окраска гематоксилином и эозином, x200

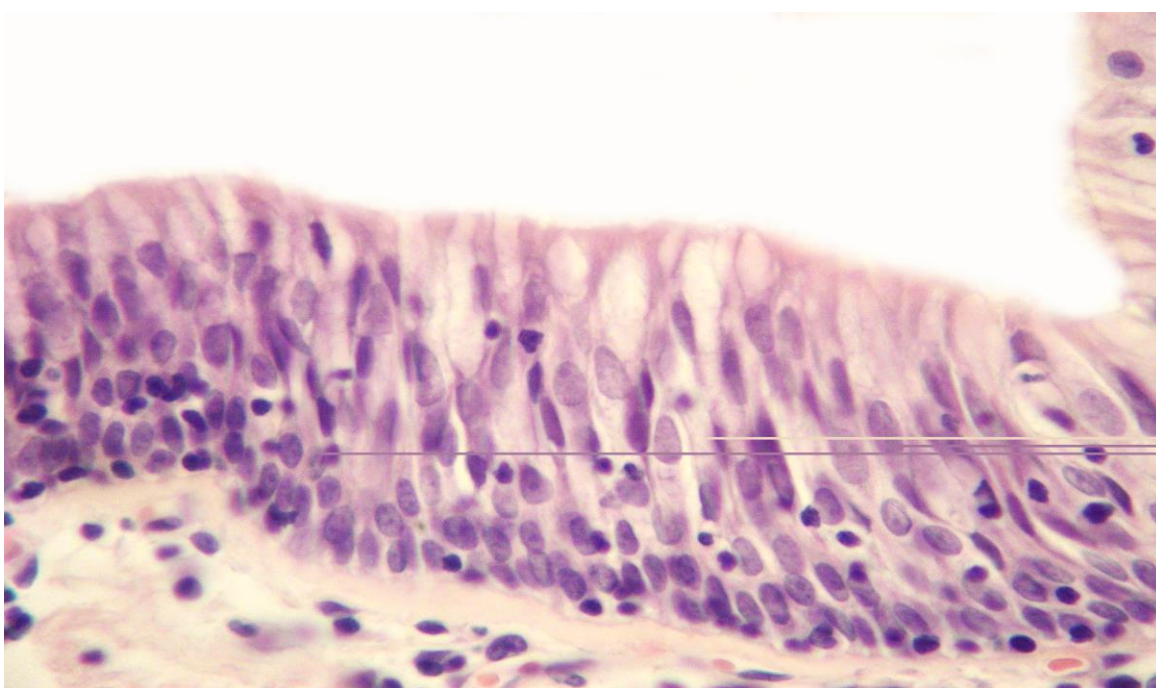


Рисунок 3 – Базальноклеточная гиперплазия (БКГ+ПМ-Д-). Окраска гематоксилином и эозином, x400

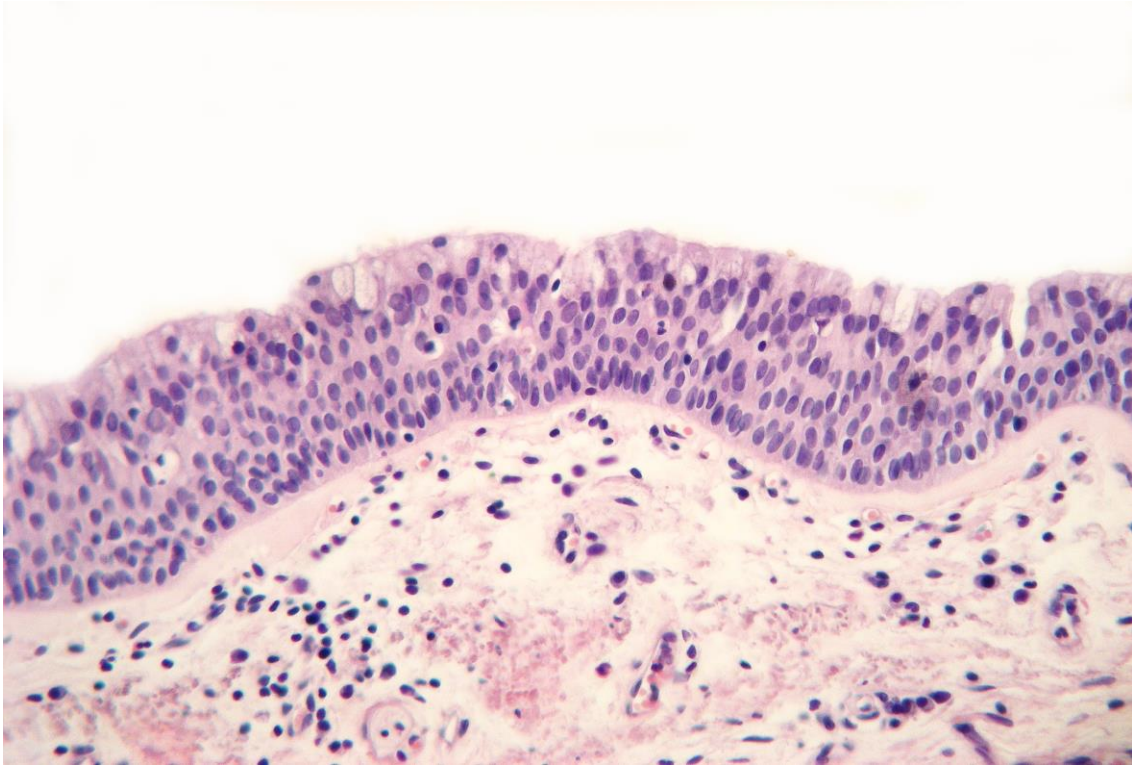
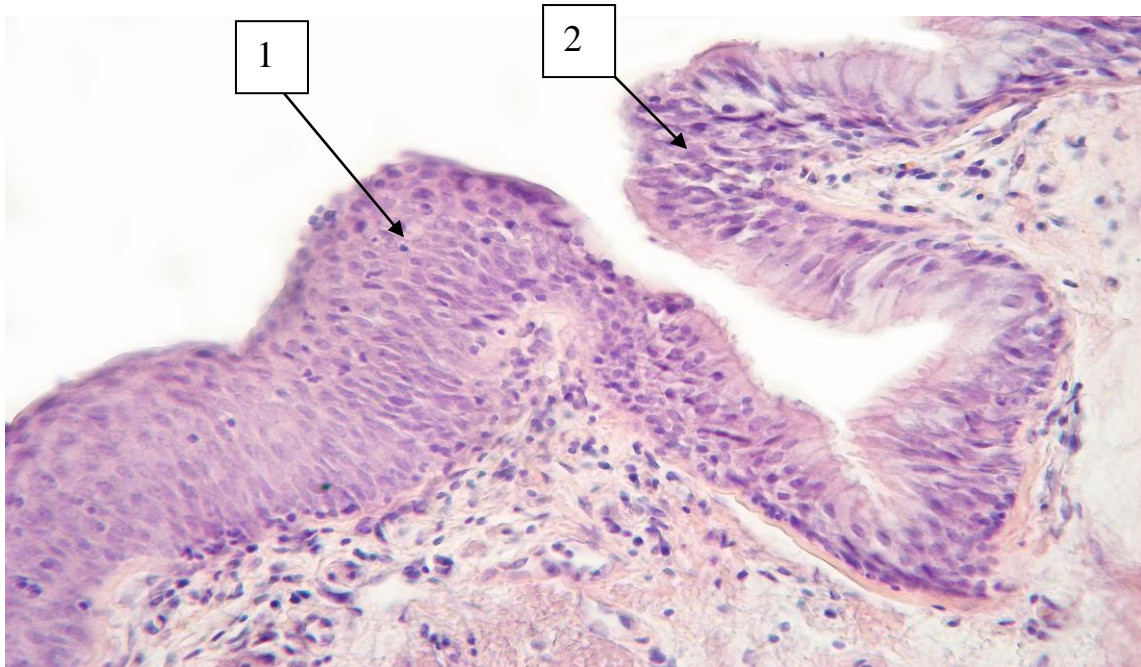
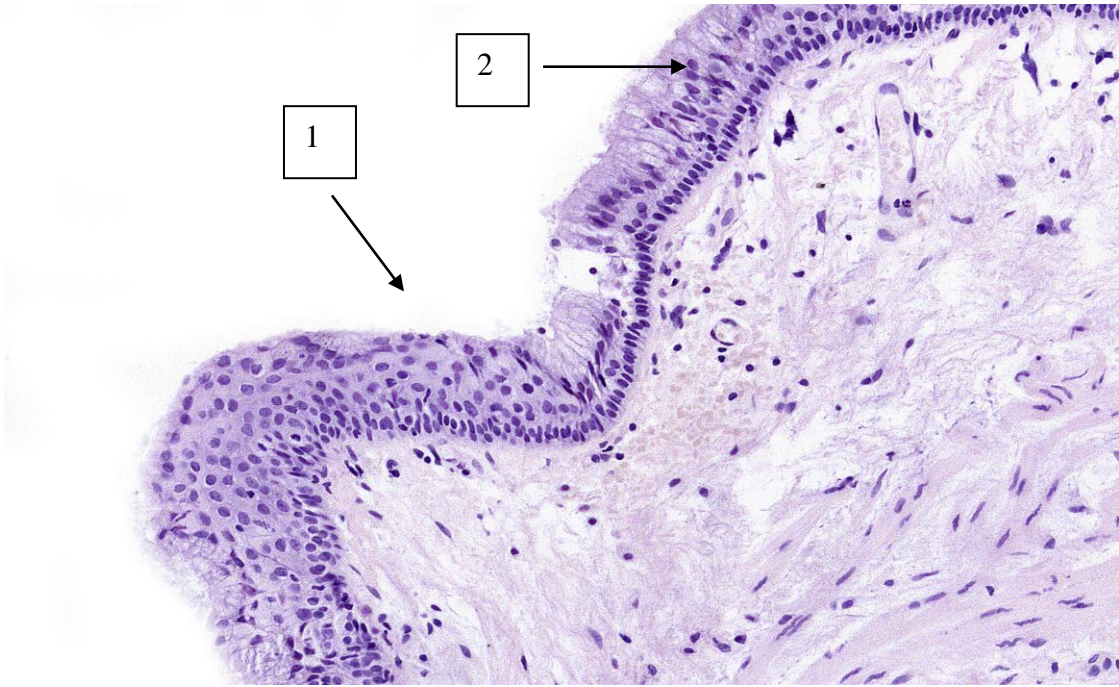


Рисунок 4 – Выраженная базальноклеточная гиперплазия БКГ+ПМ-Д-, реснитчатые клетки сохранены. Окраска гематоксилином и эозином, x200

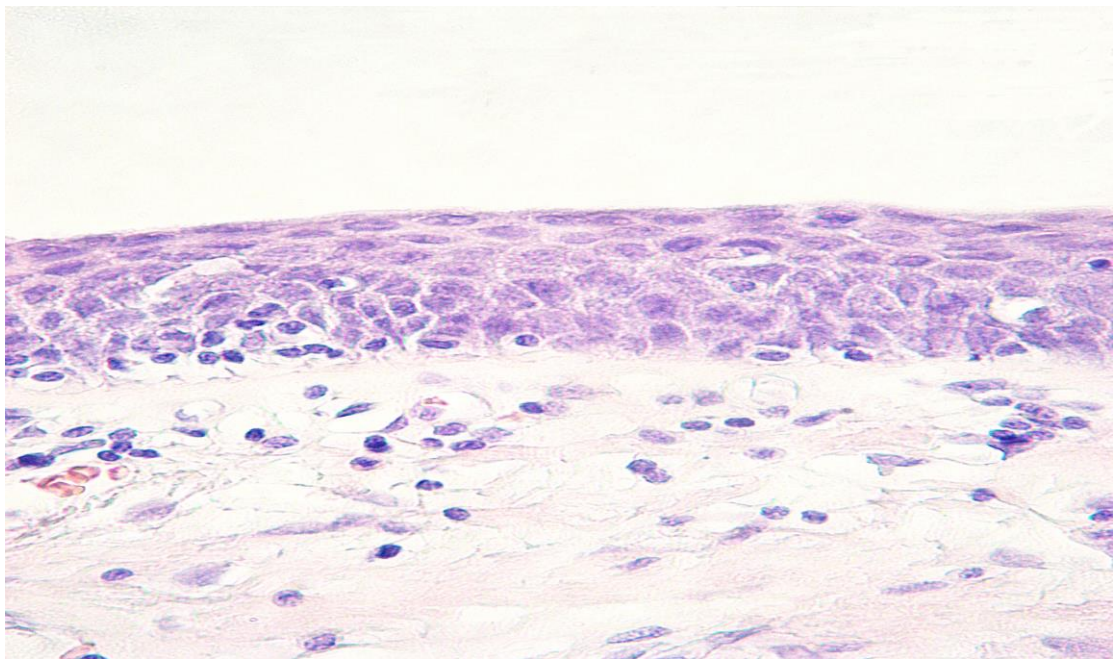


A

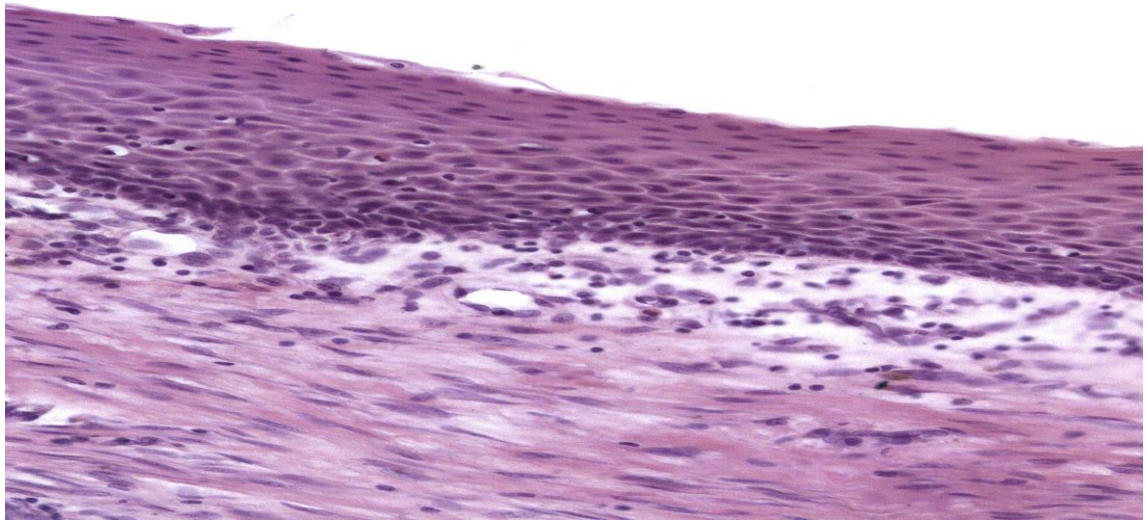


Б

Рисунок 5 – Сочетание базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии, БКГ+ПМ+Д-. 1 – плоскоклеточная метаплазия, 2 – базальноклеточная гиперплазия. Окраска гематоксилином и эозином, А – х400, Б – х200



А



Б

Рисунок 6 – Плоскоклеточная метаплазия (БКГ-ПМ+Д-). Окраска гематоксилином и эозином, А, Б – х400

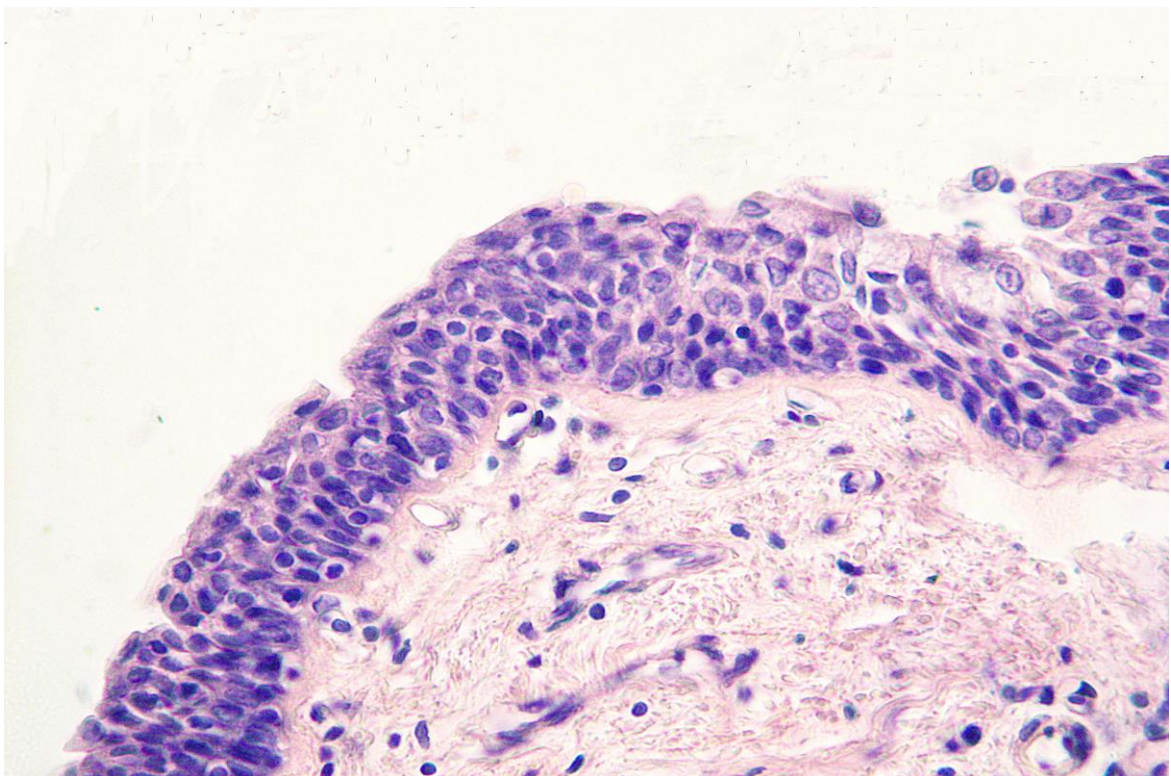


Рисунок 7 – Дисплазия III степени на фоне плоскоклеточной метаплазии. Окраска гематоксилином и эозином, х400

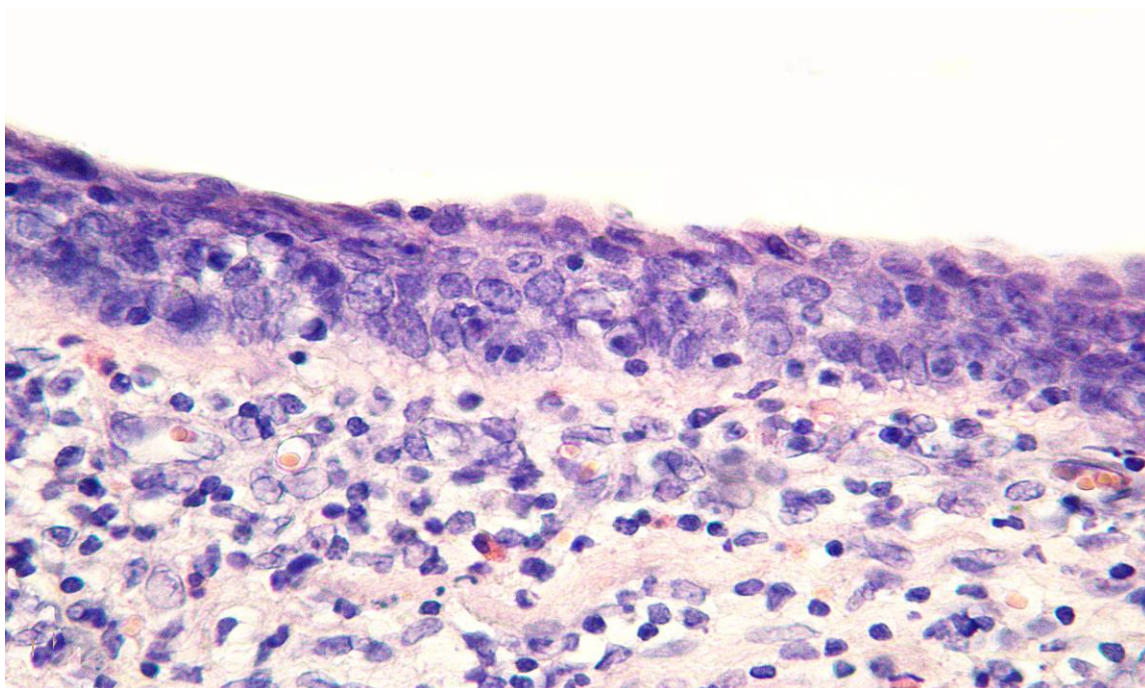


Рисунок 8 – Дисплазия III степени. Окраска гематоксилином и эозином, x400

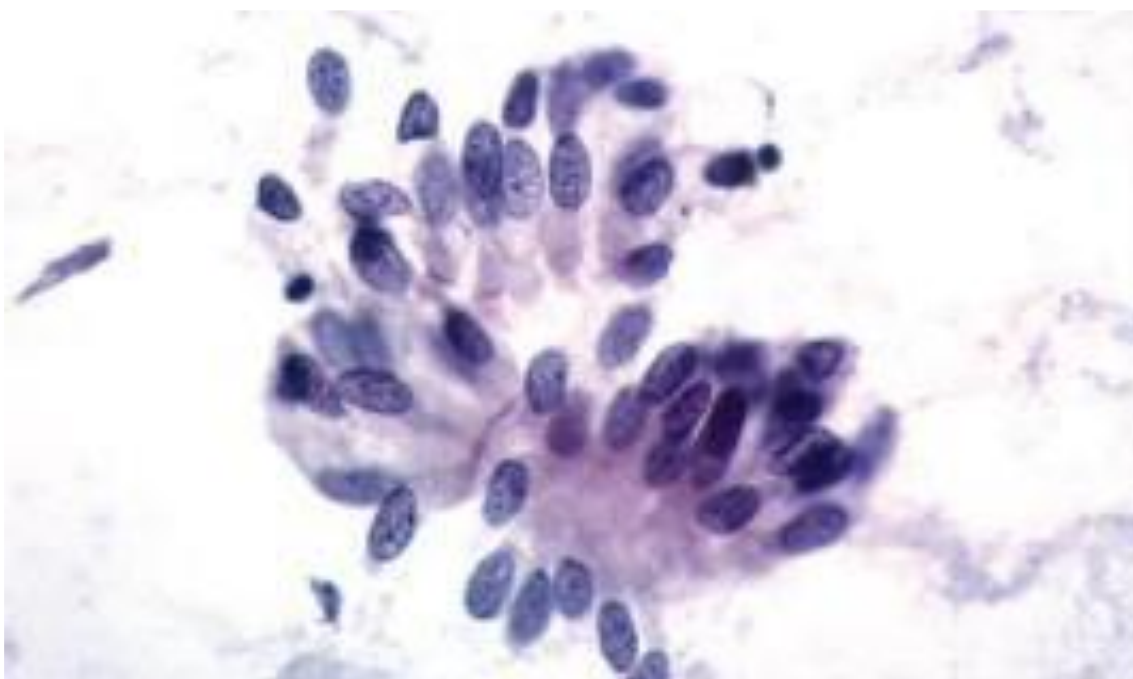


Рисунок 9 – Клетки нормального бронхиального эпителия . Окраска азур – эозином, x100

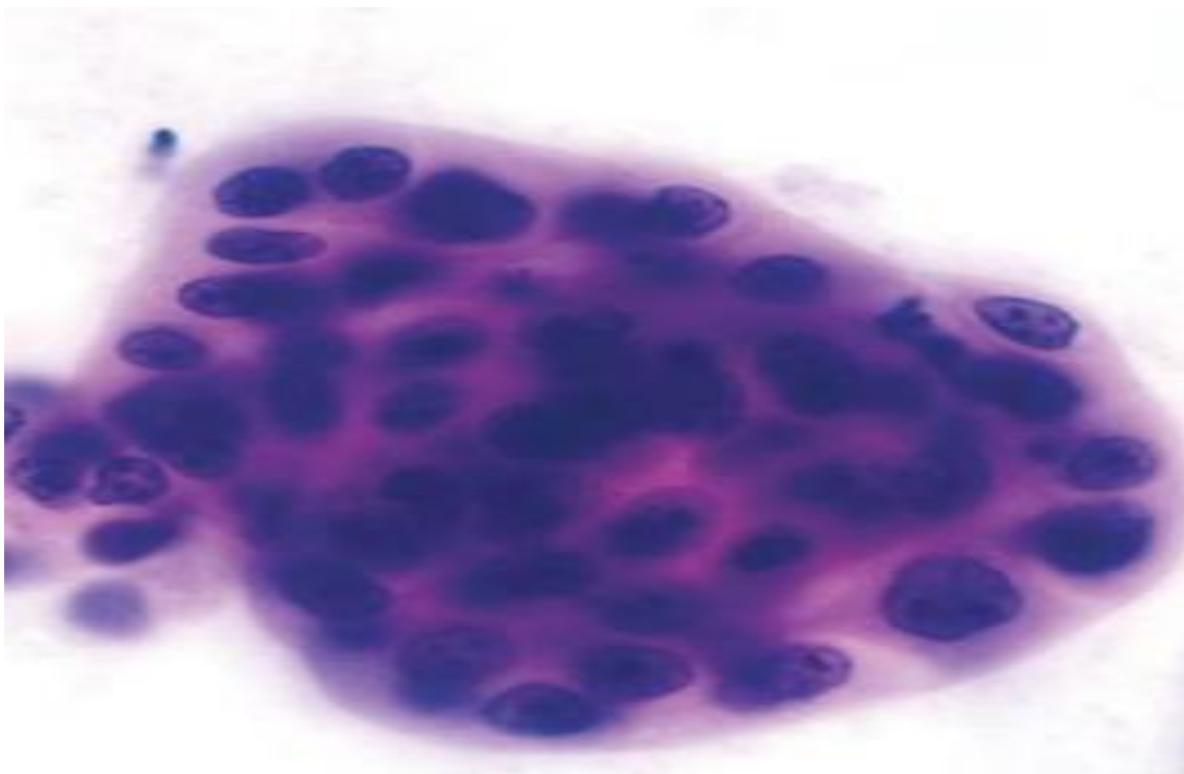


Рисунок 10 – Плоскоклеточная метаплазия. Окраска азур – эозином, x1000

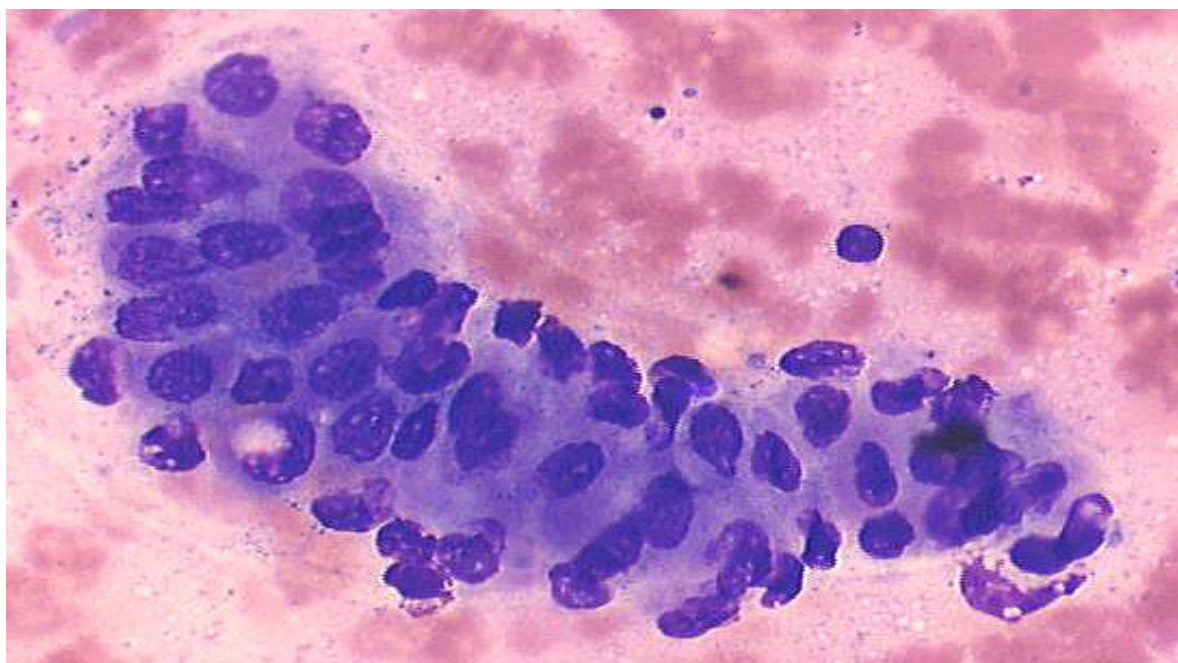
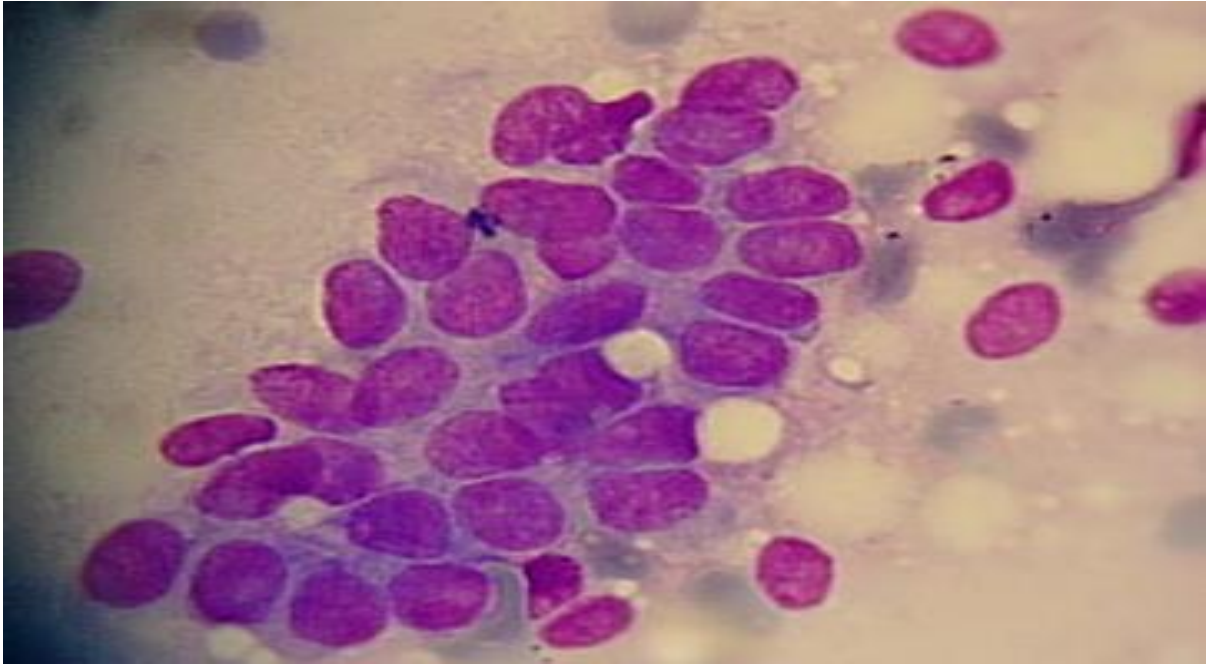
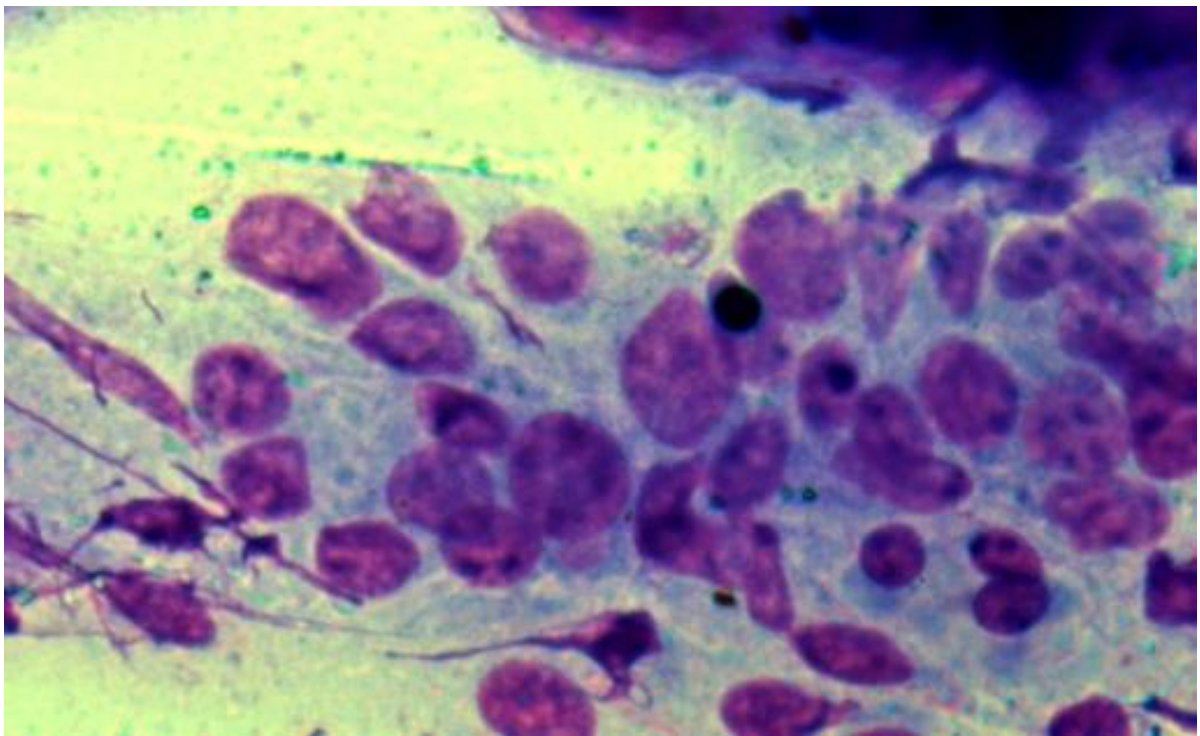


Рисунок 11 – Дисплазия бронхиального эпителия II степени. Окраска азур – эозином, x1000



А



Б

Рисунок 12 – Дисплазия бронхиального эпителия III степени (А,Б).
Окраска азур – эозином, x1000

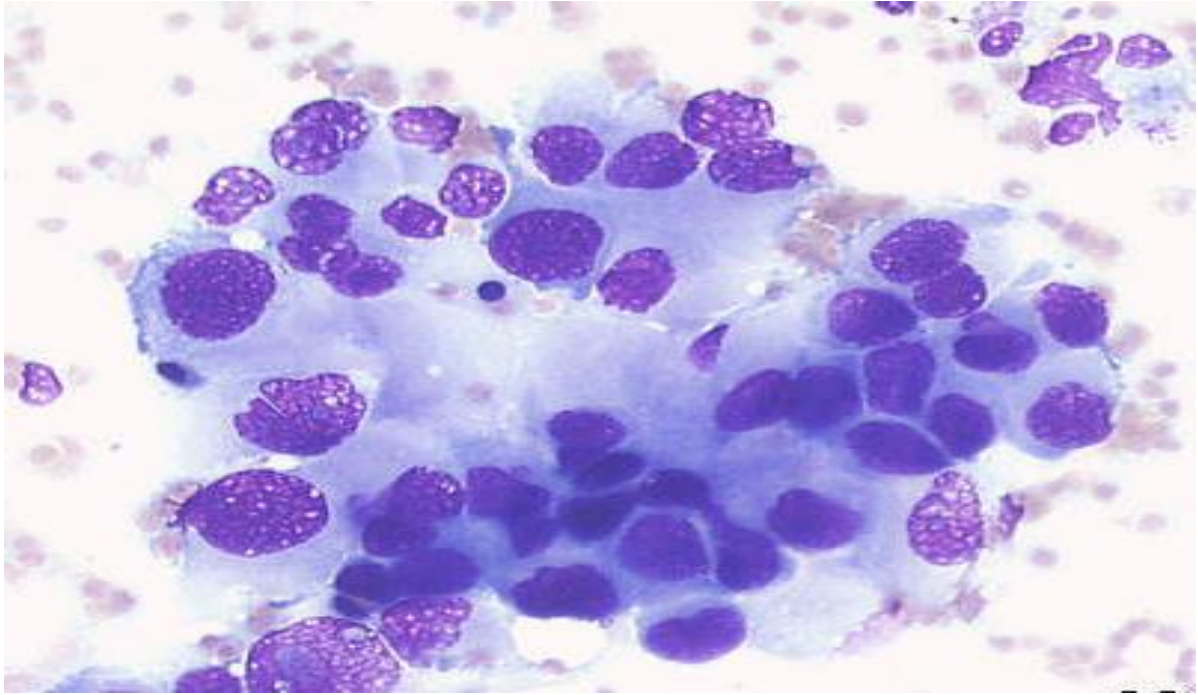


Рисунок 13 – Плоскоклеточный рак легкого. Окраска азур – эозином, x1000

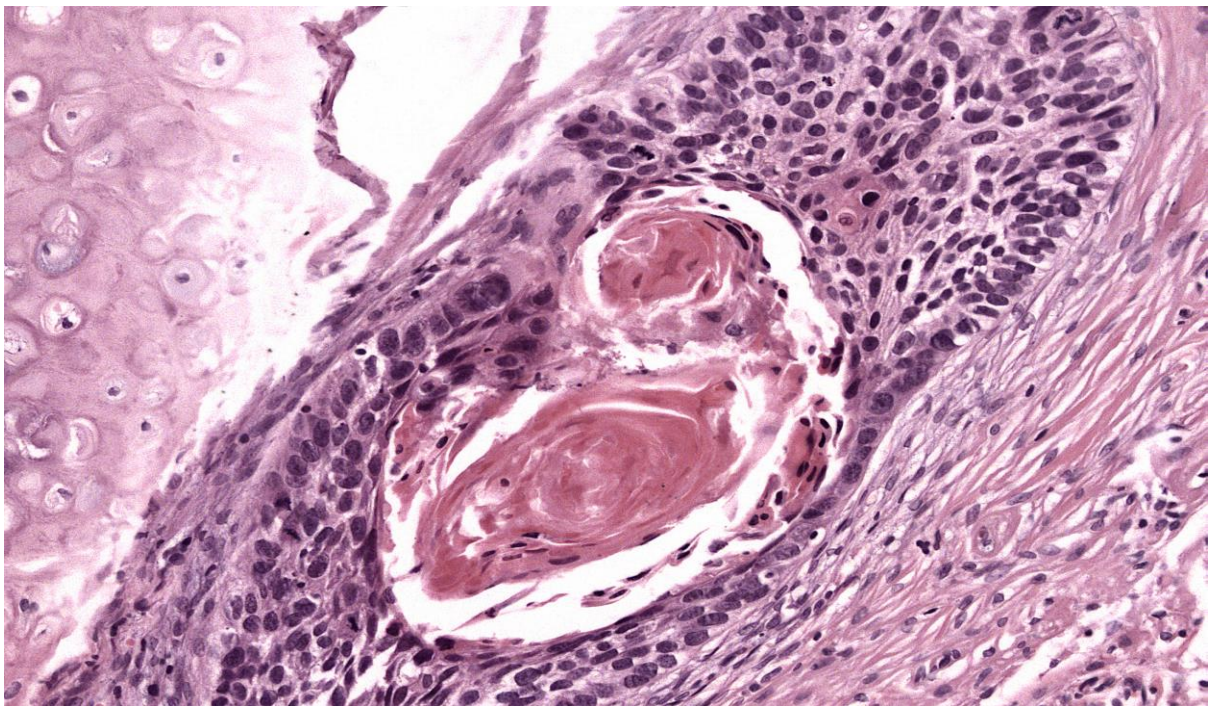


Рисунок 14 – Плоскоклеточный ороговевающий рак. Окраска гематоксилином и эозином, x400

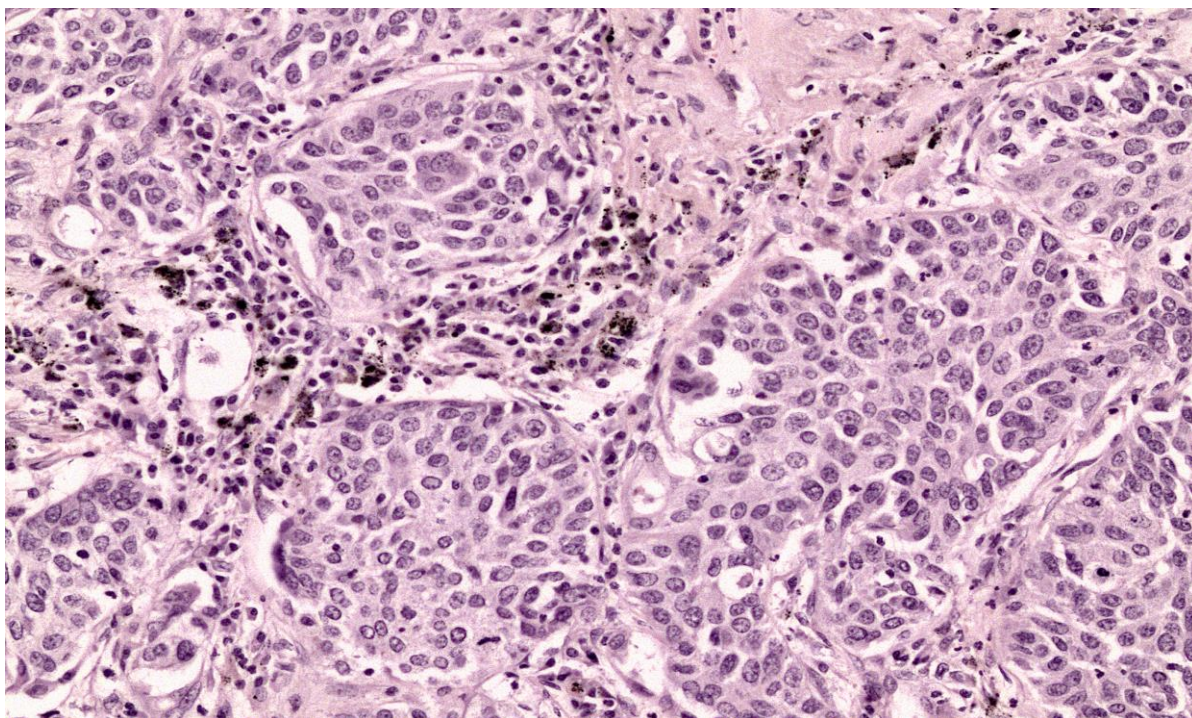


Рисунок 15 – Плоскоклеточный неороговевающий рак. Окраска гематоксилином и эозином, х400

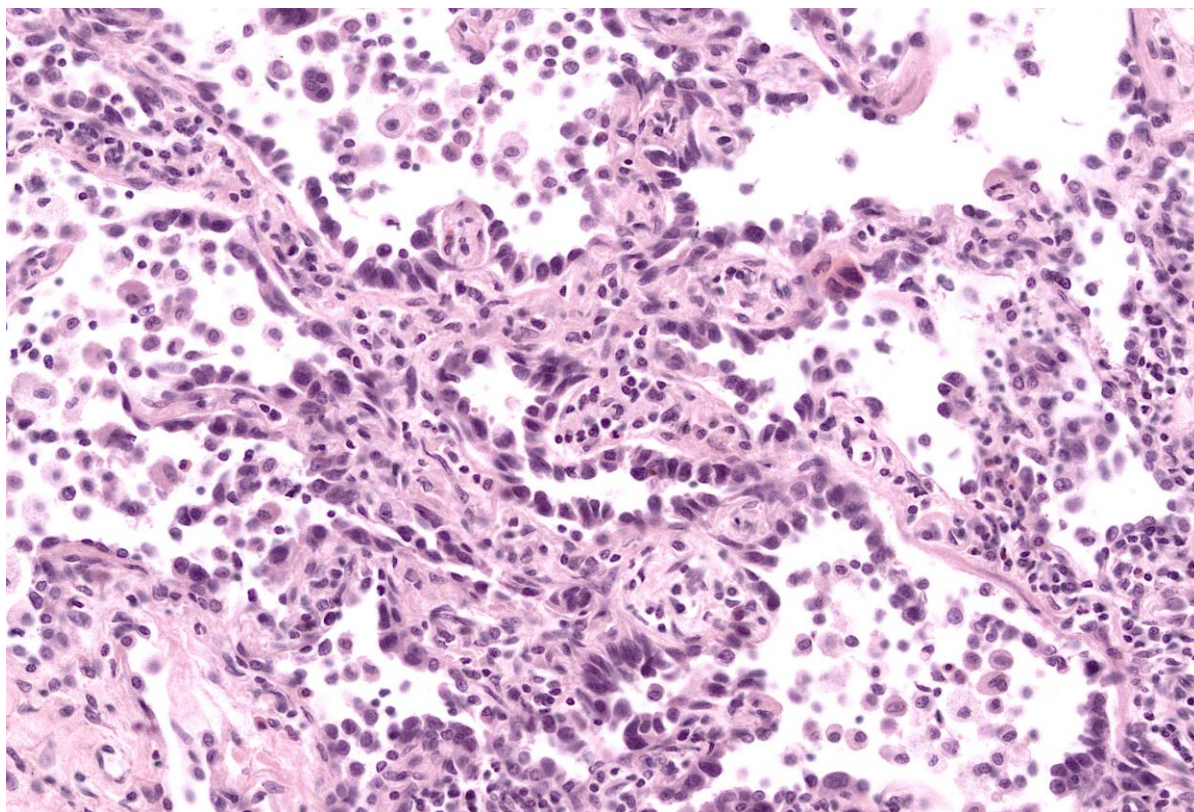


Рисунок 16 – Аденокарцинома легкого с наличием Lepidic структур. Окраска гематоксилином и эозином, х400

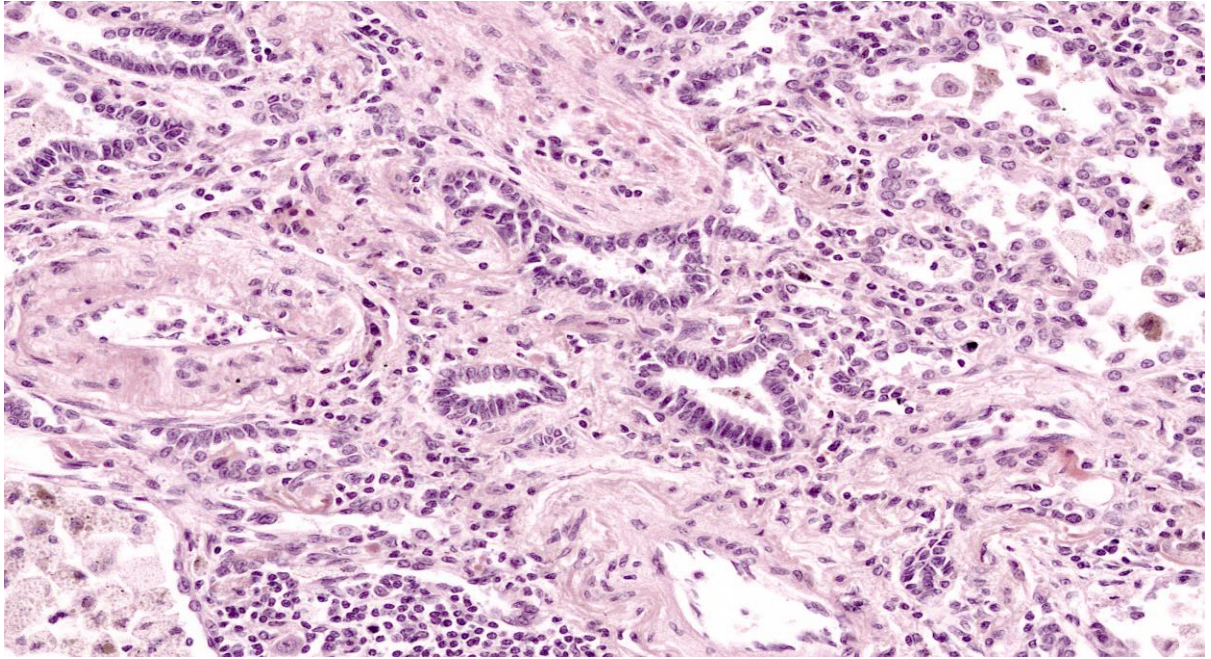


Рисунок 17 – Ацинарная аденокарцинома легкого. Окраска гематоксилином и эозином, х400

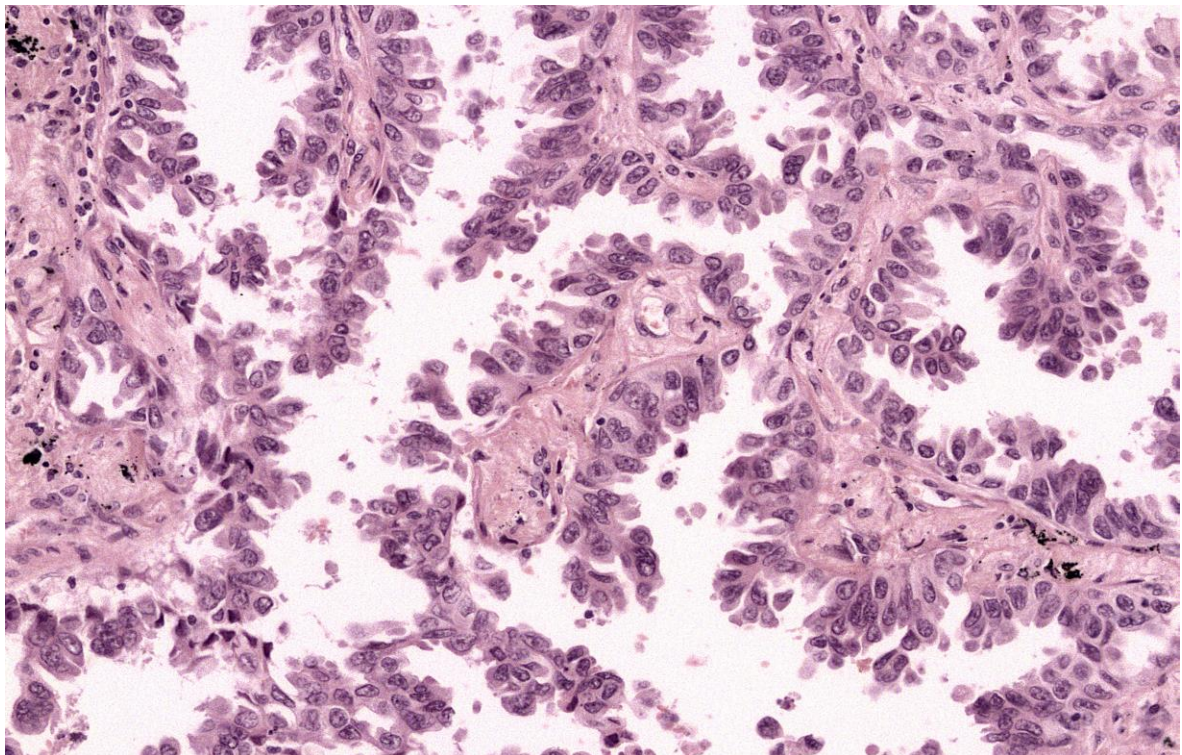


Рисунок 18 – Папиллярная аденокарцинома легкого. Окраска гематоксилином и эозином, х400

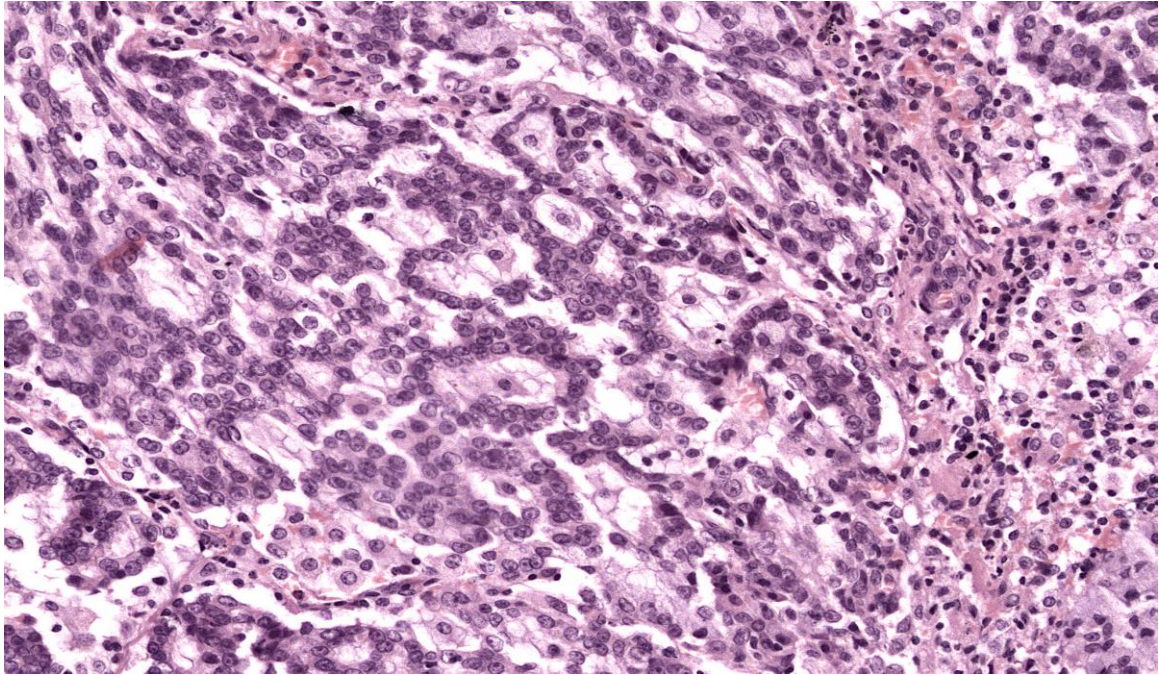


Рисунок 19 – Аденокарцинома легкого с наличием криброзных структур. Окраска гематоксилином и эозином, х400

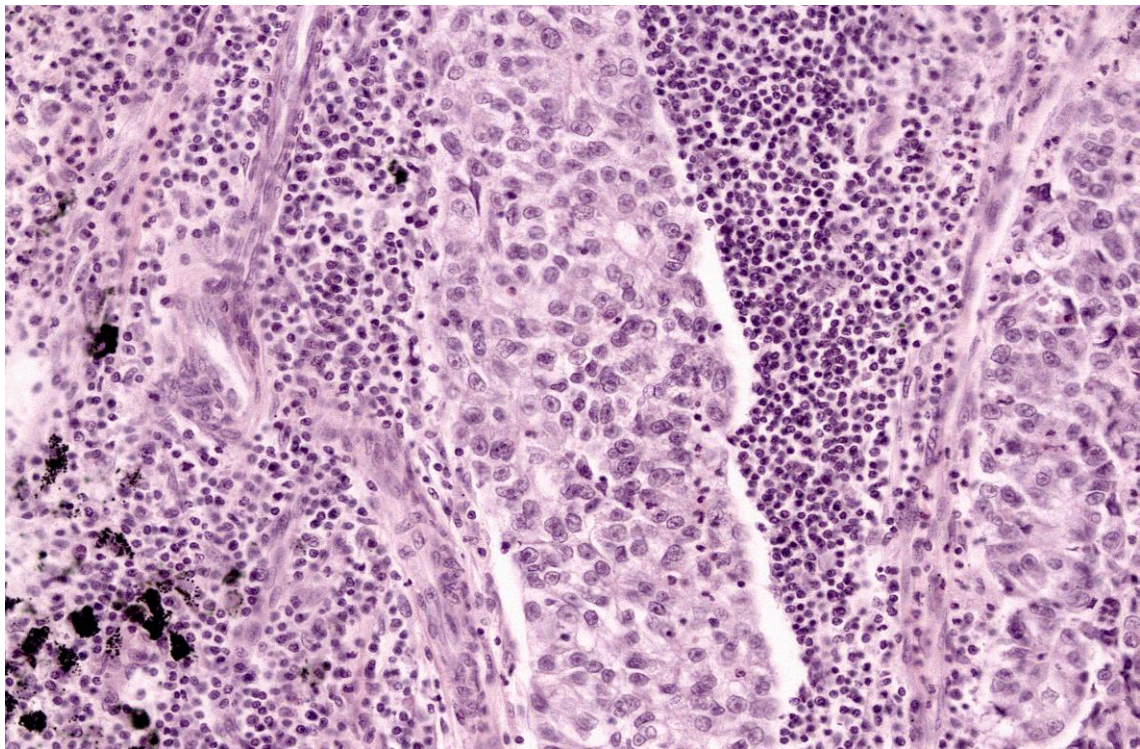


Рисунок 20 – Солидная аденокарцинома легкого. Окраска гематоксилином и эозином, х400

2.4. Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое исследование проводили по стандартной методике. Срезы депарафинировали в трех порциях спирта (96°), промывали 5 минут в дистиллированной воде. Стекла со срезами помещали в пластиковый держатель и погружали в 0,01М цитратный буфер pH=6,0.

Демаскировку антигенов осуществляли с помощью аппарата «PT Link», «Dako» в буфере с высоким pH. После демаскировки контейнеры со стеклами оставляли остывать 20 минут при комнатной температуре. Далее стекла промывали в двух порциях фосфатного буфера по 5 минут, наносили блокирующий реагент (Peroxidase blocking reagent, «Dako») на 10 минут. Далее, стекла со срезами промывали по 5 минут в дистиллированной воде и фосфатном буфере. Следующим этапом наносили первичные антитела и инкубировали срезы при температуре 25°C в течение часа. По окончании инкубации срезы промывали в 2 порциях фосфатного буфера и наносили биотинилированные антитела на 10 минут. Затем промывали в фосфатном буфере и наносили на срезы стрептавидинбиотиновый комплекс на 10 минут. Срезы отмывали трис-буфером и добавляли раствор ДАБ (диаминобензидин, «Dako»). С диаминбензидином инкубировали срезы 10 минут. Использовали систему визуализации LSAB System – HRP («Dako»).

Срезы докрашивали гематоксилином в течение 6 секунд. Стекла с окрашенными срезами помещали в водопроводную воду на 10 минут. Стекла со срезами проводили по спиртам (96°) – 3 порции по 5 минут. Затем по толуолу – 3 порции по 5 минут. Срезы заключали в канадский бальзам.

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»); CD 20 (клон L26, рабочее разведение 1:300, «Dako»); CD3 (клон UCHT1, рабочее разведение 1:1000, «Dako»).

В сложных диагностических случаях для уточнения гистотипа немелкоклеточного рака легкого использовали панель антител к Ttf-1 (clone 8G7G3/1, Dako); Napsin A (Napsin A, Rabbit Polyclonal); CK7 (clone OV-TL 12/30, Novocastra); CK20 (clone Ks 20.08, Novocastra); CEA (clone AMT28, Novocastra), CDX2 (clone AMT28, Novocastra); p63 (clone DAK-p63, Dako); HMW (clone 34βE12, Dako).

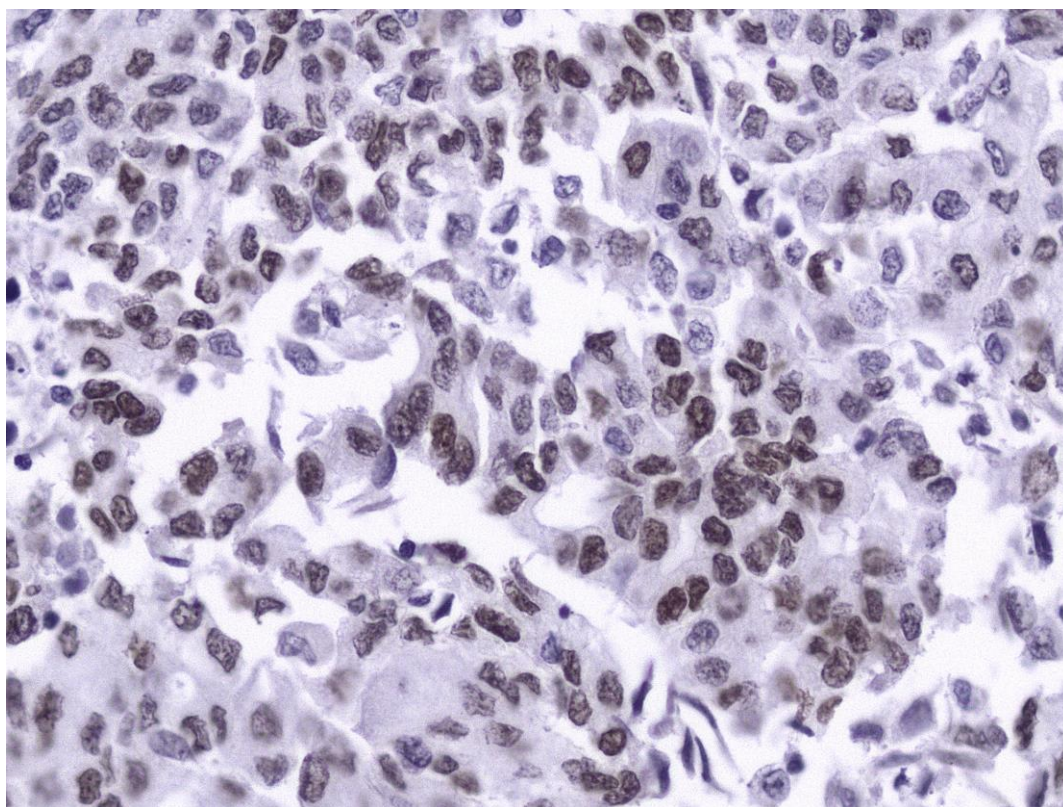


Рисунок 21 – Экспрессия Ttf1 в солидном компоненте аденокарциномы легкого, х400

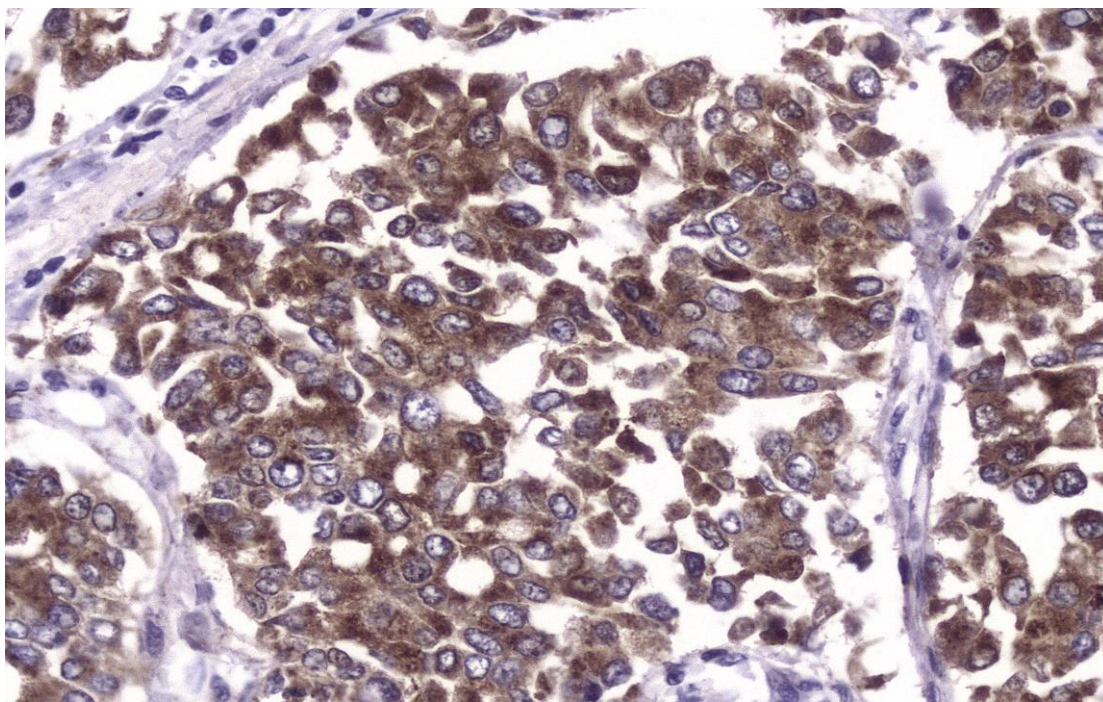


Рисунок 22 – Экспрессия Napsin в криброзной структуре аденокарциномы легкого, х400

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 I-III степени. Аналогичным образом оценивали экспрессию исследуемых маркеров в клетках воспалительного инфильтрата, отдельно под каждым участком того или иного варианта изменений бронхиального эпителия. Подсчитывали плотность воспалительной инфильтрации: количество лейкоцитов на 1 мм².

2.5. Экспрессионное профилирование

2.5.1. Лазерная микродиссекция

Для полнотранскриптомного профилирования были отобраны случаи «изолированной» базальноклеточной гиперплазией (иБКГ; БКГ+ПМ–; n=2), БКГ, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией (пмБКГ;

БКГ+ПМ+; n=2), ПМ, сочетающейся с базальноклеточной гиперплазией (бкгПМ; БКГ+ПМ+; n=2), плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с дисплазией (дПМ; БКГ-ПМ+Д+; n=1), дисплазии, сочетающейся с ПМ (пмД; БКГ-ПМ+Д+; n=1), и 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 пмБКГ), 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 °С до выделения РНК.

2.5.2. *Выделение РНК и полнотранскриптомная амплификация*

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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до микроматричного экспрессионного анализа.

2.5.3. Микроматричный экспрессионный анализ

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 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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 [326]. Логарифм-трансформированные сигналы брали для анализа уровня экспрессии, нормализованного к нормальному бронхиальному эпителию.

2.5.4. Функциональное аннотирование экспрессирующихся генов

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 [326]. 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) [98, 329]. 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 $< 0,1$).

2.6. Статистический анализ

Обработку полученных данных выполняли с помощью пакета программ «Statistica for Windows 7,0». Цитометрические показатели представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, а m – стандартная ошибка среднего. Количественные показатели экспрессионных параметров представлены в виде $M \pm Sd$, где M – среднее значение, Sd – среднеквадратичное (стандартное) отклонение. 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 использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса (в случаях, когда ожидаемые частоты были менее 10) и точный критерий Фишера (в случаях, когда ожидаемые частоты были менее 6). Обсуждали результаты с достоверностью различий при $p=0,05$ и менее. Оценивали отношение шанса (OR) события в одной группе к шансу события в другой группе с помощью электронной таблицы Effect Size Calculator.xls [360]

ГЛАВА 3

СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предопухолевые изменений при хроническом бронхите

3.1. Морфологические изменения бронхиального эпителия на фоне хронического бронхита в сегментарных бронхах

Согласно существующей концепции канцерогенеза плоскоклеточного рака легкого гиперплазия респираторного эпителия, плоскоклеточная метаплазия и дисплазия являются его этапами [234, 237]. Наиболее высокий риск злокачественной трансформации бронхиального эпителия ассоциирован с дисплазией.

При хроническом бронхите в 68/261 (26,1%) случаях дисплазия бронхиального эпителия отсутствовала. Базальноклеточная гиперплазия бронхиального эпителия и плоскоклеточная метаплазия с одинаковой частотой наблюдались на фоне хронического бронхита – 25/261 (9,7%) и 33/261 (12,6%) случаев соответственно ($p=0,28$, таблица 3). Группу контроля составили 10/261 (3,8%) пациентов, у которых при морфологическом исследовании каких-либо изменений в слизистой оболочке бронхов не было найдено.

У 193/261 (73,9%) пациентов с хроническим бронхитом в слизистой оболочке сегментарных бронхов были выявлены диспластические изменения различной степени тяжести. Чаще всего отмечалась дисплазия I степени – в 102/261 (39,1%) случаев, дисплазия II степени – 76/261 (29,1%, таблица 3). Дисплазия тяжелой степени, на фоне хронического бронхита встречалась значительно реже – 15/261 случаев (5,7%, таблица 3).

При микроскопическом исследовании бронхобиоптатов была отмечена следующая особенность. Из 193 (100%) пациентов с дисплазией бронхиального эпителия различной степени тяжести, у 128 (66,3%) она

была «изолированной», встречалась диффузно в пределах исследуемого препарата.

Таблица 3 – Частота встречаемости реактивных и диспластических изменений бронхиального эпителия различной степени выраженности на фоне хронического бронхита

Морфологический процесс	Количество больных n, (%)	p
1. Нормальная слизистая бронхов (контроль)	10/261 (3,8%)	p ₁₋₂ = 0,007 p ₁₋₃ = 0,0003 p ₁₋₄ = 0,0002 p ₁₋₅ = 0,09 p ₁₋₆ = 0,29
2. БКГ	25/261 (9,7%)	p ₂₋₃ = 0,28 p ₂₋₄ = 0,0006 p ₂₋₅ = 0,05 p ₂₋₆ = 0,09
3. ПМ	33/261 (12,6%)	p ₃₋₄ = 0,0001 p ₃₋₅ = 0,07 p ₃₋₆ = 0,007
4. Д I	102/261 (39,1%)	p ₄₋₅ = 0,02 p ₄₋₆ = 0,0001
5. Д II	76/261 (29,1%)	p ₅₋₆ = 0,0002
6. Д III	15/261 (5,7%)	

У 65 (33,7%) больных дисплазия бронхиального эпителия наблюдалась на фоне плоскоклеточной метаплазии. Для дальнейшего исследования группы наблюдения были сформированы в зависимости не только от степени тяжести дисплазии, но и ее сочетания (ДI-III+ПМ+) или не сочетания с плоскоклеточной метаплазией (ДI-III+ПМ-). Распределение пациентов по группам представлено в таблице 4.

При сопоставлении частоты встречаемости дисплазии различной степени тяжести, в случаях ее сочетания (Д+ПМ+) или не сочетания (Д+ПМ-) с плоскоклеточной метаплазией, статистически значимых различий не было выявлено (таблица 4).

Частота встречаемости дисплазии на фоне хронических заболеваний легких, по сведениям разных авторов, колеблется от 28,5% до 87,7% случаев [207, 210, 237, 391]. Высокая частота встречаемости дисплазии в

Таблица 4 – Частота встречаемости дисплазии различной степени выраженности при наличии плоскоклеточной метаплазии

Процесс	Дисплазия I n, (%)	Дисплазия II n, (%)	Дисплазия III n, (%)
ПМ+	37/65 (56,9)	23/65 (35,4)	5/65 (7,7)
ПМ-	65/128 (50,8)	53/128 (41,4)	10/128 (7,8)
	p=0,51	p=0,62	p=0,99

нашем исследовании согласуется с данными литературы. Кроме того, ее можно объяснить тем, что для исследования специально отбирались случаи с данным морфологическим изменением слизистой бронхов. Причем, забор биопсийного материала проводился из сегментарных бронхов, а согласно исследованиям G. Wang et. al. (2006), именно в сегментарных и субсегментарных бронхах чаще всего находили дисплазию [410].

Таким образом, при хроническом бронхите в сегментарных бронхах отмечались диспластические изменения различной степени тяжести. В большинстве случаев дисплазия была «изолированной» (Д+ПМ-). Сочетание дисплазии с плоскоклеточной метаплазией (Д+ПМ+) встречалось менее часто. Как в отсутствии плоскоклеточной метаплазии, так и при ее наличии преобладали диспластические изменения I-II степени. Тяжелая дисплазия наблюдалась значительно реже. Частота встречаемости дисплазии различной степени тяжести не зависела от того, сочетается она с плоскоклеточной метаплазией или нет.

3.2. Цитометрические параметры различных вариантов реактивных и диспластических изменений бронхиального эпителия

Морфометрический анализ проводился на цитологических препаратах. Изучались параметры клеток и ядер при различных вариантах реактивных и диспластических изменений бронхиального эпителия.

Размеры клетки, ядра и коэффициенты их формы нормального бронхиального эпителия контрольной группы и эпителия с признаками гиперплазии находились в одном диапазоне, и не имели статистически значимых различий ($p_{1-2} < 0,05$, таблица 5 – 6).

В случаях плоскоклеточной метаплазии, значения показателей размеров клетки, ядра и коэффициентов формы колебались в незначительных пределах. Так, площадь клетки (S_1) при ПМ составила в среднем $385,1 \pm 3,9$ мкм², ядра (S_2) – $181,6 \pm 3,4$ мкм². Значения данных показателей были значимо выше, по сравнению с нормальным и гиперплазированным эпителием ($p_{1-3; 2-3} < 0,05$, таблица 5 – 6). Периметры клеток и ядер, а также коэффициенты их формы при плоскоклеточной метаплазии также были больше, чем в «норме» и при гиперплазии ($p_{1-3; 2-3} < 0,05$, таблица 5 – 6).

В значениях количественных параметров клетки и ядра диспластических изменений эпителия бронхов наблюдался большой разброс. Например, при ДІ, не сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией (ДІ+ПМ-), площадь клетки колебалась в пределах 347,2 – 423,1 мкм², ядра – 155,6 – 232,1 мкм² (таблица 5 – 6). Следует отметить, что размеры площади, периметра клеток и ядер, а также коэффициентов их формы изолированной ДІ (ДІ+ПМ-), не имели статистически значимых различий, в сравнении с подобными параметрами плоскоклеточной метаплазии ($p_{3-4} > 0,05$, таблица 5 – 6).

Площадь клеток (S_1) ДІ, сочетающейся с ПМ (ДІ+ПМ+), составила в среднем $555,1 \pm 43,2$ мкм², ядер (S_2) – $267,2 \pm 42,1$ мкм² и была значимо больше, по сравнению с показателями S_1 и S_2 в группе «изолированной» дисплазии слабой степени (ДІ+ПМ-; $p_{4-5} < 0,05$; таблица 5 – 6). Показатели периметров клеток и ядер (P_1, P_2), коэффициенты их формы (F_1, F_2) также были больше и имели статистически значимые различия, в сравнении с подобными параметрами «изолированной» дисплазии I степени (таблица 5 – 6).

Количественные значения исследуемых цитометрических показателей в случаях дисплазии умеренной степени, не сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией (ДП+ПМ-), были выше по сравнению с аналогичными значениями группы ДІ+ПМ+ ($p_{5-6} < 0,05$). Однако параметры площади, периметра и коэффициентов формы «изолированной» ДП (ДП+ПМ-) были ниже, чем при умеренной дисплазии, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией (ДП+ПМ+ ; $p_{6-7} < 0,05$; таблица 5 – 6).

При анализе морфометрических данных группы ДП+ПМ+ отмечалась следующая особенность. Все значения размеров, относящиеся к ядру (площадь S_2 , периметр P_2 , коэффициент формы F_2), не имели статистически значимых отличий, в сравнении с подобными показателями дисплазии III степени (ДП+ПМ-; $p_{7-8} > 0,05$ таблица 6). Размеры же клетки, в группе ДП+ПМ+ были меньше, по сравнению с размерами клетки группы «изолированной» ДП III степени. Например, при сочетанной умеренной дисплазии (ДП+ПМ+) площадь клетки составила $S_1 = 627,6 \pm 38,2$ мкм²; периметр $P_1 = 334,5 \pm 21,2$ мкм; коэффициент формы $F_1 = 1,89 \pm 1,2$. В случаях тяжелой дисплазии, не сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией (ДП+ПМ-), значения данных показателей были: $712,1 \pm 19,7$ мкм² – $381,2 \pm 23,1$ мкм – $1,97 \pm 0,9$, соответственно ($p_{7-8} < 0,05$; таблица 5)

Следует отметить, что морфометрические показатели площади, периметра и коэффициентов формы клеток и ядер тяжелой дисплазии,

сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией (ДШ+ПМ+), были значимо выше, чем при «изолированной» ДШ степени (ДШ+ПМ-, $p_{8-9}<0,05$; таблица 5 – 6).

Таблица 5 – Значения цитометрических показателей клеток при реактивных, диспластических изменениях бронхиального эпителия и плоскоклеточном раке легкого

Группы	Площадь (S_1), мкм ² M±m	Периметр (P_1), мкм M±m	Коэффициент формы (F_1) M±m
1.Контроль n=10	221,1±1,2	117,1±1,1	1,15±0,8
	$p_{1-3}=0,002$ $p_{1-4-10}=0,0001$	$p_{1-3}=0,004$ $p_{1-4-10}=0,0000$	$p_{1-3}=0,05$ $p_{1-4}=0,02$ $p_{1-5}=0,005$ $p_{1-6-10}=0,0000$
2. БКГ n=25	235,5±1,4	120,2±1,7	1,14±0,7
	$p_{2-3}=0,002$ $p_{2-4}=0,001$ $p_{2-5}=0,0003$ $p_{2-6-10}=0,0000$	$p_{2-3}=0,01$ $p_{2-4}=0,001$ $p_{2-5}=0,003$ $p_{2-6-10}=0,0000$	$p_{2-3}=0,05$ $p_{2-4}=0,03$ $p_{2-5}=0,002$ $p_{2-6-10}=0,0001$
3. ПМ n=33	385,1±3,9	189,8±4,1	1,25±0,8
	$p_{3-5}=0,0001$ $p_{3-6}=0,0005$ $p_{3-7-10}=0,0000$	$p_{3-5}=0,002$ $p_{3-6}=0,0005$ $p_{3-7-10}=0,0000$	$p_{3-5}=0,001$ $p_{3-6-10}=0,0000$
4.Д I+ПМ- n=65	404,5±38,2	199,6±42,9	1,26±0,9
	$p_{4-5}=0,004$ $p_{4-6}=0,003$ $p_{4-7}=0,0001$ $p_{4-8-10}=0,0000$	$p_{4-5}=0,002$ $p_{4-6}=0,0003$ $p_{4-7}=0,0001$ $p_{4-8-10}=0,0000$	$p_{4-5}=0,02$ $p_{4-6}=0,01$ $p_{4-7}=0,0001$ $p_{4-8-10}=0,0000$
5.ДI + ПМ+ n=37	555,1±43,2	289,9±40,1	1,70±1,0
	$p_{5-6}=0,003$ $p_{5-7}=0,0001$ $p_{5-8-10}=0,0000$	$p_{5-6}=0,003$ $p_{5-7}=0,0001$ $p_{5-8-10}=0,0000$	$p_{5-6}=0,05$ $p_{5-7,8}=0,03$ $p_{5-9-10}=0,001$
6. Д II+ПМ- n=53	591,3±21,1	294,8±23,3	1,81±0,9
	$p_{6-7}=0,002$ $p_{6-8}=0,003$ $p_{6-9,10}=0,0001$	$p_{6-7}=0,005$ $p_{6-8}=0,003$ $p_{6-9,10}=0,0001$	$p_{6-7}=0,02$ $p_{6-8}=0,003$ $p_{6-9,10}=0,001$

Таблица 5 (продолжение) – Значения цитометрических показателей клеток при реактивных, диспластических изменениях бронхиального эпителия и плоскоклеточном раке легкого

Группы	Площадь (S_1), мкм ² M±m	Периметр (P_1), мкм M±m	Коэффициент формы (F_1) M±m
7. Д II +ПМ+ n=23	627,6±38,2	334,5±21,2	1,89±1,2
	p ₇₋₈ =0,003 p ₇₋₉ =0,001 p ₇₋₁₀ =0,0001	p ₇₋₈ =0,001 p ₇₋₉ =0,0004 p ₇₋₁₀ =0,0001	p ₇₋₈ =0,05 p ₇₋₉ =0,01 p ₇₋₁₀ =0,005
8. Д III+ПМ- n=10	712,1±19,7	381,2±23,1	1,97±0,9
	p ₈₋₉ =0,005 p ₈₋₁₀ =0,001	p ₈₋₉ =0,001 p ₈₋₁₀ =0,002	p ₈₋₉ =0,05 p ₈₋₁₀ =0,01
9. Д III +ПМ+ n=5	841,1±38,8	510,3±37,8	2,01±1,1
	p ₉₋₁₀ =0,001	p ₉₋₁₀ =0,01	
10. ПР n=10	989,2±21,1	573,4±33,1	2,1±0,9

Таблица 6 – Значения цитометрических показателей ядер при реактивных, диспластических изменениях бронхиального эпителия и плоскоклеточном раке легкого

Группы	Площадь (S_2), мкм ² M±m	Периметр(P_2), мкм M±m	Коэффициент формы (F_2) M±m
1. Контроль n=10	98,2±2,4	69,8±1,2	1,17±0,7
	p ₁₋₃ =0,0001 p ₁₋₄₋₁₀ =0,0000	p ₁₋₃ =0,002 p ₁₋₄ =0,0001 p ₁₋₅₋₁₀ =0,0000	p ₁₋₃ =0,03 p ₁₋₄ =0,01 p ₁₋₅ =0,002 p ₁₋₆₋₁₀ =0,0000
2. БКГ n=25	113,4±1,3	74,2±1,4	1,20±0,6
	p ₂₋₃ =0,0001 p ₂₋₄ =0,001 p ₂₋₅ =0,0003 p ₂₋₆₋₁₀ =0,00000	p ₂₋₃ =0,004 p ₂₋₄ =0,001 p ₂₋₅ =0,0003 p _{2-6,10} =0,0000	p ₂₋₃ =0,01 p ₂₋₄ =0,005 p ₂₋₁₀ =0,001

Таблица 6 (продолжение) – Значения цитометрических показателей ядер при реактивных, диспластических изменениях бронхиального эпителия и плоскоклеточном раке легкого

Группы	Площадь (S ₂), мкм ² M±m	Периметр (P ₂), мкм M±m	Коэффициент формы (F ₂) M±m
3. ПМ n=33	181,6±3,4	115,7±3,1	1,33±0,9
	p ₃₋₅ =0,0001 p ₃₋₆ =0,0005 p ₃₋₇₋₁₀ =0,00000	p ₃₋₅ =0,0001 p ₃₋₆ =0,0005 p ₃₋₇₋₁₀ =0,00000	p ₃₋₅ =0,004 p ₃₋₆ =0,001 p ₃₋₇₋₁₀ =0,0000
4. Д I+ПМ- n=65	193,8±38,2	122,7±33,3	1,34±0,8
	p ₄₋₅ =0,001 p ₄₋₆ =0,0003 p ₄₋₇ =0,0001 p ₄₋₁₀ =0,0000	p ₄₋₅ =0,001 p ₄₋₆ =0,0003 p ₄₋₇ =0,0001 p ₄₋₁₀ =0,0000	p ₄₋₅ =0,03 p ₄₋₆ =0,01 p ₄₋₇ =0,001 p ₄₋₈₋₁₀ =0,0000
5. Д I + ПМ+ n=37	267,2±42,1	184,5±33,5	1,50±1,0
	p ₅₋₆ =0,003 p ₅₋₇ =0,0001 p ₅₋₁₀ =0,0000	p ₅₋₆ =0,003 p ₅₋₇ =0,0001 p ₅₋₁₀ =0,0000	p ₅₋₆ =0,03 p ₅₋₇ =0,001 p ₅₋₁₀ =0,0000
6. Д II+ПМ- n=53	287,9±19,9	189,7±18,7	1,59±0,9
	p ₆₋₇ =0,001 p ₆₋₈ =0,003 p _{6-9,10} =0,0001	p ₆₋₇ =0,001 p ₆₋₈ =0,003 p _{6-9,10} =0,0001	p ₆₋₇ =0,03 p ₆₋₈ =0,003 p _{6-9,10} =0,0001
7. Д II + ПМ+ n=23	398,8±31,1	261,4±20,1	1,71±1,0
	p ₇₋₉ =0,003 p ₇₋₁₀ =0,0001	p ₇₋₉ =0,003 p ₇₋₁₀ =0,0001	p ₇₋₉ =0,04 p ₇₋₁₀ =0,0001
8. Д III+ПМ- n=10	407,5±20,4	268,1±21,5	1,72±0,9
	p ₈₋₉ =0,005 p ₈₋₁₀ =0,001	p ₈₋₉ =0,005 p ₈₋₁₀ =0,001	p ₈₋₉ =0,05 p ₈₋₁₀ =0,004
9. Д III + ПМ+ n=5	530,3±42,1	278,9±21,2	1,98±1,2
	p ₉₋₁₀ =0,001	p ₉₋₁₀ =0,001	
10. ПР n=10	652,5±31,8	361,8±36,2	2,0±1,2

Значения средних размеров площади, периметра клеток и ядер плоскоклеточного рака легкого увеличивались, по сравнению с тяжелой дисплазией, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией (ДШ+ПМ+, $p_{9-10} < 0,05$, таблица 5 – 6). Однако коэффициенты формы клеток и ядер в этих группах были одинаковы – 1,8 и 1,9 соответственно ($p_{9-10} > 0,05$; таблица 5 – 6).

Морфологическое исследование является стандартом в диагностике диспластических изменений. Однако критерии оценки этих изменений зачастую носят субъективный характер. Использование цитометрического анализа позволяет более точно классифицировать предраковые изменения, выделить те процессы, которые биологически более агрессивны. Однако, несмотря на то, что морфометрический метод является объективным и применяемым в морфологии, сопоставить результаты различных исследований бывает очень сложно. Это объясняется использованием авторами в своих работах разной аппаратуры, программ, методик и изучаемых параметров. Тем не менее, результаты исследования предраковых изменений различных тканей (шейка матки, молочная, предстательная железы, бронхи) свидетельствуют о том, что по мере повышения степени тяжести патологического процесса (нормальный эпителий – дисплазия – рак) размеры клеток и ядер увеличиваются [6, 7, 13, 39, 240, 274, 275]. В исследовании, проведенном Guilard et.al. (2005), не было выявлено существенных отличий в морфометрических параметрах между умеренной и тяжелой дисплазией эпителия бронхов, а также между плоскоклеточной метаплазией и дисплазией I степени [164]. Согласно данным Z. Mijović et.al. (2014; 2015), исследовавших кариометрические параметры при диспластических изменениях бронхиального эпителия у пациентов с хроническим бронхитом и плоскоклеточным раком легкого, наибольший диаметр и периметр ядер отмечен при плоскоклеточном раке. Различия были статистически значимы по сравнению с нормальным

эпителием, эпителием с признаками плоскоклеточной метаплазии, а также диспластическими изменениями I–III степени. В тоже время, авторы не нашли значимых различий по ядерным параметрам между тяжелой дисплазией и раком *in situ*, между раком *in situ* и инвазивным плоскоклеточным раком [274, 275]. Результаты нашего исследования не противоречат данным, полученным этими авторами, и свидетельствуют в пользу того, что цитометрические параметры могут быть дополнительными дифференциальными критериями оценки реактивных изменений и умеренной/тяжелой дисплазии бронхиального эпителия.

Таким образом, проведенное исследование показало, что размер площади, периметра, коэффициентов формы клеток и ядер возрастает по мере увеличения степени тяжести морфологических изменений в бронхиальном эпителии. При этом размеры ядра, клетки и коэффициенты их формы при дисплазии бронхиального эпителия, в случаях ее сочетания с плоскоклеточной метаплазией (Д+ПМ+), были значительно больше, чем при «изолированной» дисплазии. Значения цитометрических параметров при плоскоклеточной метаплазии и дисплазии I степени, не сочетающейся с ПМ (ДИ+ПМ-), не имели статистически значимых различий. Размеры ядра при дисплазии II степени, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией (ДII+ПМ+), не отличались от таковых при «изолированной» тяжелой дисплазии (ДIII+ПМ-). Значения коэффициентов формы клетки (F₁) и ядра (F₂), при сочетании дисплазии тяжелой степени с плоскоклеточной метаплазией (ДIII+ПМ+) и плоскоклеточном раке легкого, не имели значимых различий.

3.3. Связь плоскоклеточной метаплазии с прогрессией дисплазии при хроническом бронхите

Представляло определенный интерес не только проследить исход диспластического процесса в более отдаленный период времени, но и

выявить какие-либо морфологические признаки, связанные с его необратимостью.

Пациенты в группе с плоскоклеточной метаплазией (ПМ+Д-; n=33), а также в группах с «изолированной» дисплазией (ДІ–ІІ+ПМ-; n=128) и сочетанием дисплазии с плоскоклеточной метаплазией (ДІ–ІІ+ПМ+; n=65) наблюдались в динамике на протяжении 36 месяцев. Благоприятным исходом процесса мы считали его полную регрессию, или регрессию до более низкой степени. Неблагоприятным исходом – прогрессирование или отсутствие какой-либо динамики (стабилизация) процесса.

При морфологическом исследовании эпителия слизистой бронхов обращал внимание тот факт, что из 33 случаев плоскоклеточной метаплазии, в 15 (45,5%) она была очаговой. Участок плоскоклеточной метаплазии определялся на фоне нормального или гиперплазированного эпителия. У 18/33 (54,5%) пациентов плоскоклеточная метаплазия определялась во всех полях зрения (диффузная) в пределах исследуемого материала.

Исследование бронхобиоптатов и мазков-отпечатков в контрольные сроки показало, что из 33 пациентов с плоскоклеточной метаплазией, благоприятный исход (регрессия) процесса зафиксирован в 12 (36,4%) случаях. Из них у 10/12 (83,3%) человек плоскоклеточная метаплазия была очаговой, у двух (16,7%) – диффузной.

Неблагоприятный исход плоскоклеточной метаплазии отмечался в 21/33 (63,6%) случае. При этом процесс оставался без динамики у 8/21 (24,2%) пациентов, а прогрессия плоскоклеточной метаплазии в дисплазию наблюдалось в 13/21 (39,4%) случаях.

Из 13 пациентов с прогрессией плоскоклеточной метаплазии, последняя перешла в дисплазию I степени у 4 (30,8%) человек. Причем, только у одного больного возникшая дисплазия была диффузной (ДІ+ПМ-). Соответственно у 3 пациентов дисплазия слабой степени была очаговой

и наблюдалась на фоне сохранившихся участков плоскоклеточной метаплазии (ДІ+ПМ+).

У 9/13 (69,2%) пациентов плоскоклеточная метаплазия перешла в дисплазию II степени. Перехода плоскоклеточной метаплазии в тяжелую дисплазию, за указанный период наблюдения, нами выявлено не было.

Следует отметить, что из всех случаев с неблагоприятным исходом плоскоклеточной метаплазии, в 16/21 (76,2%) – метаплазия была диффузной, а в 5/21 (23,8%) – очаговой. Варианты исхода плоскоклеточной метаплазии в зависимости от ее характера представлены в таблице 7.

Таблица 7– Прогноз исхода плоскоклеточной метаплазии, в зависимости от ее характера

Исход плоскоклеточной метаплазии	Характер плоскоклеточной метаплазии, n (%)		
	Очаговая ПМ	Диффузная ПМ	
благоприятный	10 (83,3)	2 (16,7)	12
неблагоприятный	5 (23,8)	16 (76,2)	21
	$\chi^2_{Y}=8,64; p=0,003$ (0,95 CI) OR =16,0 (2,08-159,03)		33

Таким образом, диффузная плоскоклеточная метаплазия ассоциировалась с неблагоприятным прогнозом ($p=0,003$; OR=16,0 (2,08-159,03); таблица 7).

Из 37 пациентов, у которых в слизистой бронха было выявлено сочетание дисплазии бронхиального эпителия I степени и плоскоклеточной метаплазии (ДІ+ПМ+), у 8 (21,6%) – дисплазия регрессировала (таблица 8). Однако плоскоклеточная метаплазия сохранялась в течение всего периода наблюдения. Неблагоприятный исход процесса был отмечен у 29/37 (78,4 %) больных. Из них дисплазия

прогрессировала до умеренной степени (ДII) в 18/29 (48,7%) случаях, соответственно у 11/29 (29,7%) пациентов процесс оставался без динамики (таблица 8).

Таблица 8 – Динамика диспластического процесса в исследуемых группах

Характер изменения дисплазии	Процесс n, (%)						n, (%)
	ДИ+ПМ+	ДИ+ПМ-	ДII+ПМ+	ДII+ПМ-	ДIII+ПМ+	ДIII+ПМ-	
Регрессия	8/37 (21,6)	37/65 (56,9)	0/23	38/53 (71,7)	0/5	8/10 (80,0)	91/193 (47,1)
		p=0,0008		p=0,0000	p=0,01		
Без динамики	11/37 (29,7)	24/65 (36,9)	8/23 (34,8)	11/53 (20,8)	1/5 (20,0)	1/10 (10,0)	56/193 (29,1)
		p=0,46		p=0,20	p=0,6		
Прогрессия	18/37 (48,7)	4/65 (6,2)	15/23 (65,2)	4/53 (7,5)	4/5 (80,0)	1/10 (10,0)	46/193 (23,8)
		p=0,0000		p=0,0000	p=0,02		

При «изолированной» ДI степени (ДИ+ПМ-) полная регрессия дисплазии была у 37/65 (56,9%) человек (таблица 8). Неблагоприятный исход зафиксирован в 28/65 (43,1%) случаях (p=0,002, сравнение с группой ДИ+ПМ+). Из них, прогрессия дисплазии до дисплазии II степени отмечалась в 4/28 (6,2%) случаях, а в 24/28 (36,9%) – процесс оставался без динамики (таблица 8).

У всех 23 больных с дисплазией II степени, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией (ДII+ПМ+), процесс имел неблагоприятный исход. Дисплазия прогрессировала до тяжелой степени у 13/23 (56,5%) пациентов, а у 2/23 (8,7%) больных – перешла в плоскоклеточный рак. В 8/23 (34,8%) случаях сохранялась исходная степень дисплазии (таблица 8).

Из 53 человек с дисплазией II степени без плоскоклеточной метаплазии (ДII+ПМ-), полная или до более низкой степени регрессия процесса наблюдалась в 38 (71,7%) случаях (таблица 8). Неблагоприятный

исход дисплазии был зафиксирован у 15/53 (28,3%) пациентов ($p=0,03$ – сравнение с группой ДШ+ПМ+). Причем, у 4/53 (7,5%) пациентов дисплазия прогрессировала до тяжелой степени, у 11/53 (20,8%) – сохранилась морфологическая картина дисплазии II степени (таблица 8). Перехода «изолированной» дисплазии умеренной степени тяжести в рак нами не выявлено.

Ни в одном из пяти случаев сочетания тяжелой дисплазией с плоскоклеточной метаплазией (ДШ+ПМ+) регрессии дисплазии не было отмечено (таблица 8). Соответственно у 4/5 (80%) пациентов дисплазия прогрессировала в инвазивный плоскоклеточный рак, а у 1/5 (20%) – сохранялась на протяжении всего срока наблюдения (таблица 8).

У 8/10 (80%) пациентов с дисплазией III степени без плоскоклеточной метаплазии (ДШ+ПМ-) произошла регрессия дисплазии (таблица 8). Неблагоприятный исход отмечался только в 2/10 (20%) случаях ($p=0,04$ – сравнение с группой ДШ+ПМ+). У одного больного дисплазия перешла в плоскоклеточный рак, соответственно у второго наблюдалась стабилизация процесса (таблица 8).

Результаты проведенного исследования показали, что в 87,7% (57/65) случаев сочетания дисплазии с плоскоклеточной метаплазией (Д+ПМ+) исход диспластического процесса был неблагоприятный (табл. 8). Причем, в 47,7% (31/65) случаев дисплазия прогрессировала до более высокой степени, а 9,2% (6/65) – перешла в плоскоклеточный рак. Без динамики процесс оставался в 30,8% (20/65) случаев. Соответственно в 12,3% (8/65) случаев отмечалась регрессия дисплазии.

При отсутствии плоскоклеточной метаплазии на фоне дисплазии (Д+ПМ-) неблагоприятный исход последней отмечался лишь в 35,2% (45/128) случаев (таблица 9). При этом прогрессия дисплазии до более высокой степени наблюдалась в 6,25% (8/128), переход в рак – 0,8% (1/128) случае.

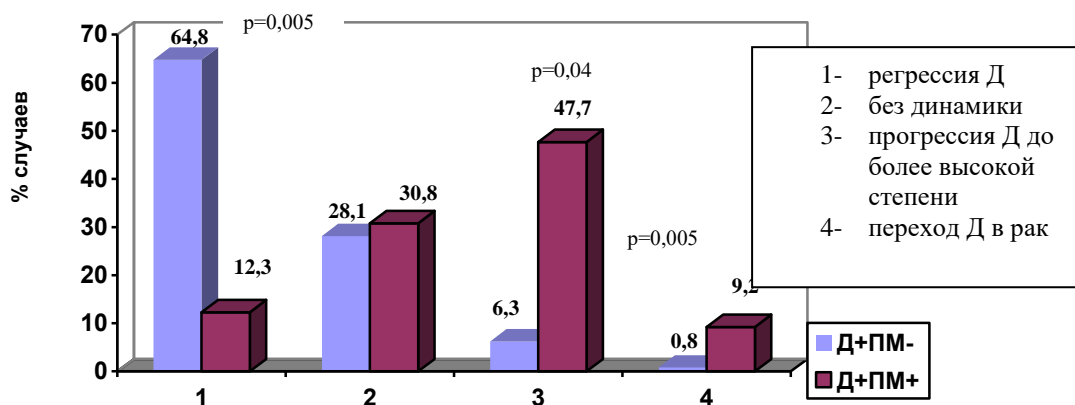


Рисунок 23 – Исход дисплазии, в зависимости от ее сочетания с плоскоклеточной метаплазией

В 28,1% (36/128) случаев процесс оставался в исходном состоянии на протяжении всего периода наблюдения. У большинства пациентов – 64,8% (83/128), дисплазия регрессировала полностью или до более низкой степени.

Таблица 9 – Прогноз течения диспластического процесса различной степени тяжести в эпителии сегментарных бронхов в зависимости от наличия плоскоклеточной метаплазии.

Группы	Дисплазия, n (%)						n (%)	
	I степень		II степень		III степень			
	1	2	1	2	1	2	1	2
ПМ-	37 (56,9)	28 (43,1)	38 (71,7)	15 (28,3)	8 (80,0)	2 (20,0)	83 (64,8)	45 (35,2)
ПМ+	8 (21,6)	29 (78,4)	0	23 (100)	0	5 (100)	8 (12,3)	57 (87,7)
Итого	45	57	38	38	8	7	91	102
	$\chi^2_{Y}=10,53$ p=0,001 (0,95 CI) OR = 4,79 (1,75-13,47)		$\chi^2_{Y}=30,18$ p=0,0000		$\chi^2_{Y}=5,66$ p=0,02		$\chi^2_{Y}=45,66$ p=0,0000 (0,95 CI) OR= 13,14 (5,44-32,82)	

Примечание:

- 1 – благоприятный исход диспластического процесса;
- 2 – неблагоприятный исход диспластического процесса;
- χ^2_{Y} – критерий χ^2 с поправкой Йетса

Таким образом, изолированная плоскоклеточная метаплазия ассоциирована с высокой вероятностью прогрессии в дисплазию ($p=0,003$; $OR=16,0$ (2,08-159,03)). Сочетание дисплазии бронхиального эпителия с плоскоклеточной метаплазией (Д+ПМ+) является неблагоприятным признаком, ассоциированным с необратимостью дисплазии и большей вероятностью ее прогрессии ($p=0,0000$; $OR= 13,14$ (5,44-32,82)).

ГЛАВА 4

Морфологические изменения эпителия бронхов мелкого калибра при немелкоклеточном раке легкого и их связь с прогрессией опухоли

Во многих исследованиях биологические, молекулярно-генетические особенности бронхиального эпителия, соответствующие различным вариантам морфологических изменений (базальноклеточной гиперплазии, плоскоклеточной метаплазии, дисплазии), изучаются на материале, взятом у пациентов прооперированных по поводу рака легкого [234, 236, 310, 384, 387, 409]. Морфологические изменения эпителия, в бронхах, отдаленных от опухоли (НМРЛ) могут быть выявлены в различных сочетаниях друг с другом. Однако исследования, в которых особенности морфологических изменений возникающих в бронхах мелкого калибра, отдаленных от опухоли, изучались в зависимости от различных вариантов сочетания этих изменений друг с другом, отсутствуют. Представляло большой интерес посмотреть, имеются ли какие-либо молекулярные и генетические отличия разных вариантов сочетаний морфологических изменений эпителия в бронхах, отдаленных от опухоли, а также, есть ли связь каждого из вариантов морфологических изменений с прогрессией немелкоклеточной карциномы.

По результатам проведенного нами микроскопического исследования гистологического материала удаленного легкого, в мелких бронхах, находящихся на расстоянии 4-5 см от опухоли, определялись разные варианты изменений – базальноклеточная гиперплазия, плоскоклеточная метаплазия, а также дисплазия I–III степени. Перечисленные варианты морфологических изменений бронхиального эпителия встречались не только как самостоятельные процессы, но и в различных сочетаниях друг с другом в пределах одного исследованного фрагмента ткани. Кроме того, разные варианты изменений иногда были отделены друг от друга участками неизменной ткани. Наши наблюдения

согласуются с данными Guo F. Wang (2006) и Mao D. Lai (2009). Авторы показали, что различные «типы» бронхиальной эпителиальной дисплазии могут быть найдены в одном и том же бронхе, или гистологическом фрагменте. Иногда разные «типы» бронхиальной эпителиальной дисплазии отделяются друг от друга участками нормального бронхиального эпителия [234, 397].

4.1. Частота встречаемости различных вариантов сочетаний морфологических изменений эпителия бронхов мелкого калибра при плоскоклеточном раке легкого

Базальноклеточная гиперплазия была наиболее часто встречаемым изменением бронхиального эпителия при плоскоклеточном раке легкого (таблица 10). Она отмечалась у 85 больных (80,9%) из 105 вошедших в исследование. Как самостоятельный процесс базальноклеточная гиперплазия (БКГ+ПМ-Д-) наблюдалась у 55/105 (52,4%) пациентов. Реже, в 30/105 (28,6%) случаях, базальноклеточная гиперплазия сочеталась с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-).

Таблица 10 – Частота встречаемости различных вариантов сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия, отдаленного от плоскоклеточного рака легкого

Плоскоклеточный рак		
Группы	Количество больных, n (%)	p
1. БКГ+ПМ-Д-	55/105 (52,4)	$p_{1-2}=0,0008$ $p_{1-3}=0,001$ $p_{1-4}=0,02$
2. БКГ+ПМ+Д-	30/105 (28,6)	$p_{2-3}=0,001$ $p_{2-4}=0,0003$
3. БКГ-ПМ+Д+	11/105 (10,5)	$p_{3-4}=0,63$
4. БКГ-ПМ-Д-	9/105 (8,5)	

Плоскоклеточная метаплазия отмечалась всего в 11/105 (10,5%) случаях (таблица 10). У 9/105 (8,5%) больных, отдаленная от опухоли слизистая бронхов была либо нормального строения (БКГ-ПМ-Д-).

В сформированных по принципу наличия или отсутствия базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии группах наблюдения, изучалась частота встречаемости диспластических изменений бронхиального эпителия. Следует отметить, что в качестве самостоятельного процесса, дисплазия в нашем исследовании не была обнаружена. Отсутствовала она и на фоне базальноклеточной гиперплазии, не сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ-Д). Очаги диспластических изменений были выявлены в тех случаях, когда в слизистой бронхов мелкого калибра определялась плоскоклеточная метаплазия. Данный факт свидетельствует в пользу представленных выше (Глава 3) результатов цитологического исследования о том, что сочетание дисплазии с плоскоклеточной метаплазией является прогностическим признаком прогрессии дисплазии. А в этом случае, прогрессия реализовалась рядом в плоскоклеточный рак.

При сочетании базальноклеточной гиперплазии с плоскоклеточной метаплазией, дисплазия наблюдалась только в 1/30 (3,3%) случае, причем это была дисплазия I степени.

Высокая частота встречаемости дисплазии отмечалась на фоне плоскоклеточной метаплазии, в отсутствии базальноклеточной гиперплазии (БКГ-ПМ+Д+, таблица 11). Из 11 больных этой группы в двух (18,2%) случаях была «изолированная» плоскоклеточная метаплазия, а у 9 (81,8%) человек, ПМ сочеталась с дисплазией. Из них, у двух (18,2%) пациентов на фоне плоскоклеточной метаплазии отмечалась дисплазия I степени, соответственно у 7 (63,%) больных участки метаплазии чередовались с очагами дисплазии II-III степени.

Таблица 11 – Частота встречаемости дисплазии, в зависимости от варианта сочетания морфологических изменений бронхиального эпителия при плоскоклеточном раке легкого

Плоскоклеточный рак n=105			
Группы	Встречаемость дисплазии, n (%)		
	Д +	Д -	
БКГ-ПМ+Д+	9/11 (81,8)	2/11 (18,2)	$\chi^2_{Y}=65,45$ $p=0,00000;$ (95%CI) OR=418,50 (27,54-16213)
БКГ+ПМ-Д- БКГ+ПМ+Д- БКГ-ПМ-Д-	1/94 (1,1)	93/94 (98,9)	

По результатам работы S. Lantuejoul et. al. (2009), у одной трети пациентов с ранее резецированным плоскоклеточным раком легкого, развиваются очаги бронхиальной дисплазии высокой степени (Д III). При этом автор отмечает, что сама по себе тяжелая дисплазия бывает редко. Как правило, она выявляется в сочетании с диспластическими изменениями более низкой степени – Д I-II. [237]. В нашем исследовании, диспластические изменения слизистой бронхов встречались значительно реже. Объяснить данный факт можно тем, что указанные выше авторы проводили свое исследование у пациентов с ранее резецированной опухолью. Материалом для морфологического исследования у них были фрагменты ткани крупных бронхов, взятых при проведении контрольной фибробронхоскопии. В нашей работе, как отмечалось выше, забор материала проводился на момент оперативного лечения, и в основном это были бронхи мелкого калибра.

Таким образом, при плоскоклеточном раке легкого в бронхиальном эпителии наблюдаются различные варианты сочетаний морфологических изменений. Высокая частота встречаемости дисплазии отмечается при

плоскоклеточной метаплазии, в отсутствие базальноклеточной гиперплазии (БКГ-ПМ+Д+).

4.1.1 Частота встречаемости различных вариантов сочетаний морфологических изменений эпителия бронхов мелкого калибра при аденокарциноме легкого

При аденокарциноме легкого в бронхиальном эпителии чаще всего встречалась базальноклеточная гиперплазия. Из 67 пациентов она отмечалась у 55 (82,1%) человек. Причем, в 59,7% (40/67) случаях это была так называемая «изолированная» БКГ, не сочетающаяся ни с каким другим морфологическим процессом (БКГ+ПМ-Д-, таблица 13). В 15/67 (22,4%) случаях базальноклеточная гиперплазия сочеталась с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-, таблица 12).

Таблица 12 – Частота встречаемости различных вариантов сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия при аденокарциноме легкого

Аденокарцинома легкого		
Группы	Количество больных, n (%)	p
1. БКГ+ПМ-Д-	40/67 (59,7)	$p_{1-2}=0,0002$ $p_{1-3}=0,0003$ $p_{1-4}=0,01$
2. БКГ+ПМ+Д-	15/67 (22,4)	$p_{2-3}=0,0005$ $p_{2-4}=0,47$
3. БКГ-ПМ+Д-	1/67 (1,5)	$p_{3-4}=0,004$
4. БКГ-ПМ-Д-	11/67 (16,4)	

В 12/67 (17,9%) случаях, в отдаленной от опухоли ткани бронхов, признаков базальноклеточной гиперплазии не было выявлено. При этом, «изолированная» плоскоклеточная метаплазия (БКГ-ПМ+Д-) отмечалась только в 1/67 (1,5%) случае (таблица 12). У 11 (16,4%) пациентов, в

отдаленных от опухоли участках слизистой, каких-либо изменений слизистой бронхов не было найдено (БКГ-ПМ-Д-). Следует отметить, что ни в одном из 67 случаев аденокарциномы легкого, диспластических изменений бронхиального эпителия обнаружено не было.

Таким образом, особенностью бронхиального эпителия при аденокарциноме легкого, являлось крайне редкая частота встречаемости случаев «изолированной» плоскоклеточной метаплазии и отсутствие дисплазии.

Известно, что базальноклеточная гиперплазия, плоскоклеточная метаплазия и дисплазия – предшественники плоскоклеточного рака легкого [76, 79, 83, 100, 114, 123, 141, 150, 162, 200, 207, 209, 234, 237, 397]. Перечисленные реактивные и диспластические изменения могут быть найдены на фоне аденокарциномы легкого [114, 234, 237, 397,]. При этом отмечается, что местоположение и степень тяжести диспластических изменений, найденных при немелкоклеточном раке легкого, не связаны с расстоянием от опухоли [397]. Проведенное нами исследование показало, что наиболее часто наблюдаемым морфологическим изменением бронхиального эпителия, отдаленного от плоскоклеточного рака и аденокарциномы легкого, была базальноклеточная гиперплазия (таблица 13). В большинстве случаев плоскоклеточного рака и аденокарциномы легкого преобладала «изолированная» базальноклеточная гиперплазия (БКГ+ПМ-Д-) – 55,2% (95/172), реже наблюдалось ее сочетание с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-) – 26,2% (45/172; $p=0,002$).

Отличием морфологических изменений, сопутствующих развитию аденокарциномы легкого, являлась меньшая частота встречаемости случаев, в которых нет базальноклеточной гиперплазии, но имеет место плоскоклеточная метаплазия (БКГ-ПМ+Д-; $\chi^2_y=5,12$; $p=0,02$ – сравнение с группой БКГ-ПМ+Д+ при плоскоклеточном раке).

Таблица 13 – Частота встречаемости различных вариантов сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия, отдаленного от немелкоклеточного рака легкого

Группы	Количество больных, n (%)	
	Плоскоклеточный рак	Аденокарцинома
1. БКГ+ПМ-Д-	55/105 (52,4)	40/67 (59,7)
	p=0,5	
2. БКГ+ПМ+Д-	30/105 (28,6)	15/67 (22,4)
	p=0,7	
3. БКГ-ПМ+Д+	11/105 (10,5)	1/67 (1,5)
	p=0,02	
4. БКГ-ПМ-Д-	9/105 (8,5)	11/67 (16,4)
	p=0,3	

Диспластические изменения, в нашем исследовании, наблюдались только при плоскоклеточном раке, и на фоне других реактивных процессов. При этом в случаях, когда развивалась базальноклеточная гиперплазия, независимо от наличия или отсутствия плоскоклеточной метаплазии, дисплазия возникала крайне редко (группы БКГ+ПМ-; БКГ+ПМ+). Вероятно, дисплазии развиваются крайне редко, если отсутствуют базальноклеточная гиперплазия и плоскоклеточная метаплазия (группа БКГ-ПМ-Д-). Наиболее часто, выраженные диспластические изменения встречаются, когда плоскоклеточная метаплазия, обнаруживается без базальноклеточной гиперплазии (группа БКГ-ПМ+Д+).

Согласно данным литературы базальноклеточная гиперплазия, плоскоклеточная метаплазия и дисплазия могут быть найдены по всему бронхиальному дереву, но чаще всего встречаются в бронхах среднего калибра, особенно сегментарных и субсегментарных [114, 150, 207]. Реже метаплазия и особенно дисплазия, наблюдаются в долевыми бронхах [207, 209, 397]. Данный факт может объяснить не высокую частоту встречаемости дисплазий в нашем исследовании – 5,2% (9/172), поскольку

изучались фрагменты ткани в основном мелких бронхов. Цитометрические параметры изучались на материале, полученном при фибробронхоскопии. В этом случае фрагменты ткани забирались из сегментарных бронхов, соответственно выше была и частота встречаемости диспластических процессов.

Следует отметить, что у 79,7% (137/172) больных НМРЛ определялся хронический бронхит курильщиков, соответственно 20,3% (35/172) больных были не курящие. Результаты исследования показали, что частота встречаемости изучаемых вариантов сочетаний морфологических изменений в мелких бронхах, как при плоскоклеточном раке, так и при аденокарциноме легких, не имела существенных различий у курящих и не курящих пациентов (таблица 14).

Таблица 14 – Частота встречаемости различных вариантов сочетаний бронхиального эпителия при НМРЛ в зависимости от статуса курения

Процесс	Плоскоклеточный рак n, (%)		Аденокарцинома n, (%)	
	курящие	не курящие	курящие	не курящие
БКГ+ПМ-Д-	46/55 (52,3)	9/55 (52,9)	29/40 (59,2)	11/40 (61,1)
	p=0,94		p=0,86	
БКГ+ПМ+Д-	25/30 (28,4)	5/30 (29,4)	10/15 (20,4)	5/15 (27,8)
	p=0,93		p=0,84	
БКГ-ПМ+Д+	9/11 (10,2)	2/11 (11,8)	1/1 (2,0)	-
	p=0,95			
БКГ-ПМ-Д-	8/9 (9,1)	1/9 (5,9)	9/11 (18,4)	2/11 (11,1)
	p=0,80		p=0,63	
Итого	88/105 (83,8)	17/105 (16,2)	49/67 (73,1)	18/67 (26,9)

4.2. Особенности характера экспрессии маркеров пролиферативной активности, апоптоза и клеточной дифференцировки при различных вариантах сочетаний морфологических изменений эпителия бронхов мелкого калибра при немелкоклеточном раке легкого

Согласно представленным выше результатам исследования, дисплазия, чаще встречалась на фоне плоскоклеточной метаплазии и реже, при наличии базальноклеточной гиперплазии или ее сочетании с ПМ. Кроме того, было обращено внимание на известный факт, что базальноклеточная гиперплазия не всегда сопровождается развитием плоскоклеточной метаплазии. Поэтому представляло интерес сравнить характер экспрессии маркеров пролиферативной активности (Ki-67), апоптоза (Bcl-2, p53) и клеточной дифференцировки (CD138) при различных вариантах сочетаний морфологических изменений. Исследуемые параметры определялись в эпителии каждого варианта морфологических изменений (например, в группе БКГ+ПМ+Д-, подсчитывалось количество клеток с экспрессией маркера отдельно в участках базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии, соответственно в группе БКГ-ПМ+Д+ – в очагах плоскоклеточной метаплазии и дисплазии).

4.2.1 Морфофункциональная характеристика различных вариантов базальноклеточной гиперплазии при плоскоклеточном раке легкого

При исследовании характера экспрессии маркеров пролиферативной активности и апоптоза обращал внимание тот факт, что в нормальном бронхиальном эпителии и при базальноклеточной гиперплазии, не во всех случаях отмечалось наличие клеток с экспрессией p53 и Bcl-2. Например, в неизмененном бронхиальном эпителии (БКГ-ПМ-Д-), экспрессия данных маркеров наблюдалась всего в 38% (8/21) случаев. При «изолированной»

базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-) p53+ клетки были выявлены в 70,9% (39/55) случаев. В 90% (27/30) случаев сочетания базальноклеточной гиперплазии с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-), определялись клетки базальноклеточной гиперплазии с экспрессией p53. Однако, различия с «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-), достигли только уровня статистической тенденции ($p_1=0,06$; OR = 3,69; 95% CI 0,98-13,92; таблица 15). Экспрессия Vcl-2 в клетках «изолированной» базальноклеточной гиперплазии группы БКГ+ПМ-Д- встречалась в 85,5% (47/55) случаев, а при сочетании БКГ+ПМ+Д- – 96,7% (29/30), но различия не были статистически значимы ($p_2=0,15$; таблица 15).

Таблица 15 – Частота встречаемости случаев с экспрессией p53 и Vcl-2 при различных вариантах базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии, возникающих в бронхах мелкого калибра, отдаленных от плоскоклеточного рака легкого

	Базальноклеточная гиперплазия, n (%)				Плоскоклеточная метаплазия, n (%)			
	p53		Vcl-2		p53		Vcl-2	
	-	+	-	+	-	+	-	+
БКГ+ПМ-Д- n=55	16 (29,1)	39 (70,9)	8 (14,5)	47 (85,5)	-	-	-	-
БКГ+ПМ+Д- n=30	3 (10,0)	27 (90,0)	1 (3,3)	29 (96,7)	0	30 (100)	0	30 (100)
OR (95% CI)	OR=0,27 (0,06<OR<1,13)		OR=0,20 (0,01<OR<1,75)					
	$p_1=0,06$		$p_2=0,15$		$p_3=1,00$		$p_4=1,00$	

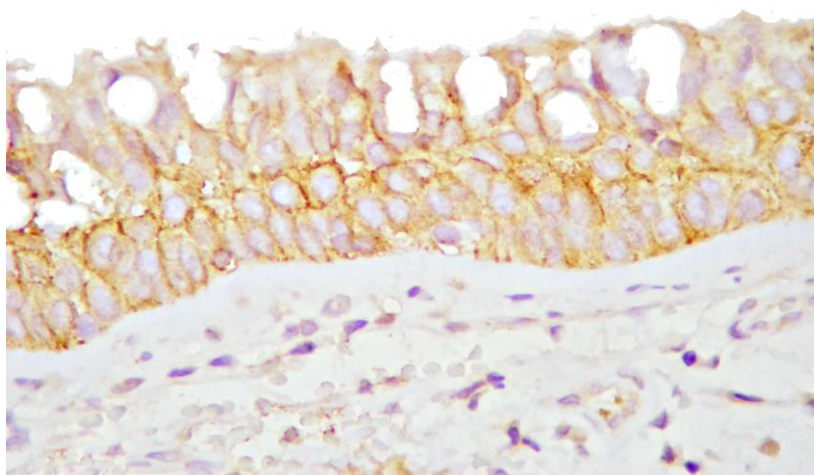
Примечание: различия по числу случаев с экспрессией p53 (p_1) и Vcl-2 (p_2) между изолированной БКГ (БКГ+ПМ-) и БКГ сочетающейся с ПМ (БКГ+ПМ+) и между БКГ и ПМ (p_3). Различия между БКГ и ПМ (БКГ+ПМ+) (p_4). OR – отношение шансов

В нормальном бронхиальном эпителии количество пролиферирующих Ki 67+ клеток составило 12,3% (таблица 16). Причем, Ki 67+ клетки определялись во всех случаях. Уровень экспрессии белка p53 и Bcl-2 был не высок – 4,4% и 5,3% соответственно (таблица 16).

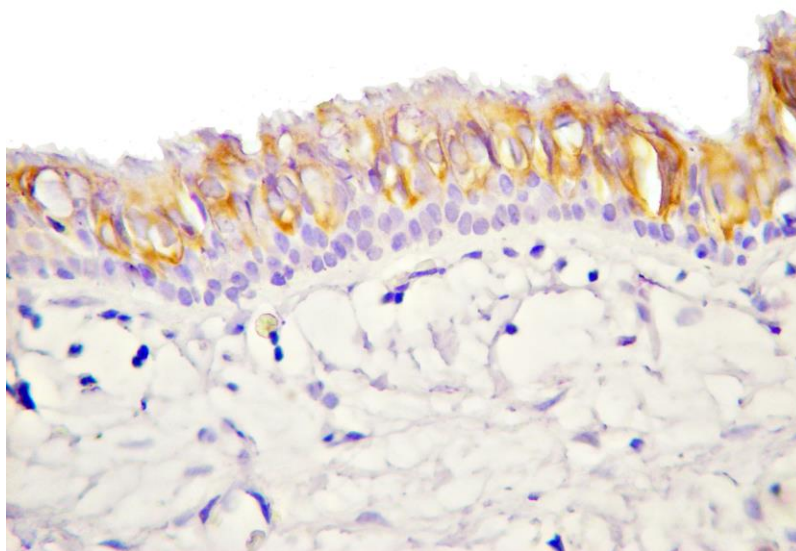
Таблица 16 – Экспрессия маркеров пролиферативной активности, апоптоза и клеточной дифференцировки, в зависимости от варианта сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия при плоскоклеточном раке легкого

Процесс	Количество клеток с экспрессией (%)			
	Ki-67	p53	Bcl-2	CD 138
	M±SD	M±SD	M±SD	M±SD
1. БКГ-ПМ-Д- n ₁ =9	12,3±5,1	4,4±1,2	5,3±2,3	58,5±3,2
2. БКГ (БКГ+ПМ-Д-) n ₁ =55	18,3±7,1	9,6±2,3 n ₂ =39	9,3±4,3 n ₂ =47	38,5±2,7
	p ₁₋₂ =0,005	p ₁₋₂ =0,01	p ₁₋₂ =0,05	p ₁₋₂ =0,001
3. БКГ (БКГ+ПМ+Д-) n ₁ =30	34,9±1,7	14,4±5,5 n ₂ =27	11,0±3,8	21,8±2,6
	p ₁₋₃ =0,004; p ₂₋₃ =0,003	p ₁₋₃ =0,001; p ₂₋₃ =0,0008	p ₁₋₃ =0,02; p ₂₋₃ =0,08	p ₁₋₃ =0,0001; p ₂₋₃ =0,003
4. ПМ (БКГ+ПМ+Д-) n ₁ =30	48,9±9,8	29,4±7,6 n ₂ =29	29,4±4,1	0,0±0,0
	p ₃₋₄ =0,04	p ₃₋₄ =0,0001	p ₃₋₄ =0,0001	
5. ПМ+ (БКГ-ПМ+Д+) n ₁ =11	59,2±9,1	29,3±8,8	21,2±7,1	0,0±0,0
	p ₄₋₅ =0,16	p ₄₋₅ =0,65	p ₄₋₅ =0,12	
6. ДІ (БКГ-ПМ+ДІ) n ₁ =2	60,8±6,2	30,1±1,2	22,8±1,3	0,0±0,0
7. ДІ-ІІ (БКГ-ПМ+Д+) n ₁ = 7	77,1±10,7	42,1±1,3	33,0±11,3	0,0±0,0
	p ₅₋₇ =0,03	p ₅₋₇ =0,02	p ₅₋₇ =0,02	

При «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-) число клеток с экспрессией Ki-67, p53 и Vcl-2 составляло 18,3% – 9,6% – 9,3% соответственно и было значимо больше, по сравнению с неизмененным бронхиальным эпителием (таблица 16).

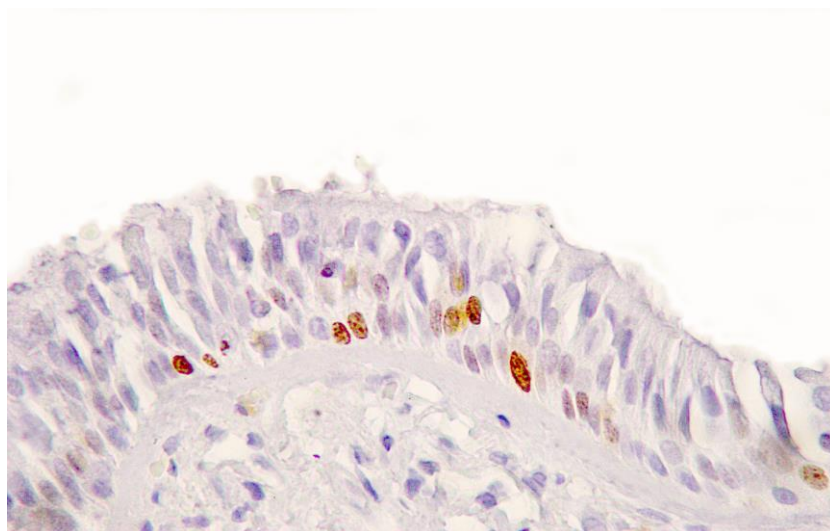


А

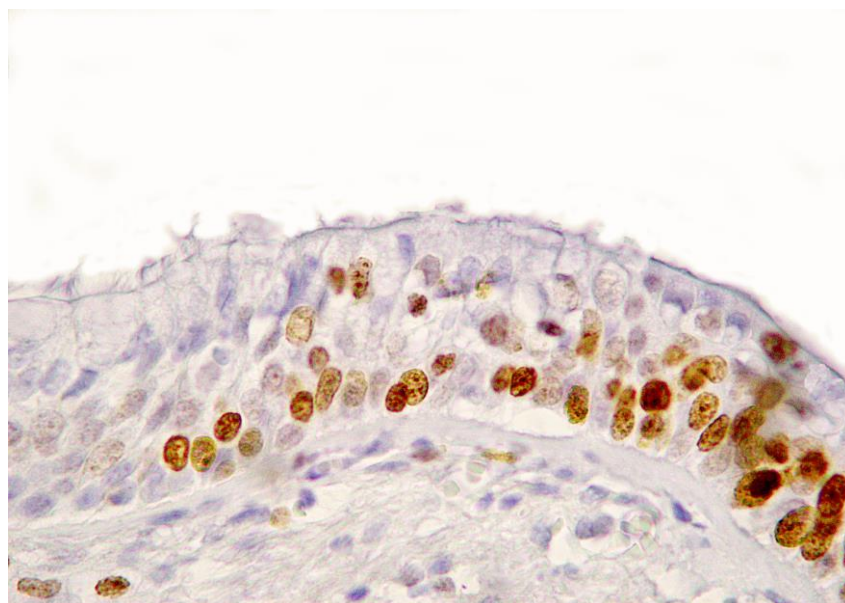


Б

Рисунок 24 – Экспрессия CD138: А – выраженное мембранное окрашивание при «изолированной» базальноклеточной гиперплазии, х 400; Б – слабая экспрессия или отсутствие экспрессии в части клеток в участке базальноклеточной гиперплазии, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией, х 400



А

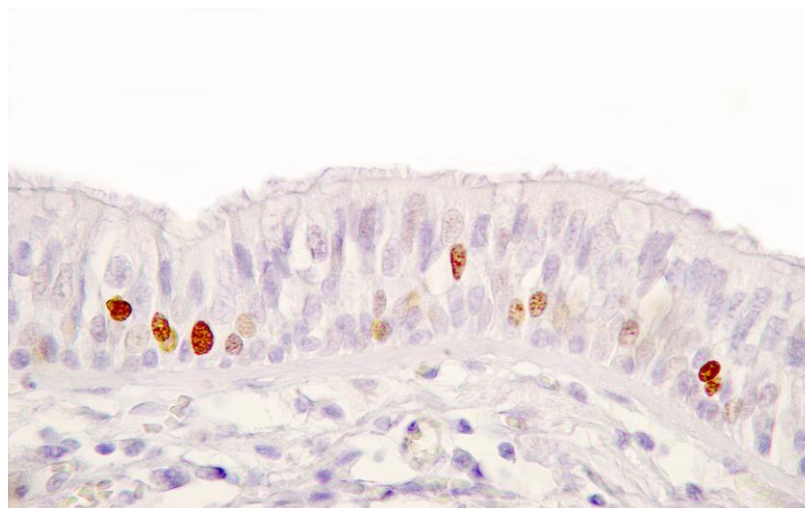


Б

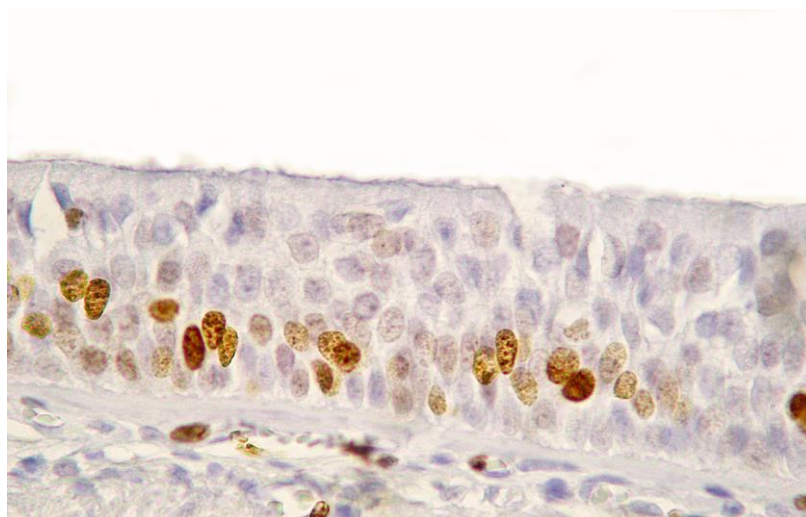
Рисунок 25 – Ядерная экспрессия Ki-67 в клетках: А – изолированной базальноклеточной гиперплазии, х 200; Б – базальноклеточной гиперплазии, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией, х 200

Однако, в отличие от нормального бронхиального эпителия, при «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-) уменьшалось количество дифференцированных CD138+ клеток – 58,5% и 38,5% соответственно ($p=0,001$, таблица 15, рисунок 24)

По сравнению с «изолированной» базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ-Д-), в участках сочетанной БКГ (БКГ+ПМ+Д-), возрастала пролиферативная активность Ki-67+ – (34,9±1,7)% против (18,3±7,1)% ($p_{2-3} = 0,003$, таблица 15, рисунок 25). Также было больше количество p53+ клеток – (14,4±5,5)% против (9,6±2,3)%, соответственно ($p = 0,0008$, таблица 16, рисунок 26).



А



Б

Рисунок 26 – Ядерная экспрессия p53 в клетках: А – «изолированной» базальноклеточной гиперплазии, х200; Б – базальноклеточной гиперплазии, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией, х 200

При этом по уровню экспрессии Vcl-2, сочетанная (БКГ+ПМ+Д-) и «изолированная» (БКГ+ПМ-Д-) базальноклеточная гиперплазия не имели статистически значимых различий ((11,0±3,8)% против (9,3±4,3)% соответственно, $p_{2-3}=0,08$, таблица 15, рисунок 27). Экспрессия маркера клеточной дифференцировки CD138, в участках базальноклеточной гиперплазии группы БКГ+ПМ+Д- была меньше, по сравнению с «изолированной» БКГ (БКГ+ПМ-Д-) – (21,8±2,6)% против (38,5±2,7)% ($p_{2-3}=0,003$, таблица 16).

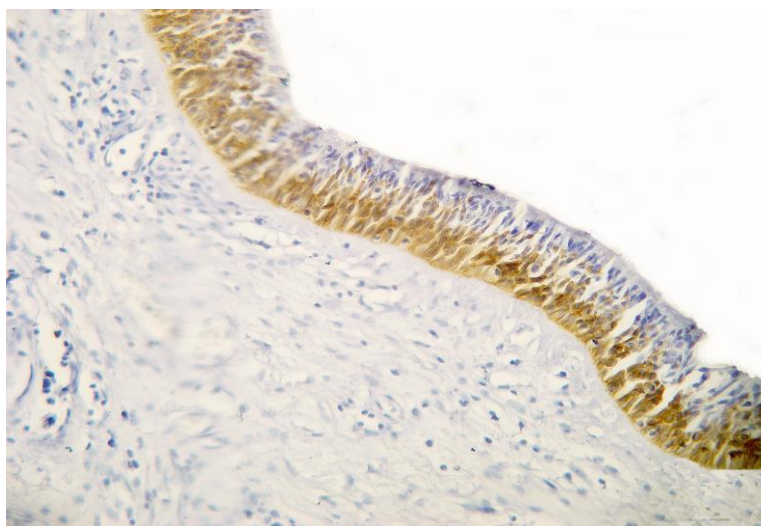


Рисунок 27 – Цитоплазматическая экспрессия Vcl-2 при базальноклеточной гиперплазии, x200

Таким образом, иммунофенотип базальноклеточной гиперплазии зависел от того, сочетается ли она с плоскоклеточной метаплазией. При сочетании БКГ+ПМ+Д-, в участках базальноклеточной гиперплазии была выше пролиферативная активность и больше клеток с экспрессией белка p53. При этом, случаев с отсутствием экспрессии белка p53 было меньше. Более выраженные изменения при сочетании базальноклеточной гиперплазии с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-), в сравнении с

«изолированной» БКГ (БКГ+ПМ-Д-), подтверждаются и уменьшением числа дифференцированных CD138+ клеток.

4.2.2 Сравнительная характеристика иммунофенотипов базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии при плоскоклеточном раке легкого

Сопоставление показателей экспрессии маркеров пролиферативной активности и апоптоза группы БКГ+ПМ+Д- показало следующее. В фокусах плоскоклеточной метаплазии выявлялось большее число пролиферирующих Ki-67+ клеток – (48,9±9,8)%, по сравнению с участками базальноклеточной гиперплазии – (34,9±1,7)% ($p_{3-4}=0,04$, таблица 16, рисунок 28). Уровень экспрессии белков p53 и Bcl-2 в участках плоскоклеточной метаплазии был одинаков – 29,4% клеток. В очагах базальноклеточной гиперплазии значения данных показателей были значимо ниже – (14,4±5,5)% и (11,0±3,8)% клеток соответственно ($p_{3-4}=0,0001$, таблица 16).

В участках базальноклеточной гиперплазии группы БКГ+ПМ+Д- количество клеток с экспрессией CD138 составляло (21,8±2,6)% (таблица 15). В очагах плоскоклеточной метаплазии, экспрессии маркера дифференцировки плоского эпителия CD138 найдено не было (таблица 16, рисунок 29).

Таким образом, в пределах слизистой одного бронха, в участках плоскоклеточной метаплазии значения показателей пролиферативной активности и апоптоза были выше, чем в участках базальноклеточной гиперплазии. При этом в фокусах плоскоклеточной метаплазии отсутствовала экспрессия маркера дифференцировки плоского эпителия CD138.

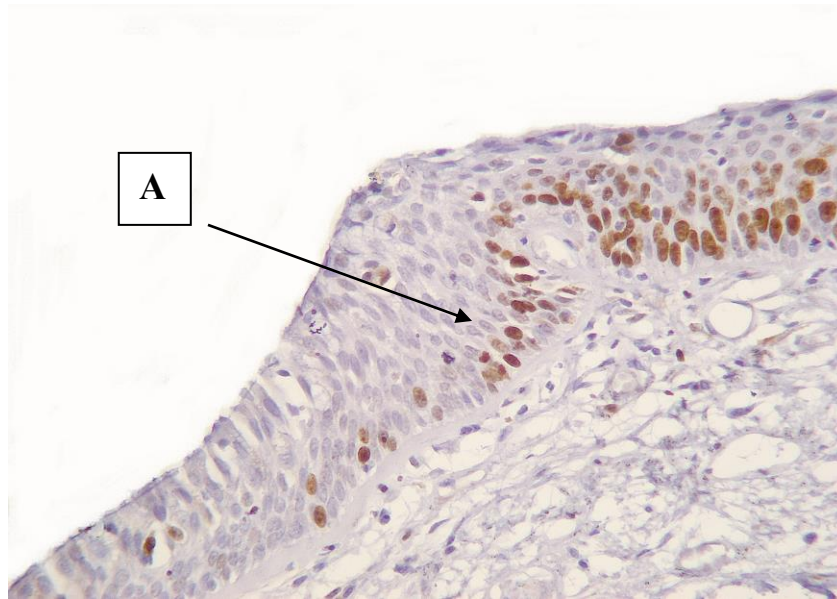


Рисунок 28 – Слабая ядерная экспрессия маркера пролиферативной активности Ki-67 в участке базальноклеточной гиперплазии (А), x200; Б – умеренная ядерная экспрессия маркера пролиферативной активности Ki-67 в участке плоскоклеточной метаплазии, x200

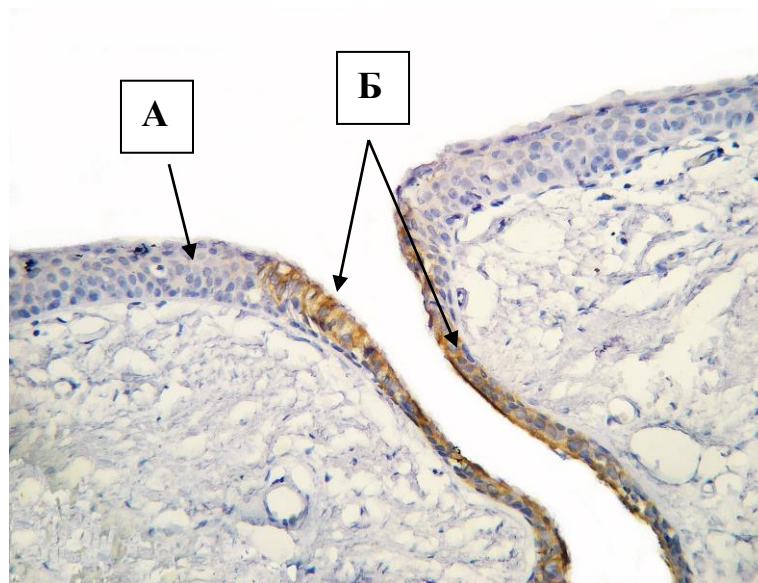


Рисунок 29 – Отсутствие экспрессии маркера CD138 в участках плоскоклеточной метаплазии (А), x100; Б – экспрессия маркера CD138 в участке базальноклеточной гиперплазии, x100

4.2.3 Иммунофенотипическая характеристика различных вариантов плоскоклеточной метаплазии при плоскоклеточном раке легкого

Определение экспрессионных параметров плоскоклеточной метаплазии, наблюдаемой на фоне базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ+Д-), показало, что она характеризовалась высокой пролиферативной активностью – $(48,9 \pm 9,8)\%$ клеток (таблица 16). Число клеток с экспрессией p53 и Vcl-2 при данном варианте плоскоклеточной метаплазии было одинаковым и составило 29,4% (таблица 16). При этом, только у одного пациента (3,3%) в очаге ПМ отсутствовала экспрессия p53. Случаев с отсутствием экспрессии Vcl-2 не было (таблица 15).

При сочетании плоскоклеточной метаплазии с дисплазией, без наличия базальноклеточной гиперплазии (БКГ-ПМ+Д+), случаев с отсутствием экспрессии в клетках плоскоклеточной метаплазии белков p53 и Vcl-2 не было выявлено. Пролиферативная активность данного варианта плоскоклеточной метаплазии была чуть выше и составила $(52,9 \pm 9,1)\%$, однако различия с плоскоклеточной метаплазией, сочетающейся с базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ+Д-), были не достоверны – $(48,9 \pm 9,8)\%$ ($p_{4-5}=0,16$, таблица 16). Также не было выявлено статистически значимых различий по уровню экспрессии белков p53 и Vcl-2 плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ+Д-) или с дисплазией (БКГ-ПМ+Д, таблица 16).

Таким образом, показатели пролиферативной активности и апоптоза плоскоклеточной метаплазии, не зависели от варианта ее сочетания с базальноклеточной гиперплазией или дисплазией, и были одинаковы. Экспрессия маркера клеточной дифференцировки CD138 отсутствовала при обоих вариантах плоскоклеточной метаплазии.

4.2.4 Иммунофенотипическая характеристика дисплазии

Как отмечалось выше, при сочетании плоскоклеточной метаплазии с базальноклеточной гиперплазией (группа БКГ+ПМ+), только у одного (1,8%) пациента наблюдалась дисплазия I степени. Поэтому в дальнейшем исследовании этот случай дисплазии мы не учитывали. В группе БКГ-ПМ+Д+, у 81,8% (9/11) больных на фоне плоскоклеточной метаплазии были выявлены диспластические процессы. Также из-за небольшого числа случаев дисплазии I степени (2 пациента), не проводилось сопоставление ее иммунофенотипических параметров с иммунофенотипами реактивных процессов и дисплазии II-III степени.

В отличие от плоскоклеточной метаплазии, при дисплазии II-III степени был значительно выше уровень пролиферативной активности – $(77,1 \pm 10,7)\%$ ($p_{5-7}=0,03$, таблица 16, рисунок 30). Больше было и клеток с экспрессией белка p53 – $(42,1 \pm 1,3)\%$ ($p_{5-7}=0,02$) и Vcl-2 – $(33,0 \pm 11,3)\%$ ($p_{5-7}=0,02$, таблица 15). Следует отметить, что при дисплазии бронхиального эпителия, как и при плоскоклеточной метаплазии, экспрессия маркера клеточной дифференцировки CD138 отсутствовала (таблица 16).

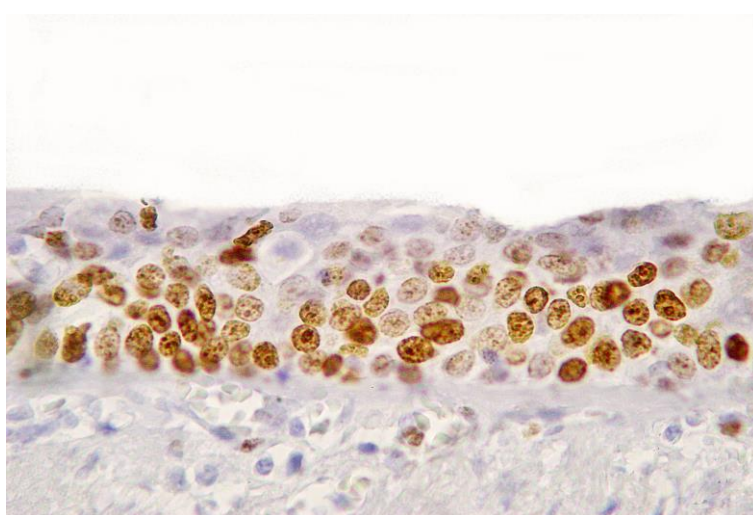


Рисунок 30 – Выраженная ядерная экспрессия Ki-67 при дисплазии бронхиального эпителия III степени, на фоне плоскоклеточной метаплазии, x200

Таким образом, в участках дисплазии II-III степени значения показателей пролиферативной активности и апоптоза значительно выше, по сравнению с аналогичными параметрами плоскоклеточной метаплазии и базальноклеточной гиперплазии.

4.2.5 Иммунофенотипическая характеристика различных вариантов сочетаний морфологических изменений эпителия бронхов мелкого калибра при аденокарциноме легкого

При исследовании характера экспрессии маркеров пролиферативной активности, апоптоза и клеточной дифференцировки в эпителии бронхов мелкого калибра было обращено внимание на то, что также как и при плоскоклеточном раке, не во всех случаях неизмененного бронхиального эпителия и базальноклеточной гиперплазии, выявлялись p53+ и Vcl-2+ клетки. В нормальном эпителии экспрессия p53 и Vcl-2 наблюдалась в 38,5% (5/13) случаев. Сравнение групп «изолированной» (БКГ+ПМ-Д-) и сочетанной (БКГ+ПМ+Д-) базальноклеточной гиперплазии между собой, по числу случаев с экспрессией p53 и Vcl-2 статистически значимой разницы между ними не было выявлено. Распределение случаев с экспрессией данных маркеров представлено в таблице 17.

В нормальном бронхиальном эпителии отмечалась выраженная экспрессия маркера клеточной дифференцировки CD138 – (59,1±3,6)% клеток (таблица 17). Пролиферативная активность была не высока – (12,5±4,8)% клеток (таблица 17). Уровень экспрессии белков p53 и Vcl-2 составил (3,9±1,7)% и (5,1±2,2)% клеток соответственно (таблица 17).

По сравнению с неизмененным бронхиальным эпителием, при «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-) значения показателей пролиферативной активности и апоптоза Ki-67, p53 и Vcl-2 были значимо больше, и составили (17,2±8,1)% – (9,1±2,1)% – (9,7±3,9)% клеток соответственно (таблица 18). Число клеток с экспрессией маркера

клеточной дифференцировки CD138 снижалось до $(40,2 \pm 2,9)\%$ против $(59,1 \pm 3,6)\%$ ($p_{1-2}=0,0001$, таблица 18).

Таблица 17 – Частота встречаемости случаев с экспрессией p53 и Vcl-2 при различных вариантах базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазией, возникающих в бронхах мелкого калибра, отдаленных от аденокарциномы легкого

	Базальноклеточная гиперплазия, n (%)				Плоскоклеточная метаплазия, n (%)			
	p53		Vcl-2		p53		Vcl-2	
	-	+	-	+	-	+	-	+
БКГ+ПМ-Д- n=40	13 (32,5)	27 (67,5)	6 (15,0)	34 (85,0)	-	-	-	-
БКГ+ПМ+Д- n=15	2 (13,3)	13 (86,7)	1 (6,6)	14 (93,4)	1 (6,6)	14 (93,4)	1 (6,6)	14 (93,4)
OR (95% CI)	OR=3,13 (0,54-23,48)		OR=2,47 (0,25-59,55)		OR=2,15 (0,13-68,54)		OR=1,00 (0,0-41,50)	
	$p_1=0,19$		$p_2=0,66$		$p_3=1,00$		$p_4=1,00$	

Примечание: различия по числу случаев с экспрессией p53 (p_1) и Vcl-2 (p_2) между изолированной БКГ (БКГ+ПМ-) и БКГ сочетающейся с ПМ (БКГ+ПМ+) и между БКГ и ПМ (p_3). Различия между БКГ и ПМ (БКГ+ПМ+) (p_4). OR – отношение шансов

При сочетанной базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ+Д-), в сравнении с «изолированной» (БКГ+ПМ-Д-), пролиферативная активность была выше – $(33,6 \pm 1,5)\%$ клеток ($p_{2-3}=0,0001$, таблица 18). Выше были и значения показателей экспрессии p53 – $(13,9 \pm 5,1)\%$ ($p_{2-3}=0,001$) и Vcl-2 – $(17,2 \pm 3,5)\%$ ($p_{2-3}=0,001$, таблица 18). Уровень экспрессии CD138, наоборот была ниже – $(22,2 \pm 3,1)\%$, против $(40,2 \pm 2,9)\%$ ($p_{2-3}=0,001$, таблица 18).

Сравнение характера экспрессии маркеров пролиферативной активности и апоптоза в участках плоскоклеточной метаплазии и базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ+Д-) показало, что число Ki-67+, p53+ и Vcl-2+ клеток было значимо больше в фокусах

плоскоклеточной метаплазии, чем в фокусах базальноклеточной гиперплазии (таблица 18).

Таблица 18 – Экспрессия маркеров пролиферативной активности, апоптоза и клеточной дифференцировки, в зависимости от варианта морфологических изменений бронхиального эпителия при аденокарциноме легкого

Процесс	Количество клеток с позитивной экспрессией (%)			
	Ki 67	P53	Bcl-2	CD 138
	M±SD	M±SD	M±SD	M±SD
1. Норма n ₁ =8	12,5±4,8	3,9±1,7 n ₂ =5	5,1±2,2 n ₂ =5	59,1±3,6
2. БКГ (БКГ+ПМ-Д-) n ₁ =40	17,2±8,1	9,1±2,1 n ₂ =27	9,7±3,9 n ₂ =34	40,2±2,9
	p ₁₋₂ =0,05	p ₁₋₂ =0,001	p ₁₋₂ =0,02	p ₁₋₂ =0,0001
3. БКГ (БКГ+ПМ+Д-) n ₁ =15	33,6±1,5	13,9±5,1 n ₂ =13	17,2±3,5 n ₂ =14	22,2±3,1
	p ₁₋₃ =0,0000; p ₂₋₃ =0,0001	p ₁₋₃ =0,002; p ₂₋₃ =0,001	p ₁₋₃ =0,0001; p ₂₋₃ =0,001	p ₁₋₃ =0,0001; p ₂₋₃ =0,002
4. ПМ (БКГ+ПМ+Д-) n ₁ =15	47,4±8,3	29,1±6,2 n ₂ =14	28,7±4,2 n ₂ =14	0,0±0,0
	p ₃₋₄ =0,01	p ₃₋₄ =0,0000	p ₃₋₄ =0,0002	
5. ПМ (БКГ-ПМ+Д-) n ₁ =1	53,6±6,1	27,8±4,8	22,1±4,1	0,0±0,0

Клетки с экспрессией CD138 в участках плоскоклеточной метаплазии отсутствовали. При аденокарциноме легкого наблюдался только один случай плоскоклеточной метаплазии, при отсутствии БКГ (БКГ-ПМ+Д-). Поэтому мы не сопоставляли иммуногистохимические параметры этой плоскоклеточной метаплазии с другими вариантами реактивных изменений.

Сопоставление экспрессионных характеристик «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-) при плоскоклеточном раке

и аденокарциноме легкого, не выявило значимых различий по исследуемым показателям ($p > 0,05$). При сравнении показателей уровня экспрессии маркеров пролиферативной активности, апоптоза и клеточной дифференцировки базальноклеточной гиперплазии, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-), при плоскоклеточном раке и аденокарциноме легкого показало следующее. Уровень экспрессии маркера Vcl-2 в участках базальноклеточной гиперплазии, в случаях аденокарциномы легкого, был несколько выше – $(17,2 \pm 3,5)\%$, по сравнению с плоскоклеточным раком – $(11,0 \pm 3,8)\%$ клеток ($p = 0,05$). Характер экспрессии других маркеров в группе БКГ+ПМ+Д- при плоскоклеточном раке и аденокарциноме легкого не имел отличий.

Таким образом, характер экспрессии исследуемых маркеров при аденокарциноме легкого имел ту же направленность, что и при плоскоклеточном раке. Базальноклеточная гиперплазия, в отсутствие плоскоклеточной метаплазии (БКГ+ПМ-Д-), характеризовалась меньшими значениями показателей пролиферативной активности и апоптоза. При плоскоклеточной метаплазии, число клеток с экспрессией Ki-67, p53, Vcl-2 было значительно больше. По мере нарастания степени тяжести морфологических изменений эпителия, снижался уровень экспрессии маркера клеточной дифференцировки, вплоть до полного отсутствия CD138+ клеток при плоскоклеточной метаплазии.

Нарушение равновесия между процессами пролиферации и гибели клеток – основной момент в развитии неоплазии. Высокий показатель пролиферативной активности ассоциируется с неблагоприятным прогнозом при немелкоклеточном раке легкого [216], в то время как экспрессия Vcl-2 – с благоприятным [425]. Сведения о прогностическом значении p53 противоречивы. В одних работах говорится о снижении выживаемости больных, в случаях экспрессии p53 в опухолевых клетках

[80, 83, 108, 163]. В других, наоборот, наличие экспрессии p53 связывают с благоприятным прогнозом [216].

Сведения о прогностической значимости маркеров пролиферативной активности и апоптоза в прогрессии реактивных и диспластических изменений отсутствуют. При этом большинство публикаций свидетельствует о возрастании этих параметров в ряду гиперплазия – метаплазия – дисплазия. [237, 300, 365]. Исследование нами показателей экспрессии Ki-67, p53, Vcl-2 в участках базальноклеточной гиперплазии, плоскоклеточной метаплазии и дисплазии, выявляемых в пределах одного бронха, подтвердило эту закономерность. Увеличение доли клеток, экспрессирующих Ki-67, p53 и Vcl-2 в последовательности базальноклеточная гиперплазия – плоскоклеточная метаплазия – дисплазия, по-видимому, не зависит от индивидуальных особенностей, поскольку наблюдается при сочетании разных форм предопухолевых изменений в бронхиальном эпителии одного больного. Вероятно, развитие неопластического процесса обусловлено не столько генетическими изменениями, возникающими при дисплазии I-II, сколько экспансией клона клеток, появляющихся уже в очагах плоскоклеточной метаплазии или даже в участках базальноклеточной гиперплазии. Также нами было установлено, что несмотря на идентичность морфологических процессов, базальноклеточная гиперплазия, сочетающаяся с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-), характеризуется более выраженной экспрессией маркеров пролиферативной активности и апоптоза, и меньшим числом дифференцированных CD138+ клеток, по сравнению с «изолированной» базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ-Д-). Данный факт может свидетельствовать о различиях биологических свойств морфологически идентичных клеток базальноклеточной гиперплазии при наличии или отсутствии признаков ее прогрессии в направлении плоскоклеточной метаплазии.

Результаты нашего исследования показали идентичность экспрессионных параметров плоскоклеточной метаплазии, не зависимо от наличия или отсутствия диспластических изменений в эпителии этого же бронха. При этом, в участках бронхиального эпителия с плоскоклеточной метаплазией и дисплазией, отсутствовала экспрессия syndecan-1 (CD138). Экспрессия CD138 наблюдается в дифференцированном многослойном плоском эпителии [55, 56, 155, 183, 354, 364]. Имеющиеся в литературе сведения о его экспрессии в эпителии, противоречивы. В эпителии шейки матки описана экспрессия CD138 в неизменном и метапластическом плоском эпителии. При низкодифференцированном плоскоклеточном раке шейки матки отмечено снижение количества CD138+ клеток, вплоть до полного отсутствия экспрессии [183]. В нормальном эпителии полости рта показано, что экспрессия CD138 в несколько раз выше, чем при диспластических изменениях. Однако статистически значимой разницы между дисплазией (I-III), раком *in situ* и инвазивным раком выявлено не было. [364]. Отсутствие в нашем исследовании экспрессии CD138 в участках плоскоклеточной метаплазии, может свидетельствовать об утрате контроля над процессом дифференцировки клеток уже при данном процессе.

4.3. Особенности воспалительной реакции вблизи различных вариантов сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия при немелкоклеточном раке легкого

Развитие предопухолевых изменений, как правило, происходит на фоне хронического воспаления [48, 106, 111, 126, 150, 167, 180, 271, 290, 311, 342, 369, 424]. Характер этих изменений может быть связан с вариантом местной воспалительной реакции. Представляло интерес сопоставить особенности воспалительной реакции при различных вариантах сочетания морфологических процессов. Для оценки особенностей характера воспалительной реакции, в каждом случае отдельно, изучался состав воспалительного инфильтрата вблизи каждого из вариантов морфологических изменений бронхиального эпителия (например, в группе БКГ+ПМ+Д-, подсчитывалось количество лейкоцитов отдельно в участках под базальноклеточной гиперплазией и плоскоклеточной метаплазией).

4.3.1. Сравнительная характеристика воспалительного инфильтрата вблизи различных вариантов базальноклеточной гиперплазии при плоскоклеточном раке легкого

В воспалительном инфильтрате около нормального бронхиального эпителия, отдаленного от плоскоклеточного рака легкого, плотность инфильтрации лейкоцитами составила $5,8 \pm 3,1$ на мм^2 (таблица 19). Больше всего было CD3+ Т-лимфоцитов – $(12,2 \pm 1,3)\%$, и CD68+ макрофагов – $(11,7 \pm 1,7)\%$, меньше – CD138+ плазматических клеток $(9,2 \pm 1,4)\%$ и CD 20+ В-лимфоцитов – $(9,9 \pm 1,1)\%$ (таблица 20).

Плотность инфильтрации лейкоцитами вблизи «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-) была выше – $14,2 \pm 4,7$ клеток/ мм^2 , чем в строме нормального эпителия ($p=0,0001$, таблица 19).

Таблица 19 – Плотность воспалительного инфильтрата вблизи различных вариантов морфологических изменений бронхиального эпителия, отдаленного от плоскоклеточного рака

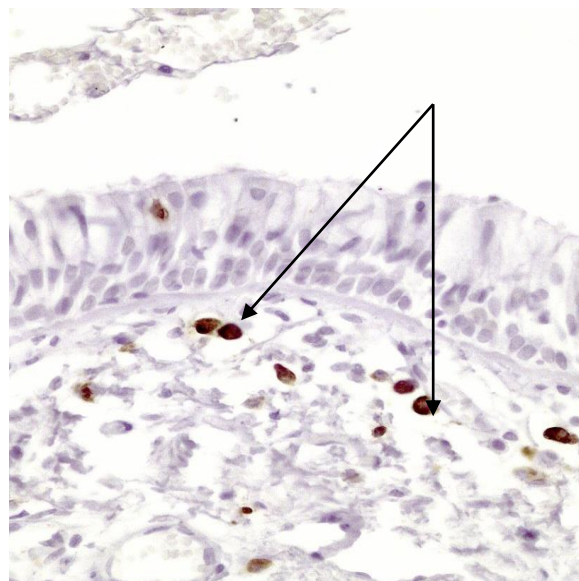
	Количество лейкоцитов на 1 мм ²	
	M±SD	p
1. БКГ-ПМ-Д- n=9	5,8±3,1	
2. БКГ (БКГ+ПМ-Д-) n=55	14,2±4,7	p ₁₋₂ =0,0001
3. БКГ (БКГ+ПМ+Д-) n=30	15,7±4,5	p ₂₋₃ =0,10
4. ПМ (БКГ+ПМ+Д-) n=30	12,9±4,4	p ₁₋₄ =0,0001 p ₃₋₄ =0,003
5. ПМ (БКГ-ПМ+Д+) n=7	14,2±6,3	p ₄₋₅ =0,53
6. ДП-Ш (БКГ-ПМ+Д+) n= 7	11,4±6,1	p ₁₋₆ =0,03 p ₅₋₆ =0,14

Также в воспалительном инфильтрате под «изолированной» базальноклеточной гиперплазией, в отличие от инфильтрата вблизи нормального эпителия, было больше всех типов лейкоцитов: CD138 – (13,3±3,4)% (p₁₋₂=0,0007), CD 68 – (23,1±3,6)% (p₁₋₂=0,00001), CD3 – (28,8±4,6)% (p₁₋₂=0,00001) и CD20 – (14,5±1,6)% (p₁₋₂=0,0000, таблица 20, рисунок 31).

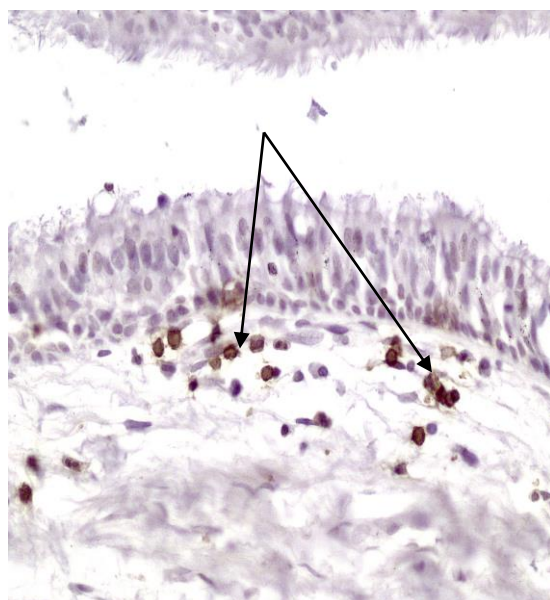
Выраженность инфильтрации стромы лейкоцитами около сочетанной базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ+Д-) составила 15,7±4,5 клеток/мм². На уровне тенденции (p=0,10), плотность инфильтрата оказалась выше, чем вблизи «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (таблица 19).



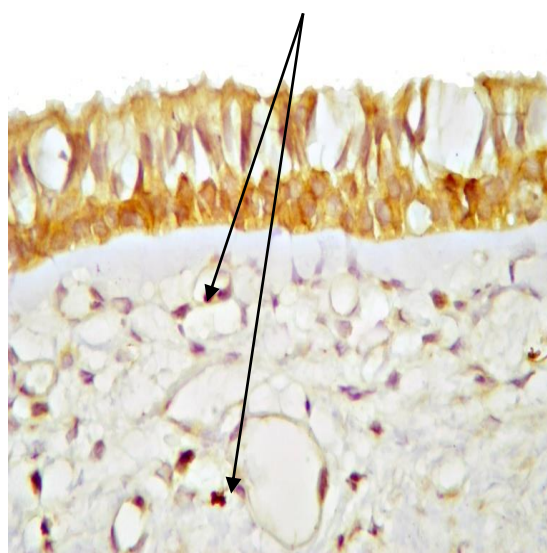
А



Б



В



Г

Рисунок 31. А – Выраженная инфильтрация CD68+ клетками при БКГ (БКГ+ПМ-Д-), х400; Б – инфильтрация CD3+ Т-лимфоцитами в воспалительном инфильтрате вблизи базальноклеточной гиперплазии, х400; В – инфильтрация CD20+ В-лимфоцитами в воспалительном инфильтрате вблизи базальноклеточной гиперплазии, х400; Г – CD 138+ плазматические клетки в воспалительном инфильтрате вблизи нормального бронхиального эпителия, х400.

Таблица 20 – Иммунофенотип воспалительного инфильтрата вблизи различных вариантов морфологических изменений бронхиального эпителия при плоскоклеточном раке легкого

	CD 138	CD 68	CD 3	CD 20
	M±SD (%)	M±SD (%)	M±SD (%)	M±SD (%)
1. БКГ-ПМ-Д- n=9	9,2±1,4	11,7±1,7	12,2±1,3	9,9±1,1
2. БКГ (БКГ+ПМ-Д-) n=55	13,3±3,4	23,1±3,6	28,8±4,6	14,5±1,6
	p ₁₋₂ =0,0007	p ₁₋₂ =0,00001	p ₁₋₂ =0,00001	p ₁₋₂ =0,0000
3. БКГ (БКГ+ПМ+Д-) n=30	23,6±1,8	18,1±4,9	33,1±4,7	17,3±2,1
	p ₁₋₃ =0,00001 p ₂₋₃ =0,0002	p ₁₋₃ =0,0005 p ₂₋₃ =0,004	p ₁₋₃ =0,0000 p ₂₋₃ =0,008	p ₁₋₃ =0,0000 p ₂₋₃ =0,0001
4. ПМ (БКГ+ПМ+Д-) n=30	15,1±3,7	15,2±4,9	18,6±3,8	12,3±3,4
	p ₃₋₄ =0,004	p ₃₋₄ =0,03	p ₃₋₄ =0,0001	p ₃₋₄ =0,0002
5. ПМ (БКГ-ПМ+Д+) n=7	16,6±5,1	21,3±8,9	17,4±4,2	11,5±3,4
	p ₄₋₅ =0,33	p ₄₋₅ =0,01	p ₄₋₅ =0,42	p ₄₋₅ =0,53
6. ДП-Ш (БКГ-ПМ+Д+) n= 7	18,6±6,5	15,02±8,7	9,6±3,3	8,1±4,6
	p ₄₋₆ =0,06 p ₅₋₆ =0,5	p ₄₋₆ =0,94 p ₅₋₆ =0,07	p ₄₋₆ =0,0000 p ₅₋₆ =0,002	p ₄₋₆ =0,004 p ₅₋₆ =0,05

Несмотря на морфологическую идентичность «изолированной» (БКГ+ПМ-Д-) и сочетанной с плоскоклеточной метаплазией базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ+Д-), в воспалительном инфильтрате вблизи последней, определялось большее количество CD138+ плазматических клеток (23,6±1,8)% (p₂₋₃=0,0002), CD3 Т – (33,1±4,7)% (p₂₋₃=0,008) и CD20 В – лимфоцитов (17,3±2,1)% (p₂₋₃=0,0001, таблица 20). При этом было меньше число CD68+ макрофагов – (18,1±4,9)% против (23,1±3,6)% в инфильтрате «изолированной» БКГ (p₂₋₃=0,004, таблица 20).

Таким образом, воспалительный инфильтрат вблизи различных вариантов базальноклеточной гиперплазии отличался по процентному содержанию лейкоцитов. Инфильтрат под сочетанной базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ+Д-) характеризовался более выраженной инфильтрацией CD138+ плазматическими клетками, CD3 T – и CD20 B – лимфоцитами. При этом в воспалительном инфильтрате под сочетанной базальноклеточной гиперплазией было меньше количество CD68+ макрофагов.

4.3.2. Сравнительная характеристика воспалительного инфильтрата вблизи базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии при плоскоклеточном раке легкого

При сопоставлении характера воспалительного инфильтрата под очагами базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии в группе БКП+ПМ+Д- между собой, была отмечена следующая особенность. Плотность инфильтрации лейкоцитами под участками плоскоклеточной метаплазии составила $12,9 \pm 4,4$ клеток/мм² и была менее выражена, чем вблизи участков базальноклеточной гиперплазии – $15,7 \pm 4,5$ клеток/мм² ($p=0,003$, таблица 19). В воспалительном инфильтрате вблизи плоскоклеточной метаплазии отмечалось меньше CD3+ T – ($18,6 \pm 3,8$)% ($p_{3-4}=0,0001$) и CD20+ B – лимфоцитов ($12,3 \pm 3,4$)% ($p_{3-4}=0,0002$), CD68+ макрофагов ($15,2 \pm 4,9$)% ($p_{3-4}=0,03$) и CD138+ плазматических клеток ($15,1 \pm 3,7$)% ($p_{3-4}=0,004$, таблица 20)

Таким образом, воспалительный инфильтрат вблизи базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии, наблюдаемых в пределах одного исследуемого бронха, отличался по составу. Выраженность инфильтрации лейкоцитами в строме плоскоклеточной метаплазией была меньше, чем вблизи участков базальноклеточной гиперплазии. Клеточный состав инфильтрата вблизи

плоскоклеточной метаплазии характеризовался также меньшим числом CD138+ плазматических клеток, CD68+ макрофагов, CD3+ Т – и CD20+ В – лимфоцитов.

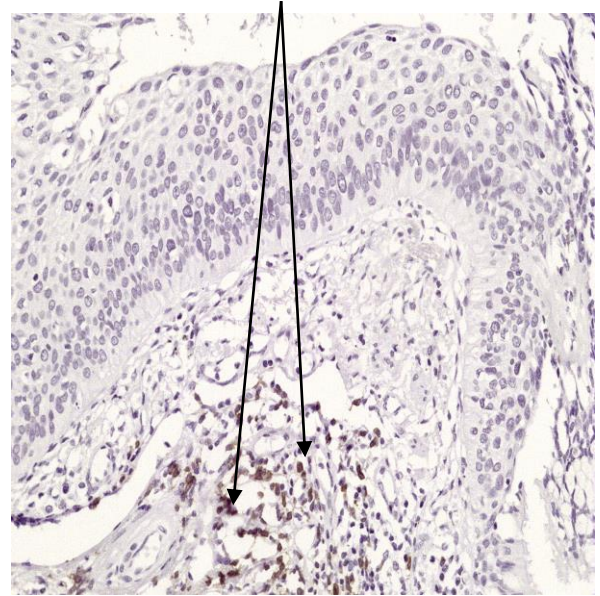
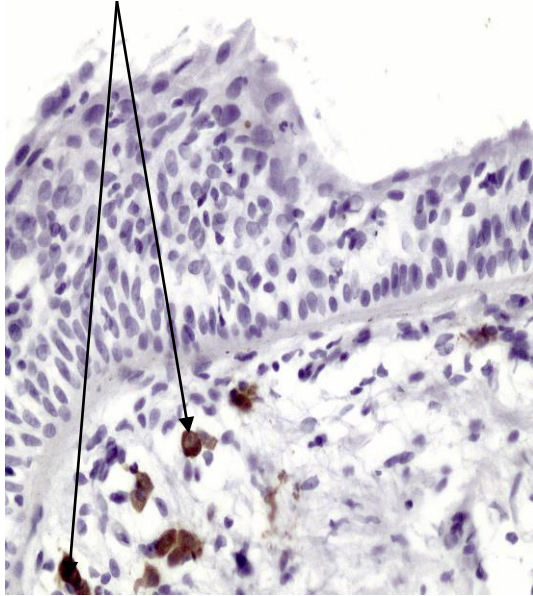
4.3.3. Сравнительная характеристика воспалительного инфильтрата вблизи различных вариантов плоскоклеточной метаплазии при плоскоклеточном раке легкого

По плотности инфильтрации стромы лейкоцитами различные варианты плоскоклеточной метаплазии (сочетающейся с БКГ и сочетающейся с дисплазией) не отличались – $12,9 \pm 4,4$ и $14,2 \pm 6,3$ клеток/мм² соответственно ($p=0,53$, таблица 19). По клеточному составу, инфильтрат разных вариантов плоскоклеточной метаплазии отличался только лишь большим числом CD68+ макрофагов в воспалительном инфильтрате около плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с дисплазией (БКГ-ПМ+Д+) – $(21,3 \pm 8,9)\%$ против $(15,2 \pm 4,9)\%$ при плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с базальноклеточной гиперплазией ($p_{4-5}=0,01$; таблица 20, рисунок 32).

Таким образом, воспалительный инфильтрат плоскоклеточной метаплазии был одинаков по своим характеристикам и не зависел от варианта ее сочетания с другими процессами.

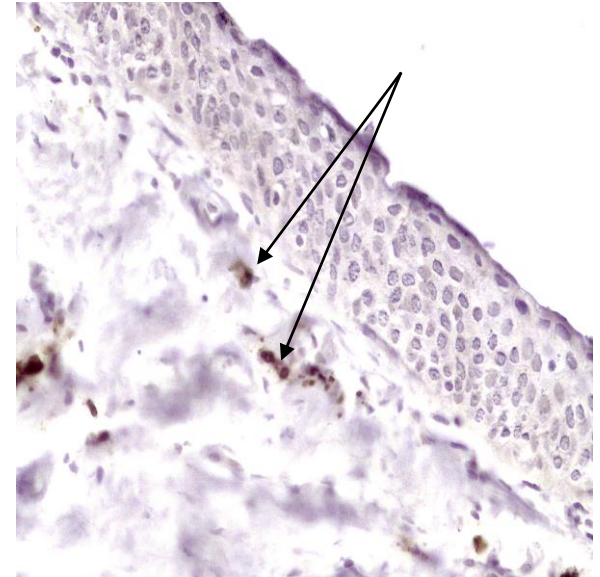
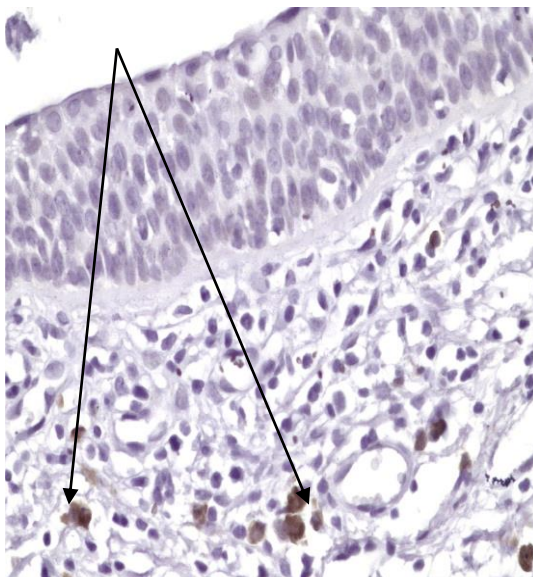
4.3.4. Сравнительная характеристика воспалительного инфильтрата вблизи участков плоскоклеточной метаплазии и дисплазии бронхиального эпителия при плоскоклеточном раке легкого

Плотность инфильтрации стромы лейкоцитами вблизи дисплазии II-III степени на уровне тенденции была меньше, чем около очагов плоскоклеточной метаплазии – $11,4 \pm 6,1$ против $14,2 \pm 6,3$ клеток/мм² ($p=0,14$, таблица 19).



А

Б



В

Г

Рисунок 32. А – инфильтрация CD 68+ макрофагами в воспалительном инфильтрате вблизи плоскоклеточной метаплазии, x400; Б – инфильтрация CD3+ Т – лимфоцитами в воспалительном инфильтрате вблизи плоскоклеточной метаплазии, x200; В – CD20+ В-лимфоциты в воспалительном инфильтрате вблизи плоскоклеточной метаплазии, x400; Г – CD 138+ плазматические клетки в воспалительном инфильтрате вблизи плоскоклеточной метаплазии, x400

Клеточный состав воспалительного инфильтрата вблизи дисплазии, в отличие от плоскоклеточной метаплазии, характеризовался меньшим числом CD3+ Т – (9,6±3,3)%, против (17,4±4,2)% ($p_{5-6}=0,002$) и CD20+ В – лимфоцитов (8,1±4,60%, против (11,5±3,4)% ($p_{5-6}=0,05$)). При этом, по числу CD138+ плазматических клеток и CD68+ макрофагов, воспалительная инфильтрация вблизи дисплазии и плоскоклеточной метаплазии не отличалась (таблица 20).

Таким образом, воспалительный инфильтрат вблизи дисплазии II – III степени, в отличие от других морфологических изменений, характеризовался меньшей плотностью инфильтрации стромы лейкоцитами, а также снижением числа Т – и В – лимфоцитов.

4.3.5. Сравнительная характеристика воспалительного инфильтрата вблизи различных вариантов сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия при аденокарциноме легкого

Плотность инфильтрации лейкоцитами стромы вблизи нормального эпителия бронхиального эпителия, отдаленного от опухоли, составила 4,1±2,3 клеток/мм² (таблица 21). Вблизи «изолированной» базальноклеточной гиперплазии она была уже более выраженной – 13,8±4,03 клеток/мм² ($p=0,0004$, таблица 21). Кроме того, в воспалительном инфильтрате под «изолированной» базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ-Д-), по сравнению с нормальным эпителием, было большим процентное содержание различных типов лейкоцитов (таблица 22).

Плотность инфильтрации лейкоцитами вблизи базальноклеточной гиперплазии сочетанной с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-), на уровне тенденции была больше – 15,8±4,7 клеток/мм², чем вблизи изолированной БКГ – 15,8±4,7 клеток/мм² (БКГ+ПМ-Д-, $p=0,18$, таблица 22).

Таблица 21 – Плотность воспалительного инфильтрата вблизи различных вариантов морфологических изменений бронхиального эпителия, отдаленного от аденокарциномы легкого

	Количество лейкоцитов на 1 мм ²	
	M±SD	p
1. Норма n=11	4,1±2,3	
2. БКГ (БКГ+ПМ-) n=40	13,8±4,03	p ₁₋₂ =0,0004
3. БКГ (БКГ+ПМ+) n=15	15,8±4,7	p ₂₋₃ =0,18
4. ПМ (БКГ+ПМ+) n=15	9,6±3,1	p ₁₋₄ =0,001 p ₃₋₄ =0,005

Таблица 22 – Иммунофенотип воспалительного инфильтрата вблизи различных вариантов морфологических изменений бронхиального эпителия при аденокарциноме легкого

	CD 138	CD 68	CD 3	CD 20
	M±SD	M±SD	M±SD	M±SD
1. БКГ-ПМ-Д- n=8	8,8±1,2	10,2±1,9	11,8±1,5	9,1±1,7
2. БКГ (БКГ+ПМ-Д-) n=40	12,6±2,1	20,9±3,1	29,6±4,3	13,8±2,3
	p ₁₋₂ =0,0001	p ₁₋₂ =0,0000	p ₁₋₂ =0,0000	p ₁₋₂ =0,0001
3. БКГ (БКГ+ПМ+Д-) n=15	19,7±5,3	18,2±3,3	36,8±2,1	15,1±2,4
	p ₁₋₃ =0,0000 p ₂₋₃ =0,0000	p ₁₋₃ =0,0000 p ₂₋₃ =0,02	p ₁₋₃ =0,0000 p ₂₋₃ =0,001	p ₁₋₃ =0,0000 p ₂₋₃ =0,22
4. ПМ (БКГ+ПМ+Д-) n=15	17,5±4,6	15,3±5,7	18,1±2,9	11,8±2,8
	p ₃₋₄ =0,23	p ₃₋₄ =0,07	p ₃₋₄ =0,0001	p ₂₋₄ =0,11 p ₃₋₄ =0,02

Клеточный состав инфильтрата вблизи сочетанной базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ+Д-), в отличие от «изолированной» БКГ (БКГ+ПМ-Д-), характеризовался увеличением числа CD138+ плазматических клеток – $(19,7 \pm 5,3)\%$, против $(12,6 \pm 2,1)\%$ ($p_{2-3}=0,0000$) и CD3+ Т – лимфоцитов – $(36,8 \pm 2,1)\%$ против $(29,6 \pm 4,3)\%$ ($p_{2-3}=0,001$, таблица 22). В тоже время, наблюдалось уменьшение количества CD68+ макрофагов – $(18,2 \pm 3,3)\%$, против $(20,9 \pm 3,1)\%$ ($p_{2-3}=0,02$, таблица 22). По числу CD20+ В-лимфоцитов воспалительный инфильтрат около различных вариантов базальноклеточной гиперплазии не имел статистически значимых различий (таблица 22).

Плотность инфильтрации лейкоцитами вблизи плоскоклеточной метаплазии в группе БКГ+ПМ+Д- была меньше – $(9,6 \pm 3,1)\%$ клеток, чем под очагами базальноклеточной гиперплазии – $(15,8 \pm 4,7)\%$ ($p=0,005$, таблица 21). Сопоставление характера воспалительного инфильтрата базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии между собой (группа БКГ+ПМ+Д-) показало, что в инфильтрате под очагами последней была меньшей доля CD3+ Т – $(18,1 \pm 2,9)\%$ ($p_{3-4}=0,0001$) и CD20+ В – лимфоцитов $(11,8 \pm 2,8)\%$ ($p_{3-4}=0,02$, таблица 22)

Таким образом, изменение характера воспалительной реакции под очагами различных вариантов морфологических изменений бронхиального эпителия в случаях аденокарциномы легкого, имело ту же направленность, что и при соответствующих морфологических процессах плоскоклеточного рака. Дисплазии бронхиального эпителия при аденокарциноме легкого, как отмечалось выше, выявлено не было.

Проведенное исследование показало, что изменение плотности воспалительного инфильтрата вблизи различных вариантов морфологических изменений бронхиального эпителия бронхов мелкого калибра, отдаленных от плоскоклеточного рака и аденокарциномы легкого, имело одну направленность. Плотность воспалительного инфильтрата

вблизи нормального бронхиального эпителия была наименее выраженной, чем при различных вариантах базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии, а также дисплазии II-III степени, в случаях плоскоклеточной карциномы. Причем, плотность инфильтрации стромы лейкоцитами при сочетании базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии (БКГ+ПМ+), наблюдаемом в пределах одного исследуемого бронха, была меньше под участками метаплазии, чем под очагами базальноклеточной гиперплазии в 1,2 раза при плоскоклеточном раке, и 1,6 – при аденокарциноме легкого. Выраженность инфильтрации лейкоцитами вблизи базальноклеточной гиперплазии, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-), на уровне тенденции больше, нежели вблизи «изолированной» БКГ (БКГ+ПМ-Д-). Плотность инфильтрации лейкоцитами стромы вблизи дисплазии II-III степени, выявленной только в случаях плоскоклеточной карциномы, была менее выраженной (на уровне тенденции), чем под очагами плоскоклеточной метаплазии (группа БКГ-ПМ+Д+).

Кроме того, отмечено, что каждому из вариантов изменений соответствует свой характер воспаления. В пределах одного фрагмента слизистой бронха, воспалительный инфильтрат вблизи очагов базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии отличался по составу. Воспалительный инфильтрат около плоскоклеточной метаплазии характеризовался меньшим числом плазматических, макрофагов, Т – и В – лимфоцитов.

Выраженность воспалительных изменений под участками базальноклеточной гиперплазии зависела от того, сопровождается или нет последняя плоскоклеточной метаплазией. Воспалительный инфильтрат вблизи базальноклеточной гиперплазии, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией, характеризовался большим количеством плазматических клеток, Т – и В – лимфоцитов, а также уменьшением числа макрофагов.

Характер воспалительной реакции вблизи плоскоклеточной метаплазии не зависел от варианта ее сочетания с другими процессами. Исключение составила более выраженная инфильтрация под очагами плоскоклеточной метаплазии CD68+ макрофагами, в случаях ее сочетания с дисплазией (БКГ-ПМ+Д+), при плоскоклеточном раке легкого.

Согласно данным литературы, в стромальном компоненте НМРЛ наблюдается выраженная инфильтрация воспалительными и иммунными клетками: Т – и В – лимфоцитами, макрофагами, плазматическими, тучными клетками и другими типами лейкоцитов [51, 52, 72, 89, 170, 187, 215, 352, 358]. Причем было показано, что число всех опухоль – ассоциированных иммуноцитов, за исключением MUM1+ клеток, коррелировало со стадией процесса, и было значительно выше при Т3 стадии НМРЛ. Однако, при этом не зависело от гистотипа, размера опухоли, и не было связано с характером лимфогенного метастазирования [62].

Хорошо известно, что хроническое воспаление предшествует немелкоклеточному раку легкого [290]. Не только высокий риск его развития, но и неблагоприятный исход после лечения, связывают с хронической обструктивной болезнью легких [325]. Связь между воспалением и НМРЛ, по-видимому, обусловлена тем, что в условиях хронического воспаления, лежащего в основе ХОБЛ, происходят реактивные изменения бронхиального эпителия: базальноклеточная гиперплазия и плоскоклеточная метаплазия. Именно они, как правило, являются основой для развития дисплазии и рака легких [48, 57, 106, 162, 234, 300, 347].

Согласно данным M. Herfs et. al. (2012), в участках базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии слизистая инфильтрирована различными лейкоцитами, в том числе: Т – и В – лимфоцитами, тучными клетками, макрофагами и т.д. [170] Секретция клетками воспалительного

инфильтрата в окружающую среду разнообразных факторов (EGFR, TGF- β) и цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-6) способствует изменению регуляции различных клеточных процессов, в том числе пролиферации, дифференцировки и выживаемости клеток [68, 143, 154, 170]. Воспалительные медиаторы могут способствовать последующей злокачественной трансформации плоскоклеточной метаплазии, вызывая генетические и эпигенетические изменения [48, 153, 170]. В нашем исследовании, наибольшее число практически всех типов лейкоцитов отмечалось в инфильтрате около базальноклеточной гиперплазии, в случаях ее сочетания с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-). В инфильтрате же плоскоклеточной метаплазии и дисплазии, число всех лейкоцитов было меньше. Данный факт предполагает, что особый характер воспаления при сочетанной базальноклеточной гиперплазии, может быть определяющим в ее биологических отличиях от других типов реактивных изменений, и способствует дальнейшей прогрессии к дисплазии.

4.4. Влияние неoadьювантной химиотерапии на частоту встречаемости и морфофункциональные характеристики вариантов сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия при немелкоклеточном раке легкого

Пациентам немелкоклеточным раком легкого проводится неoadьювантная химиотерапия. При этом сведения о влиянии НАХТ на характер морфологических процессов, развивающихся в отдаленных от опухоли участках слизистой бронхов, отсутствуют. Поэтому мы оценили влияние НАХТ на частоту встречаемости различных морфологических изменений бронхиального эпителия. Кроме того, был исследован характер экспрессии маркеров пролиферативной активности, апоптоза и клеточной дифференцировки при разных вариантах изменений эпителия бронхов в случаях, когда проводилась НАХТ и без таковой.

Из 105 больных плоскоклеточным раком легкого 57 (54,3%) получили НАХТ. По частоте встречаемости различных вариантов сочетаний морфологических изменений в эпителии бронхов, группы пациентов получивших НАХТ и без таковой, не имели различий (таблица 22).

При аденокарциноме легкого НАХТ проводилась в 29/67 (43,3%) случаях. Встречаемость разных вариантов сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия, также не зависела от полученного лечения (таблица 23).

При плоскоклеточном раке легкого, в группе без проведения неoadьювантной химиотерапии, экспрессия изучаемых маркеров зависела от варианта сочетаний морфологических изменений эпителия (таблица 24). Значения показателей пролиферативной активности и апоптоза увеличивались от «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-) к БКГ, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-), и далее по мере нарастания степени тяжести

морфологических изменений бронхиального эпителия, как описывалось выше (глава 4.2).

Таблица 23 – Частота встречаемости различных вариантов морфологических изменений бронхиального эпителия, в зависимости от проведения пациентам неoadьювантной химиотерапии при немелкоклеточном раке легкого

Процесс	Плоскоклеточный рак n=105, (%)		Аденокарцинома легкого n=67, (%)	
	НАХТ -	НАХТ +	НАХТ -	НАХТ +
БКГ+ПМ-Д-	23/55 (41,8)	32/55 (58,2)	23/40 (57,5)	17/40 (42,5)
	p=0,23		p=0,35	
БКГ+ПМ+Д-	12/30 (40,0)	18/30 (60,0)	8/15 (53,3)	7/15 (46,7)
	p=0,29		p=0,80	
БКГ-ПМ+Д+	8/11 (72,7)	3/11 (27,3)	1/1	0/1
	p=0,07		-	
БКГ-ПМ-Д-	5/9 (55,6)	4/9 (44,4)	6/11 (54,5)	5/11 (45,5)
	p=0,75		p=0,77	

Больше всего клеток с экспрессией CD138 было в нормальном (БКГ-ПМ-Д-) эпителии бронхов, и в случаях «изолированной» базальноклеточной гиперплазии, меньше – при БКГ, сочетающейся с ПМ (БКГ+ПМ+Д-, таблица 24). В клетках плоскоклеточной метаплазии и дисплазии экспрессия CD138 отсутствовала (таблица 24). Следует отметить, что в случаях, когда больным проводилась НАХТ, экспрессионный профиль различных вариантов морфологических изменений бронхиального эпителия изменялся подобным образом, как и в группе без лечения (таблица 24). Статистически значимых различий между аналогичными вариантами морфологических изменений эпителия у пациентов, получивших НАХТ и в ее отсутствии, выявлено не было

Таблица 24 – Зависимость экспрессии маркеров пролиферативной активности, апоптоза и клеточной дифференцировки от проведения НАХТ и характера морфологических изменений бронхиального эпителия при плоскоклеточном раке легкого

Процесс (НАХТ-/ НАХТ+)	% клеток с позитивной экспрессией							
	Ki67		p53		Bcl2		CD138	
	НАХТ -	НАХТ+	НАХТ -	НАХТ+	НАХТ -	НАХТ+	НАХТ -	НАХТ+
БКГ-ПМ-Д- n=9 (5/4)	10,4±6,1	13,1±2,2	5,0±1,7	4,1±2,2	5,2±2,8	5,9±2,1	59,3±4,2	56,2±2,3
	p=0,43		p=0,51		p=0,69		p=0,23	
БКГ БКГ+ПМ-Д- n=55 (23/32)	18,5±0,7	16,8±4,6	10,1±3,1	9,2±1,4	9,9±3,9	9,1±2,4	39,1±3,8	37,4±3,1
	p=0,08		p=0,15		p=0,35		p=0,07	
БКГ БКГ+ПМ+Д- n=30 (12/18)	34,5±3,6	32,1±3,8	14,3±5,6	13,2±6,3	11,1±4,2	9,1±4,4	23,2±2,2	21,3±3,7
	p=0,09		p=0,57		p=0,23		p=0,12	
ПМ БКГ+ПМ+Д+ n=30 (12/18)	49,2±8,1	46,4±9,6	30,5±6,5	27,4±9,2	29,9±3,2	28,1±5,7	0	0
	p=0,41		p=0,32		p=0,33			
ПМ БКГ-ПМ+Д+ n=11 (8/3)	60,1±2,1	57,3±3,3	30,1±3,1	28,7±2,2	22,9±3,1	20,7±2,3	0	0
	p=0,12		p=0,50		p=0,30			
Д II-III БКГ-ПМ+Д+ n=10 (8/3)	78,5±12,3	71,1±10,7	40,3±13,5	46,5±2,1	34,3±8,1	32,5±9,3	0	0
	p=0,46		p=0,55		p=0,79			

Таблица 25 – Зависимость экспрессии маркеров пролиферативной активности, апоптоза и клеточной дифференцировки от проведения НАХТ и характера морфологических изменений бронхиального эпителия при аденокарциноме легкого

Процесс (НАХТ- /НАХТ+)	% клеток с позитивной экспрессией							
	Ki 67		p53		Bcl2		CD 138	
	НАХТ -	НАХТ+	НАХТ -	НАХТ+	НАХТ -	НАХТ+	НАХТ -	НАХТ+
БКГ-ПМ-Д- n=11 (6/5)	12,1±3,5	14,2±7,1	4,5±1,7	3,8±1,8	5,4±4,8	5,2±3,7	58,1±4,2	57,8±1,7
	p=0,54		p=0,52		p=0,94		p=0,88	
БКГ БКГ+ПМ-Д- n=40 (23/17)	17,5±0,7	16,9±3,6	9,0±2,1	9,9±1,4	9,1±4,2	9,8±2,1	41,1±1,8	39,7±3,1
	p=0,44		p=0,13		p=0,53		p=0,08	
БКГ БКГ+ПМ+Д- n=15 (8/7)	33,1±8,2	30,1±6,8	13,4±5,8	14,1±5,6	16,2±3,3	17,6±4,6	23,1±1,6	21,8±2,5
	p=0,46		p=0,82		p=0,51		p=0,24	
ПМ БКГ+ПМ+Д- n=15 (8/7)	48,0±5,6	46,0±8,5	29,0±7,0	26,0±11,3	29,1±4,2	27,8±6,4	0	0
	p=0,59		p=0,78		p=0,64		-	

Характер экспрессии маркеров пролиферативной активности, апоптоза и клеточной дифференцировки в группах больных с химиотерапевтическим лечением и без него при аденокарциноме легкого, изменялся таким же образом, как при плоскоклеточном раке. Наименьшие значения показателей экспрессии маркеров пролиферативной активности и апоптоза были в неизмененном бронхиальном эпителии (БКГ-ПМ-Д-) и при «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-). Значимо больше Ki67+, p53+ и Vcl-2+ клеток было в случаях сочетанной БКГ (БКГ+ПМ+Д-) и плоскоклеточной метаплазии (таблица 25). Уровень экспрессии маркера клеточной дифференцировки CD138, наоборот снижался в данной последовательности вплоть до полного отсутствия позитивных клеток в плоскоклеточной метаплазии (таблица 25).

Следует отметить, что экспрессионные характеристики клеток при наиболее часто встречаемых изменениях бронхиального эпителия, «изолированной» (БКГ+ПМ-Д-) и сочетанной (БКГ+ПМ+Д-) базальноклеточной гиперплазии (n>10), не зависели от эффекта, оказанного НАХТ на опухоль (таблица 26). Значения показателей пролиферативной активности, апоптоза и дифференцировки плоского эпителия в группе с частичной регрессией немелкоклеточной карциномы не имели статистически значимых различий, в сравнении с группой пациентов, у которых отмечалась стабилизация опухолевого процесса после проведения НАХТ (таблица 26).

Выраженность воспалительной инфильтрации вблизи различных вариантов морфологических изменений не зависела от того, проводилась неоадьювантная химиотерапия при НМРЛ или нет (таблица 27). Клеточный состав воспалительного инфильтрата вблизи одинаковых морфологических изменений бронхиального эпителия, в случаях проведения пациентам НАХТ, и без таковой, не отличался как при плоскоклеточном раке (таблица 28), так и при аденокарциноме

Таблица 26 – Характер экспрессии маркеров пролиферативной активности, апоптоза и клеточной дифференцировки, в зависимости от варианта морфологических изменений бронхиального эпителия и эффекта НАХТ при немелкоклеточном раке легкого

Процесс n, (I/II)	Количество клеток с экспрессией маркера, %							
	Ki 67		p53		Bcl-2		CD 138	
	Эффект НАХТ							
	I	II	I	II	I	II	I	II
1.БКГ+ (БКГ+ПМ-Д-)* n=32 (13/19)	15,9±3,9	16,5±2,3	8,5±3,2	9,9±2,1	8,9±2,6	9,2±3,1	38,3±2,8	35,7±2,2
	p I-II=0,58		p I-II=0,14		p I-II=0,77		p I-II=0,66	
2.БКГ+ (БКГ+ПМ+Д-)* n=18 (7/11)	31,9±1,7	32,9±1,9	12,4±3,2	13,5±3,6	8,7±1,2	9,3±2,1	22,1±2,6	19,8±3,4
	p I-II=0,27		p I-II=0,52		p I-II=0,50		p I-II=0,15	
3.ПМ+ (БКГ+ПМ+Д-)* n=18 (7/11)	45,0±8,9	47,6±7,2	21,2±8,4	29,3±9,6	21,5±9,9	26,2±8,7	0	0
	p I-II=0,50		p I-II=0,08		p I-II=0,30			
4.БКГ+ (БКГ+ПМ-Д-)# n=17 (7/10)	15,7±2,7	16,1±3,1	8,7±1,6	9,0±1,9	8,9±3,1	9,4±3,5	39,8±1,7	38,2±2,1
	p I-II=0,78		p I-II=0,73		p I-II=0,76		p I-II=0,12	

Примечание: I – частичная регрессия опухоли; II – стабилизация; * - плоскоклеточный рак; # - аденокарцинома легкого

Таблица 27 – Выраженность воспалительной инфильтрации вблизи различных вариантов морфологических изменений бронхиального эпителия при НМРЛ, в зависимости от проведения НАХТ

Процесс	Количество лейкоцитов на мм ² M±SD			
	Плоскоклеточный рак		Аденокарцинома легкого	
	НАХТ-	НАХТ+	НАХТ-	НАХТ+
БКГ-ПМ-Д-	4,03±2,9	6,9±2,9	2,6±1,04	4,6±2,07
	p=0,23		p=0,12	
БКГ (БКГ+ПМ-Д-)	13,2±4,9	15,3±4,3	12,3±4,6	14,6±3,5
	p=0,11		p=0,10	
БКГ (БКГ+ПМ+Д-)	15,01±5,7	16,0±4,1	14,9±5,4	16,7±4,1
	p=0,60		p=0,65	
ПМ (БКГ+ПМ+Д-)	12,9±2,4	13,1±3,1	8,9±4,2	9,9±3,1
	p=0,88		p=0,71	
ПМ (БКГ-ПМ+Д+)	13,0±6,5	16,4±1,6	-	-
	p=0,20			
Д (БКГ-ПМ+Д+)	10,9±1,5	11,3±6,4	-	-
	p=0,60			

легкого (таблица 29).

Таким образом, проведение больным неoadьювантной химиотерапии при немелкоклеточном раке легкого, не оказывало существенного влияния на частоту встречаемости морфологических изменений, возникающих в отдаленных от опухоли участках слизистой бронха. Кроме того, проведение больным НАХТ не влияло на экспрессионный профиль, выраженность и состав воспалительного инфильтрата различных вариантов изменений бронхиального эпителия, отдаленного от опухоли. Это дает возможность изучать особенности морфологических изменений бронхиального эпителия в случаях, если проводилась неoadьювантная химиотерапия, объединяя в одну группу результаты исследования пациентов которым проводился данный вид лечения и не проводился.

Таблица 28 – Характер воспалительного инфильтрата при различных вариантах морфологических изменений бронхиального эпителия при плоскоклеточном раке легкого, в зависимости от проведения НАХТ

Процесс (НАХТ-/НАХТ+)	% клеток с позитивной экспрессией							
	CD20		CD3		CD68		CD138	
	НАХТ -	НАХТ+	НАХТ -	НАХТ+	НАХТ -	НАХТ+	НАХТ -	НАХТ+
БКГ-ПМ-Д- n=9 (5/4)	9,4±1,6	10,1±1,1	12,0±1,7	11,7±2,1	12,4±3,5	11,3±4,9	8,1±4,5	10,1±2,3
	p=0,65		p=0,56		p=0,98		p=0,20	
БКГ (БКГ+ПМ-) n=55 (23/32)	14,5±1,5	14,3±1,7	28,7±4,2	29,2±5,3	22,8±2,4	23,0±2,3	13,1±1,6	13,3±1,9
	p=0,66		p=0,76		p=0,35		p=0,67	
БКГ (БКГ+ПМ+) n=30 (12/18)	17,9±1,1	17,1±2,4	32,1±6,6	33,5±3,9	19,8±2,5	17,6±4,4	21,4±4,1	24,2±2,5
	p=0,53		p=0,63		p=0,23		p=0,36	
ПМ (БКГ+ПМ+) n=30 (12/18)	9,7±2,4	13,5±3,2	16,05±2,8	19,9±3,7	16,2±4,3	14,8±5,2	14,8±3,1	15,9±3,9
	p=0,06		p=0,1		p=0,53		p=0,75	
ПМ (БКГ-ПМ+) n=11 (8/3)	13,1±2,1	11,8±3,3	18,1±3,1	16,7±3,2	23,9±9,4	15,1±3,2	17,2±5,7	15,4±3,9
	p=0,54		p=0,71		p=0,17		p=0,63	
Д (I-III) n=10 (8/2)	8,2±1,1	7,9±1,2	9,3±1,3	9,8±1,5	18,2±1,1	14,3±4,9	20,6±4,6	14,8±8,6
	p=0,63		p=0,72		p=0,53		p=0,19	

Таблица 29 – Характер воспалительного инфильтрата при различных вариантах морфологических изменений бронхиального эпителия при аденокарциноме легкого, в зависимости от проведения НАХТ

Процесс (НАХТ-/НАХТ+)	% клеток с позитивной экспрессией							
	CD20		CD3		CD68		CD138	
	НАХТ -	НАХТ+	НАХТ -	НАХТ+	НАХТ -	НАХТ+	НАХТ -	НАХТ+
БКГ-ПМ-Д- n=11 (6/5)	8,7±2,6	10,1±1,1	12,0±1,7	11,5±2,1	12,1±1,2	10,7±2,6	7,9±2,8	9,1±3,4
	p=0,26		p=0,23		p=0,92		p=0,37	
БКГ (БКГ+ПМ-) n=40 (23/17)	12,6±2,6	14,1±2,0	27,3±1,2	30,5±3,9	21,2±3,3	20,0±2,3	12,9±1,9	12,2±2,3
	p=0,25		p=0,13		p=0,16		p=0,34	
БКГ (БКГ+ПМ+) n=15 (8/7)	16,7±2,3	15,6±1,8	34,1±1,9	38,7±1,3	17,2±2,5	20,1±4,5	19,4±6,6	20,5±4,4
	p=0,77		p=0,21		p=0,21		p=0,79	
ПМ (БКГ+ПМ+) n=15 (8/7)	12,4±2,7	11,7±1,2	20,1±1,2	17,6±2,6	15,7±6,3	14,9±6,7	16,5±4,6	18,5±5,7
	p=0,28		p=0,23		p=0,86		p=0,57	

4.5. Характер экспрессии генов при различных вариантах сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия при плоскоклеточном раке легкого

Учитывая результаты исследования, о различиях в характере экспрессии маркеров пролиферативной активности, апоптоза, клеточной дифференцировки, а также в выраженности и составе воспалительного инфильтрата вблизи разных вариантов морфологических изменений эпителия бронхов мелкого калибра, отдаленных от опухоли, было сделано следующее предположение: разные варианты базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии могут демонстрировать специфическую экспрессию генов. Для проверки этой гипотезы было выполнено полнотранскриптомное профилирование образцов различных вариантов базальноклеточной гиперплазии: «изолированной» (БКГ+ПМ-Д, (иБКГ)) и сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-, (пмБКГ)); различных вариантов плоскоклеточной метаплазии: сочетающейся с базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ+Д-, (бкгПМ)) и дисплазией (БКГ-ПМ+Д+, (дПМ)), а также дисплазии, сочетающейся с метаплазией (БКГ-ПМ+Д+, (пмД)). Образцы были получены с помощью лазерной микродиссекции ткани эпителия бронхов, отдаленных от плоскоклеточной карциномы легкого.

Кластерный анализ показал, что различные варианты базальноклеточной гиперплазии, плоскоклеточной метаплазии и дисплазия в значительной степени отличались от нормального эпителия, а также друг от друга. Тем не менее, варианты БКГ были более схожи друг с другом, чем с другими морфологическими изменениям. Более того, плоскоклеточная метаплазия, сочетающаяся с базальноклеточной гиперплазией (бкгПМ), по экспрессионному профилю была ближе к кластеру иБКГ+пмБКГ, чем к группе морфологических изменений,

представленных плоскоклеточной метаплазией и дисплазией, полученных из бронхов одного пациента (рисунок 33).

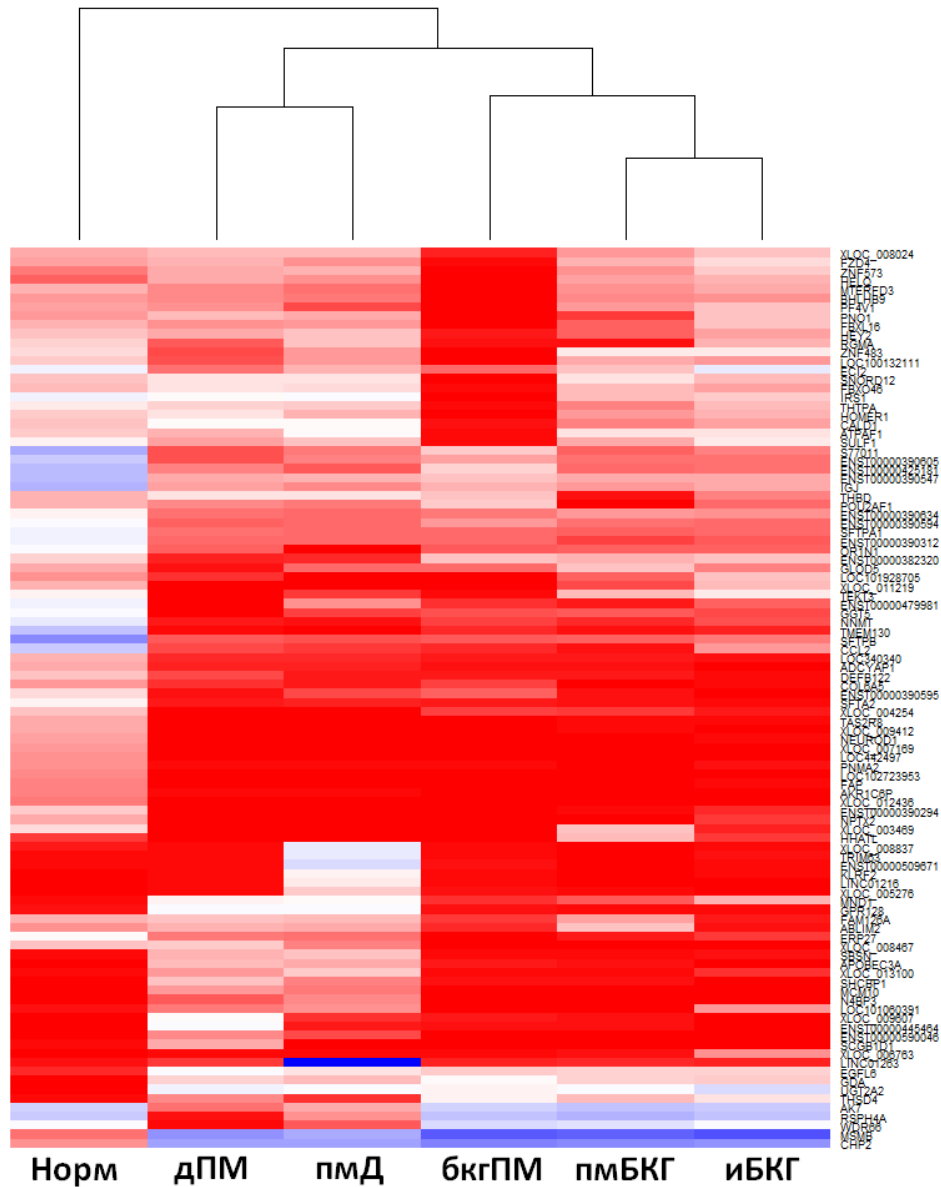


Рисунок 33 – Тепловая карта уровня экспрессии генов (ТОП 100) в морфологических изменениях эпителия бронхов мелкого калибра, отдаленных от плоскоклеточного рака легкого, и кластерный анализ экспрессионной близости их друг к другу. Норм – нормальный эпителий бронхов.

4.5.1. Экспрессионная характеристика различных вариантов базальноклеточной гиперплазии

При «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (ИБКГ) была выявлена гиперэкспрессия 1221 и гипозэкспрессия 1334 генов. Из них, специфическая гиперэкспрессия, свойственная только данному варианту базальноклеточной гиперплазии, была характерна для 680, а гипозэкспрессия – для 530 генов (рисунок 34).

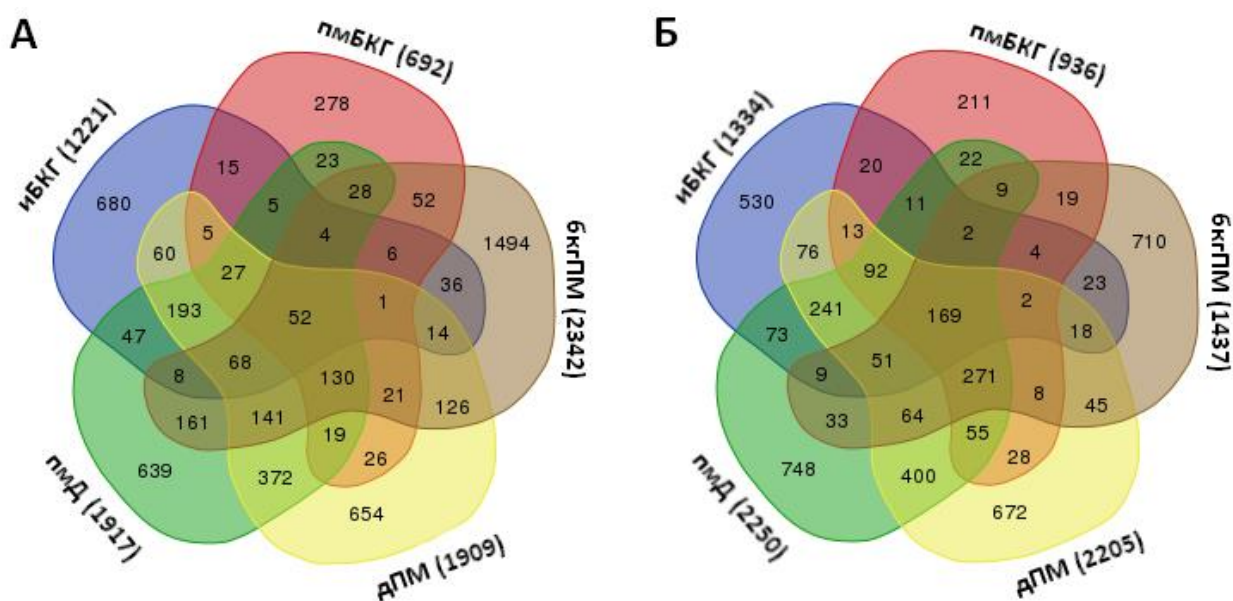


Рисунок 34 – Количество общих и специфических гипер- (А) и гипозэкспрессирующихся (Б) генов в различных вариантах морфологических изменений эпителия мелких бронхов, отдаленных от плоскоклеточного рака легкого.

Функциональное аннотирование гиперэкспрессирующихся генов показало отсутствие ассоциации «изолированной» БКГ с какими-либо биологическими процессами (GO процессы). Однако, анализ сигнальных путей (KEGG) показал значимую регуляцию в «изолированной» БКГ метаболизма ретинола (FDR=0.0002) и ксенобиотиков через систему цитохромов 450 (FDR=0.002) и химического канцерогенеза (FDR=0.003). Напротив, анализ гипозэкспрессирующихся генов продемонстрировал

ассоциацию иБКГ с большим количеством разнообразных процессов и сигнальных путей, большая часть которых была связана с иммунным ответом (рисунок 35).

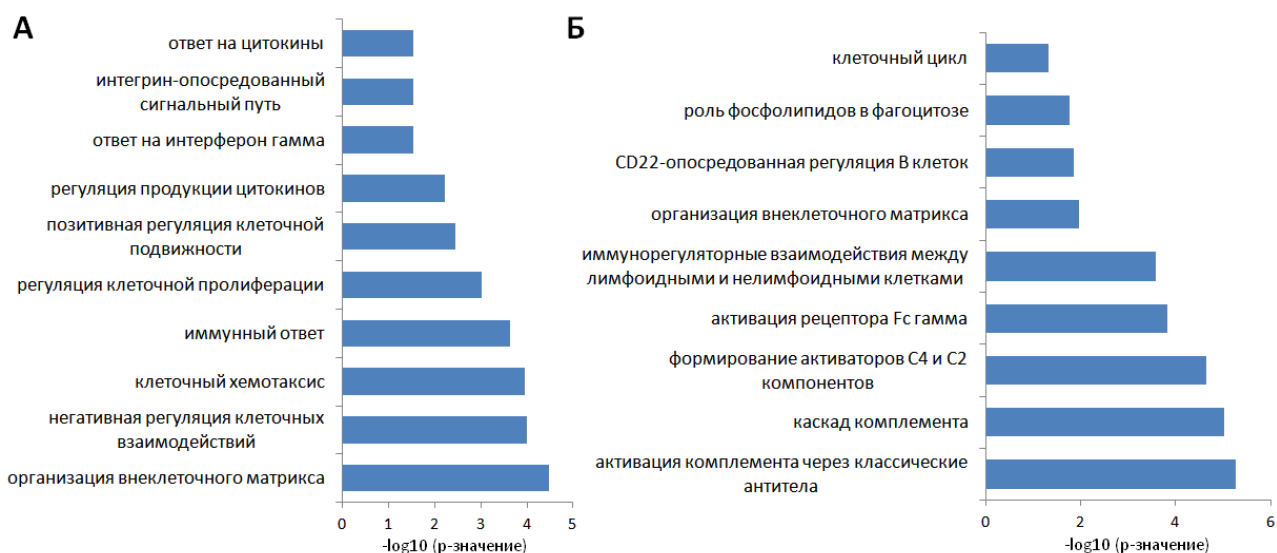


Рисунок 35 – Ассоциация «изолированной» базальноклеточной гиперплазии с биологическими процессами (А) и сигнальными путями (Б), построенными на основе аннотирования гипозэкспрессирующихся генов.

Анализ экспрессионного профиля «изолированной» БКГ выявил набор специфических гипо- и гиперэкспрессирующихся генов (включая неохарактеризованные ранее транскрипты). При этом, функциональная роль некоторых, в настоящее время еще не известна (таблица 30). В частности, не понятно, в какие биологические процессы вовлечены гены *TMEM81* и *KIAA1211*, демонстрирующие высокую экспрессию в иБКГ. Тем не менее, мутации в гене *KIAA1211*, являются распространенным событием при бронхоальвеолярной карциноме (bronchioloalveolar carcinoma, ВАС) и мелкоклеточном раке легких [151, 372, 412]. Кроме того, несмотря на экспериментальные результаты, о вовлеченности *VMO1* в формирование желточной оболочки, известно, что данный ген экспрессируется в разных тканях, в том числе легочной

(<http://www.proteinatlas.org>). Среди гипозэкспрессирующихся генов, обращает на себя внимание ген *VASP*, экспрессия которого, как было показано ранее, много выше в аденокарциноме легкого, по сравнению с нормальным эпителием [124], и *SPII*, который был охарактеризован как возможный маркер плоскоклеточного рака лёгких [59]

Таблица 30 – Гены, гипо- и гиперэкспрессирующиеся только в «изолированной» базальноклеточной гиперплазии

Гены	Полное название	Функции	Уровень экспрессии (logFC)	p*
<i>TMEM81</i>	Transmembrane Protein 81	не известны	3.46	0.005
<i>VMO1</i>	Vitelline Membrane Outer Layer 1 Homolog	формирование желточной оболочки	3.40	0.011
<i>RND1</i>	Rho Family GTPase 1	организация актинового цитоскелета	-3.82	0.014
<i>VASP</i>	Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein	ремоделирование цитоскелета, клеточная полярность и миграция, активация тромбоцитов	-4.61	0.042
<i>SPII</i>	Spi-1 Proto-Oncogene	дифференцировка и активация макрофагов или В клеток	-3.91	0.049
<i>KIAA1211</i>	KIAA1211	не известны	3.11	0.040
<i>LOC440386</i>	неохарактеризованные транскрипты		3.96	0.001
<i>XLOC_006763</i>			4.65	0.010
<i>LOC101927250</i>			2.44	0.014
<i>ENST00000527819</i>			-4.10	0.027

Примечание: *, p-значение после поправки на множественные сравнения. Информация о функциях взята из базы данных GeneCards (<http://www.genecards.org>).

Из 692 гипер- и 936 гипозэкспрессирующихся генов базальноклеточной гиперплазии, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией (пмБКГ), 278 и 211, соответственно, были специфическими (рисунок 34). Экспрессия гиперэкспрессирующихся генов, не была статистически значимо связана как с какими-либо биологическими процессами, так и с сигнальными

путями. Напротив, функциональное аннотирование гипохекспрессирующихся генов, показало регуляцию процессов и путей, вовлеченных в организацию внеклеточного матрикса, продукцию молекул адгезии и клеточной пролиферации (рисунок 36).

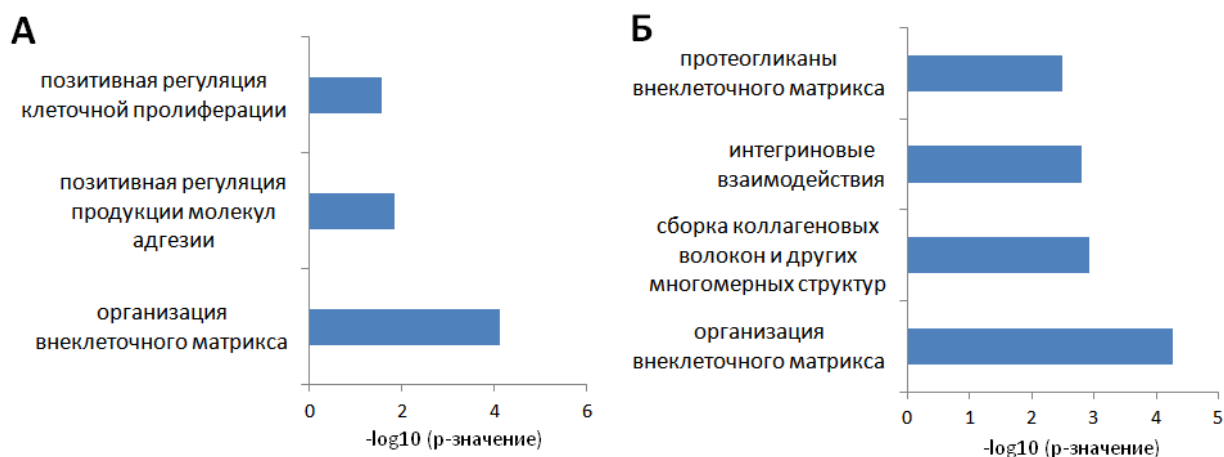


Рисунок 36 – Ассоциация базальноклеточной гиперплазии, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией, с биологическими процессами (А) и сигнальными путями (Б), построенными на основании аннотирования гипохекспрессирующихся генов.

В отличие от «изолированной» базальноклеточной гиперплазии, для пмБКГ, не было найдено статистически значимо специфических экспрессирующихся генов при уровне значимости $p < 0,05$ с поправкой на множественные сравнения. На уровне тенденции ($p = 0,06$) была обнаружена специфическая экспрессия неохарактеризованного транскрипта XLOC_012803, представляющего внутригенную некодирующую РНК.

4.5.2. Экспрессионная характеристика различных вариантов плоскоклеточной метаплазии

В случае плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с базальноклеточной гиперплазией (бкгПМ), резко возросло число гиперэкспрессирующихся генов – до 2342. Из них, 1494 было специфических (рисунок 34). Помимо этого, в бкгПМ была снижена, по сравнению с морфологически неизменным эпителием, экспрессия 1437 генов, в том числе 710 специфических (рисунок 34).

Посредством гиперэкспрессирующихся генов, плоскоклеточная метаплазия, сочетающаяся с базальноклеточной гиперплазией (бкгПМ), была связана с сигналингом через G – белок-опосредованные рецепторы и ольфакторным сигнальным путем, вовлеченным в восприятие химических стимулов (рисунок 37 А, Б). Аннотирование гипоэкспрессирующихся генов показало регуляцию двух процессов: транскрипции/экспрессии и дифференцировки эпителиальных клеток легкого (рисунок 37 В), последний из которых, был связан с низкой экспрессией семи генов: *CREB1*, *FGF10*, *FOXA2*, *NFIB*, *NUMA1*, *NUMB* и *YAP1*. Все из указанных генов, как было показано, принимают важнейшее участие в контроле клеточного цикла и роста, репарации ДНК, гомеостазе и т.д. Кроме того, абберрации в некоторых из них, вносят вклад в формирование и прогрессию различных злокачественных новообразований [361, 392, 395]. В частности, нарушения в гене *YAP1*, предрасполагают к развитию аденокарциномы легкого [99, 289]. Помимо этого, амплификация данного гена наблюдается в 23% случаев немелкоклеточного рака легких [247], а снижение его экспрессии, повышает чувствительность к EGFR ингибитору эрлотинибу [111].

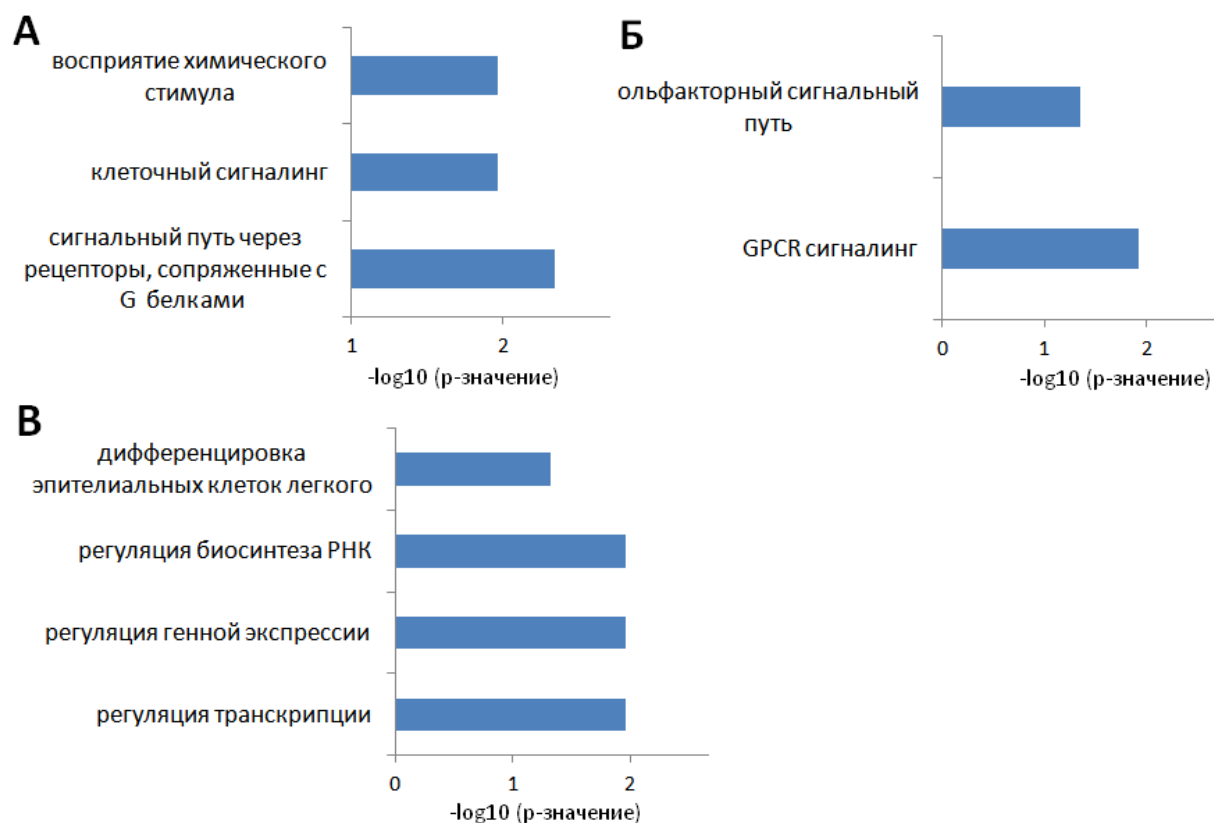


Рисунок 37 – Ассоциация плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с базальноклеточной гиперплазией, с биологическими процессами (А, В) и сигнальными путями (Б), построенными на основании аннотирования гипер- (А, Б) и гипозэкспрессирующихся (В) генов. GPCR – рецепторы, сопряженные с G-белками.

Помимо этого плоскоклеточная метаплазия, сочетанная с БКГ (бкгПМ), характеризовалась гипозэкспрессией специфических генов, вовлеченных в контроль различных процессов: репарации ДНК, клеточного старения, метаболизма и т.д. (таблица 31). Для двух генов *FOXC1* и *MTERFD3* в литературе имеются данные об их вовлеченности в патогенез рака легкого. В частности, высокий уровень экспрессии *FOXC1*, является независимым фактором плохого прогноза [407], а ген *MTERFD3* включен в мультигенную панель предсказания риска развития рецидивов у

больных немелкоклеточным раком легких [341, 349, патент US 20100009357 A1].

Таблица 31 – Гены, гипозэкспрессирующиеся только в плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с базальноклеточной гиперплазией

Ген	Полное название	Функции	Уровень экспрессии	p*
<i>BHLHB9</i>	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 9	фактор транскрипции, контроль клеточного старения и выживаемости	-5.23	0.027
<i>EXD2</i>	exonuclease 3'-5' domain containing 2	репарация повреждения хромосом	-5.42	0.033
<i>ALG10B</i>	alpha-1,2-glucosyltransferase	метаболизм	-4.73	0.036
<i>SNORD12</i>	small nucleolar RNA	не известны	-6.27	0.070
<i>ATPAF1</i>	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1	снижение экспрессии АТРАF1 – супрессия биогенеза митохондрий и остановка клеточного цикла (G1/S)	-6.48	0.070
<i>FOXC1</i>	forkhead box C1	участие в эмбриональном развитии	-6.08	0.091
<i>HOMER1</i>	homer homolog 1	член семейства дендритных белков	-6.75	0.091
<i>DIAPH2</i>	diaphanous-related formin 2	оогенез, регуляция динамики эндосом, реорганизация актинового цитоскелета	-3.86	0.091
<i>MTERFD3</i>	MTERF domain containing 3	регуляция транскрипции митохондрий	-5.85	0.095

Примечания: *, p-значение после поправки на множественные сравнения. Информация о функциях взята из базы данных GeneCards (<http://www.genecards.org>).

При плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с дисплазией (дПМ), наблюдалась гиперэкспрессия 1909 и гипозэкспрессия 2205 генов. Из них, 654 и 672 – специфические, соответственно (рисунок 34).

Аннотирование гиперэкспрессирующихся генов показало ассоциацию дПМ с процессами клеточного цикла, ответом на ксенобиотики и развитием эпителия (рисунок 38А). Подобные результаты были получены при построении сигнальных путей (рисунок 38Б). Анализ гипозэкспрессирующихся генов выявил значительную выраженность процесса сборки реснитчатого эпителия и аксонемы, а также менее выраженную ассоциацию с организацией внеклеточного матрикса, миграцией и хемотаксисом лейкоцитов, регуляцией клеточной пролиферации и дифференцировки пневмоцитов II-го типа (рисунок 38В).

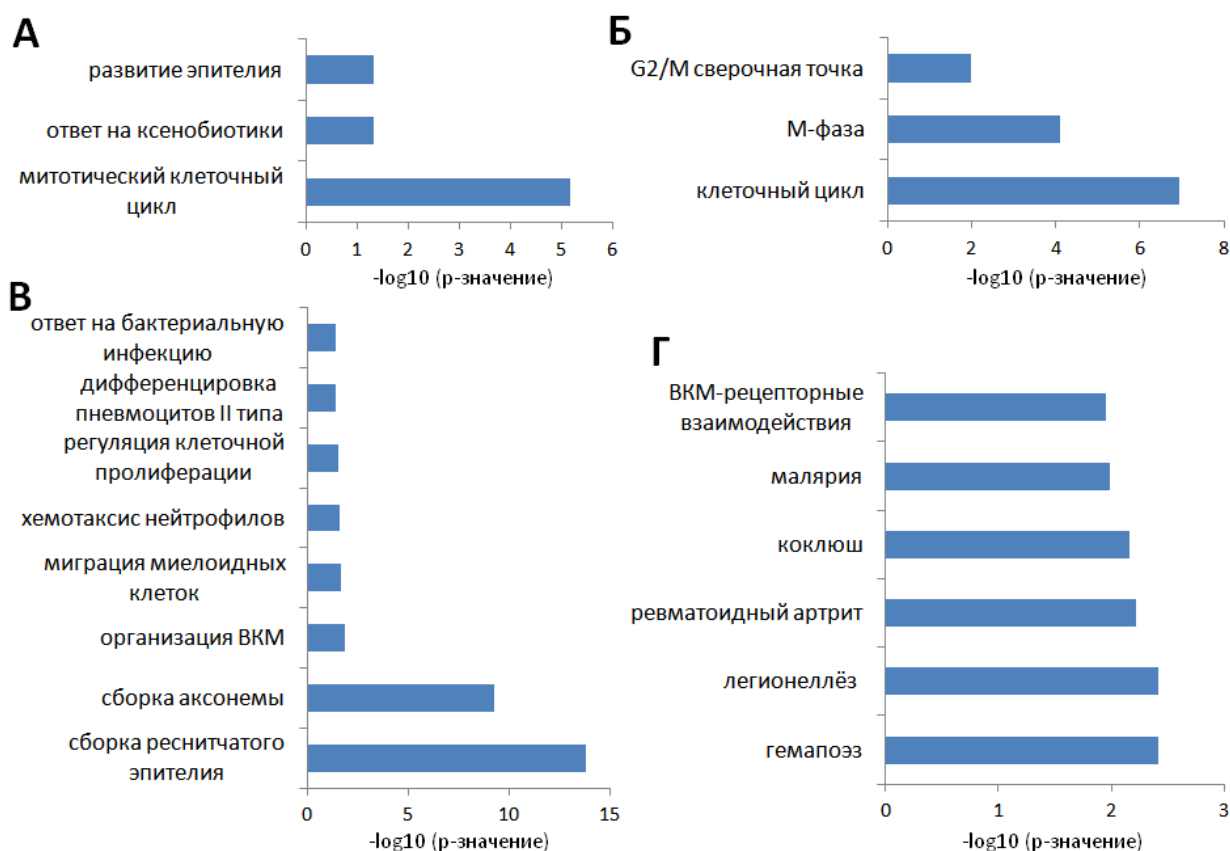


Рисунок 38 – Ассоциация плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с дисплазией II-III степени, с биологическими процессами (А, В) и сигнальными путями (Б, Г), построенными на основании аннотирования

гипер- (А, Б) и гипохэкспрессирующихся (В, Г) генов. ВКМ, внеклеточный матрикс.

Кроме того, были выражены сигнальные пути различных заболеваний, в основе которых лежит воспалительный процесс (рисунок 38Г).

Анализ экспрессионного профиля плоскоклеточной метаплазии, сочетанной с дисплазией (дПМ), показал наличие большого числа специфических гипер- и гипохэкспрессирующихся генов, включая неохарактеризованные транскрипты (таблица 32). Среди них значительная гипохэкспрессия гена *CCDC114*, кодирующего компонент «the outer dynein arm docking complex» в реснитчатых клетках, и гена *DLL1*, избирательно экспрессирующегося в нейроэндокринных клетках, и связанного с ингибированием образования клеток Клара [117]. Обращает на себя внимание гиперэкспрессия гена *TRIM67*, ранее описанного как супрессор Ras-сигнального пути [414]. Для части генов в литературе имеются упоминания об их возможной причастности к патогенезу рака легких и его метастазированию. Например, гиперэкспрессия гена *КНК* была включена в мультигенную панель, связанную с метастазированием немелкоклеточного рака легких в печень [118]. Экспрессия гена *ITPR2* снижалась при трансдукции в респираторные эпителиальные клетки белка KRAS дикого типа [292]. Напротив, экспрессия *IGLL1* повышалась при трансдукции в нормальные эмбриональные клетки легкого аденовируса Adhz60, содержащего протеин E1B [322], и в целом, была высокой в тканях аденокарциномы легкого [276].

Таблица 32 – Гены, гипер- и гипозэкспрессирующиеся только в плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с дисплазией II-III степени

Ген	Полное название	Функции	Уровень экспрессии	p*
<i>KHK</i>	Ketohexokinase	конверсия фруктозы в фруктозу-1-фосфат	5.50	0.006
<i>ITPR2</i>	Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 2	перенос кальция в цитоплазму; роль в клеточной миграции, делении, сокращении гладкомышечных волокон и нейрональном сигналинге	-5.14	0.007
<i>MAP7D2</i>	MAP7 Domain Containing 2	динамика микротрубочек; экспрессия преимущественно в эпителиальных клетках	-6.04	0.008
<i>PCDH18</i>	Protocadherin 18	клеточная адгезия нейрональных клеток	2.52	0.009
<i>IPO9</i>	Importin 9	ядерный транспортер; переносчик фактора транскрипции С-Jun и фосфатазы 2А	3.20	0.011
<i>OR5H15</i>	Olfactory Receptor Family 5 Subfamily H Member 15	ольфакторный рецептор	2.96	0.012
<i>IGLL1</i>	Immunoglobulin Lambda Like Polypeptide 1	рецептор пре-В и про-В клеток; пролиферация и дифференцировка про-В в пре-В клетки	-9.49	0.017
<i>TRIM67</i>	Tripartite Motif Containing 67	ингибирование Ras-опосредованного сигналинга	5.17	0.020
<i>HOXD1</i>	Homeobox D1	фактор транскрипции, роль в процессах дифференцировки и развития конечностей	3.25	0.029
<i>UGT2B15</i>	UDP Glucuronosyltransferase Family 2 Member B15	метаболизм и удаление токсических компонентов	2.28	0.034
<i>POMT1</i>	Protein O-Mannosyltransferase 1	переход резистентного маннозила к гидроксильной группе остатков серина или треонина	-2.44	0.041
<i>CPQ</i>	Carboxypeptidase	металлопептидаза,	-5.47	0.042

	Q	гидролиз циркулирующих белков		
<i>DLL1</i>	Delta Like Canonical Notch Ligand 1	клеточная адгезия, активация Notch 1 и 3 сигналинга, экспрессия в нейроэндокринных клетках легкого, ингибирование клеток Клара, экспрессирующих Notch 1 и 3, дифференцировка предшественников респираторного эпителия	-4.30	0.043
<i>CCDC114</i>	Coiled-Coil Domain Containing 114	компонент «the outer dynein arm docking complex» в реснитчатых клетках	-11.04	0.048
<i>WT1-AS</i>	WT1 Antisense RNA	длинная некодирующая РНК, транскрибируемая с 1-го интрона и экзона гена <i>WT1</i>	3.85	0.035
<i>Сборf222</i>	неохарактеризованные транскрипты		3.67	0.020
<i>AY358225</i>			4.93	0.027
<i>LOC643551</i>			4.69	0.001
<i>LOC100506472</i>			4.00	0.007
<i>LOC101929046</i>			3.20	0.017
<i>LOC100506844</i>			-8.25	0.011
<i>LOC100129148</i>			4.33	0.020
<i>XLOC_007088</i>			2.72	0.005
<i>XLOC_002798</i>			3.52	0.007
<i>XLOC_007850</i>			5.71	0.017
<i>XLOC_005336</i>			7.43	0.022
<i>XLOC_007346</i>			4.11	0.029
<i>XLOC_010719</i>			2.22	0.047
<i>A_21_P0014374</i>			-3.08	0.007
<i>A_33_P3262366</i>			3.47	0.018
<i>A_33_P3240144</i>			2.07	0.025
<i>A_33_P3236122</i>			5.91	0.035
<i>ENST00000515188</i>			3.10	0.007
<i>ENST00000439217</i>			4.93	0.041
<i>LINC01132</i>			-5.06	0.040
<i>LINC00578</i>			5.41	0.033

Примечания: *, р-значение после поправки на множественные сравнения. Информация о функциях взята из базы данных GeneCards (<http://www.genecards.org>), а также из статей [117, 255, 414]

4.5.3. Экспрессионная характеристика дисплазии, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией

При дисплазии эпителия II-III степени наблюдалась гиперэкспрессия 1917 и гипоекспрессия 2250 генов. Из них, 639 и 748 генов, соответственно, были экспрессированы специфически.

На основании аннотирования гиперэкспрессирующихся генов, дисплазия, сочетающаяся с плоскоклеточной метаплазией (пмД), в существенной степени была ассоциирована с процессами клеточного деления, а в меньшей – с развитием эпителия, метаболизмом ретиноевой кислоты и организацией внеклеточного матрикса (рисунок 39А). Значительное разнообразие сигнальных путей, выраженных в дисплазии (пмД), было получено при анализе гиперэкспрессирующихся генов. Подобно биологическим процессам, для пмД отмечена сильная ассоциация с клеточным циклом. Кроме того, показана выраженность сигналинга, опосредованного через Rho ГТФазы и приводящего к ремоделированию актинового цитоскелета, клеточному старению и ассоциированного с ним секреторного фенотипа клеток, а также сигнальных путей, вовлеченных в повышенное метилирование ДНК и опосредующих передачу сигнала посредством активации комплекса Т – клеточных факторов и др. (рисунок 39Б).

Анализ гипоекспрессирующихся генов выявил связь пмД с регуляцией процессов клеточного хемотаксиса, в частности миграции лейкоцитов. Более того, показана ассоциация с процессами, вовлеченными в воспаление и иммунный ответ, а также в регуляцию продукции цитокинов. Помимо этого отмечена связь с процессом сборки реснитчатого эпителия, однако, менее выраженная по сравнению с дПМ. В число других наблюдаемых процессов входила организация матрикса, клеточная дифференцировка и др. (рисунок 39В). Построение сигнальных путей показало значительную связь дисплазии

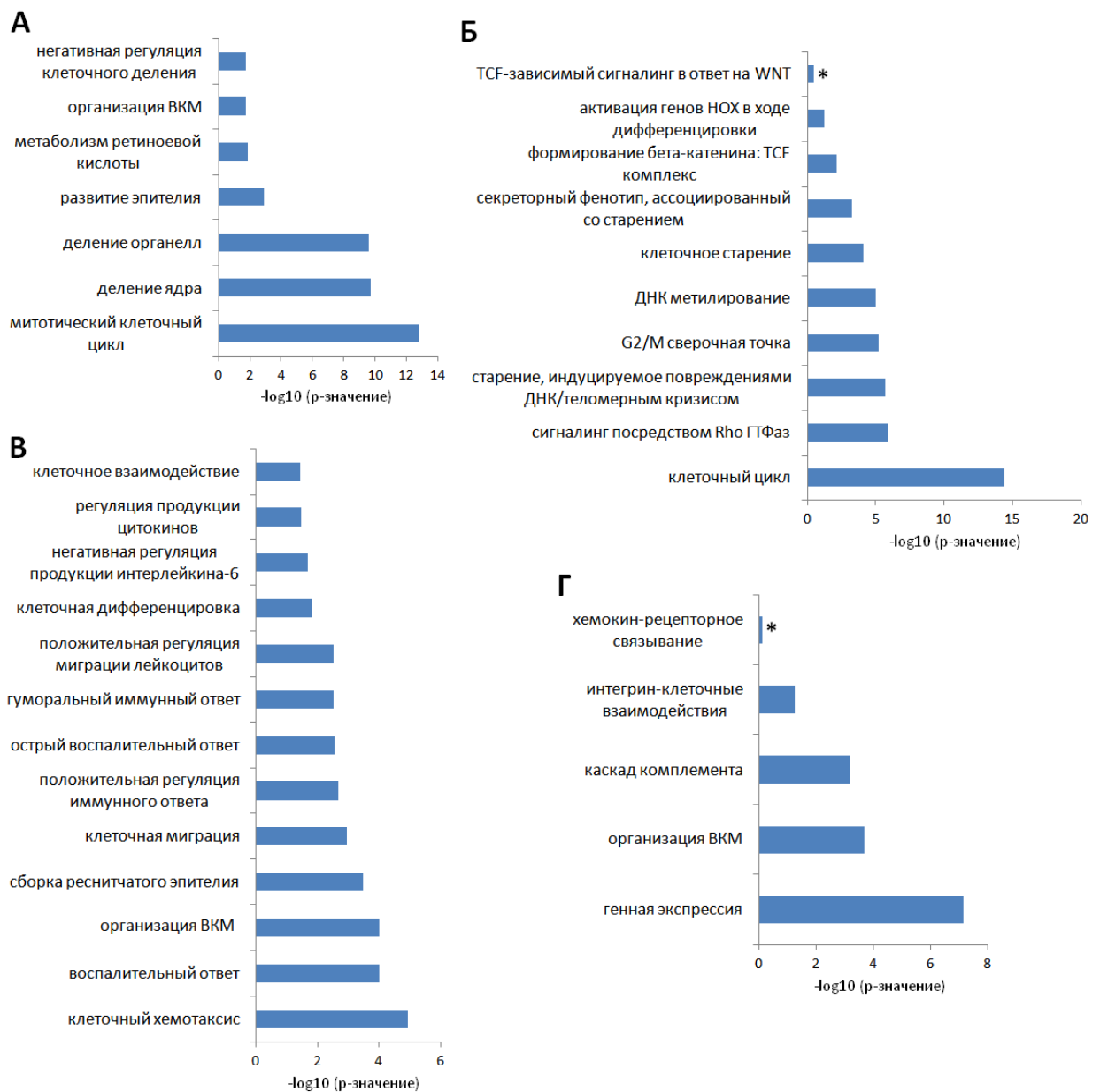


Рисунок 39 – Ассоциация дисплазии II-III степени, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией, с биологическими процессами (А, В) и сигнальными путями (Б, Г), построенными на основании аннотирования гипер- (А, Б) и гипозэкспрессирующихся (В, Г) генов. ВКМ – внеклеточный матрикс; TCF – Т-клеточные факторы; WNT – сигнальный путь; *, $p > 0.05$.

с регуляцией генной экспрессии, каскада комплемента, клеточных взаимодействий через интегрин и связывания с хемокинами (рисунок 39Г).

Подобно плоскоклеточной метаплазии, сочетающаяся с ней дисплазия, демонстрировала большое количество специфических гипер- и гипохэкспрессирующихся генов, в том числе неохарактеризованных транскриптов (таблица 33). Например, дисплазия (пмД) характеризовалась гиперэкспрессией гена *MS4A3*, который ранее был описан как один из возможных драйверов патогенеза плоскоклеточного рака легких [428]. Помимо этого, была обнаружена высокая экспрессия гена *KCNG3*, часто подверженного гиперметилованию при канцерогенезе легких [324], и гена *SYNPO2L*, высоко экспрессирующегося в мезенхимальных стволовых клетках при немелкоклеточном раке легких [161, 376, 356, 357, 429]. Из гипохэкспрессирующихся генов, обращают на себя внимание *ADAM8*, играющий значительную роль в прогрессии рака легких [184], *PCDH10*, являющийся мишенью метилирования в опухолях легких [374], и *XAGE2*, высоко экспрессирующийся в опухолевых стволовых клетках аденокарциномы легких [415].

Проведенное исследование позволило заключить, что экспрессионный профиль базальноклеточной гиперплазии зависел от того, сочетается она с плоскоклеточной метаплазией или нет. Аналогичным образом профиль плоскоклеточной метаплазии также определялся наличием базальноклеточной гиперплазии или дисплазии. Различия каждого из вариантов сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия отмечались на уровне количества дифференциально гипер- или гипохэкспрессируемых генов, включая гены имеющие отношение к регуляции биологических процессов и сигнальным путям, часть из которых являются специфическими.

Таблица 33 – Гены, гипер- и гипохэкспрессирующиеся в дисплазии II-III степени, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией

Ген	Полное название	Функции	Уровень экспрессии	p*
<i>EVI2A</i>	Ecotropic Viral Integration Site 2A	комплексирование с другими белками и формирование рецепторов	-5.45	0.006
<i>MS4A3</i>	Membrane Spanning 4-Domains A3	гемопоэтический модулятор перехода клеточного цикла с G1 в S фазу, модулирует уровень фосфорилирования циклин-зависимой киназы 2 (CDK2)	6.98	0.007
<i>BTN1A1</i>	Butyrophilin Subfamily 1 Member A1	член семейства иммуноглобулинов, ингибирует пролиферацию CD4 и CD8 Т-клеток, Т-клеточный метаболизм, секрецию IL2 и IFNG	6.61	0.010
<i>XAGE2</i>	X Antigen Family Member 2	член семейства CAGE антигенов	-4.37	0.012
<i>ADAM8</i>	ADAM Metallopeptidase Domain 8	член семейства доменов дизинтегринов и металлопротеаз; вовлечен в клеточную адгезию, вероятно, играет роль в экстравазации лейкоцитов	-3.26	0.012
<i>ADAMTS10</i>	ADAM Metallopeptidase With Thrombospondin Type 1 Motif 10	цинк-зависимая протеаза; вовлечен в организацию соединительной ткани, воспаление, ангиогенез и клеточную миграцию	-4.30	0.013
<i>WBSCR17</i>	Williams-Beuren Syndrome Chromosome Region 17	N-ацетилгалактозамин трансфераза; катализирует начальную стадию биосинтеза O-связанных олигосахаридов	-5.20	0.014
<i>CTAG1A</i>	Cancer/Testis Antigen 1A	опухольный антиген	-3.74	0.014
<i>PCDH10</i>	Protocadherin 10	клеточная адгезия, ингибирование	-4.54	0.015

		клеточной подвижности и миграции		
<i>MYOM1</i>	Myomesin 1	главный компонент М-зоны миофибрилл; связывает миозин, титин и лёгкий меромиозин	-4.34	0.015
<i>SPATA5</i>	Spermatogenesis Associated 5	вовлечен в морфологические и функциональные трансформации митохондрий в ходе сперматогенеза	3.62	0.017
<i>SLC34A1</i>	Solute Carrier Family 34 Member 1	мембранный транспортёр; вовлечен в перенос фосфатов в клетки	3.87	0.017
<i>HOXB6</i>	Homeobox B6	фактор транскрипции; вовлечен в регуляцию процессов развития лёгких и кожи	-6.16	0.017
<i>OMG</i>	Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein	вовлечен в миелинизацию	3.53	0.024
<i>KCNG3</i>	Potassium Voltage-Gated Channel Modifier Subfamily G Member 3	калиевый канал	5.91	0.019
<i>MDM1</i>	Mdm1 Nuclear Protein	негативно регулирует дубликацию центриолей, связывает и стабилизирует микротрубочки	-6.19	0.025
<i>TAC4</i>	Tachykinin 4 (Hemokinin)	регуляция периферических эндокринных и паракринных функций, включая кровяное давление, иммунный ответ и секреторную активность эндокринных желёз	-4.03	0.025
<i>CLDN14</i>	Claudin 14	клеточная адгезия	-3.84	0.031
<i>NPAT</i>	Nuclear Protein, Coactivator Of Histone Transcription	необходим для прогрессии клеточного цикла из фазы G1 в S, активирует транскрипцию генов гистонов H2A, H2B, H3 и H4, положительно влияет на экспрессию генов <i>ATM</i> , <i>MIZF</i> и <i>PRKDC</i>	-3.36	0.032

<i>SYNPO2L</i>	Synaptopodin 2 Like	актин-связывающий белок	3.21	0.032
<i>LIFR</i>	Leukemia Inhibitory Factor Receptor Alpha	цитокин; вовлечен в клеточную дифференцировку, пролиферацию и выживаемость	-6.93	0.039
<i>ADAMTS6</i>	ADAM Metallopeptidase With Thrombospondin Type 1 Motif 6	металлопротеиназа	-3.02	0.042
<i>GPR63</i>	G Protein-Coupled Receptor 63	G-белок-связывающий рецептор	4.28	0.044
<i>C2orf71</i>	Chromosome 2 Open Reading Frame 71	кодируемый белок ассоциирован с первичной ресничкой наружного сегмента (the primary cilium of the outer segment)	-3.22	0.049
<i>C6orf163</i>	Chromosome 6 Open Reading Frame 163	не известны	5.74	0.042
<i>A_33_P3330761</i>	неохарактеризованные транскрипты		2.98	0.038
<i>ENST00000453166</i>			-4.53	0.007
<i>ENST00000467198</i>			-4.94	0.014
<i>ENST00000502101</i>			-4.70	0.010
<i>ENST00000506878</i>			-3.94	0.007
<i>ENST00000548329</i>			4.15	0.004
<i>ENST00000558411</i>			-4.05	0.028
<i>ENST00000585520</i>			-5.95	0.018
<i>ENST00000456535</i>			2.78	0.032
<i>ENST00000580756</i>			-5.38	0.035
<i>ENST00000426811</i>			-3.51	0.035
<i>ENST00000514966</i>			2.98	0.036
<i>FLJ45256</i>			-4.48	0.035
<i>LINC00502</i>			-2.31	0.039
<i>LOC284080</i>			4.65	0.000
<i>LOC101928582</i>			-4.94	0.031
<i>LOC102659288</i>			-3.76	0.032
<i>LOC102724631</i>			-4.59	0.032
<i>LOC388942</i>			-4.67	0.033
<i>LOC101928580</i>			-4.05	0.037
<i>LOC100129048</i>			-4.54	0.040
<i>LOC100130264</i>			-3.28	0.047
<i>THC2558619</i>			2.87	0.015
<i>THC2634011</i>			-4.28	0.030
<i>XLOC_001178</i>			-3.68	0.024

<i>XLOC_002185</i>		-5.46	0.009
<i>XLOC_003147</i>		6.55	0.019
<i>XLOC_008043</i>		-2.56	0.023
<i>XLOC_011136</i>		4.30	0.019
<i>XLOC_011319</i>		4.02	0.012
<i>XLOC_013047</i>		-3.59	0.012
<i>XLOC_013577</i>		-3.16	0.015
<i>XLOC_014366</i>		-4.33	0.014
<i>XLOC_12_008546</i>		-5.46	0.004
<i>XLOC_005302</i>		-4.35	0.031
<i>XLOC_005890</i>		-3.37	0.031
<i>XLOC_011331</i>		3.40	0.032
<i>XLOC_000916</i>		-3.72	0.033
<i>XLOC_001373</i>		4.03	0.035
<i>XLOC_009528</i>		1.78	0.035
<i>XLOC_006886</i>		-5.33	0.035
<i>XLOC_011424</i>		2.31	0.040
<i>XLOC_004729</i>		-4.28	0.043
<i>XLOC_003919</i>		-3.08	0.046

Примечания: *, p-значение после поправки на множественные сравнения. Информация о функциях взята из базы данных GeneCards (<http://www.genecards.org>).

ГЛАВА 5

Связь различных вариантов сочетаний морфологических изменений эпителия бронхов мелкого калибра с прогрессией немелкоклеточного рака легкого

На основании результатов нашего исследования о существовании значительных различий между вариантами сочетаний морфологических процессов, особенно между «изолированной» базальноклеточной гиперплазией и базальноклеточной гиперплазией, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией по морфофункциональным параметрам и характеру воспалительного инфильтрата, мы сделали следующее предположение. Поскольку данные изменения, во многом обусловлены воспалительной реакцией, можно предположить, что они отражают как индивидуальные особенности воспаления, являющегося основным компонентом микроокружения опухоли, так и индивидуальные особенности реагирования респираторного эпителия на цитокины и ростовые факторы. С другой стороны, хорошо известно, что характер иммуновоспалительной реакции в опухоли, включая НМРЛ, связан с различными вариантами прогрессии [159, 213, 215, 244, 245]. Поэтому представляло интерес выяснить, существует ли какая-то связь между вариантами сочетаний морфологических изменений, наблюдаемых в отдаленном от опухоли бронхиальном эпителии, и рецидивированием, синхронным и гематогенным метастазированием немелкоклеточного рака легкого.

При изучении связи характера морфологических изменений бронхиального эпителия с прогрессией НМРЛ, пациенты, после оперативного лечения наблюдались в динамике на протяжении 60 месяцев. Следует отметить, что в группе больных с плоскоклеточным раком легкого (n=105), один пациент, у которого в отдаленном от опухоли бронхиальном эпителии наблюдалась «изолированная» плоскоклеточная метаплазия

(БКГ-ПМ+Д-), умер через 3 месяца после оперативного лечения. Поэтому он был исключен из дальнейшего исследования. Соответственно в группе больных с плоскоклеточным раком легкого наблюдалось 104 пациента.

5.1. Связь вариантов сочетаний морфологических изменений эпителия бронхов мелкого калибра с синхронным лимфогенным метастазированием при немелкоклеточном раке легкого

Представляло интерес посмотреть, имеется ли какая-то связь между тем или иным вариантом сочетаний морфологических изменений эпителия, возникающих в мелких бронхах, отдаленных от немелкоклеточного рака легкого, и синхронным лимфогенным метастазированием.

При плоскоклеточном раке легкого, на момент оперативного лечения, у 40,4% (42/104) больных были обнаружены лимфогенные метастазы. В группах пациентов с неизменным эпителием (БКГ-ПМ-Д-) и «изолированной» базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ-Д-), в бронхах, отдаленных от опухоли, синхронные лимфогенные метастазы были выявлены в 44,4% (4/9) и 36,4% (20/55) случаев соответственно (таблица 34). В группе пациентов, у которых в бронхиальном эпителии определялось сочетание базальноклеточной гиперплазии с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-), в 40,0% случаев (12/30) были найдены синхронные лимфогенные метастазы. В группе больных с выявленным в бронхах мелкого калибра, отдаленных от плоскоклеточной карциномы, сочетанием метаплазии и дисплазии (БКГ-ПМ+Д+), не смотря на то, что частота возникновения синхронных лимфогенных метастазов была несколько выше – 60% (6/10), однако статистически значимых различий по сравнению с другими вариантами сочетаний морфологических изменений эпителия, отмечено не было (таблица 34). По числу исследованных в целом лимфоузлов и метастатических среди них,

группы с различными вариантами сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия также не отличались (таблица 34).

Таблица 34 – Связь варианта сочетаний морфологических изменений эпителия в бронхах мелкого калибра с частотой синхронного лимфогенного метастазирования при плоскоклеточном раке легкого

Процесс	Частота синхронных лимфогенных метастазов, n (%)		Количество метастатических лимфоузлов	
1. БКГ+ПМ+Д-	12/30 (40,0)	$p_{1-2}=0,84$ $p_{1-3}=0,43$ $p_{1-4}=0,88$	$1,7\pm 1,0$	$p_{1-2}=0,81$ $p_{1-3}=0,27$ $p_{1-4}=0,32$
2. БКГ+ПМ-Д-	20/55 (36,4)	$p_{2-3}=0,23$ $p_{2-4}=0,76$	$1,8\pm 1,2$	$p_{2-3}=0,22$ $p_{2-4}=0,36$
3. БКГ-ПМ+Д+	6/10 (60,0)	$p_{3-4}=0,64$	$1,1\pm 1,2$	$p_{3-4}=0,22$
4. БКГ-ПМ-Д-	4/9 (44,4)		$2,5\pm 0,2$	

При аденокарциноме легкого синхронные лимфогенные метастазы на момент оперативного вмешательства были выявлены у 46,3% (31/67) больных. По частоте встречаемости синхронных лимфогенных метастазов группы с различными вариантами сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия не имели различий (таблица 35).

Таблица 35 – Связь варианта сочетаний морфологических изменений эпителия в бронхах мелкого калибра с частотой синхронного лимфогенного метастазирования при аденокарциноме легкого

Процесс	Частота синхронных лимфогенных метастазов, n (%)		Количество метастатических лимфоузлов	
1. БКГ+ПМ+Д-	4/15 (26,6)	$p_{1-2}=0,23$ $p_{1-4}=0,41$	$1,5\pm 1,1$	$p_{1-2}=0,67$ $p_{1-4}=0,31$
2. БКГ+ПМ-Д-	24/40 (60,0)	$p_{2-4}=0,81$	$1,8\pm 1,2$	$p_{2-4}=0,12$
3. БКГ-ПМ+Д+	0/1	-	-	-
4. БКГ-ПМ-Д-	6/11 (54,5)		$0,9\pm 0,7$	

Результаты исследования показали, что на момент проведения оперативного лечения у 42,7% (73/171) больных НМРЛ определялись синхронных лимфогенные метастазы. Частота синхронного лимфогенного метастазирования не зависела от варианта сочетаний морфологических изменений, наблюдаемых в отдаленном от опухоли бронхиальном эпителии (таблица 36).

Таблица 36 – Связь варианта сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия с частотой синхронного лимфогенного метастазирования при немелкоклеточном раке легкого

Процесс	Частота синхронных лимфогенных метастазов, n (%)	
1. БКГ+ПМ+Д-	16/45 (35,5)	p ₁₋₂ =0,59 p ₁₋₃ =0,42 p ₁₋₄ =0,46
2. БКГ+ПМ-Д-	41/95 (43,2)	p ₂₋₃ =0,61 p ₂₋₄ =0,69
3. БКГ-ПМ+Д+	6/11 (54,4)	p ₃₋₄ =0,86
4. БКГ-ПМ-Д-	10/20 (50,0)	

Таким образом, проведенное исследование не выявило связи между тем или иным вариантом сочетания морфологических изменений эпителия бронхов мелкого калибра, наблюдаемых в отдалении от НМРЛ, и синхронным лимфогенным метастазированием.

5.2. Связь рецидивирования с клинко-морфологическими параметрами НМРЛ

Из 171 больного немелкоклеточным раком легкого, рецидивы были выявлены в 12,8% (22) случаев. При плоскоклеточном раке легкого рецидивы были зарегистрированы у 14,4% (15/104) пациентов. Из них, в 73,3% (11/15) случаях это были отсроченные лимфогенные метастазы, а в 26,7% (4/15) – опухоль в культе.

По срокам наблюдения у 13,4% (2/15) пациентов, рецидив возник в течение 8–12 месяцев после завершения хирургического и терапевтического лечения (рисунок 40). В обоих случаях это была опухоль в культе. В большинстве случаев – 40,0% (6/15), рецидив заболевания был выявлен в период 13–24 месяцев после окончания лечения. Из них, в 13,3% (2/6) случаев рецидив возник в культе бронха, а 26,7% (4/6) – отсроченные метастазы в регионарные лимфоузлы. У 26,6% (4/15) больных рецидив был найден в сроки 25–36 месяцев, а у 20,0% (3/15) – через 37–48 месяцев после проведенного лечения (рисунок 40). Во всех случаях это были отсроченные лимфогенные метастазы.

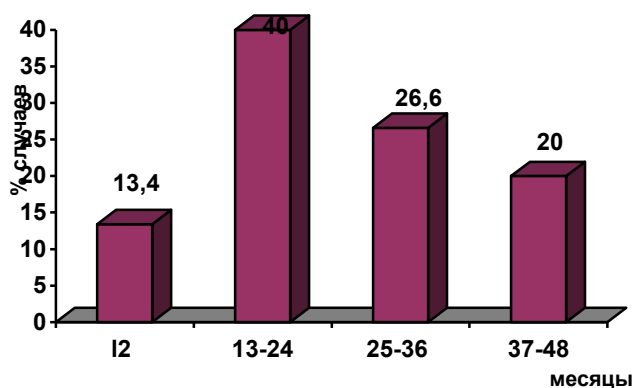


Рисунок 40 – Частота возникновения рецидивов плоскоклеточного рака легкого, в зависимости от срока наблюдения

При аденокарциноме легкого рецидивы заболевания были обнаружены у 10,5% (7/67) пациентов. Во всех случаях это были локорегионарные метастазы. У 42,8% (3/7) больных рецидив возник в сроки 12–18 месяцев, еще у 42,8% (3/7) пациентов, через 20–25 месяцев после проведенного лечения (рисунок 41). Соответственно у одного (14,4%) больного рецидив заболевания был выявлен в сроки 25–36 месяцев после окончания лечения (рисунок 41).

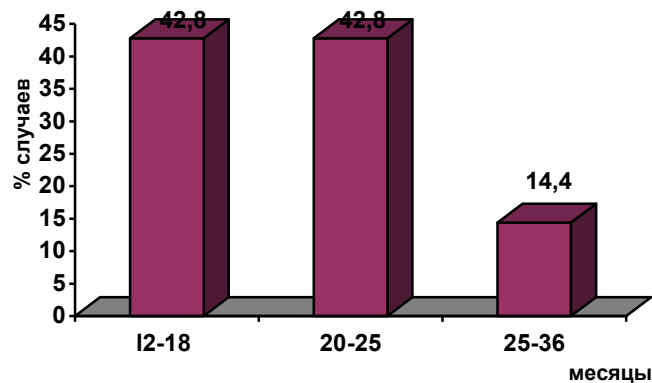


Рисунок 41 – Частота возникновения рецидивов аденокарциномы легкого, в зависимости от срока наблюдения

Интересным оказался следующий факт. В нашем исследовании мы не обнаружили связи между частотой возникновения рецидивов и клинико-морфологическими параметрами опухолевого процесса: стадии процесса, размера опухолевого узла, наличия синхронных лимфогенных метастазов, а также проведения пациентам НАХТ (таблица 37).

Таким образом, рецидивы в культе бронха возникли только при плоскоклеточном раке легкого, в период 8–24 месяца после проведения оперативного и терапевтического лечения. Развитие рецидива НМРЛ не имело в нашем исследовании связи с такими параметрами как размер опухолевого узла и стадия процесса. Возникновение рецидива заболевания не было связано с проведением больным НАХТ. Кроме того, не было выявлено связи рецидивирования с частотой синхронного лимфогенного метастазирования и степенью дифференцировки опухолевого процесса.

Таблица 37 – Связь рецидивирования с клинико-морфологическими параметрами опухоли при немелкоклеточном раке легкого

Параметры	Рецидивы +	
	Плоскоклеточный рак n, (%)	Аденокарцинома n, (%)
Стадия		
I	1/8 (12,5)	0/5 (0,0)
II	3/30 (10,0) $p_{I-II}=0,84$	2/15 (13,3) $p_{I-II}=0,40$
IIIА	9/50(18,0) $p_{II-IIIА}=0,33$	4/33 (12,1) $p_{II-IIIА}=0,93$
IIIВ	2/16 (12,5) $p_{II-IIIВ}=0,61$	1/14 (7,1) $p_{II-IIIВ}=0,61$
Размер опухоли		
T ₁₋₂	6/32 (18,7) $p=0,41$	2/24 (8,3) $p=0,67$
T ₃₋₄	9/72 (12,5)	5/43 (11,6)
Степень дифференцировки		
G1- высокая	0/6 (0,0) $p_{1-3}=0,34$	0/4 (0,0) $p_{1-3}=0,43$
G2- умеренная	10/62 (16,1) $p_{1-2}=0,29$	4/42 (9,5) $p_{1-2}=0,52$
G3- низкая	5/36 (13,9) $p_{2-3}=0,78$	3/21 (14,3) $p_{2-3}=0,56$
НАХТ		
Есть	7/57 (12,3) $p=0,50$	4/29 (9,5) $p=0,81$
Нет	8/47 (17,02)	3/38 (7,9)
Синхронные лимфогенные метастазы		
Есть	7/42 (16,7) $p=0,59$	4/34 (11,7) $p=0,73$
Нет	8/62 (12,9)	3/33 (9,1)

5.2.1. Связь рецидивирования с вариантом морфологических изменений бронхиального эпителия, отдаленного от плоскоклеточного рака легкого

При плоскоклеточном раке легкого рецидивы опухоли были выявлены в 14,4% (15/104) случаев. Рассматривая частоту встречаемости рецидивов плоскоклеточного рака легкого, в зависимости от варианта сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия, отдаленного от опухоли, отмечалась следующая особенность. Чаще всего рецидивы наблюдались у пациентов, у которых в эпителии бронхов определялось

сочетание базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии (БКГ+ПМ+Д-). Из 30 пациентов этой группы рецидивы возникли в 46,7% (14/30) случаев. В группе больных с «изолированной» базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ-Д-) в бронхах, отдаленных от опухоли, рецидив возник только у 1,8% (1/55) случаев ($p=0,00002$, сравнение с группой БКГ+ПМ+Д-). В группах пациентов, у которых при морфологическом исследовании определялось сочетание плоскоклеточной метаплазии с дисплазией (БКГ-ПМ+Д+) или изменения отсутствовали (БКГ-ПМ-Д-), ни одного случая возникновения рецидивов плоскоклеточной карциномы не было отмечено (таблица 38).

Таблица 38 – Частота возникновения рецидивов плоскоклеточного рака легкого, в зависимости от варианта морфологических изменений эпителия в бронхах мелкого калибра

Процесс	Рецидив - n,(%)	Рецидив + n,(%)	
БКГ+ПМ+Д-	16/30 (53,3)	14/30 (46,7)	$\chi^2_{Y}=31,94$ $p=0,0000$ OR = 63,88 95% CI (7,71-1397,56)
БКГ+ПМ-Д-	73/74 (98,6)	1/74 (1,4)	
БКГ-ПМ+Д+ БКГ-ПМ-Д-			

Мы посмотрели, имеются ли отличия в характере экспрессии маркеров пролиферативной активности, апоптоза и клеточной дифференцировки в группе с высокой частотой встречаемости рецидивов – БКГ+ПМ+Д-. Сопоставлялось количество клеток с экспрессией маркеров в очагах базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии у пациентов с рецидивами заболевания и без таковых.

Пролиферативная активность в очагах базальноклеточной гиперплазии, в случаях наличия рецидивов плоскоклеточного рака и при их отсутствии, была одинакова – $(33,8 \pm 5,4)\%$ и $(33,4 \pm 4,2)\%$ клеток соответственно (таблица 39). Уровень экспрессии белка p53, Bcl-2 и

маркера CD138 тоже не зависел от того, есть рецидив заболевания или нет (таблица 39). В очагах плоскоклеточной метаплазии характер экспрессии маркеров пролиферативной активности и апоптоза не отличался у пациентов с рецидивами опухоли и без таковых (таблица 39). Экспрессия маркера клеточной дифференцировки CD138 в участках плоскоклеточной метаплазии отсутствовала.

Таблица 39 – Экспрессия маркеров пролиферативной активности, апоптоза и клеточной дифференцировки в группе БКГ+ПМ+Д-, в зависимости от наличия рецидивов плоскоклеточной карциномы

Процесс	Рецидив	Процент клеток с экспрессией маркера, (M±SD, %)			
		Ki-67	Vcl-2	p53	CD138
БКГ n ₁ =30	нет n ₂ =16	33,4±4,2	10,2±3,8	12,4±5,9	22,1±6,6
	есть n ₂ =14	33,8±5,4	11,6±5,3	13,7±5,7	23,8±8,3
		p=0,35	p=0,42	p=0,64	p=0,54
ПМ n ₁ =30	нет n ₂ =16	53,6±6,4	26,2±3,9	29,1±8,5	0,0±0,0
	есть n ₂ =14	56,0±7,3	26,8±4,9	29,7±7,8	0,0±0,0
		p=0,61	p=0,66	p=0,85	

Состав воспалительного инфильтрата под очагами базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ+Д-) у больных с наличием рецидивов, и в случаях их отсутствия, существенно не различался (таблица 40). Однако необходимо отметить, что в воспалительном инфильтрате вблизи базальноклеточной гиперплазии, у пациентов с рецидивами плоскоклеточного рака легкого, была меньше инфильтрация CD3+ Т – лимфоцитами – (26,6±3,8)% против (33,9±3,7)% (p=0,03, таблица 40).

Воспалительный инфильтрат вблизи плоскоклеточной метаплазии (БКГ+ПМ+Д-), у больных с рецидивами плоскоклеточной карциномы, и

без рецидивов, был одинаков по процентному содержанию различных типов лейкоцитов (таблица 40).

Таблица 40 – Характер воспалительного инфильтрата вблизи базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии, в зависимости от наличия рецидивов плоскоклеточной карциномы

Показатель	Базальноклеточная гиперплазия		Плоскоклеточная метаплазия	
	Рецидив -	Рецидив +	Рецидив -	Рецидив +
	(M±SD, %)		(M±SD, %)	
CD138	25,4±3,8	27,9±7,5	15,6±2,4	14,2±5,8
	p=0,24		p=0,36	
CD68	19,3±3,2	17,5±4,8	15,3±4,7	15,3±5,9
	p=0,22		p=0,99	
CD3	33,9±3,7	26,6±3,8	18,9±4,2	16,6±2,9
	p=0,03		p=0,48	
CD20	17,3±2,3	17,0±1,8	12,8±3,2	9,8±5,2
	p=0,84		p=0,30	

Таким образом, рецидивы плоскоклеточного рака легкого чаще всего встречались в случаях, когда в отдаленном от опухоли бронхиальном эпителии, определялось сочетание базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии (БКГ+ПМ+Д-). Характер экспрессии маркеров пролиферативной активности, апоптоза и клеточной дифференцировки в фокусах базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии не зависел от наличия рецидива опухоли. Состав воспалительного инфильтрата у пациентов с прогрессией заболевания и с отсутствием рецидивов, также не имел существенных отличий.

5.2.2. Связь рецидивирования с вариантом сочетаний морфологических изменений эпителия бронхов мелкого калибра, отдаленных от аденокарциномы легкого

При аденокарциноме легкого рецидивы заболевания были зарегистрированы у 10,4% (7/67) пациентов. Во всех случаях это были больные, у которых в отдаленном от опухоли эпителии бронхов мелкого калибра, определялась сочетание базальноклеточной гиперплазии с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-) – 46,7% (7/15, таблица 41). При других вариантах сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия и их отсутствии (БКГ-ПМ-Д-), рецидивов заболевания обнаружено не было (таблица 41).

Таблица 41 – Частота возникновения рецидивов аденокарциномы легкого в зависимости от варианта сочетаний морфологических изменений эпителия в бронхах мелкого калибра

Процесс	Рецидив – n, (%)	Рецидив + n, (%)	
БКГ+ПМ+Д-	8/15 (53,3)	7/15 (46,7)	$\chi^2_{\text{Y}}=22,34;$ $p=0,0000$
БКГ+ПМ-Д- БКГ-ПМ+Д- БКГ-ПМ-Д-	52/52 (100,0)	0/52 (0,0)	

При наличии рецидивов аденокарциномы легкого (группа БКГ+ПМ+Д-), пролиферативная активность в фокусах базальноклеточной гиперплазии составила $(33,0 \pm 1,1)\%$ клеток, уровень экспрессии маркеров p53 – $(13,5 \pm 4,1)\%$, Vcl-2 – $(16,9 \pm 3,1)\%$ и CD138 – $(22,1 \pm 3,0)\%$ (таблица 41). Подобными были значения данных показателей в случаях отсутствия рецидивов аденокарциномы легкого ($p > 0,05$, таблица 42).

В очагах плоскоклеточной метаплазии, параметры пролиферативной активности и апоптоза также не отличались в случаях с наличием, и отсутствием рецидивов аденокарциномы легкого (таблица 42).

Таблица 42 – Экспрессия маркеров пролиферативной активности, апоптоза и клеточной дифференцировки при базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии (группа БКГ+ПМ+) в зависимости от наличия рецидива аденокарциномы легкого

Процесс	Рецидив	Процент клеток с экспрессией маркера (%)			
		Ki-67	Vcl-2	p53	CD138
БКГ n ₁ =15	нет n ₂ =8	32,1±1,8	16,4±2,5	13,4±4,8	21,7±2,6
	есть n ₂ =7	33,0±1,1	16,9±3,1	13,5±4,1	22,1±3,0
		p=0,29	p=0,73	p=0,96	p=0,78
ПМ n ₁ =15	нет n ₂ =8	45,9±7,6	27,4±4,1	28,6±5,4	0,0±0,0
	есть n ₂ =7	46,1±6,8	27,8±3,7	29,1±3,7	0,0±0,0
		p=0,96	p=0,85	p=0,84	

Воспалительный инфильтрат вблизи базальноклеточной гиперплазии, при наличии рецидивов, характеризовался меньшим числом CD138+ плазматических клеток – (16,3±3,5)% по сравнению со случаями, при которых рецидивы отсутствовали – (23,1±5,4)% (p=0,04 таблица 43). Выраженность воспалительной инфильтрации около базальноклеточной гиперплазии другими типами лейкоцитов существенно не отличалась у пациентов с рецидивами заболевания, и без таковых. Отличий в воспалительной инфильтрации вблизи фокусов плоскоклеточной метаплазии, у пациентов с рецидивами опухоли и с их отсутствием, нами не было выявлено (таблица 43).

Таким образом, сопоставление частоты встречаемости рецидивов немелкоклеточного рака легкого при различных вариантах сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия, отдаленных от опухоли, показало следующее. Рецидивы, в нашем исследовании, были выявлены у 12, 8% (22/171) больных НМРЛ. Чаще всего они возникали в

Таблица 43 – Характеристика воспалительного инфильтрата вблизи базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии в зависимости от наличия рецидива аденокарциномы легкого

Показатель	Базальноклеточная гиперплазия		Плоскоклеточная метаплазия	
	Рецидив -	Рецидив +	Рецидив -	Рецидив +
	(M±SD,%)		(M±SD,%)	
CD138	23,1±5,4	16,3±3,5	17,04±5,2	16,3±2,7
	p=0,04		p=0,82	
CD68	16,9±1,6	17,9±2,6	16,1±5,7	11,8±2,5
	p=0,46		p=0,21	
CD3	37,2±0,84	38,5±2,8	20,4±0,91	20,8±1,3
	p=0,77		p=0,73	
CD20	14,9±3,8	15,2±2,1	11,6±0,42	13,3±1,8
	p=0,90		p=0,31	

тех случаях, когда наблюдалось сочетание базальноклеточной гиперплазии с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-) – 46,7% (21/45). При других вариантах изменений бронхиального эпителия, рецидив НМРЛ был найден только в 0,8% (1/126) случаев (p=0,0000, OR = 109,38, таблица 44).

Таблица 44 – Частота возникновения рецидивов немелкоклеточного рака легкого, в зависимости от варианта сочетаний морфологических изменений эпителия в бронхах мелкого калибра

Процесс	Рецидив – n,(%)	Рецидив + n (%)	
БКГ+ПМ+Д-	24/45 (53,3)	21/45 (46,7)	$\chi^2_{Y}=58,22;$ $p=0,0000$ $OR = 109,38;$ $95\% CI (14,35-2287,02);$
БКГ+ПМ-Д-	125/126 (99,2)	1/126 (0,8)	
БКГ-ПМ+Д+			
БКГ-ПМ-Д-			

Таким образом, развитие рецидивов немелкоклеточного рака легкого, чаще всего наблюдалось в случаях обнаружения в бронхиальном эпителии, отдаленном от опухоли, сочетания базальноклеточной гиперплазии с плоскоклеточной метаплазии (БКГ+ПМ+Д-). Характер экспрессии маркеров пролиферативной активности, апоптоза и клеточной

дифференцировки, как в очагах базальноклеточной гиперплазии, так и плоскоклеточной метаплазии, не зависел от наличия или отсутствия признаков прогрессии. Воспалительный инфильтрат, в случаях наличия рецидивов, практически не отличался от случаев с их отсутствием.

5.3. Связь гематогенного метастазирования с клиничко-морфологическими параметрами НМРЛ.

Гематогенные метастазы НМРЛ были выявлены в нашем исследовании у 28,1% (48/171) больных. Гематогенные метастазы плоскоклеточного рака легкого возникли в 29,8% (31/104) случаев. По срокам наблюдения, у 3,2% (1/31) больных отдаленные метастазы были обнаружены через 11 месяцев после проведенного лечения (рисунок 42). В 9,7% (3/31) случаях, в течение 13–24 месяцев. В период 25–36 месяцев после оперативного лечения, гематогенные метастазы были выявлены у 25,8% (8/31) пациентов. В сроки 36–48 месяцев после завершения оперативного и терапевтического лечения метастазы возникли у 35,5% (11/31) больных. Еще у 25,8% (8/31) пациентов гематогенные метастазы были обнаружены в более отдаленные сроки – 49–59 месяцев после проведенного лечения (рисунок 42).

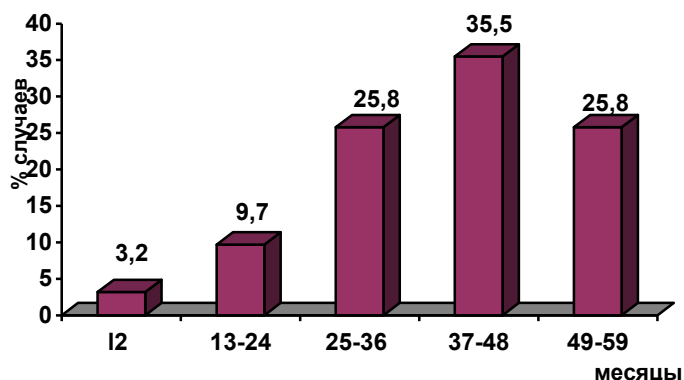


Рисунок 42 – Частота возникновения гематогенных метастазов плоскоклеточного рака легкого, в зависимости от срока наблюдения

Гематогенные метастазы аденокарциномы легкого были выявлены у 25,4% (17/67) больных. В период 6–12 месяцев после хирургического и терапевтического лечения метастазы возникли в 17,6% (3/17) случаев (рисунок 43). У 35,3% (6/17) больных метастазы были обнаружены в период 13–24 месяцев после окончания лечения. Еще в 35,3% (6/17) случаев – через 25–36 месяцев. В более отдаленные сроки, 36–48 месяцев после оперативного лечения, гематогенные метастазы наблюдались в 11,8% (2/17) случаях (рисунок 43).

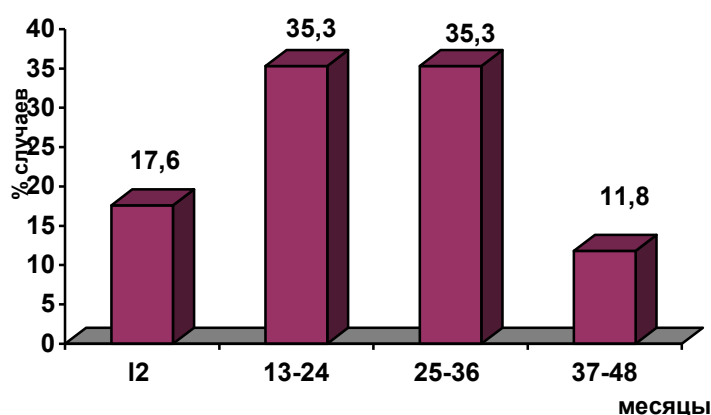


Рисунок 43 – Частота возникновения гематогенных метастазов аденокарциномы легкого, в зависимости от срока наблюдения

При плоскоклеточном раке легкого развитие гематогенных метастазов не было связано со стадией процесса, размером опухоли, наличием синхронных лимфогенных метастазов и степенью дифференцировки опухоли (таблица 45). Частота возникновения гематогенных метастазов, в группах больных с НАХТ и при ее отсутствии, была одинакова (таблица 45). Гематогенное метастазирование чаще регистрировалось у пациентов в отсутствии рецидивов опухоли – 19,2%, чем при их наличии – 3,2% случаев ($p=0,04$, таблица 45).

Подобная картина наблюдалась и при аденокарциноме легкого. Наличие гематогенных метастазов не зависело от стадии опухолевого

процесса, размера опухолевого узла, наличия лимфогенных метастазов на момент операции, степени дифференцировки опухоли, а также от того, проводилась или нет пациентам НАХТ (таблица 45). Следует отметить, что при аденокарциноме легкого, в тех случаях, когда возникали гематогенные метастазы, не было выявлено ни одного случая рецидивирования. Однако,

Таблица 45 – Связь гематогенного метастазирования с клинико-морфологическими параметрами опухоли при немелкоклеточном раке легкого

Параметры	Гематогенные метастазы +	
	Плоскоклеточный рак, n (%)	Аденокарцинома, n (%)
Стадия		
I	0/8 (0,0)	0/6 (0,0)
II	5/22 (22,7) $p_{I-II}=0,15$	1/12 (8,3) $p_{I-II}=0,48$
IIIA	17/53 (32,1) $p_{II-IIIA}=0,69$	11/32 (34,4) $p_{II-IIIA}=0,09$
IIIB	9/21 (42,8) $p_{II-IIIB}=0,59$	5/16 (31,2) $p_{II-IIIB}=0,82$
Размер опухоли		
T ₁₋₂	8/32 (25,0)	6/24 (25,0)
T ₃₋₄	23/72 (31,9) $p=0,72$	11/43 (25,6) $p=0,95$
Степень дифференцировки		
G1- высокая	1/6 (16,7) $p_{1-3}=0,35$	1/4 (25,0) $p_{1-3}=0,60$
G2- умеренная	17/62 (27,4) $p_{1-2}=0,57$	13/42 (30,9) $p_{1-2}=0,81$
G3- низкая	13/36 (36,1) $p_{2-3}=0,53$	3/21 (14,3) $p_{2-3}=0,16$
НАХТ		
Есть	16/57 (28,1)	6/29 (20,7)
Нет	15/47 (31,9) $p=0,67$	11/38 (28,9) $p=0,45$
Синхронные лимфогенные метастазы		
Есть	12/42 (28,6)	7/31 (22,6)
Нет	19/62 (30,6) $p=0,83$	10/36 (27,8) $p=0,63$
Рецидивы		
Есть	1/15 (6,7)	0/7 (0,0)
Нет	30/89 (33,7) $p=0,04$	17/60 (28,3)

нельзя считать, что обязательным условием для развития гематогенных метастазов при аденокарциноме легкого является отсутствие рецидивов, поскольку значимых различий между группами с наличием рецидивов и гематогенных метастазов и наличием рецидивов (Рецидив+ГМ+), но отсутствием ГМ (Рецидив+ГМ-), не отмечалось ($\chi^2_{\gamma} = 1,37$, $p = 0,24$, таблица 45).

Таким образом, развитие гематогенных метастазов НМРЛ не было связано с размером опухоли и стадией процесса. Частота возникновения отдаленных метастазов у больных, получивших НАХТ и без нее, была одинакова. Отсутствовала связь гематогенного метастазирования с развитием синхронных лимфогенных метастазов. Чаще всего гематогенные метастазы возникали в случаях, когда отсутствовали рецидивы опухоли.

5.3.1. Связь гематогенного метастазирования с вариантом сочетаний морфологических изменений эпителия бронхов мелкого калибра, отдаленных от плоскоклеточного рака легкого

Из 31 больного с гематогенными метастазами плоскоклеточного рака легкого у 25 (80,6%) они наблюдались в тех случаях, когда в отдаленном от опухоли бронхиальном эпителии определялась «изолированная» базальноклеточная гиперплазия (БКГ+ПМ-Д-). Кроме того, гематогенные метастазы возникли также у 6 (19,4%) пациентов, у которых в бронхиальном эпителии была выявлена дисплазия, в сочетании плоскоклеточной метаплазией (БКГ-ПМ+Д+). При отсутствии реактивных и диспластических изменений в слизистой бронхов (БКГ-ПМ-Д-) и при сочетании базальноклеточной гиперплазии с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-), гематогенных метастазов выявлено не было. Частота встречаемости гематогенных метастазов плоскоклеточного рака

легкого при различных вариантах сочетания морфологических изменений бронхиального эпителия, представлена в таблице 46.

Таблица 46 – Частота возникновения гематогенных метастазов в зависимости от варианта сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия при плоскоклеточном раке легкого

Процесс	ГМ – ,n (%)	ГМ + , n (%)	
1. БКГ+ПМ+Д- БКГ-ПМ-Д-	38/38 (100,0)	0/38 (0,0)	$\chi^2_{Y}=21,37;$ $p_{1-2}=0,0000$
2. БКГ+ПМ-Д-	30/55 (54,5)	25/55 (45,5)	
3. БКГ-ПМ+Д+	4/10 (40,0)	6/10 (60,0)	$\chi^2_{Y}=20,86;$ $p_{1-3}=0,00002$

Следует отметить, что по частоте встречаемости гематогенных метастазов плоскоклеточного рака легкого, группы БКГ+ПМ-Д- и БКГ-ПМ+Д+ не имели статистически значимых отличий ($\chi^2_{Y}=0,25$, $p=0,61$).

Характер экспрессии маркеров пролиферативной активности (Ki-67) и дифференцировки плоского эпителия (CD138), в группе пациентов с «изолированной» базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ-Д-), не зависел от наличия или отсутствия у пациентов гематогенных метастазов плоскоклеточной карциномы (таблица 47).

Уровень экспрессии Vcl-2 в эпителии с признаками базальноклеточной гиперплазии, в случаях наличия и отсутствия ГМ, был одинаков (таблица 47). В тоже время, при наличии у пациентов гематогенных метастазов, в бронхиальном эпителии было больше клеток с экспрессией белка p53 – $(9,1 \pm 4,5)\%$, чем в случаях с отсутствием гематогенных метастазов – $(6,3 \pm 4,8)\%$ клеток ($p=0,04$, таблица 47).

Таблица 47 – Характер экспрессии маркеров пролиферативной активности, апоптоза и клеточной дифференцировки при базальноклеточной гиперплазии (группа БКГ+ПМ-Д-), в зависимости от наличия гематогенных метастазов плоскоклеточной карциномы

Процесс	ГМ	Процент клеток с экспрессией маркера (%)			
		Ki-67	Vcl-2	p53	CD138
БКГ n=55	нет n ₂ =30	18,2±5,4	8,1±5,4	6,3±4,8	38,9±3,3
	есть n ₂ =25	19,9±4,0	9,1±4,9	9,1±4,5	37,8±3,9
p		0,21	0,49	0,04	0,27

Состав воспалительного инфильтрата вблизи базальноклеточной гиперплазии у пациентов с гематогенными метастазами плоскоклеточной карциномы и без таковых, не имел значимых отличий (таблица 48).

Таблица 48 – Характеристика воспалительного инфильтрата вблизи базальноклеточной гиперплазии, в зависимости от наличия гематогенных метастазов плоскоклеточной карциномы

Показатель	ГМ -, n=30	ГМ +, n=25
	БКГ	БКГ
	(M±SD,%)	
CD138	12,7±4,9	14,9±3,5
p=0,07		
CD68	24,1±4,3	22,8±3,8
p=0,26		
CD3	29,6±4,7	27,6±4,1
p=0,25		
CD20	14,6±1,6	14,0±1,4
p=0,36		

Как отмечалось выше, гематогенные метастазы также были выявлены у пациентов, у которых в эпителии бронхов мелкого калибра при морфологическом исследовании обнаружилось сочетание дисплазии II-III

степени с плоскоклеточной метаплазии (БКГ-ПМ+Д+). Уровень экспрессии маркеров пролиферативной активности и апоптоза, в случаях с наличием и отсутствием гематогенных метастазов, как в очагах плоскоклеточной метаплазии, так и дисплазии был одинаков (таблица 49).

Таблица 49 – Характер экспрессии маркеров пролиферативной активности и апоптоза при плоскоклеточной метаплазии и диспластических изменениях бронхиального эпителия (группа БКГ-ПМ+Д+), в зависимости от наличия гематогенных метастазов плоскоклеточной карциномы

Процесс	ГМ	Процент клеток с экспрессией маркера (M±SD,%)		
		Ki-67	Bcl-2	p53
ПМ n=11	нет n=5	57,7±7,8	22,5±4,4	29,5±2,6
	есть n=6	58,7±8,5	27,0±7,1	31,0±3,8
		p=0,86	p=0,29	p=0,66
Дисплазия n=10	нет n=5	66,0±18,9	27,2±9,9	39,9±11,0
	есть n=6	78,±10,2	30,6±5,7	43,0±13,7
		p=0,11	p=0,55	p=0,68

Воспалительный инфильтрат вблизи очагов плоскоклеточной метаплазии, в случаях наличия и отсутствия гематогенных метастазов, не отличался по составу (таблица 50)

Таким образом, при плоскоклеточном раке легкого возникновение гематогенных метастазов наблюдалось в случаях, когда в отдаленном от опухоли эпителии бронхов мелкого калибра, определялась «изолированная» базальноклеточная гиперплазия (БКГ+ПМ-Д-) или сочетание плоскоклеточной метаплазией с дисплазией (БКГ-ПМ+Д+). Как было показано выше (глава 3), именно сочетание дисплазии с

плоскоклеточной метаплазией, является прогностическим признаком прогрессии дисплазии.

Таблица 50 – Характеристика воспалительного инфильтрата вблизи плоскоклеточной метаплазии и дисплазии, в зависимости от наличия гематогенных метастазов плоскоклеточного рака легкого

Показатель	Плоскоклеточная метаплазия		Дисплазия	
	ГМ-	ГМ+	ГМ-	ГМ+
	(M±SD,%)		(M±SD,%)	
CD138	14,4±2,6	18,1±5,9	19,7±5,0	17,7±7,2
	p=0,28		p=0,64	
CD68	18,5±5,2	23,1±8,1	21,3±9,8	14,3±6,3
	p=0,45		p=0,22	
CD3	37,2±0,84	38,5±2,8	20,4±0,91	20,8±1,3
	p=0,77		p=0,73	
CD20	14,9±3,8	15,2±2,1	11,6±0,42	13,3±1,8
	p=0,90		p=0,31	

При этом, по частоте встречаемости гематогенных метастазов, группы БКГ+ПМ-Д- и БКГ-ПМ+Д+ не имели отличий.

Характер экспрессии маркеров пролиферативной активности и клеточной дифференцировки в эпителии с признаками «изолированной» базальноклеточной гиперплазии, не был связан с гематогенным метастазированием. При наличии признаков прогрессирования опухоли (гематогенных метастазов), повышался уровень экспрессии проапоптического белка p53 в эпителии «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-). Воспалительный инфильтрат при «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-), у пациентов с возникшими гематогенными метастазами и без метастазов, был идентичен.

5.3.2 Связь гематогенного метастазирования с вариантом сочетаний морфологических изменений эпителия бронхов мелкого калибра, отдаленного от аденокарциномы легкого

Гематогенные метастазы аденокарциномы легкого, как и при плоскоклеточном раке, чаще всего наблюдались у пациентов с «изолированной» базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ-Д-), выявленной в эпителии бронхов, отдаленных от опухоли – 94,1% (16/17) случаев. В 5,9% (1/17) случаев гематогенные метастазы были отмечены при сочетании базальноклеточной гиперплазии с плоскоклеточной метаплазией (таблица 51). В отсутствие реактивных и диспластических изменений в слизистой бронхов (БКГ-ПМ-Д), гематогенных метастазов выявлено не было.

Таблица 51 – Частота возникновения гематогенных метастазов, в зависимости от варианта сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия при аденокарциноме легкого

Процесс	МТС – , n (%)	МТС + , n (%)	
БКГ+ПМ-Д-	24/40 (60,0)	16/40 (40,0)	X ² _Y =9,38 p=0,002 OR = 17,33, 95% CI (2,11-377,16)...
БКГ+ПМ+Д-	26/27 (96,3)	1/27 (3,7)	
БКГ-ПМ+Д- БКГ-ПМ-Д-			

Изменения значений показателей пролиферативной активности, апоптоза и клеточной дифференцировки в эпителии с признаками базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-), в случаях с метастазами и без метастазов аденокарциномы легкого, носили ту же направленность, что и при плоскоклеточном раке легкого. Значения показателей экспрессии Ki-67, Vcl-2, CD138 у больных с наличием гематогенных метастазов не отличались от значений аналогичных показателей пациентов без отдаленных метастазов (p>0,05, таблица 52). Однако при наличии

гематогенных метастазов аденокарциномы легкого в эпителии с признаками базальноклеточной гиперплазии, отмечался более высокий уровень экспрессии белка p53 – (10,8±3,8)% клеток. Соответственно при отсутствии ГМ этот показатель составил (7,2±5,9)% клеток (p=0,04, таблица 52).

Таблица 52 – Характер экспрессии маркеров пролиферативной активности, апоптоза и клеточной дифференцировки при базальноклеточной гиперплазии (группа БКГ+ПМ-Д-), в зависимости от наличия гематогенных метастазов аденокарциномы легкого

Процесс	МТС	Процент клеток с экспрессией маркера (%)			
		Ki-67	Vcl-2	p53	CD138
БКГ n=40	нет n=24	16,5±6,6	8,5±5,4	7,2±5,9	41,5±4,8
	есть n=16	17,9±10,3	11,3±5,6	10,8±3,8	39,9±5,2
		p=0,60	p=0,12	p=0,04	p=0,32

Сравнение состава воспалительного инфильтрата в группе БКГ+ПМ-Д- у пациентов с наличием и отсутствием гематогенных метастазов, выявило одну особенность. В случаях наличия гематогенных метастазов, в воспалительном инфильтрате вблизи базальноклеточной гиперплазии снижалась доля CD68+ макрофагов – (19,5±2,0)% (таблица 53). При отсутствии метастазов, число CD68+ макрофагов было несколько больше (21,8±3,3)% (p=0,02, таблица 53). По характеру инфильтрации стромы вблизи базальноклеточной гиперплазии другими типами лейкоцитов, случаи с наличием и отсутствием гематогенных метастазов не отличались между собой (таблица 53).

Таблица 53 – Характер воспалительного инфильтрата вблизи базальноклеточной гиперплазии, в зависимости от наличия гематогенных метастазов аденокарциномы легкого

Показатель (M±SD,%)	ГМ -, n=24	ГМ +, n=16
	БКГ	БКГ
CD138	12,9±2,0	12,1±2,1
	p=0,25	
CD68	21,8±3,3	19,5±2,0
	p=0,02	
CD3	28,9±4,1	30,8±4,6
	p=0,34	
CD20	13,7±2,3	13,9±2,2
	p=0,90	

Таким образом, при аденокарциноме легкого гематогенные метастазы чаще всего наблюдались при «изолированной» базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ-Д-). В отличие от плоскоклеточного рака легкого, воспалительный инфильтрат базальноклеточной гиперплазии, при наличии у пациентов гематогенных метастазов аденокарциномы легкого, характеризовался меньшим числом CD68+ макрофагов. Как и в случаях плоскоклеточной карциномы, пролиферативная активность и уровень экспрессии Vcl-2 в клетках базальноклеточной гиперплазии при наличии у больных гематогенных метастазов и их отсутствии, не имели отличий. Уровень экспрессии белка p53, при наличии гематогенных метастазов, был выше. Иммуногистохимическая экспрессия p53, как правило, свидетельствует о наличии missense - мутации гена p53 [182]. Мутация p53 инактивирует ген-супрессор опухоли, что способствует выживаемости и пролиферации злокачественных клеток, а также инвазии и метастазированию [22, 108]. Мутация p53 идентифицируется в более чем 50% случаев НМРЛ [23, 25, 47, 129, 181]. Сведения о связи экспрессии p53 с прогнозом НМРЛ противоречивы. По одним данным, наличие экспрессии p53 в опухолевых клетках связано со снижением выживаемости больных [11, 12, 26, 28, 129, 299]. Согласно другим,

наоборот, прогноз более благоприятный, особенно у пациентов с аденокарциномой легкого [35, 29, 216]. В нашем случае, более высокий уровень экспрессии p53 в клетках базальноклеточной гиперплазии является неблагоприятным фактором, имеющим отношение к прогрессии опухоли.

Сопоставление частоты встречаемости гематогенных метастазов немелкоклеточной карциномы легкого при различных вариантах сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия показало, что чаще всего метастазы наблюдались в случаях «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-) – 43,2% (41/95). При других вариантах сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия, гематогенные метастазы немелкоклеточного рака легкого были обнаружены лишь в 9,2% (7/76) случаев ($p=0,0000$, OR = 109,38, таблица 54). Причем необходимо отметить, что при немелкоклеточном раке легкого, гематогенные метастазы чаще всего возникали в тех случаях, когда отсутствовали рецидивы заболевания (таблица 55).

Таблица 54 – Частота возникновения гематогенных метастазов немелкоклеточного рака легкого, в зависимости от варианта сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия

Процесс	ГМ – n,(%)	ГМ + n (%)	
БКГ+ПМ-	54/95 (56,8)	41/95 (43,2)	$\chi^2_{Y}=22,45$; $p=0,000002$ OR =7,48; 95% CI (2,93-19,93)
БКГ+ПМ+	69/76 (90,8)	7/76 (9,2)	
БКГ-ПМ+Д+ БКГ-ПМ-			

Таблица 55 – Зависимость гематогенного метастазирования от развития рецидивов немелкоклеточного рака легкого

НМРЛ	ГМ – n,(%)	ГМ + n (%)	
Рецидивы -	102/171 (59,6)	47/171 (27,5)	$\chi^2_{Y}=5,65$ $p=0,02$
Рецидивы +	21/171 (12,3)	1/171 (0,6)	

Таким образом, развитие гематогенных метастазов немелкоклеточного рака легкого было связано с вариантом морфологических изменений, выявленных в отдаленном от опухоли эпителии бронхов. Высокая частота возникновения гематогенных метастазов была сопряжена с наличием «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-). Связь гематогенного метастазирования с дисплазией бронхиального эпителия, наблюдалась только при плоскоклеточном раке легкого.

Основными факторами, связанными с рецидивированием и гематогенным метастазированием, являются распространенность опухоли, ее гистологическая структура, степень дифференцировки и биологическая агрессивность [122, 137, 144, 157, 168, 253, 366, 389]. По данным ESMO отмечено, что при низкодифференцированных опухолях частота отдаленного метастазирования выше, чем при умеренно- или высокодифференцированных ($p < 0,01$) [115]. Показана зависимость частоты развития рецидивов от стадии заболевания [122, 128, 137, 144, 308, 309] степени злокачественности [116], размера опухоли, сосудистой инвазии [246] и распространенности опухоли по висцеральной плевре [139, 178, 179]. Согласно исследованию Т. Nakagawa (2008), к неблагоприятным факторам, способствующим прогрессии при НМРЛ относят: меньший, чем лобэктомия, объем оперативного вмешательства, отсутствие адекватной лимфодиссекции, размер опухоли больше T2 [145, 284, 393].

В исследованиях М.Р. Личиницера (2007) показано, что p53 и VEGF являются независимыми маркерами, предсказывающими появление метастазов. Совместная их экспрессия имеет прогностическое значение для больных немелкоклеточным раком легкого I-II стадии. Группу повышенного риска метастазирования составляют больные p53+VEGF+, а низкого риска метастазирования – p53-VEGF-. Такие показатели как: пол, дифференцировка, клинико-анатомическая форма, распространенность опухоли, гистологическое строение не оказывали значимого влияния на

развитие отдаленных метастазов [23]. В нашем исследовании какой-либо ассоциации между такими характеристиками первичного опухолевого процесса как стадия, размер опухолевого узла, наличие лимфогенных метастазов, степень дифференцировки опухоли и прогрессирование (рецидивирование и гематогенное метастазирование) немелкоклеточного рака легкого не наблюдалось. Объяснить это можно тем, что большинство пациентов, вошедших в исследование, имели III стадию процесса – 66,7% (114/171), а при морфологическом исследовании чаще всего определялась опухоль умеренной степени дифференцировки, как в случаях плоскоклеточного рака – 62/104 (59,6%), так и аденокарциномы легкого – 42/67 (62,8%). Возникшие рецидивы и гематогенные метастазы тоже определялись в основном у больных с III стадией заболевания и в случаях умеренно- и низкодифференцированных карцином. Не было обнаружено разницы и по частоте встречаемости рецидивов и гематогенных метастазов при различных вариантах сочетаний морфологических изменений в мелких бронхах у курящих и не курящих пациентов (таблицы 56-57).

Таблица 56 – Связь частоты рецидивирования и гематогенного метастазирования с вариантами сочетания морфологических изменений эпителия мелких бронхов и статусом курения при плоскоклеточном раке легкого

Вариант сочетания изменений в бронхах	Вариант прогрессии n (%)	Курящие n (%)	Не курящие n (%)	Уровень достоверности
БКГ+ПМ+Д- n=30	Рец+	10/25(40)	4/5 (80)	$\chi^2_{Y}=1,31$ p=0,25
	Рец-	15/25(60)	1/5 (20)	
БКГ+ПМ-Д- n=55	ГМ+	21/46 (45,7)	4/9 (44,4)	$\chi^2_{Y}=0,09$ p=0,76
	ГМ-	25/46 (54,3)	5/9 (55,6)	

Таблица 57 – Связь частоты рецидивирования и гематогенного метастазирования с вариантами сочетания морфологических изменений эпителия мелких бронхов и статусом курения при аденокарциноме легкого

Вариант сочетания изменений в бронхах	Вариант прогрессии n (%)	Курящие n (%)	Не курящие n (%)	Уровень достоверности
БКГ+ПМ+Д- n=15	Рец+	6/10 (60)	1/5 (20)	$\chi^2_{Y}=0,84$ p=0,36
	Рец-	4/10 (40)	4/5 (80)	
БКГ+ПМ-Д- n=40	ГМ+	12/29 (41,4)	4/11 (36,4)	$\chi^2_{Y}=0,01$ p=0,94
	ГМ-	17/29 (58,6)	7/11 (63,6)	

Следует отметить, что рецидивы в нашем исследовании, чаще всего были представлены отсроченными лимфогенными метастазами. Из 22 случаев выявленных рецидивов НМРЛ, 18 (81,8%) – были отсроченными лимфогенными метастазами, а 4 (18,2%) – рецидивы в культе бронха. При этом сочетание базальноклеточной гиперплазии с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-), было связано с отсроченным лимфогенным метастазированием (рецидивированием), но не связано с синхронным лимфогенным метастазированием, выявленным во время операции. Одним из объяснений данной особенности может быть то, что отсроченные лимфогенные метастазы возникают из дремлющих опухолевых клеток. Механизм их активации тождественен механизму активации опухолевых клеток в нишах с развитием гематогенных метастазов. Активация же дремлющих опухолевых клеток, в большей степени, зависит от микроокружения (преметастатических ниш). По-видимому, сочетание БКГ+ПМ+Д- связано с активацией дремлющих опухолевых клеток.

Хроническое воспаление предшествует НМРЛ [290]. Во многих работах рассматривается прогностическая роль системного воспаления при НМРЛ [51, 93, 166, 215, 225, 226, 306, 328, 348, 402, 404]. Подсчет в периферической крови соотношения нейтрофилов/лимфоцитов (NRL) и

тромбоцитов/лимфоцитов (PLR) показал, что значения коэффициентов $NRL \geq 3,44$ и $PLR \geq 1,94$ связаны с более коротким периодом общей и безрецидивной выживаемости пациентов НМРЛ [390]. В исследованиях D. Pinato et. al., 2014 отмечается, что наиболее значимым прогностическим показателем, является NRL, повышение которого у пациентов на ранних стадиях НМРЛ может свидетельствовать о плохом прогнозе [93, 306].

Высокий риск развития рака легкого, а также неблагоприятный его исход после лечения, связывают с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) [325]. Отмечается связь между наличием в качестве сопутствующего заболевания ХОБЛ у пациентов, оперированных на ранней стадии НМРЛ, и рецидивированием [229, 325]. У пациентов с ХОБЛ и НМРЛ T2a стадии был более высокий риск развития рецидивов и метастазов в головной мозг [229]. В условиях хронического воспаления, лежащего в основе ХОБЛ, происходят реактивные изменения бронхиального эпителия – базальноклеточная гиперплазия и плоскоклеточная метаплазия. Именно они, как правило, являются основой для развития предопухолевых изменений и рака легких.

Проведенное нами исследование показало, что для развития рецидивов и гематогенных метастазов НМРЛ имело значение, какой тип морфологических изменений бронхиального эпителия наблюдался в отдалении от опухоли. Частота возникновения рецидивов при плоскоклеточном раке и аденокарциноме легкого находилась в опосредованной связи с сочетанием базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии (БКГ+ПМ+Д-). Необходимо отметить, что наличие дисплазии, в случаях отсутствия сочетания БКГ+ПМ+ при плоскоклеточном раке легкого, не увеличивало риск развития рецидивов. Однако, в случаях отсутствия базальноклеточной гиперплазии, но наличия плоскоклеточной метаплазии и дисплазии, возрастал риск развития гематогенных метастазов.

Связь между вариантом сочетания морфологических изменений в эпителии бронхов, расположенных в отдалении от опухоли с прогрессией плоскоклеточного рака и аденокарциномы легкого можно объяснить существованием различий между «изолированной» базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ-Д-) и БКГ, сочетающейся с ПМ (БКГ+ПМ+Д-), о которых говорилось выше. Нами было показано, что изменения в бронхиальном эпителии, отдаленном от первичной опухоли, связаны с изменениями клеточной пролиферации, апоптоза и дифференцировки. Кроме того, для каждого из вариантов сочетаний морфологических изменений характерны свои особенности воспалительной реакции. Не исключено, что вариант воспаления в стенке бронха отражает индивидуальные особенности иммунной системы пациента и коррелирует с характером воспалительного микроокружения в строме карциномы. Исходя из этого предположения, при сочетании базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии (БКГ+ПМ+Д-) имеет место неблагоприятный вариант иммуновоспалительной реакции, способствующий рецидивированию (отсроченному лимфогенному метастазированию). В случаях «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-), другой вариант иммуновоспалительной реакции, коррелирующий с гематогенным метастазированием. Необходимо отметить, что в соединительнотканной строме вблизи морфологических изменений бронхиального эпителия во всех случаях наблюдалась воспалительная инфильтрация разной степени выраженности. При этом, нами были обнаружены различия инфильтрации вблизи «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-) и сочетанной базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ+Д-). Кроме того, различные типы сочетаний базальноклеточной гиперплазии, помимо молекулярно-биологических различий, имеют еще и генетические отличия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рак легкого по-прежнему остается одной из основных причин смерти среди онкологических больных. Статистические данные различных авторов показывают, что, несмотря на совершенствование хирургических и терапевтических методов лечения, 5-летняя выживаемость составляет 15 – 30% [1, 9, 10, 14, 20, 21, 24, 26, 37, 38, 41, 42, 115, 135]. Одной из причин низкой выживаемости пациентов с НМРЛ – диагностика опухолевого процесса на поздних (III – IV) стадиях. Тем не менее, даже в тех случаях, когда диагноз установлен на ранней стадии, 45 – 75% больных, в течение первых пяти лет наблюдения, умирают от местных рецидивов или отдаленных метастазов [3, 5, 12, 23, 116, 117, 130, 135, 141, 144, 157]. Поэтому в современной онкопульмонологии определены две важные задачи. Во-первых – диагностика предшествующих раку легкого изменений. Во-вторых, в случаях, когда опухолевый процесс уже реализовался, необходимо иметь возможность прогнозировать вероятность его прогрессии.

Согласно классификации ВОЗ (2015) к предопухолевым изменениям бронхиального эпителия предшествующим, как правило, плоскоклеточной карциноме, относят плоскоклеточную дисплазию/рак *in situ*. При этом многими исследователями отмечается, что канцерогенез плоскоклеточного рака легкого связан еще с базальноклеточной гиперплазией и плоскоклеточной метаплазией [200, 206, 210, 221, 241, 238, 331, 340]. Возникающие в условиях хронического воспаления, эти процессы могут быть не только предшественниками дисплазии и плоскоклеточного рака, но обнаруживаться и при развитии аденокарциномы легкого [83, 162, 210, 234, 400, 401].

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

Проведенное нами исследование цитологических мазков-отпечатков, взятых в крупных сегментарных бронхах, показало, что на фоне хронического бронхита чаще всего развививалась дисплазия I – II степени – 39,1% (102/261) и 29,1% (76/261) случаев соответственно. Реже встречались диспластические изменения III степени – 5,7% (15/261). В 33,7% (65/193) случаев мы наблюдали в пределах одного бронха сочетание дисплазии различной степени тяжести с плоскоклеточной метаплазией (ДИ-III+ПМ+). Базальноклеточная гиперплазия и плоскоклеточная метаплазия, не сочетающаяся с дисплазией (изолированная ПМ, ПМ+Д-), отмечались в 9,7% (25/261) и 12,6% (33/261) случаев соответственно.

Исследование цитометрических параметров клеток и ядер при различных вариантах диспластических изменений бронхиального эпителия (ДИ-III+ПМ+ и ДИ-III+ПМ-), во-первых, подтвердило известную закономерность о возрастании размеров клеток и ядер по мере прогрессии процесса от нормального эпителия к раку [6, 7, 13, 39, 240, 274, 275]. Во-вторых, нами было показано, что при сочетании дисплазии с плоскоклеточной метаплазией (Д+ПМ+) цитометрические параметры клеток и ядер были значительно больше по сравнению с «изолированной» (Д+ПМ-) дисплазией ($p < 0,05$).

Полученные нами результаты исследования цитометрических параметров различных вариантов диспластических изменений и динамическое наблюдение за пациентами в течение трех лет, позволили заключить, что сочетание дисплазии с плоскоклеточной метаплазией является неблагоприятным признаком, связанным с необратимостью и прогрессией дисплазии. В 87,7% (57/65) случаев сочетания дисплазии с плоскоклеточной метаплазией (Д+ПМ+) исход диспластического процесса

был неблагоприятным. При этом в 47,7% (31/65) случаев отмечалась прогрессия дисплазии до более высокой степени, а в 9,2% (6/65) – дисплазия перешла в рак. При «изолированной» дисплазии (Д+ПМ-) неблагоприятный ее исход был всего в 35,2% (45/128) случаев. Дисплазия прогрессировала до более высокой степени в 6,25% (8/128) и всего в 0,8% (1/128) случаев – в плоскоклеточный рак. Известно, что течение дисплазии может носить волнообразный характер. Нередко остановившись в своем развитии или совсем исчезнув, через какой-то промежуток времени она может появиться вновь [114, 209]. Считается, что дисплазия легкой степени может подвергаться спонтанной регрессии, а тяжелой – имеет высокий злокачественный потенциал. Последний реализуется в сроки от нескольких месяцев до нескольких десятков лет [114, 136, 185, 191, 234, 239]. Условия, способствующие необратимости и прогрессии диспластических изменений, до конца не известны.

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

Мелкие бронхи диаметром 1-4 мм выстланы псевдомногорядным эпителием, состоящим из реснитчатых, не реснитчатых, нейроэндокринных клеток и слоя базальных клеток. Не реснитчатые клетки включают бокаловидные, образующие серозный секрет, а также клетки Клара и клетки промежуточного типа [273].

Базальные клетки в бронхах разного калибра составляют 6-30%. На сегодняшний день доказано, что базальные клетки псевдомногорядного эпителия бронхов человека обладают всеми классическими признаками стволовых клеток [213, 219]. Клеточный состав ниши базальных клеток, являющихся тканевыми стволовыми клетками, не уточнен. Полагают, ниши стволовых базальных клеток включают соседние клетки, например люминальные и, возможно, базальные. Кроме этого, свойства ниши

определяются фибробластами и цитокинами клеток, образующих ниши. В условиях воспаления добавляются клетки воспалительного инфильтрата и их цитокины. В нормальном эпителии дыхательных путей существует баланс между самообновляющимися базальными и секреторными реснитчатыми клетками [331]. При хронической обструктивной болезни происходит «патологическое ремоделирование дыхательных путей» с изменением эпителия и подлежащей соединительной ткани. В условиях хронического воспаления, нарушается баланс между пролиферацией и дифференцировкой базальных клеток, проявлением чего становится их гиперплазия [169, 331].

Проведенное нами исследование показало, что базальноклеточная гиперплазия, плоскоклеточная метаплазия и дисплазия бронхиального эпителия в бронхах мелкого калибра, отдаленных от опухоли, в зависимости от варианта их сочетания друг с другом, характеризовались неодинаковыми морфофункциональными характеристиками и разной степенью связи с прогрессией немелкоклеточного рака.

Изучение частоты встречаемости разных морфологических изменений бронхиального эпителия при плоскоклеточном раке и аденокарциноме легкого позволило установить, что наиболее часто встречаемым изменением, как при плоскоклеточном раке, так и при аденокарциноме легкого была базальноклеточная гиперплазия – 81,4% (140/172) случаев. Из них в 67,8% (95/140) базальноклеточная гиперплазия была «изолированной» (БКГ+ПМ-Д-), а в 32,2% (45/140) случаев – базальноклеточная гиперплазия сочеталась с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-). Плоскоклеточную метаплазию в отсутствие базальноклеточной гиперплазии (БКГ-ПМ+) мы наблюдали всего в 7% (12/172) случаев. Дисплазия бронхиального эпителия была выявлена только при плоскоклеточном раке легкого – 9,5% (10/105). Чаще всего она отмечалась на фоне плоскоклеточной метаплазии в отсутствие

базальноклеточной гиперплазии (БКГ-ПМ+Д+) – 8,6% (9/105) случаев. Эпителий бронхов мелкого калибра, отдаленных от опухоли, был нормального строения (БКГ-ПМ-Д-) в 11,6% (20/172) случаев.

Необходимо отметить выявленный нами факт, что проведение больным НАХТ при немелкоклеточном раке легкого, не оказывало существенного влияния на частоту встречаемости различных вариантов сочетания морфологических изменений бронхиального эпителия, морфофункциональные характеристики базальноклеточной гиперплазии, плоскоклеточной метаплазии и дисплазии, а также на выраженность и состав воспалительного инфильтрата вблизи этих процессов.

Характеристика «изолированной» базальноклеточной гиперплазии бронхиального эпителия в бронхах мелкого калибра при немелкоклеточном раке легкого

В условиях хронического воспаления одним из морфологических изменений бронхиального эпителия является «изолированная» базальноклеточная гиперплазия (БКГ+ПМ-Д-). Она развивается как проявление ускоренной регенерации и замедления дифференцировки эпителия. Для нее характерны не высокие значения показателей экспрессии маркеров пролиферативной активности и апоптоза, однако, превышающие значения аналогичных показателей в нормальном эпителии. Результаты нашего исследования показали, что по сравнению с нормальным эпителием, в клеточных элементах «изолированной» базальноклеточной гиперплазии пролиферативная активность была выше в 1,5 раза при плоскоклеточной карциноме и в 1,4 раза при аденокарциноме легкого. Соответственно клетки с мутантным p53 отмечались в 2,2 раза чаще как при плоскоклеточной карциноме, так и при аденокарциноме. В 1,7 раза был больше процент клеток с экспрессией Vcl-2 при плоскоклеточном раке, а при аденокарциноме – в 1,9 раза. 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 обнаруженное нами уменьшение в 1,5 раза в сравнении с нормой эпителиальных клеток, экспрессирующих CD 138.

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 2,44 раза выше при плоскоклеточном раке, и в 3,4 раза – 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. Подобные изменения наблюдались как при плоскоклеточной карциноме, так и при аденокарциноме. Большая выраженность хронического воспаления, согласно современным представлениям, по-видимому, и является причиной реакции бронхиального эпителия в форме базальноклеточной гиперплазии [290, 331].

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.

При изолированной базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-) нами была выявлена специфическая гиперэкспрессия 680 и гипоекспрессия – 530 генов. Наиболее интересным является обнаружение связи между гипоекспрессированными генами и большим количеством разнообразных биологических процессов и сигнальных путей, связанных с иммунным ответом. Среди биологических процессов – «ответ на цитокины», «регуляция продукции цитокинов», «ответ на интерферон гамма», «иммунный ответ», «клеточный хемотаксис», «регуляция клеточной пролиферации». Гипоекспрессированные 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». Описанные нами результаты оценки экспрессии генов при «изолированной» БКГ позволяют предположить, что в данной подгруппе пациентов с плоскоклеточным раком легкого важным компонентом реакции респираторного эпителия является гипоекспрессия 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 БКГ до плоскоклеточной метаплазии.

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+) 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. По сравнению с «изолированной» базальноклеточной гиперплазией, в участках сочетанной БКГ в 1,9 раза была выше пролиферативная активность, определяемая по экспрессии Ki-67+, как при плоскоклеточной карциноме, так и при аденокарциноме.

Подобные же отличия мы обнаружили и относительно процента клеток в эпителии базальноклеточной гиперплазии, экспрессирующих p53. При сочетанной базальноклеточной гиперплазии таких клеток было в 1,5 раза больше, чем при «изолированной» базальноклеточной гиперплазии, как при плоскоклеточном раке, так и при аденокарциноме легкого. Процент клеток в участках сочетанной базальноклеточной гиперплазии, экспрессирующих Vcl-2, был на уровне тенденции ($p=0,08$) больше в 1,2 раза при плоскоклеточной карциноме и значимо больше в 1,8 раза при аденокарциноме легких. Как следует из этих результатов, при базальноклеточной гиперплазии, сочетанной с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д-), не только больше пролиферирующих клеток, но и клеток с мутацией p53 и экспрессирующих Vcl-2. Как известно мутация p53 препятствует инициации апоптоза, а экспрессия Vcl-2

ингибирует апоптоз в случаях, когда возможна его инициация [15, 80, 82, 108, 163, 192, 216, 259, 426]. 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 [54, 97, 183, 186], дополняет представления о выявленных нами различиях между «изолированной» и сочетанной базальноклеточной гиперплазией бронхиального эпителия. В участках базальноклеточной гиперплазии, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией процент клеток, экспрессирующих CD138 был в 1,8 раза меньше, чем при «изолированной» базальноклеточной гиперплазии, как при плоскоклеточном раке, так и при аденокарциноме легких. Это значит, что при сочетанной базальноклеточной гиперплазии больше клеток с потерей этого маркера дифференцировки.

Воспалительная инфильтрация вблизи участков сочетанной базальноклеточной гиперплазии была на уровне тенденции более выражена в сравнении с «изолированной» БКГ – в 1,1 раза. Такая тенденция наблюдалась как при плоскоклеточном раке, так и при аденокарциноме легких. По-видимому, это происходило за счет более выраженной инфильтрации CD138+ плазматическими клетками – в 1,8 в случаях плоскоклеточного рака, а при аденокарциноме – в 1,6 раза, а также CD3+ Т-лимфоцитами – в 1,2 раза при НМРЛ. Процент же CD68+ макрофагов, напротив, был меньше в 1,3 при плоскоклеточном раке и в 1,2 раза при аденокарциноме легкого.

При базальноклеточной гиперплазии, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией, нами было выявлено 278 гиперэкспрессированных и 211 гипоекспрессированных специфических генов. Как и в «изолированной» базальноклеточной гиперплазии, при БКГ

сочетанной с плоскоклеточной метаплазией, мы не обнаружили связи гиперэкспрессированных генов с известными биологическими процессами и сигнальными путями. Вместе с тем, гипоекспрессированные гены демонстрировали такую связь. Но в отличие от «изолированной», при сочетанной БКГ были гипоекспрессированы гены, связанные с «интегриновыми взаимодействиями», «сборкой коллагеновых молекул, волокон и других многомерных структур» и «организацией внеклеточного матрикса». При этом среди гипоекспрессированных генов, отсутствовали гены, связанные с иммуновоспалительными реакциями. По-видимому, это важное различие между сравниваемыми вариантами базальноклеточной гиперплазии. 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, гипоекспрессия генов, обеспечивающих взаимодействие с межклеточным матриксом, может нарушать нормальное эпителиально-стромальное взаимодействие. Можно допустить, что все это вместе взятое нарушает обратимость базальноклеточной гиперплазии и способствует плоскоклеточной метаплазии, с которой она в этой группе сочетается.

Хотя нельзя исключить возможность развития плоскоклеточной метаплазии на фоне хронического воспаления из эпителия с нормальной морфологией, чаще она может возникнуть на фоне базальноклеточной гиперплазии. Причем некоторые признаки, обуславливающие развитие плоскоклеточной метаплазии, по-видимому, могут появляться на молекулярном уровне уже на этапе базальноклеточной гиперплазии с ее классическими морфологическими проявлениями. По-видимому, базальноклеточная гиперплазия респираторного эпителия изначально гетерогенна по функциональным характеристикам. Наши расчеты показали, что когда при базальноклеточной гиперплазии параметры

экспрессии маркеров пролиферативной активности $Ki67 \geq 25\%$, а уровня дифференцировки $CD138 \leq 20\%$, то прогнозируется высокий риск развития плоскоклеточной метаплазии (чувствительность – 91%; специфичность – 93%). В таких случаях, с определенного момента развития хронического воспаления, вероятнее обнаружение сочетания базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии.

Характеристика плоскоклеточной метаплазии сочетающейся с базальноклеточной гиперплазией бронхиального эпителия в бронхах мелкого калибра при немелкоклеточном раке легкого

Согласно данным литературы, нарушение физиологической регенерации респираторного эпителия при хроническом воспалении, в определенных условиях приводит не только к базальноклеточной гиперплазии, но и к накоплению супрабазальных клеток за счет реснитчатых и, в конечном счете, к плоскоклеточной метаплазии [331]. Получены убедительные данные о том, что провоспалительные цитокины (TNF- α , IL-1 β и IL-6) ответственны за гиперплазию и плоскоклеточную метаплазию в бронхиальном эпителии. Происходит это через активацию сигнальных путей NF- κ B и activator protein-1/mitogen-activated protein kinase. Подобная связь подтверждается торможением развития плоскоклеточной метаплазии под действием антагонистов провоспалительных цитокинов [170]. Отмечается ключевая роль интегрин опосредованной активации TGF- β в развитии и усилении выраженности плоскоклеточной метаплазии. Представлены доказательства того, что плоскоклеточная метаплазия, через повышение секреции IL-1, приводит к фибропластической реакции в рядом расположенных фибробластах [57].

Синдиканы вовлечены в широкий круг биологических процессов: формирование цитоскелета, рост, дифференцировку, адгезию, клеточную

миграцию и ангиогенез [56, 155, 370, 375]. Syndecan-1 (CD138) – поверхностный протеингликан, определяет эпителиальный фенотип и дифференцировку клеток [56, 203, 298]. Одной из его функций является негативная регуляция воспалительных процессов [155, 427]. Причиной снижения или полного подавления экспрессии CD138 может быть эпителиально-мезенхимальный переход. Показано, что трансформирующий фактор роста бета (TGF- β), среди прочих изменений приводит к экспрессии *SNAIL*, который ингибирует не только экспрессию E-cadherin, но и CD138 [307].

Известна связь экспрессии CD138 с прогнозом карцином [370]. Уровень экспрессии CD138 снижается при развитии плоскоклеточного рака и коррелирует с плохим прогнозом при раках головы и шеи, плоскоклеточном раке шейки матки [105, 291]. В случаях плоскоклеточного рака головы и шеи, снижение экспрессии CD138 ассоциировано с агрессивностью и низкой выживаемостью [232]. Низкий уровень экспрессии CD138 при плоскоклеточной карциноме легких связывают с неблагоприятным прогнозом [54, 55].

Однако имеются данные противоположного характера. Syndecan-1 необычно высоко экспрессируется при назофарингиальной карциноме и это связано с высокой стадией и плохим прогнозом [97].

Что касается реактивных и предопухолевых изменений, то преобладают данные о снижении уровня экспрессии CD138 по мере нарастания диспластических изменений [217, 364]. Так, экспрессия CD138 зарегистрирована в неизменном и метапластическом плоском эпителии шейки матки. По мере прогрессирования степени тяжести цервикальной дисплазии уровень экспрессии CD138 снижался, число клеток с экспрессией CD138 уменьшалось [183]. Однако описанное снижение экспрессии CD138 при дисплазии и плоскоклеточной карциноме

отмечается не всегда. Например, в полости рта не обнаружено статистически значимой разницы в ряду дисплазия (I-III) – рак *in situ* – инвазивный плоскоклеточный рак [186].

В наших наблюдениях при слабо выраженной базальноклеточной гиперплазии экспрессия CD138 практически отсутствовала в базальном слое, но была отчетлива в большинстве реснитчатых и других дифференцированных клеток. Вероятно поэтому, по мере увеличения выраженности базальноклеточной гиперплазии, уменьшается процент клеток, экспрессирующих CD138. Именно такая картина наблюдалась при сочетанной с ПМ базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ+Д-). Мы обнаружили практически полную потерю способности к экспрессии CD138 уже при плоскоклеточной метаплазии. Не исключено, что эта особенность экспрессии CD138, установленная в наших наблюдениях, зависит от органной локализации плоскоклеточной метаплазии.

При сравнении плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с БКГ (БКГ+ПМ+Д-) с базальноклеточной гиперплазией из этого сочетания, мы выявили в плоскоклеточной метаплазии большую (в 1,4 раза) выраженность пролиферативной активности, как при плоскоклеточной карциноме, так и аденокарциноме легкого, а также клеток экспрессирующих p53 (в 2 раза) при плоскоклеточном раке и аденокарциноме легкого. Клеток с экспрессией Vcl-2 было больше в 2,7 раза при плоскоклеточной карциноме и в 1,7 – при аденокарциноме. Как отмечалось выше, экспрессия CD138 при плоскоклеточной метаплазии отсутствовала.

В сравнении с базальноклеточной гиперплазией, плотность воспалительного инфильтрата вблизи сочетающейся с ней плоскоклеточной метаплазии, была меньше в 2,2 раза при плоскоклеточном раке и в 2,3 раза при аденокарциноме легких.

Кроме того, нами 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. В случаях аденокарциномы легкого, в воспалительном инфильтрате около плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с базальноклеточной гиперплазией было в 2 раза меньше число CD3+ Т-лимфоцитов и в 1,3 раза – В-лимфоцитов, по сравнению с инфильтратом базальноклеточной гиперплазии, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией.

В плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с базальноклеточной гиперплазией, было обнаружено 1494 гипер- и 710 гипоэкспрессированных специфических генов. Эти цифры значительно больше, чем в сочетающейся с ней БКГ. Не всем биологическим процессам и сигнальным путям, с которыми связаны гипер- или гипоэкспрессированные гены, судя по их названию, можно дать функциональную трактовку. Среди гиперэкспрессированных отмечались гены, ассоциированные с «клеточным сигналингом». Более интересен результат аннотирования гипоэкспрессирующихся генов, которые были связаны с процессами экспрессии генов («регуляция транскрипции», «регуляция геной экспрессии», «регуляция биосинтеза РНК»). Выявленная связь гипоэкспрессированных генов с процессом «дифференцировки эпителиальных клеток легкого», по-видимому, отражает трансформацию респираторного эпителия бронхов в плоский эпителий.

Характеристика плоскоклеточной метаплазии бронхиального эпителия, сочетающейся с дисплазией, в бронхах мелкого калибра при немелкоклеточном раке легкого

Данный вариант морфологических изменений встречался значительно реже, чем другие типы морфологических изменений бронхов. В группе больных составлял 5,2% (9/172) от исследованных случаев и был 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.

При сравнении плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с дисплазией (БКГ-ПМ+Д+) и плоскоклеточной метаплазии, сочетанной с базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ+Д-), в случаях плоскоклеточной карциномы, мы не обнаружили значимых различий пролиферативной активности, определяемой по экспрессии Ki-67, а также доли клеток экспрессирующих p53 и Vcl-2. В клеточных элементах плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с дисплазией, как и в случаях ее сочетания с базальноклеточной гиперплазией, экспрессия CD138 отсутствовала.

Выраженность и состав воспалительного инфильтрата вблизи плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с дисплазией, также не отличались от воспалительного инфильтрата вблизи плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с базальноклеточной гиперплазией. Исключение составили CD68+ макрофаги. Их количество при плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с дисплазией, было больше в 1,4 раза.

Плоскоклеточная метаплазия, сочетающаяся с дисплазией, обнаружена нами в бронхах мелкого калибра при плоскоклеточном раке легкого. При аденокарциноме таких случаев нами отмечено не было. Базальноклеточная гиперплазия очевидно легче, чем плоскоклеточная метаплазия подвергается обратному развитию. В связи с этим обнаружение плоскоклеточной метаплазии, без базальноклеточной гиперплазии, можно рассматривать, как ситуацию когда базальноклеточная гиперплазия была, но относительно быстро процесс нормализовался, либо она трансформировалась в плоскоклеточную метаплазию.

В отличие от плоскоклеточной карциномы, при развитии аденокарциномы, в бронхах отдаленных от опухоли, практически не было выявлено ни изолированной плоскоклеточной метаплазии, ни дисплазии респираторного эпителия, но наблюдались либо «изолированная» базальноклеточная гиперплазия, либо ее сочетание с плоскоклеточной метаплазией. Не исключено, что варианты изменений в респираторном эпителии альтернативны, и пациенты с аденокарциномой относятся к подгруппе, в которой, в силу особенностей развития иммуновоспалительных реакций при хроническом бронхите и/или особенностей реагирования эпителия на воспалительные цитокины, нет склонности к развитию дисплазии и плоскоклеточного рака.

При плоскоклеточной метаплазии, которая сочеталась с дисплазией II-III степени, нами отмечена гиперэкспрессия 654 и гипоекспрессия 672 специфических генов. Гиперэкспрессированные гены имели отношение к клеточному делению и ответу на ксенобиотики. Кроме этого был гиперэкспрессирован ген *КНК*, описанный в литературе в связи с патогенезом и метастазированием рака легкого [118, 165, 250]. Последнее, особенно примечательно, поскольку именно в обсуждаемой группе больных с плоскоклеточной карциномой легкого нами отмечена более высокая частота гематогенного метастазирования. В тоже время

гипоэкспрессированные гены отражают потерю способности к дифференцировке реснитчатого эпителия, подчеркивая, по-видимому, определенную степень необратимости плоскоклеточной метаплазии. Гипоэкспрессированными при данном варианте плоскоклеточной метаплазии были и гены, связанные с организацией внеклеточного матрикса, а также хемотаксисом нейтрофильных лейкоцитов и миграцией миелоидных клеток. Предположение о том, что клеточные элементы плоскоклеточной метаплазии, сочетающиеся с дисплазией, не обладают заметными способностями к стимуляции воспаления, подтверждается выявленной гипоэкспрессией генов, ассоциированных с сигнальными путями, которые обозначены названиями инфекционных (малярия, коклюш, легионеллез) или иммунопатологических (ревматоидный артрит) заболеваний.

Характеристика дисплазии бронхиального эпителия в бронхах мелкого калибра при немелкоклеточном раке легкого

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

Поскольку в наших наблюдениях дисплазия сочеталась с плоскоклеточной метаплазией при отсутствии базальноклеточной гиперплазии, важно было сравнить ее характеристики с сочетающейся с ней плоскоклеточной метаплазией. В клеточных элементах дисплазии II-III степени пролиферативная активность была выше, чем в плоскоклеточной метаплазии в 1,3 раза, а процент клеток экспрессирующих p53 – в 1,44, Vcl-2 – в 1,55 раза.

Общее количество лейкоцитов в инфильтрате вблизи дисплазии II-III степени на уровне тенденции было в 1,2 раза меньше, чем при сочетающейся с ней плоскоклеточной метаплазии. Это было связано с уменьшением в составе воспалительного инфильтрата CD3+ Т-лимфоцитов и CD20+ В-лимфоцитов. В тоже время в составе воспалительного инфильтрата вблизи дисплазии II-III степени наблюдалось одинаковое с сочетающейся с ней плоскоклеточной метаплазией содержание CD138 + плазматических клеток, а CD68+ макрофагов на уровне тенденции меньше. 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.

Среди специфических гиперэкспрессированных в диспластически измененном эпителии 639 генов были гены, ассоциированные с биологическими процессами и сигнальными путями, участвующими в клеточном делении и процессе старения клеток. Кроме этого, гиперэкспрессированными оказались гены, причастные к развитию немелкоклеточного рака легких. Это гены *MS4A3*, *KCNG3* и *SYNPO2L* [161, 212, 251, 324, 428]. Эти данные подтверждают существующие представления о том, что молекулярные изменения, приводящие в

конечном итоге к развитию опухоли, могут выявляться уже в предопухолевых процессах [50, 237].

Среди выявленных гипоэкспрессированных генов, 748 были специфическими. Интересно отметить, что при дисплазии, как и при «изолированной» базальноклеточной гиперплазии, оказались гипоэкспрессированы гены, связанные с биологическими процессами и сигнальными путями, благодаря которым развиваются иммунные реакции и воспаление (это: «регуляция продукции цитокинов», «клеточный хемотаксис», «положительная регуляция миграции лейкоцитов», «хемокин-рецепторное связывание», «положительная регуляция иммунного ответа», «гуморальный ответ», «острый воспалительный ответ», «воспалительный ответ»). Как и при плоскоклеточной метаплазии, при дисплазии были гипоэкспрессированы 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 легкого

Одним из основных результатов изложенной работы являются отличия «изолированной» базальноклеточной гиперплазии, от сочетанной с плоскоклеточной метаплазией, а плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с базальноклеточной гиперплазией, от плоскоклеточной метаплазии, сочетанной с дисплазией. Другой результат – различия состава воспалительного инфильтрата вблизи «изолированных» и сочетанных вариантов морфологических изменений бронхиального эпителия. Все это легло в основу предположения о различиях эпителиально-стромальных отношений при разных вариантах сочетания морфологических изменений в респираторном эпителии, которые могут иметь конститутивный характер. В силу этого можно было ожидать, что разные варианты эпителиально-стромальных отношений могут быть сопряжены с различными вариантами паренхиматозно-стромальных отношений в карциномах, при которых мы изучали изменения в мелких бронхах. Поскольку стромально-паренхиматозные отношения существенно влияют на прогрессию опухоли [71, 268, 283, 290, 305, 306, 316, 327, 328, 350], можно предполагать, что и 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.

Оказалось, что это предположение не подтвердилось при рассмотрении синхронного лимфогенного метастазирования, выявляемого при проведении операции. Связи варианта сочетаний морфологических

изменений, наблюдаемых в бронхиальном эпителии при НМРЛ, с развитием синхронных лимфогенных метастазов нам выявить не удалось.

В отличие от синхронного лимфогенного метастазирования вероятность рецидивирования была сопряжена с сочетанием базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии. Подавляющее число рецидивов возникло именно в этой группе: при плоскоклеточном раке в 93% (14/15), при аденокарциноме легких – 100% (7/7) случаев. Необходимо отметить, что даже наличие дисплазии, в случаях отсутствия сочетания БКГ+ПМ+ при плоскоклеточном раке легкого, не увеличивало риск развития рецидивов.

Для понимания механизма подобной связи следует обратить внимание на сущность проявлений рецидивов опухолевого процесса. Только в 4 случаях из 22 это были истинные рецидивы опухоли в культе бронха. Все они отмечены при плоскоклеточном раке легкого. Остальные рецидивы (18 случаев) опухолевой болезни, и при плоскоклеточной карциноме и при аденокарциноме легких, представляли собой отсроченные лимфогенные метастазы в регионарные лимфоузлы (в лимфоузлы грудной полости). Поскольку на момент операции опухолевые клетки, скорее всего уже находились в лимфатических узлах, можно ожидать, что специфика эпителиально-стромальных отношений в бронхах мелкого калибра при сочетании базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии (БКГ+ПМ+Д-) каким-то образом связана со стимуляцией роста лимфогенных микрометастазов, то есть с формированием в лимфатическом узле оптимальной премегастатической ниши [64, 154, 344]. Описанная закономерность подчеркивает различие механизмов развития синхронных и отсроченных лимфогенных метастазов. Можно предположить, что для развития синхронных лимфогенных метастазов, в отличие от отсроченных, рассматриваемых как рецидивы болезни, не

требуются дополнительные межклеточные взаимодействия, коррелирующие с эпителиально-стромальными событиями в участках базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии при их сочетании.

Именно подобная закономерность обнаружена в наших исследованиях. При «изолированной» базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-) в отдаленных от опухоли бронхах, гематогенные метастазы немелкоклеточного рака возникли в 43,2% (41/95) случаев. При других вариантах сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия, гематогенные метастазы немелкоклеточного рака легкого были обнаружены лишь в 9,2% (7/76) случаев.

Полученные нами результаты демонстрируют независимость механизмов разных форм прогрессии. Гематогенное метастазирование не зависело от наличия синхронных лимфогенных метастазов и от развития рецидивов. Скорее, наоборот, у пациентов в отсутствии рецидивов опухоли гематогенные метастазы возникали в 97,9% (47/48), а при их наличии – в 2,1% (1/48) случаев. Следует отметить, что при аденокарциноме легкого, в тех случаях, когда возникали гематогенные метастазы, не было выявлено ни одного случая рецидивирования.

В 80,6% (25/31) гематогенные метастазы плоскоклеточного рака мы наблюдали в тех случаях, когда в отдаленном от опухоли в бронхиальном эпителии определялась «изолированная» базальноклеточная гиперплазия (БКГ+ПМ-Д-). В остальных, у пациентов, у которых в бронхиальном эпителии выявлялась дисплазия в сочетании с плоскоклеточной метаплазией (БКГ-ПМ+Д+).

Гематогенные метастазы аденокарциномы легкого, как и при плоскоклеточном раке, чаще всего наблюдались у пациентов с «изолированной» базальноклеточной гиперплазией бронхиального эпителия (БКГ+ПМ-Д-) – 94,1% (16/17) случаев. При отсутствии

морфологических изменений в слизистой оболочке бронхов (БКГ-ПМ-Д-) нами не было обнаружено ни гематогенных метастазов, ни рецидивов НМРЛ.

Связь между вариантом сочетания морфологических изменений в эпителии бронхов, расположенных в отдалении от опухоли, с прогрессией плоскоклеточного рака и аденокарциномы легкого, можно объяснить существованием различий между «изолированной» базальноклеточной гиперплазией (БКГ+ПМ-Д-) и БКГ, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией (БКГ+ПМ+Д+), о которых говорилось выше. Нами было показано, что изменения в бронхиальном эпителии, отдаленном от первичной опухоли, связаны с изменениями экспрессии маркеров клеточной пролиферации, апоптоза и дифференцировки. Кроме того, для каждого из вариантов сочетаний морфологических изменений характерны свои особенности воспалительной реакции. 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 некоторые различия в проявлениях воспаления при наличии и отсутствии гематогенных метастазов. В будущем, изучение различных субпопуляций Т – лимфоцитов (хелперов, Treg), субпопуляций макрофагов, с определением в каждом случае преобладающего типа иммунновоспалительных реакций, позволит проверить эту гипотезу. Исходя из нее, при сочетании базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии (БКГ+ПМ+Д-) может иметь место конститутивно обусловленный неблагоприятный вариант иммунновоспалительной реакции, который отражает существенные особенности интратуморальной реакции, способствующей рецидивированию (отсроченному лимфогенному метастазированию). В случаях «изолированной»

базальноклеточной гиперплазии (БКГ+ПМ-Д-), по-видимому, развивается вариант иммуновоспалительной реакции, коррелирующей с гематогенным метастазированием. Подобные допущения основаны на имеющихся данных литературы о том, что при хроническом бронхите, как компоненте хронической обструктивной болезни, можно различать разные «субфенотипы» воспаления [362].

Известно, что стромальное микроокружение играет важную роль в прогрессии рака [81, 110, 131, 142, 195, 242, 293]. Существенным компонентом микроокружения являются клетки воспалительного инфильтрата. При немелкоклеточном раке легкого наблюдается заметная инфильтрация стромы различными типами иммунных клеток, которая связана с прогрессированием и выживаемостью [81]. Развитие метастазов при немелкоклеточном раке легких ассоциировано с уменьшением плотности инфильтрации опухоли Т – лимфоцитами [383].

Значительная инфильтрация стромы Treg лимфоцитами, оказалось независимым фактором, связанным с улучшением общей выживаемости при немелкоклеточном раке легких [187].

Связь воспаления, развивающегося в легких вне опухоли и прогрессии немелкоклеточного рака, обсуждается. Показано, что хроническая обструктивная болезнь легких умеренной и тяжелой степени является независимым прогностическим фактором высокого риска рецидивирования при немелкоклеточном раке легкого [229, 317]. Однако, при этом не уточняется, имеют ли значение характер воспаления в бронхах и изменения в бронхиальном эпителии.

В наших наблюдениях обращает внимание, что только при двух разных состояниях респираторного эпителия в бронхах мелкого калибра, «изолированной» базальноклеточной гиперплазии и дисплазии сочетанной с плоскоклеточной метаплазией, которые являются прогностическими факторами высокого риска развития гематогенных метастазов,

наблюдается схожий характер экспрессии генов, имеющих отношение к иммунным реакциям и воспалению. Они гипоекспрессированы. Это предполагает не только низкую чувствительность эпителия к цитокинам клеток 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.

Лучшее понимание особенностей иммуновоспалительной реакции и эпителиально-стромальных отношений при этих процессах, поможет понять, каким образом они связаны с процессом гематогенного метастазирования.

Таким образом, разные варианты сочетания морфологических изменений в бронхах во многом определяют их морфофункциональные характеристики и связь с прогрессией дисплазии и немелкоклеточного рака легкого.

В сегментарных бронхах, исследованных по поводу хронического бронхита, отличия проявлялись в том, что при сочетании дисплазии с плоскоклеточной метаплазией, цитометрические показатели были больше, чем при «изолированной» дисплазии. Более того, сочетание в сегментарных бронхах БКГ-Д+ПМ+ оказалось прогностическим признаком необратимости и прогрессии дисплазии. В мелких бронхах это сочетание связано 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.

Особенностью морфологических изменений в бронхах мелкого калибра при аденокарциноме легких было крайне редкое обнаружение дисплазии и сочетанной с нею плоскоклеточной метаплазии.

В зависимости от сочетания разных вариантов морфологических изменений респираторного эпителия в бронхах мелкого калибра, отдаленных от немелкоклеточного рака легкого и их связи с разными вариантами опухолевой прогрессии, целесообразно выделить несколько групп.

I группа – (БКГ-ПМ-Д-), с морфологически неизменным респираторным эпителием. Характеризуется минимально выраженным воспалением с наличием в инфильтрате всех исследуемых элементов. Эпителий со слабо выраженной пролиферативной активностью и минимальным числом клеток экспрессирующих p53 и Vcl-2. За период наблюдения среди пациентов этой группы не обнаружилось ни рецидивов, ни гематогенных метастазов.

II группа – (БКГ+ПМ-Д-), с «изолированной» базальноклеточной гиперплазией. В отличие от первой группы, в этой группе воспалительная инфильтрация, пролиферативная активность эпителия, доля клеток с экспрессией p53 и Vcl-2 были значимо выше. При этом эпителий характеризовался гипоэкспрессией генов, обеспечивающих сигнальные пути и биологические процессы, имеющих отношение к поддержке иммуновоспалительных реакций и реагированию эпителия на цитокины. Не исключено, что именно в этой группе характер стромально-эпителиальных отношений обеспечивает неспособность БКГ, на момент исследования, прогрессировать до плоскоклеточной метаплазии и дисплазии. Данный вариант эпителиально-стромальных отношений сопряжен с высокой вероятностью гематогенного метастазирования.

III группа – (БКГ+ПМ+Д-), с сочетанием базальноклеточной гиперплазии и плоскоклеточной метаплазии. Базальноклеточная гиперплазия, несмотря на морфологическую идентичность подобному процессу во второй группе, отличается от нее несколько большей выраженностью воспалительной инфильтрации и значимым превышением пролиферативной активности и доли клеток с экспрессией p53 и Vcl-2. В значительной степени уменьшается доля дифференцированных клеток, экспрессирующих CD138. В отличие от «изолированной» базальноклеточной гиперплазии, при ее сочетании с плоскоклеточной метаплазией, нет гипох экспрессии генов, связанных с иммуновоспалительными реакциями, но гипох экспрессированы гены взаимодействия эпителия с внеклеточным матриксом. В соответствии с логикой обсуждения результатов второй группы, в данном случае, эпителий сочетанной базальноклеточной гиперплазии способен активно взаимодействовать с воспалительным инфильтратом и реагировать на цитокины. С этим может быть связана плоскоклеточная метаплазия на почве базальноклеточной гиперплазии.

Плоскоклеточная метаплазия, развивающаяся в сочетании с базальноклеточной гиперплазией, во-первых, подтверждает склонность базальноклеточной гиперплазии в этой группе наблюдения к прогрессии, характеризуется типичными морфологическими проявлениями, но при этом отмечается потеря признака высокой дифференцировки эпителия – экспрессии CD138. В отличие от базальноклеточной гиперплазии, вблизи плоскоклеточной метаплазии, в этих же бронхах, отмечается меньшая (более чем в два раза) выраженность воспалительной инфильтрации Т – и В – лимфоцитами, плазматическими клетками и макрофагами. Несмотря на это пролиферативная активность, количество клеток, экспрессирующих p53 и Vcl-2 еще выше, чем в клеточных элементах базальноклеточной гиперплазии. В отличие от двух вариантов базальноклеточной гиперплазии, при сочетанной с ней плоскоклеточной метаплазии, отмечена

гиперэкспрессия генов, включая гены, ассоциированные с «клеточным сигналингом». Среди гипоекспрессированных – гены, связанные с регуляцией транскрипции.

IV группа – БКГ-ПМ+Д+, подобные изменения наблюдались только в бронхах мелкого калибра, в отдалении от плоскоклеточного рака легких. В группе пациентов с аденокарциномой легкого не обнаружено сочетания дисплазии с плоскоклеточной метаплазией.

Плоскоклеточная метаплазия, сочетанная с дисплазией, не отличалась от подобного процесса, сочетанного с базальноклеточной гиперплазией пролиферативной активностью и количеством клеток, экспрессирующих p53 и Vcl-2. Как и в первом случае, отсутствовала экспрессия CD138. Воспалительная инфильтрация вблизи плоскоклеточной метаплазии, сочетающейся с дисплазией, отличалась от сравниваемой плоскоклеточной метаплазии, только более выраженной инфильтрацией макрофагами. Вместе с тем отмечены различия в экспрессии генов. В клеточных элементах плоскоклеточной метаплазии, сочетанной с дисплазией, наблюдалась гиперэкспрессия гена *КНК*, связанного с метастазированием и оказались гипоекспрессированы гены, имеющие отношение к дифференцировке реснитчатого эпителия. Последнее, по-видимому, отражает определенную степень необратимости плоскоклеточной метаплазии.

В участках дисплазии, сочетающейся с плоскоклеточной метаплазией, обнаружены максимально выраженная пролиферативная активность и процент клеток с экспрессией p53 и Vcl-2. При дисплазии гипоекспрессированы гены, с которыми связаны иммунные реакции и воспаление. Соответствовала этим экспрессионным особенностям меньшая степень воспалительной инфильтрации, преимущественно за счет Т – и В – лимфоцитов. При дисплазии, как и при плоскоклеточной метаплазии, были гипоекспрессированы гены, связанные с дифференцировкой

бронхиального эпителия. По-видимому, это проявление необратимости изменений имеет истоки уже в сочетанной с дисплазией плоскоклеточной метаплазии. В отличие от плоскоклеточной метаплазии, при дисплазии, истинно предопухоловом процессе, гиперэкспрессированны оказались гены, причастные к развитию немелкоклеточного рака легких.

Вариант сочетания разных морфологических изменений в условиях хронического воспаления в бронхах мелкого калибра, оказалось, отражает существенные особенности стромально-эпителиальных отношений в бронхиальном дереве, обусловленных, вероятно как особенностью иммунорегуляторных реакций, так и вариантами влияния и реагирования эпителия на воспаление. Именно этим можно объяснить тесную косвенную связь вариантов сочетания морфологических изменений в бронхах с одной стороны, и разных форм прогрессирования с другой. В подгруппе пациентов с БКГ+ПМ+Д-, как при плоскоклеточном раке, так и при аденокарциноме легкого наблюдался высокий риск локорегионарных рецидивов, представленных в основном отсроченными лимфогенными метастазами. В подгруппах пациентов с БКГ+ПМ-Д- (при плоскоклеточном раке и аденокарциноме) и БКГ-ПМ+Д+ (обнаружен только при плоскоклеточном раке) отмечался крайне низкий риск развития рецидивов, но очень высокий риск возникновения гематогенных метастазов. У пациентов с БКГ-ПМ-Д-, при любом варианте немелкоклеточного рака в течение всего срока наблюдения не возникли ни рецидивы, ни гематогенные метастазы.

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 генетические нарушения в процессе канцерогенеза выявляются уже в нормальном эпителии и увеличиваются от базальноклеточной гиперплазии к плоскоклеточной метаплазии и дисплазии/раку *in situ* [200]. Но как описанные морфологические процессы не обязательно следуют друг за другом, вплоть до развития дисплазии [211, 272], так и генетические нарушения тоже не нарастают линейно. В каждом случае развития плоскоклеточной карциномы и обнаружения в мелких бронхах, отдаленных от опухоли, определенного сочетания морфологических (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 связи с этим мы и 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 иммуно-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 эпитеия 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+: 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. Неoadъювантная 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 значительно 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 Vcl-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+ ($34,9 \pm 1,7$)% против ($18,3 \pm 7,1$)%, $p=0,003$ при плоскоклеточной карциноме и ($33,6 \pm 1,5$)% и ($17,2 \pm 8,1$)%, $p=0,0001$ при аденокарциноме, количество p53+ клеток ($14,4 \pm 5,5$)% против ($9,6 \pm 2,3$)%, $p=0,0008$ при плоскоклеточной карциноме и ($13,9 \pm 5,1$)% и ($9,1 \pm 2,1$)%, $p=0,001$ при аденокарциноме и Vcl-2+ ($17,2 \pm 3,5$)% против ($9,7 \pm 3,9$)%, $p=0,001$ 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-) значительно больше количество CD138+

плазматических клеток, CD3+ Т- и CD20+ В- лимфоцитов и значительно 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 гипохэкспрессирующихся генов и сигнальных путей, регулирующих специфические биологические процессы. Гипохэкспрессия генов, имеющих отношение к иммунно-воспалительным реакциям в эпителии изолированной БКГ и дисплазии, сочетается с уменьшением выраженности иммунновоспалительной 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% ($\chi^2_{\text{Y}}=45,66$, $p=0,0000$; 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% ($\chi^2_{\text{Y}}=65,45$; $p=0,00000$; 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% ($\chi^2_{\text{Y}}=58,22$; $p=0,0000$; 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 ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Арсеньев А. И., Аристидов Н. Ю., Барчук А. С., Левченко Е. В., Вагнер Р. И., Барчук А. А и др. Сравнительная оценка эффективности лечения больных раком легкого // Вопросы онкологии 2012, № 3 (58). – С. 398-401.
2. Арсеньев А.И., Барчук А.А., Желбунова Е.А., Мацко Д.Е., Барчук А.С., Левченко Е.В. и др. Морфологические, иммуногистохимические и спектральные характеристики дисплазий, преинвазивных и инвазивных форм центрального рака легкого // Вестник хирургии им. И.И. Грекова, 2013. – №5, т.172. – С. 16-20.
3. Артамонова Е.В. Ингибиторы тирозинкиназы EGFR в терапии 1-й линии немелкоклеточного рака легкого: переход от эмпирического подхода к персонализации // Современная онкология. 2012. – №4 – С. 26-31.
4. Болгова Л.С., Ярощук Т.М. Гистогенез рака легкого. Вопросы онкологии, 2010, том 56, № 4. – 470-475
5. Вальков М.Ю., Скрипчак Ю.В., Соловьева Е.П., Вальков А.Ю., Асахин С.М. Методы лечения и исходы при местнораспространенном раке легкого III стадии: популяционный анализ // Вестник РНЦРР Минздрава России. 2012. Т. 3, № 12. С. 7–14.
6. Волченко Н.Н., Славнова Е.Н., Гладунова З.Д., Савостикова М.В. Цитоморфометрическая характеристика дисплазий при дисгормонально-гиперпластических процессах молочной железы // СОЖ, 2004, № . С.95-96.
7. Гарлоев Р.А., Автандилов Г.Г. Морфофункциональная характеристика гиперплазии, дисплазии и карцином предстательной железы (микротелефотометрическое исследование) // Архив патологии. 2003. №1. С.16-21.

8. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких (пересмотр 2011 г.) / Пер. с англ. под ред. А.С. Белевского. М.: Российское респираторное общество, 2012. 80 с.
9. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 г. -Москва, ИГ РОНЦ, 2014 -226 с.
10. Давыдов М.И., Максимович Д.И., Заридзе Д.Г. Динамика заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований в России // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. 2015. Т. 26. № Допол., С. 1.
11. Должиков А.А.. Иммуноморфологическое исследование метаболических и пролиферативных маркеров при плоскоклеточном раке шейки матки // Вестник новых мед. технологий. Электронный журнал – 2013 – N 1.
12. Желбунова Е.А. Морфологические и эндоскопические параллели при ранней диагностике центрального рака легкого // Клиническая медицина. Хирургия. Онкология 2013. – т.14. – С. 40-51.
13. Зиновьев С.В. Морфометрические особенности бронхиального эпителия, содержащегося в бронхоальвеолярном лаваже у больных бронхиальной астмой // Бюллетень. 2006. - № 23. С. 48-50.
14. Злокачественные новообразования в России в 2014 году / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М., 2015, 250с.
15. Иммуногистохимические методы: руководство. Пер. с англ. под ред. Г.А. Франка и П.Г. Малькова // М., 2011, – 224 с. Иммуногистохимические методы: руководство. Пер. с англ. под ред. Г.А. Франка и П.Г. Малькова // М., 2011, – 224 с.

- 16.Кашинцева Т. В. Апоптоз клеток воспаления и морфологические изменения при бронхиальной астме //автореф. дис. канд. мед. наук. Санкт-Петербург, 2012. 19с.
- 17.Коган Е.А. Молекулярная патология предрака и рака легкого// Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина. 2003. №1. С.13-21.
- 18.Коган И. Ю. Молекулярно-биологические маркеры пролиферации и апоптоза в эпителии молочной железы при ее фиброзно-кистозных изменениях. Молекулярная медицина. 2008. №1. С. 22-27.
- 19.Колбанов К.И., Трахтенберг А.Х., Пикин О.В., Глушко В.А. Современные возможности хирургического лечения больных немелкоклеточным раком легкого I-III стадии. Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. 2012; 2: 4-11.
- 20.Консервативное лечение немелкоклеточного рака легкого: Под ред. проф. В.А. Горбуновой. М.: Фармарус Принт Медиа, 2014.
- 21.Копп М.В., Королева И.А. Адьювантная терапия некоторых солидных опухолей: рак поджелудочной железы, рак прямой кишки, меланомы кожи, НМРЛ // Практическая онкология. 2014. – №2, т. 15. – С. 75-83.
- 22.Лактионов К.К. Попытки количественной оценки риска развития рака легкого // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина. 2015. – №2, т.26. – С. 23-24.
- 23.Личиницер М.Р. Разработка панели маркеров белкового происхождения для прогнозирования течения злокачественных новообразований легкого, молочной железы, толстой кишки и эффективности их лечения // Электронное издание «Наука и технологии России». – 16. 11. 2007.
- 24.Мерабишвили В. М. Выживаемость онкологических больных: Вып. второй: Ч. 1.- СПб.: КОСТА, 2011.- 332 с.

- 25.Мозерова Е.Я. Мультидисциплинарный подход к лечению немелкоклеточного рака легкого: ключевые аспекты // Практическая онкология. – 2015. – №2, т.16. – С.55-65.
- 26.Моисеенко Ф.В. Принципы индивидуализации лечения рака легкого // Практическая онкология. 2013. – №4, (56). – С.208-215.
- 27.Нестерович И.И. Нарушения апоптоза клеток-мишеней при различных вариантах бронхиальной астмы //автореф. дис. доктора мед. наук. Санкт-Петербург, 2005. 30с.
- 28.Павловская А.И., Кондратьева Т.Т., Велижева Н.П., Петров С.В., Балатенко Н.В., Субраманиан С. Современные принципы морфологической диагностики немелкоклеточного рака легкого на малом биопсийном и цитологическом материале // Вестник РОНИ им. Н.Н. Блохина. 2012. №1 (23). С.62-68.
- 29.Патология. Под ред. М.А. Пальцева, В.С. Паукова, Коган Е.А. Болезни органов дыхания. 2010 Гл.10. С. 255-285.
- 30.Перцева Т.А., Ивах И.В. Морфологические изменения слизистой оболочки бронхиального дерева при хроническом обструктивном заболевании легких и их значение в диагностике стадии заболевания // Украинский пульмонологический журнал. 2009. №1. С.50-51.
- 31.Полежаев Д.А., Раскин Г.А., Феденко А.А. Рекомендации по диагностике рака легкого. – М., 2011. – 30с.
- 32.Рагулин Ю. А. Осложнения послеоперационной лучевой терапии немелкоклеточного рака легкого и их влияние на результаты комбинированного лечения // Вопросы онкологии.- 2012, том 58.- № 3. – 303-311.
- 33.Рагулин Ю.А., Смоленов Е.И., Усачев В.С., Афонин Г.В. Таргетная терапия местно-распространенного немелкоклеточного рака легкого

- с EGFR-мутацией // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2016. – №2, т.5. – С.48-53.
34. Садовников А.А., Панченко К.И. Рак легкого на фоне посттуберкулезных изменений // Российский онкологический журнал. 2011. № 6. С. 29-33
35. Снеговой А.В., Манзюк Л.В.. Значение биомаркеров для определения тактики лечения и прогноза злокачественных опухолей // Практическая онкология. - 2011. - Т. 12, №4. – С. 166-170.
36. Соловьева Е.П., Вальков М.Ю. Факторы эффективности лечения неоперабельного немелкоклеточного рака легкого III стадии (Обзор литературы). Сибирский онкологический журнал. 2016. Т. 15, № 2. С. 76–89
37. Состояние онкологической помощи населению России в 2014 году. Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России; 2015. ISBN 978-5-85502-210-0
38. Трахтенберг А.Х., Колбанов К.И. Рак легкого. М., 2012, 176 с.
39. Трунова Т.В. Компьютерная морфометрия в цитологической диагностике дисплазии эпителия и рака шейки матки // Онкология. 2003. – №4 (5). – С.271-273.
40. Франк Г.А. Рецидив злокачественной опухоли: понятие, сущность, терминология // Рос. онкологич. Журнал. – 2006. – №3. – С. 50-52
41. Черных А.В. Немелкоклеточный рак легкого: оптимизация лечения // Прикладные информационные аспекты медицины. 2009. Т. 12. № 1. С. 134-143.
42. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В., ред. Злокачественные новообразования в России в 2011 году. М.; 2013. 288 с.

43. Шапиро Н.А. Цитологическая диагностика заболеваний легких. Цветной атлас. Т. 2.—М.: Репроцентр, 2005.—208 с.
44. Шварцбурд П.М. Хроническое воспаление повышает риск развития эпителиальных новообразований, индуцируя предраковое микроокружение: анализ механизмов дисрегуляции // Вопросы онкологии. 2006, №2 (52), С. 137-144.
45. Шелехова К.В. Спорные вопросы онкоморфологии // Практическая онкология. 2014, №2, С.61-65.
46. Шестакова Л.А., Коган Е.А., Котловский Ю.В. Рак и предрак легких в кистозных аденоматоидных мальформациях. Потеря гетерозиготности гена p53 и характер экспрессии белкового продукта // Забайкальский медицинский вестник, 2011, №1, С.122-128.
47. Шикеева А.А., Кекиева Т.В., Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю., Франк Г.А. Молекулярно-генетические аспекты немелкоклеточного рака легкого // Онкология.2013.-№5.-С.56-61.
48. Adcock I., Caramori G. Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids // Immunol Cell Biol. 2001. V. 79(4). P.376-84.
49. Aggarwal B.B., Shishodia S., Sandur S.K., et al. Inflammation and cancer: how hot is the link? // Biochem. Pharmacol. 2006.V. 72. P.1605–21.
50. Aik T. Ooi, Adam C. Gower, Kelvin X. Zhang, et al. Molecular profiling of premalignant lesions in lung squamous cell carcinomas identifies mechanisms involved in stepwise carcinogenesis. Cancer Prev Res Published OnlineFirst March 11, 2014
51. Al-Shibli KI, Donnem T, Al-Saad S, Persson M, Bremnes RM, Busund LT. Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in

- non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(16):5220–7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0133 pmid:18698040.
- 52.AL- Shibli K., AL-Saad S., Andersen S., Donnem T., Bremnes R., Busund L.-T. The prognostic value of intraepithelial and stromal CD3-, CD117- and CD138-positive cells in non-small cell lung carcinoma // The Authors. *Journal Compilation, APMIS.* 2010 Volume 118, Issue 5, pages 371–382.
- 53.Anagnostou VK, Lowery FJ, Zolota V, et al. High expression of BCL-2 predicts favorable outcome in non-small cell lung cancer patients with non squamous histology // *BMC Cancer.* 2010;10:186.[
- 54.Anttonen A, Kajanti M, Heikkila P, Jalkanen M, Joensuu H Syndecan-1 expression has prognostic significance in head and neck carcinoma // *Br J Cancer,* 1999. 79(3-4):558-564. doi:10.1038/sj.bjc.6690088
- 55.Anttonen A, Heikkila P, Kajanti M, Jalkanen M, Joensuu H. High syndecan-1 expression is associated with favourable outcome in squamous cell lung carcinoma treated with radical surgery // *Lung Cancer* 2001, 32(3):297-305. doi:10.1016/S0169-5002(00)00230-0
- 56.Anttonen A. Pretreatment serum syndecan-1 levels and outcome in small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy // *Lung Cancer* 2003, 41(2):171-177. doi:10.1016/s0169-5002(03)00196-x
- 57.Araya J., Erle D., Nishimura S. Squamous metaplasia amplifies pathologic epithelial-mesenchymal interactions in COPD patients // *J Clin Invest.* 2007;117(11):3551-3562. doi:10.1172/JCI32526.
- 58.Auerbach O, Forman JB, Gere JB, et al. Changes in the bronchial epithelium in relation to smoking and cancer of the lung; a report of progress // *The New England Journal of Medicine.* 1957; 256:97–104.[[PubMed](#)]
- 59.Bai J., Hu S. Transcriptome network analysis reveals potential candidate genes for squamous lung cancer. *Int J Mol Med* 2012;29(1):95-101.

60. Balkwill F.R., Capasso M., Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. // *Journal of Cell Science* 2012. V. 125. P. 5591–5596. DOI:10.1242/jcs.116392
61. Balsara B.R., Testa J.R. Chromosomal imbalances in human lung cancer // *Oncogene* 2002, 21, 6877-6883
62. Banat G, Tretyn A, Pullamsetti S, Wilhelm J, Weigert A, Olesch C, et.al. Immune and Inflammatory Cell Composition of Human Lung Cancer Stroma // 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0139073
63. Banerjee A. K. Preinvasive lesions of the bronchus // *Thorac. Oncol.* 2009. V. 4. P.45-51. doi: 10.1097/JTO.0b013e31819667bd.
64. Barcellos-Hoff M. H., Lyden D., Wang T. C. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, AOP, published online 13 June 2013; doi:10.1038/nrc3536 www.nature.com/reviews/cancer.
65. Baron J., Sandler S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention// *Annu. Rev. Med.* 2000. V. 51. P. 511–523.
66. Bartels PH, Bartels HG. Classification in karyometry. Performance testing and prediction error // *Anal Quant Cytopathol Histopathol* 2013; 35: 181-188.
67. Bartsch H., Nair J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair Langenbecks // *Arch. Surg.* 2006. V. 39. P. 499–510.
68. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy // *Nat Rev Drug Discov* 2009, 8 (3):235-253
69. Ben-Zaken CS, Pare PD, Man SF, Sin DD: The growing burden of chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer in women: examining sex differences in cigarette smoke metabolism// *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007. V.176. P.113–120.

70. Berger, W., Setinek, U., Mohr, T., Kindas-Mügge, I., Vetterlein, M., Dekan, G., Eckersberger, F., Caldas, C. and Micksche, M. Evidence for a role of FGF-2 and FGF receptors in the proliferation of non-small cell lung cancer cells // *Int. J. Cancer*, 1999, 83: 415–423.
71. Beyer M., Schultze J.L. Immunoregulatory T cells: role and potential as a target in malignancy. *Curr Oncol Rep*. 2008 Mar;10(2):130-6.
72. Biswas S., Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm // *Nat Immunol*. 2010; 11(10):889–896.
73. Bitu CC, Kauppila JH, Bufalino A, et al. Cathepsin K is present in invasive oral tongue squamous cell carcinoma in vivo and in vitro // *PLoS One*. 2013;8(8):e70925. doi: 10.1371/journal.pone.0070925.
74. Bjaanaes MM, Halvorsen AR, Solberg S, Jorgensen L, Dragani TA, Galvan A, et al. Unique microRNA-profiles in EGFR-mutated lung adenocarcinomas // *Int J Cancer*. 2014; 135(8):1812–21.
75. Blanco D., Vicent S., Fraga M., et al. Molecular Analysis of a Multistep Lung Cancer Model Induced by Chronic Inflammation Reveals Epigenetic Regulation of p16 and Activation of the DNA Damage Response Pathway// *Neoplasia*. 2007. V.10. P. 840–852.
76. Boerdonk RAA, Sutedja TG, Snijders PJF, Reinen E, Wilting SM, van de Wiel MA, et al. DNA copy number alterations in endobronchial squamous metaplastic lesions predict lung cancer // *Am J Respir Crit Care Med*. 2011; 184(8):948–56.
77. Boerdonk RA, Daniels JM, Snijders PJ, et al. DNA copy number aberrations in endobronchial lesions: a validated predictor for cancer // *Thorax*. 2014; 69(5):451-7. doi: 10.1136/thoraxjnl-2013-203821.
78. Boffetta P., Ye W., Boman G., et al. Lung cancer risk in a population-based cohort of patients hospitalized for asthma in Sweden // *Eur. Respir. J*. 2002. V.19. P.127–133.

79. Bota S, Auliac J-B, Paris C, et al. Follow-up of bronchial precancerous lesions and carcinoma in situ using fluorescence endoscopy // *Am. J. Crit. Care Med.* 2001. V.164. P.1688–1693.
80. Brambilla E, Gazzeri S, Lanteu jeul S, Coll JL, Moro D, Negoescu A, Brambilla C. P53 mutant immunotype and deregulation of p53 transcription pathway (bcl-2, bax, waf-1) in precursor bronchoial lesions of lung cancer // *Clin Cancer Res*, 1998; 4: 1609-1618
81. Bremnes R.M., Dønnem T., Al-Saad S., Al-Shibli K., Andersen S., Sirera R., Camps C., Marinez I., Busund L.T. The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2011 Jan;6(1):209-17. doi: 10.1097/JTO.0b013e3181f8a1bd.
82. Breuer R. H. , Snijders P. J. , Sutedja T. G. et al., “Suprabasal p53 immunostaining in premalignant endobronchial lesions in combination with histology is associated with bronchial cancer” // *Lung Cancer*, vol. 40, no. 2, pp. 165–172, 2003.
83. Breuer R., Pasic A., Smit E. et. al. The natural course of preneoplastic lesions in bronchial epithelium // *Clin. Cancer Res.* 2005. V.11. P. 537-543.
84. Breuer RH, Snijders PJ, Sutedja GT, et al. Expression of the p16(INK4a) gene product, methylation of the p16(INK4a) promoter region and expression of the polycomb-group gene BMI-1 in squamous cell lung carcinoma and premalignant endobronchial lesions // *Lung Cancer.* 2005;48 (3):299-306. doi.org/10.1016/j.lungcan.2004.11.026.
85. Brockman-Schneider R. A., Pickles R. J., Gern J. E.. Effects of Vitamin D on Airway Epithelial Cell Morphology and Rhinovirus Replication // Published: January 24, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone. 0086755
86. Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: The immaculate deception? // *Histopathology.* 2002;40:2–11.[PubMed]

87. Bubendorf L. Vorläuferläsionen des Lungenkarzinoms // Pathologie. 2011.V.32. P. 218-223. doi 10.1007/s00292-011-1527-y
88. Buitrago D.H., Patnaik S.K, Kadota K., Kannisto E., Jones D.R., Adusumilli P.S. Small RNA Sequencing for Profiling MicroRNAs in Long-Term Preserved Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Non-Small Cell Lung Cancer Tumor Specimens // PLoS One. 2015, Mar 26;10(3):e0121521. doi: 10.1371/journal.pone.0121521.
89. Buschman MD, Bromann PA, Cejudo-Martin P, et al. The novel adaptor protein Tks4 (SH3PXD2B) is required for functional podosome formation // Mol Biol Cell. 2009; 20(5):1302-11. doi: 10.1091/mbc.E08-09-0949.
90. Cappello S., Attardo A., Wu X., et. al. The Rho-GTPase cdc42 regulates neural progenitor fate at the apical surface // Nature Neuroscience. 2006. V. 9. P. 1099 – 1107.
91. Cassidy A, Duffy SW, Myles JP, Liloglou T, Field JK. Lung cancer risk prediction: A tool for early detection // Int J Cancer. 2007; 120:1–6.[PubMed]
92. Cavarga I, Kocan P, Boor A, et al. Immunohistochemical markers of proliferation and vascularisation in preneoplastic bronchial lesions and invasive non-small cell lung cancer // Neoplasma 2009; 56: 414-421.
93. Cedres S, Torrejon D, Martinez A, Martinez P, Navarro A, Zamora E, Mulet-Margalef N, Felip E (2012) Neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) as an indicator of poor prognosis in stage IV non-small cell lung cancer // Clin Transl Oncol 14(11): 864–869.
94. Chapman AD, Kerr KM. The association between atypical adenomatous hyperplasia and primary lung cancer // Br J Cancer, 2000; 83: 632-636
95. Chaudhary K, Deb S, Moniaux N, Ponnusamy MP, Batra SK. Human RNA polymerase II-associated factor complex: dysregulation in cancer // Oncogene 2007, 26 (54):7499-7507

96. Chaudhry I., El-Meanawy A., Khiyami A., Tomashefski J., Machekano R., Lawrence Kass L. Short-Term Exposure to Tobacco Toxins Alters Expression of Multiple Proliferation Gene Markers in Primary Human Bronchial Epithelial Cell Cultures // *Journal of Oncology* 2011, Article ID 208563, 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2011/208563>
97. Chen C.-L., Ou D.-L. Expression of syndecan-1 (CD138) in nasopharyngeal carcinoma is correlated with advanced stage and poor prognosis. *Human Pathology*. 2006;37(10):1279–1285. doi: 10.1016/j.humpath.2006.04.024.
98. Chen E.Y., Tan C.M., Kou Y., et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool // *BMC Bioinformatics*. 2013; 14:128. doi: 10.1186/1471-2105-14-128.
99. Chen H.Y., Yu S.L., Ho B.C., Su K.Y., Hsu Y.C., Chang C.S., Li Y.C., Yang S.Y., Hsu P.Y., Ho H., Chang Y.H., Chen C.Y., Yang H.I., Hsu C.P., Yang T.Y., Chen K.C., Hsu K.H., Tseng J.S., Hsia J.Y., Chuang C.Y., Yuan S., Lee M.H., Liu C.H., Wu G.I., Hsiung C.A., Chen Y.M., Wang C.L., Huang M.S., Yu C.J., Chen K.Y., Tsai Y.H., Su W.C., Chen H.W., Chen J.J., Chen C.J., Chang G.C., Yang P.C., Li K.C. R331W Missense Mutation of Oncogene YAP1 Is a Germline Risk Allele for Lung Adenocarcinoma With Medical Actionability. *J Clin Oncol* 2015;33(20):2303-2310.
100. Chen W., Gao X., Tian Q., Chen L. A comparison of autofluorescence bronchoscopy and white light bronchoscopy in detection of lung cancer and preneoplastic lesions: a meta-analysis // *Lung Cancer*. 2011; 73:183–188. doi: 10.1016/j.lungcan.2010.12.002. [[PubMed](#)]
101. Cheng H., Zhang Z., Rodriguez-Barrueco R., Borczuk A., Liu H., Yu J., Silva J.M., Cheng S.K., Perez-Soler R., Halmos B. Functional genomics screen identifies YAP1 as a key determinant to enhance

- treatment sensitivity in lung cancer cells. *Oncotarget* 2016;7(20):28976-28988.
102. Cheng Y.L., Lee S.C., Harn H.J., Chen C.J., Chang Y.C., Chen J.C., Yu C.P. Prognostic prediction of the immunohistochemical expression of p53 and p16 in resected non-small cell lung cancer // *Eur J Cardiothorac Surg*, 2003; 23: 221-228
 103. Chiu D, Guillaud M, Cox D, Follen M, MacAulay C. Quality assurance system using statistical process control: An implementation for image cytometry // *Cell Oncol*. 2004; 26:101–117.[PubMed]
 104. Chorostowska-Wynimko J., Szpechcinska A. Genetic biomarkers in lung cancer therapy – an update // *Centr Eur J Immunol* 2009; 34 (4): 276-279
 105. Chu P.G., Arber D.A., Weiss L.M. Expression of T/NK-cell and plasma cell antigens in nonhematopoietic epithelioid neoplasms. An immunohistochemical study of 447 cases // *Am J Clin Pathol*. 2003, Jul; 120(1):64-70.
 106. Chung K., Adcock I. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction // *Eur. Respir. J*. 2008, V. 6. P. 1334-56.
 107. Chyczewski L., Niklinski J., Chyczewska E., Niklinska W. Morphological aspects of carcinogenesis in the lung // *Histopathology*. 2001. V. 39. №2. P.149-52.
 108. Ciancio N., Galasso M.G., Campisi R., et al. Prognostic value of p53 and Ki67 expression in fiberoptic bronchial biopsies of patients with non small cell lung cancer // *Multidiscip Respir Med* 2012; 7: 29.
 109. Cirombella R. Fhit loss in lung preneoplasia: Relation to DNA damage response checkpoint activation // *Cancer Letters*. 2010 Volume 291, Issue 2, Pages 230–236

110. Courtneidge S.A. Cell migration and invasion in human disease: the Tks adaptor proteins // *Biochem Soc Trans.* 2012; 40(1):129-32. doi: 10.1042/BST20110685.
111. Coussens L., Werb Z. Inflammation and cancer // *Nature* 2002. V.420.P.860–867.
112. Croswell J.M., Baker S.G., Marcus P.M., Clapp J.D., Kramer B.S. Cumulative incidence of false-positive test results in lung cancer screening: A randomized trial // *Ann Intern Med.* 2010; 152:505–512. [PubMed]
113. Crystal R.G. Airway basal cells. The "smoking gun" of chronic obstructive pulmonary disease // *Am J Respir Crit Care Med.* 2014 Dec 15;190(12):1355-62. doi: 10.1164/rccm.201408-1492PP.
114. Dacic S. Pulmonary Preneoplasia // *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2008. V. 132. P. 1073-1078.
115. D'Addario G., Felip E. Non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up // *Ann. Oncol.* - 2009. Vol. 20. – P. 68-70.
116. D'Addario G., Felip E. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up // *Ann. Oncol.* 2010. Vol. 21. - P. 116-119.
117. Daniel V.C., Peacock C.D., Watkins D.N. Developmental signalling pathways in lung cancer. *Respirology* 2006;11(3):234-240.
118. Dat le T., Matsuo T., Yoshimaru T., Kakiuchi S., Goto H., Hanibuchi M., Kuramoto T., Nishioka Y., Sone S., Katagiri T. Identification of genes potentially involved in bone metastasis by genome-wide gene expression profile analysis of non-small cell lung cancer in mice. *Int J Oncol* 2012;40(5):1455-1469.

119. Davidson M., Gazdar A., Clarke B. The pivotal role of pathology in the management of lung cancer // *Journal of Thoracic Disease (Lung cancer)*. 2013. Vol 5, P: 463-478
120. Davies D.E. The Role of the Epithelium in Airway Remodeling in Asthma // *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2009. V.6. P. 678–682.
121. Decramer, M., Janssens, W. & Miravittles, M. Chronic obstructive pulmonary disease // *Lancet* 2012, 379, 1341–1351, doi:10.1016/S0140-6736(11)60968-9.
122. Demicheli R., Fornili M., Ambrogi F., et. al. Recurrence dynamics for non-small-cell lung cancer: effect of surgery on the development of metastases // *Ann. Oncol.* – 2010. Vol. 21.- P. 116-119.
123. Demirag F., Cakir E., Bayiz H., Yazici E. MUC1 and bcl-2 expression in preinvasive lesions and adenosquamous carcinoma of the lung // *Acta Chir Belg.* 2013; 113(1):19-24.
124. Dertsiz L., Ozbilim G., Kayisli Y., Gokhan G.A., Demircan A., Kayisli U.A. Differential expression of VASP in normal lung tissue and lung adenocarcinomas. *Thorax* 2005;60(7):576-581.
125. Dogan S., Shen R., Ang D., Johnson M., D'Angelo S., Paik P., Brzostowski E., Riely G., Kris M., Zakowski M., et al. Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers // *Clin Cancer Res* 2012;18:6169–6177.
126. Dong H.P., Elstrand M.B., Holth A., Silins I., Berner A., Trope C.G., Davidson B., Risberg B. NK- and B-cell infiltration correlates with worse outcome in metastatic ovarian carcinoma. // *Am J Clin Pathol.* 2006. V. 125. P. 451–8.
127. Donnem T., Fenton C., Lonvik K., et. al. MicroRNA signatures in tumor tissue related to angiogenesis in non-small cell lung cancer // *PLoS* 2012, One 7: 29671.

128. Du L., Pertsemlidis A. microRNAs and lung cancer: tumors and 22-mers // *Cancer Metastasis Rev.* 2010, 1:109-22.
129. Duffy M.J. Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients // *J.Cancer Treatment Reviews.* 2011. Vol. 24. - P.151 - 159.
130. Edell E., Lam S., Pass H., Miller Y., Sutedja T., Kennedy T., Loewen G., Keith R., Gazdar A. Detection and localization of intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma using fluorescence-reflectance bronchoscopy: An international, multicenter clinical trial // *J Thorac Oncol.* 2009; 4:49–54. [PubMed].
131. Elinav E., Nowarski R., Thaiss C.A., Hu B., Jin C., Flavell R.A. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. // *Nat. Rev. Cancer.* 2013. V. 13. P. 759–771.
132. Ellison G, Zhu G, Moulis A, et al. EGFR mutation testing in lung cancer: a review of available methods and their use for analysis of tumour tissue and cytology samples // *J Clin Pathol* 2013; 66:79-89. [PubMed].
133. El-Zein M., Parent M., Kâ K. et. al. History of asthma or eczema and cancer risk among men: a population-based case-control study in Montreal, Quebec, Canada// *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2010. V.104. P.378–384.
134. Endo C., Sakurada A., Kondo T. Early central airways lung cancer. *Gen. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2012; 60 (9): 557-60.
135. Ettinger D.S., Wood D.E., Akerley W. et al. Non_small cell lung cancer, version 6.2015 // *J Natl Compr Canc Netw.* – 2015.– Vol.13, №5. – P.515-524.
136. Eversole Lewis Roy. Dysplasia of the Upper Aerodigestive Tract Squamous Epithelium // *Head Neck Pathol.* 2009 March; 3(1): 63–68. doi: 10.1007/s12105-009-0103-8.

137. Fan C., Gao S., Hui Z., et al. Risk factors for locoregional recurrence in patients with resected N1 non-small cell lung cancer: a retrospective study to identify patterns of failure and implications for adjuvant radiotherapy // *Radiat Oncol.* 2013; 8:286. doi: 10.1186/1748-717X-8-286.
138. Federico A., Morgillo F., Tuccillo C., Ciardiello F., et.al. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis // *International Journal of Cancer* 2007, V. 121 (11). P. 2381–2386.
139. Fibla J.J., Cassivi S.D., Brunelli A., Decker P.A., Allen M.S., Darling G.E., Landreneau R.J., Putnam J.B. Re-evaluation of the prognostic value of visceral pleura invasion in Stage IB non-small cell lung cancer using the prospective multicenter ACOSOG Z0030 trial data set. // *Lung Cancer* 2012, 78(3): 259–262.
140. Fong K., Biesterveld E., Virmani A., et al. FHIT and FRA3B 3p14.2 allele loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer-related FHIT cDNA splicing aberrations // *Cancer Res* 1997;57:2256–2267.
141. Franklin WA. Diagnosis of lung cancer: pathology of invasive and preinvasive neoplasia // *Chest.* 2000;117(4):80S–89S.[PubMed].
142. Ghajar C. M., Peinado H., Hidetoshi M., Matei I. R., Evason K. J., Brazier H., Almeida D., Koller A., Hajjar K. A., Stainier D. Y. R, Chen E. I., Lyden D., Bissell M. J.. The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. *Nature Cell Biology*, published online 2 June 2013; DOI: 10.1038/ncb2767.
143. Gajewski F., Schreiber H., Fu Y.-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment.// *Nat Immunol.* 2013. V. 14. N. 10. P. 1014–1022. doi: 10.1038/ni.2703.

144. Ganti K.A. Update on Non Small Cell Lung Cancer: Current State of Knowledge Regarding Diagnosis, Staging and Treatment //Abeloff's Clinical. Oncology 2011, Vol.4. – P.1 - 18.
145. Gao W., Yu Y., Cao H., et. al. Deregulated expression of miR-21, miR-143 and miR-181a in non small cell lung cancer is related to clinicopathologic characteristics or patient prognosis // Biomed. Pharmacother. 2010. 64(6): 399-408.
146. García-Rodríguez L., Huerta-Alvarez C. Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs // Epidemiology. 2001, V.1. P.88-93.
147. García Sanz M. T., Camargo C., Colditz G. A metaanalysis of asthma and risk of lung cancer (United States) // Cancer Causes Control. 2003, V.14. P.327–334.
148. García Sanz M. T., González Barcala F. J., Álvarez Dobaño J. M., et.al. Asthma and risk of lung cancer // Clin. Transl. Oncol. 2011. V. 13. P.728-730.
149. Gaur DS, Thapliyal NC, Kishore S, Pathak VP. Efficacy of broncho-alveolar lavage and bronchial brush cytology in diagnosing lung cancers. J Cytol. 2007;24:73–7.
150. Gazdar A., Brambilla E. Preneoplasia of lung cancer // Cancer Biomark. 2010; 9(1-6): 385–396. doi: 10.3233/CBM-2011-0166
151. George J., Lim J.S., Jang S.J., Cun Y., Ozretic L., Kong G., Leenders F., Lu X., Fernandez-Cuesta L., Bosco G., Muller C., Dahmen I., Jahchan N.S., Park K.S., Yang D., Karnezis A.N., Vaka D., Torres A., Wang M.S., Korbel J.O., Menon R., Chun S.M., Kim D., Wilkerson M., Hayes N., Engelmann D., Putzer B., Bos M., Michels S., Vlastic I., Seidel D., Pinther B., Schaub P., Becker C., Altmuller J., Yokota J., Kohno T., Iwakawa R., Tsuta K., Noguchi M., Muley T., Hoffmann H., Schnabel

- P.A., Petersen I., Chen Y., Soltermann A., Tischler V., Choi C.M., Kim Y.H., Massion P.P., Zou Y., Jovanovic D., Kontic M., Wright G.M., Russell P.A., Solomon B., Koch I., Lindner M., Muscarella L.A., la Torre A., Field J.K., Jakopovic M., Knezevic J., Castanos-Velez E., Roz L., Pastorino U., Brustugun O.T., Lund-Iversen M., Thunnissen E., Kohler J., Schuler M., Botling J., Sandelin M., Sanchez-Cespedes M., Salvesen H.B., Achter V., Lang U., Bogus M., Schneider P.M., Zander T., Ansen S., Hallek M., Wolf J., Vingron M., Yatabe Y., Travis W.D., Nurnberg P., Reinhardt C., Perner S., Heukamp L., Buttner R., Haas S.A., Brambilla E., Peifer M., Sage J., Thomas R.K. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature* 2015;524(7563):47-53.
152. Geraghty P., Hardigan A., Foronjy F. Cigarette Smoke Activates the Proto-oncogene c-Src to Promote Airway Inflammation and Lung Tissue Destruction // *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014, Vol 50, Iss 3, pp 559–570
153. Germain C¹, Gnjatic S, Tamzalit F, Knockaert S, Remark R, Goc J, Lepelley A, Becht E, Katsahian S, Bizouard G, Validire P, Damotte D, Alifano M, Magdeleinat P, Cremer I, Teillaud JL, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Dieu-Nosjean MC. Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014 Apr 1;189(7):832-44. doi: 10.1164/rccm.201309-1611OC.
154. Ghajar C. M., Peinado H., Hidetoshi M., Matei I. R., Evason K. J., Brazier H., Almeida D., Koller A., Hajjar K. A., Stainier D. Y. R., Chen E. I., Lyden D., Bissell M. J.. The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. *NATURE CELL BIOLOGY*, published online 2 June 2013; DOI: 10.1038/ncb2767

155. Gharbaran R. Advances in the molecular functions of syndecan-1 (SDC1/CD138) in the pathogenesis of malignancies // *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014; 94(1):1–17.
156. Gokden N, Greene GF, Bayer-Garner IB, Spencer HJ, Sanderson RD, Gokden M. Expression of CD138 (Syndecan-1) in renal cell carcinoma is reduced with increasing nuclear grade // *Appl Immunohistochem. Mol. Morphol*. 2006, Jun; 14(2):173-7.
157. Gold KA, Kim ES, Liu DD, Yuan P, Behrens C, Solis LM, et al. Prediction of survival in resected non-small cell lung cancer using a protein expression-based risk model: implications for personalized chemoprevention and therapy // *Clin Cancer Res*. 2014; 20(7):1946–54.
158. Gomperts BN, Walser TC, Spira A, Dubinett SM. Enriching the molecular definition of the airway “field of cancerization:” establishing new paradigms for the patient at risk for lung cancer // *Cancer Prev Res (Phila)* 2013, 6: 4–7.
159. Gonzalez-Reyes S., Marin L., Gonzalez L., Gonzalez L.O., del Casar J.M., Lamelas M.L., Gonzalez-Quintana J.M., Vizoso F.J. Study of TLR3, TLR4 and TLR9 in breast carcinomas and their association with metastasis. // *BMC Cancer*. 2010. V. 10. P. 665. doi: 10.1186/1471-2407-10-665.
160. Gorlova O., Zhang Y., Schabath M. et. al. Never smokers and lung cancer risk: a case-control study of epidemiological factors // *Int. J. Cancer* 2006. V.118. P.1798–1804.
161. Gottschling S., Granzow M., Kuner R., Jauch A., Herpel E., Xu E.C., Muley T., Schnabel P.A., Herth F.J., Meister M. Mesenchymal stem cells in non-small cell lung cancer--different from others? Insights from comparative molecular and functional analyses. *Lung Cancer* 2013;80(1):19-29.

162. Greenberg A., Yee H., Rom W. Preneoplastic lesions of the lung // *Respiratory Research*. 2002. Vol. 3. №1. P.1-10.
163. Gu Q., Hu C., Chen Q., Xia Y. Tea polyphenols prevent lung from preneoplastic lesions and effect p53 and bcl-2 gene expression in rat lung tissues// *Int J Clin Exp Pathol*. 2013; 6(8): 1523–1531.
164. Guillaud M., LeRiche J., Dawe C., et. al. Nuclear morphometry as a biomarker for bronchial intraepithelial neoplasia: Correlation with genetic damage and cancer development. *Cytometry* 2005; Part A 63: 34-40.
165. Guo N.L., Wan Y.W. Confirmation of gene expression-based prediction of survival in non-small cell lung cancer// *Clin. Cancer Res.* – 2008. Vol. 14(24). – P. 8213–8220.
166. Guthrie G.J., Charles K.A., Roxburgh C.S., Horgan P.G., McMillan D.C., Clarke S.J. The systemic inflammation-based neutrophil-lymphocyte ratio: experience in patients with cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;88(1):218–30.
167. Güngör N., Haegens A, Knaapen A., et al. Lung inflammation is associated with reduced pulmonary nucleotide excision repair in vivo. *Mutagenesis*. 2010;25(1):77–82.[[PubMed](#)]
168. Hanahan D., Coussens L. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell*. 2012;21(3):309–22. Epub 2012/03/24. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022 pmid:22439926.
169. Hattar K., Franz K., Ludwig M., Sibelius U., Wilhelm J., Lohmeyer J., et al. Interactions between neutrophils and non-small cell lung cancer cells: enhancement of tumor proliferation and inflammatory mediator synthesis. *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63(12):1297–306.
170. Herfs M., Hubert P., Poirrier A., Vandevenne P., Renoux V., Habraken Y., Cataldo D., Boniver J., Delvenne P. Proinflammatory

- cytokines induce bronchial hyperplasia and squamous metaplasia in smokers: implications for chronic obstructive pulmonary disease therapy // *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012 Jul;47(1):67-79. doi: 10.1165/rcmb.2011-0353OC. Epub 2012 Feb 16.
171. Hirsch, F. R., Franklin, W. A., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Jr. Early detection of lung cancer: Clinical perspectives of recent advances in biology and radiology. *Clin Cancer Res*, 2001.7, 5–22.
172. Hirsch F.R., Prindiville S.A., Miller Y.E., Franklin W.A., Dempsey E.C., Murphy J.R., et al. Fluorescence versus white-light bronchoscopy for detection of preneoplastic lesions: a randomized study. *J Natl Cancer Inst*, 2001. 93: 1385–91
173. Hofseth L., Ying L. Identifying and defusing weapons of mass inflammation in carcinogenesis// *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V.1765. P. 74–84.
174. Holgate S.T. Epithelium dysfunction in asthma// *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007. V. 120(6). P.1233-44.
175. Holgate S., Roberts G., Arshad H., Howarth P., Davies D. The role of the airway epithelium and its interaction with environmental factors in asthma pathogenesis//*Proc. Am. Thorac. Soc.* 2009. V.6 (8). P.655-9.
176. Horeweg N. et al. Detection of lung cancer through low_dose CT screening (NELSON): a prespecified analysis of screening test performance and interval cancers // *Lancet Oncol.* – 2014. – Vol.15, №12. – P.1342-1350.
177. Hoshino H., Shibuya K., Chiyo M. et. al. Biological features of bronchial squamous dysplasia followed up by autofluorescence bronchoscopy// *Lung Cancer.* 2004. V. 46. P.187-196.
178. Hung J., Jeng W., Hsu W., et al. Prognostic factors in pathological stage IB non-small cell lung cancer greater than 3 cm// *Eur. Respir. J.* - 2010. Vol. 36. – P. 1355-1361.

179. Hung J. J., Jeng W.J., Hsu W.H. et. al. (2010). Prognostic factors of postrecurrence survival in completely resected stage I non-small cell lung cancer with distant metastasis. *Thorax* **65**:241-245.
180. Hussein M. R., Hassan H. I. Analysis of the mononuclear inflammatory cell infiltrate in the normal breast, benign proliferative breast disease, in situ and infiltrating ductal breast carcinomas: preliminary observations// *J Clin Pathol.* 2006 Sep; 59(9): 972–977. doi: 10.1136/jcp.2005.031252
181. Iggo R, Gatter K, Bartek J, et al. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990;335:675-9. [[PubMed](#)]
- Ikeda N., MacAulay C., Lam S., et al. Malignancy associated changes in bronchial epithelial cells and clinical applications as a biomarker. *Lung Cancer* 1998; 19:161-6. [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5002\(97\)00095-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5002(97)00095-0)
182. Idowu M.O., Powers C.N. Lung cancer cytology: Potential pitfalls and mimics — a review. *Int J Clin Exp Pathol.* 2010; 3:367–85.
183. Inki P., Stenback F., Grenman S., Jalkanen M. Immunohistochemical localization of syndecan-1 in normal and pathological human uterine cervix. *J Pathol* (1994) 172(4):349-355. doi:10.1002/path.1711720410
184. Ishikawa N., Daigo Y., Yasui W., Inai K., Nishimura H., Tsuchiya E., Kohno N., Nakamura Y. ADAM8 as a novel serological and histochemical marker for lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(24):8363-8370.
185. Ishizumi T., Mc Williams A., Mc Aulay C., Gazdar A., Lam S. Natural history of bronchial preinvasive lesions // *Cancer Metastasis Rev.* 2010. V. 29. №1. P. 5-14.
186. Jackson L.L., Wade Z., Hessler R.B., Abdelsayed R., Rogers J.B., Gourin C.G. Quantitative analysis of syndecan-1 expression in dysplasia

- and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Laryngoscope*. 2007. 117(5):868-871. doi:10.1097/MLG.0b013e318033c810
187. Jackute J., Zemaitis M., Pranys D., Sitkauskiene B., Miliauskas S., Bajoriunas V., Lavinskiene S., Sakalauskas R. The prognostic influence of tumor infiltrating Foxp3(+) CD4(+), CD4(+) and CD8(+) T cells in resected non-small cell lung cancer. *J Inflamm (Lond)*. 2015 Nov 23; 12:63. doi: 10.1186/s12950-015-0108-x.
188. Jacobsen B., Santoni-Rugiu E., Illemann M., Kriegbaum M., Laerum O., Ploug M. Expression of C4.4A in precursor lesions of pulmonary adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2012;130:2734-2739.[PubMed]
189. Jacobsen B., Muley T., Meister M., Dienemann H., Christensen I., Santoni-Rugiu E., Lærum O., Ploug M. Ly6/uPAR-related protein C4.4A as a marker of solid growth pattern and poor prognosis in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2013;8:152-160.[PubMed]
190. Jacobsen B., Kriegbaum M., Santoni-Rugiu E., Ploug M. C4.4A as a biomarker in pulmonary adenocarcinoma and squamous cell carcinoma// 2014
191. Jamshedur Rahman S., Gonzalez A., Li M., Seeley E., Zimmerman L., Zhang X., Manier M., et. al. Lung cancer diagnosis from proteomic analysis of preinvasive lesions *Cancer Res*. 2011 Apr 15; 71(8): 3009–3017. Published online 2011 Apr 12. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2510
192. Jeanmart M., Lantuejoul S., Fievet F., et al. Value of immunohistochemical markers in preinvasive bronchial lesions in risk assessment of lung cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2195-2203.
193. Jeffery P.K. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease// *Proc. Am. Thorac. Soc*. 2004. V.1(3). P.176-83.

194. Jeong Y., Xie Y., Xiao G., et. al. Nuclear receptor expression defines a set of prognostic biomarkers for lung cancer// *PLoS Med.* – 2010. Vol. 7(12):e1000378.
195. Jing Y.Y., Han Z.P., Sun K., Zhang S.S., Hou J., Liu Y., Li R., Gao L., Zhao X., Zhao Q.D. et al. Toll-like receptor 4 signaling promotes epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma induced by lipopolysaccharide // *BMC Med.* 2012. V. 10. P. 98. doi: 10.1186/1741-7015-10-98.
196. Jonsson S., Varella-Garcia M., Miller Y. et. al. Chromosomal aneusomy in bronchial high-grade lesions is associated with invasive lung cancer // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008, 177, 342-347.
197. Kadara H, Wistuba, II Field cancerization in non-small cell lung cancer: implications in disease pathogenesis. *Proc Am Thorac. Soc*, 9: 38–42.
198. Kadara H., Shen L., Fujimoto J., Saintigny P., Chow C., Lang W., et al. Characterizing the molecular spatial and temporal field of injury in earlystage smoker non-small cell lung cancer patients after definitive surgery by expression profiling. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2013. 6: 8–17.
199. Kadara H., Fujimoto J., Yoo S., Maki Y., Gower A., Kabbout M., Garcia M., Chow C., Chu Z., Mendoza G., Shen L., Kalhor N., Hong W., Moran C., Wang J., Spira A., Coombes K., Wistuba, I. Transcriptomic architecture of the adjacent airway field cancerization in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2014. 106(3):dju004. doi:10.1093/jnci/dju004.
200. Kadara H., Wistuba I. Molecular biology of lung preneoplasia. In: Roth J.A., Hong W.K., Komaki R.U., editors. *Lung cancer*. Fourth ed. Hoboken: Wiley; 2014. p. 110–28.
201. Kambham N., Kong C., Longacre T., Natkunam Y. Utility of syndecan-1 (CD138) expression in the diagnosis of undifferentiated

- malignant neoplasms: a tissue microarray study of 1,754 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005 Dec;13(4):304-10.
202. Karimi S., Mohammadi F., Khodadad K., Sadr M., Seyfollahi L., Masjedi M. Relationship between angiogenic squamous dysplasia and bronchogenic carcinoma in patients undergoing white light bronchoscopy//*Can Respir J*. 2012 May-Jun;19(3):201-6.
203. Kato M., Saunders S., Nguyen H., Bernfield M. Loss of cell surface syndecan-1 causes epithelia to transform into anchorage-independent mesenchyme-like cells. *Molecular Biology of the Cell*. 1995;6(5):559–567. doi: 10.1091/mbc.6.5.559.
204. Kayser K., Kosjerina Z, Goldmann T., Kayser G., Kazmierczak B., Vollmer E. Phenotype and genotype associations of lung carcinoma with atypical adenomatoid hyperplasia, squamous cell dysplasia, and chromosome alterations in non-neoplastic bronchial mucosa // *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 2005, 46(1):5–10
205. Keith R.L., Miller Y.E., Gemmill R.M., et al. Angiogenic squamous dysplasia in bronchi of individuals at high risk for lung cancer // *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1616–1625.
206. Kennedy T., McWilliams A., Edell E., et al. Bronchial intraepithelial neoplasia/early central airways lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition) *Chest*. 2007;132(3)[[PubMed](#)]
207. Kerr K. M. Pulmonary preinvasive neoplasia // *Clin. Pathol*. 2001. V. 54. P. 257–271.
208. Kerr K.M. Morphology and genetic of pre-invasive pulmonary disease// *Current Diagnostic Pathology* 2004; 10: 259–268.
209. Kerr K.M., Popper H.H. Pre-invasive lung lesions// *European Respiratory Monograph*. 2007. Vol. 12. Monograph 39. P. 37-63.

210. Kerr K. M. Preneoplastic and Preinvasive Lesions // Diagnostic Pulmonary Pathology. Lung Biology in Health and Disease. Cagle P. T., Allen T. C., Beasley M. B. 2008. V. 226. P. 519-526.
211. Kerr K. M., Popper H. H.. The differential diagnosis of pulmonary pre-invasive lesions // Pathology of the Lung, June 30, 2010; 37 - 62
212. Kettunen E., Anttila S., Seppanen J., et al. Differentially expressed genes in nonsmall cell lung cancer: expression profiling of cancer-related genes in squamous cell lung cancer. Cancer Genet Cytogenet. 2004; 149:98-106. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-4608\(03\)00300-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-4608(03)00300-5).
213. Khan S., Jain M., Mathur V., Feroz S.M. Chronic Inflammation and Cancer: Paradigm on Tumor Progression, Metastasis and Therapeutic Intervention. (2016) Gulf J Oncolog, 20, 86
214. Khojasteh M., Buys T., LeRiche J., Lam S., Guillaud M., MacAulay C. A framework for quantitative assessment of Ki 67 distribution in preneoplastic bronchial epithelial lesions. Anal Quant Cytol Histol 2012; 34: 120-138
215. Kilic A., Landreneau R., Luketich J., Pennathur A., Schuchert M. Density of tumor-infiltrating lymphocytes correlates with disease recurrence and survival in patients with large non-small-cell lung cancer tumors. J Surg Res. 2011;167(2):207–10. doi: 10.1016/j.jss.2009.08.029 pmid:19896677.
216. Kim C. H., Lee H.S., Park J.H., Choi J.H., Jang S.H., Park Y.B., et al. Prognostic role of p53 and Ki-67 immunohistochemical expression in patients with surgically resected lung adenocarcinoma: a retrospective study J Thorac Dis. 2015 May; 7(5): 822–833. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.05.022.
217. Kim H., Choi D., Chang S., Han J., Min C., Chang K., Ryu H. The expression of syndecan-1 is related to the risk of endometrial hyperplasia

- progressing to endometrial carcinoma//J Gynecol Oncol. 2010 Mar;21(1):50-5. doi: 10.3802/jgo.2010.21.1.50.
218. Kim V., Rogers T., Criner G. New concepts in the pathobiology of chronic obstructive pulmonary disease//Proc Am Thorac Soc. 2008, 5(4):478-85. doi: 10.1513/pats.200802-014ET.
219. Kishi K., Gurney J., Schroeder D., et al. The correlation of emphysema or airway obstruction with the risk of lung cancer: a matched case-controlled study // Eur. Respir. J. 2002. V. 19. P. 1093 - 1098.
220. Kishimoto Y., Sugio K., Hung J., et al. Allele-specific loss in chromosome 9p loci in preneoplastic lesions accompanying nonsmall-cell lung cancers. J. Natl. Cancer Inst. 1995. 87:1224–1229.
221. Klebe S., Henderson D.W. Facts and fiction: premalignant lesions of lung tissues. Pathology. 2013 Apr;45 (3): p. 305-15. doi:10.1097/PAT.0b013e32835f45fd.
222. Koga T., Hashimoto S., Sugio K., Yonemitsu Y., Nakashima Y. et al. Lung Adenocarcinoma with bronchioloalveolar carcinoma component is frequently associated with foci of high-grade atypical adenomatous hyperplasia. Am J Clin Pathol, 2002;117: 464-70
223. Koo J.P. Cancer Prevention: Characterization of Epithelial Preneoplasia, and Identification of Novel Targets for Cancer Prevention and Biomarkers for Early Detection of Lung Cancer // Cancer Prev Res 2011. № 4; p. 1255
224. Kosjerina Z., Vollmer E., Goldmann T., Kayser K. Frequency in surgical specimens and morphology of atypical alveolar hyperplasia of the lung // Electronic Journal of Pathology and Histology. Volume 8.3. September 2002. 023-04.pdf
225. Kourou K., Exarchos T., Exarchos K., Karamouzis M., Fotiadis D. Machine learning applications in cancer prognosis and prediction

//Computational and Structural Biotechnology Journal. 2015,Volume 13,
Pages 8–17doi:10.1016/j.csbj.2014.11.005

226. Kratz J., He J., Stephen K. International, Large-Scale Validation of a Practical Molecular Assay Prognostic of Survival in Resected Non-Squamous, Non-Small Cell Lung Cancer// *The Lancet Int.* – 2012; 5698231.
227. Kriegbaum M., Jacobsen B., Hald A., Ploug M. Expression of C4.4A, a structural uPAR homolog, reflects squamous epithelial differentiation in the adult mouse and during embryogenesis. *J Histochem Cytochem.* 2011;59:188-201.[PubMed]
228. Kriegbaum M., Jacobsen B., Santoni-Rugiu E., Ploug M. C4.4A er en ny biomarkør i ikke-småcellet lungekræft. *BestPractice.* 2012;5:58-61.
229. Kuo C., Wu C., Lee K., Lin S., Chung F., Lo Y., et al. Chronic obstructive pulmonary disease in stage I non-small cell lung cancer that underwent anatomic resection: the role of a recurrence promoter. *Copd.* 2014;11(4):407–13.
230. Kurie J., Lee J., Khuri F., et al. N-(4-hydroxyphenyl) retinamide in the chemoprevention of squamous metaplasia and dysplasia of the bronchial epithelium. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2973-9.
231. Kurokawa H., Matsumoto S., Murata T., Yamashita Y., Tomoyose T., Zhang M., Fukuyama H., Takahashi T. Immunohistochemical study of syndecan-1 down-regulation and the expression of p53 protein or Ki-67 antigen in oral leukoplakia with or without epithelial dysplasia // *J Oral Pathol Med.* 2003 Oct; 32(9):513-21.
232. Kurokawa H., Zhang M., Matsumoto S., et al. Reduced syndecan-1 expression is correlated with the histological grade of malignancy at the deep invasive front in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral*

- Pathology and Medicine. 2006;35(5):301–306. doi: 10.1111/j.1600-0714.2006.00412.x.
233. Kwak E.L. Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non Small Cell Lung Cancer //N.E.J.M.– 2010. Vol. 363(18). – P. 1693 - 1703.
234. Lai M. Intraepithelial Neoplasia of the Lower Respiratory Tract // Intraepithelial Neoplasia. 2009. Chapter 1. P. 30-58.
235. Lam S., MacAulay C., LeRiche J., et al. Randomized phase IIb trial of anethole dithiolethione in smokers with bronchial dysplasia. J Natl Cancer Inst 2002; 94:1001-9. <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/94.13.1001>
236. Lantuejoul S., Soria J., Morat L., Lorimier P., Moro-Sibilot D., Sabatier L., Brambilla C., Brambilla E. Telomere shortening and telomerase reverse transcriptase expression in preinvasive bronchial lesions. Clin Cancer Res, 2005; 11:2074-2082
237. Lantuejoul S., Salameire D., Salon C., Brambilla E. Pulmonary preneoplasia – sequential molecular carcinogenetic events // Histopathology. 2009. V. 54. P. 43–54.
238. Lee J., Lippman S., Benner S., et al. Randomized placebo-controlled trial of isotretinoin in chemoprevention of bronchial squamous metaplasia. J Clin Oncol 1994; 12: 937-45.
239. Lee P., van den Berg R., Lam S., et al. Color fluorescence ratio for detection of bronchial dysplasia and carcinoma in situ. Clinical Cancer Research. 2009;15(14):4700–4705.
240. Li G., Guillaud M., le Riche J., McWilliams A., Gazdar A., Lam S., MacAulaya C. Automated sputum cytometry for detection of intraepithelial neoplasias in the lung // Anal Cell Pathol (Amst). 2012; 35(3): 187–201. doi: 10.3233/ACP-2012-0053
241. Liang Y., Shen C., Che G., Luo F. Primary pulmonary lymphoepithelioma-like carcinoma initially diagnosed as squamous

- metaplasia: A case report and literature review// *Oncol Lett.* 2015 Apr;9(4):1767-1771. Epub 2015 Feb 17.
242. Liao S.J., Zhou Y.H., Yuan Y., Li D., Wu F.H., Wang Q., Zhu J.H., Yan B., Wei J.J., Zhang G.M., et al. Triggering of Toll-like receptor 4 on metastatic breast cancer cells promotes $\alpha\beta$ 3-mediated adhesion and invasive migration// *Breast Cancer Res Treat.* 2012. V. 133. P. 853–63. doi: 10.1007/s10549-011-1844-0. Epub 2011 Nov 1.
243. Lippman S., Lee J., Karp D., et al. Randomized phase III intergroup trial of isotretinoin to prevent second primary tumors in stage I non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 605-18. <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/93.8.605>
244. Liu L., Ge D., Ma L., Mei J., Liu S., Zhang Q., Ren F., Liao H., Pu Q., Wang T., et al. Interleukin-17 and prostaglandin E2 are involved in formation of an M2 macrophage-dominant microenvironment in lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012;7:1091–1100.
245. Liu C.Y., Xu J.Y., Shi X.Y., Huang W., Ruan T.Y., Xie P., Ding J.L. M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway// *Lab Invest.* 2013. V. 93. N. 7. P. 844-54. doi: 10.1038/labinvest.2013.69. Epub 2013 Jun 10.
246. Lopez Guerra J., Gomez D., Lin S., Levy L., Zhuang Y., Komaki R., et al. Risk factors for local and regional recurrence in patients with resected N0-N1 non-small-cell lung cancer, with implications for patient selection for adjuvant radiation therapy. *Ann Oncol.* 2013;24(1):67–74.
247. Lorenzetto E., Brenca M., Boeri M., Verri C., Piccinin E., Gasparini P., Facchinetti F., Rossi S., Salvatore G., Massimino M., Sozzi G., Maestro R., Modena P. YAP1 acts as oncogenic target of 11q22 amplification in multiple cancer subtypes. *Oncotarget* 2014;5(9):2608-2621.

248. Lowe F., Shen W., Zu J., Li J., Wang H, Zhang X, Zhong L. A novel autoantibody test for the detection of pre-neoplastic lung lesions//Mol Cancer. 2014; 13: 78. doi: 10.1186/1476-4598-13-78
249. Lu H., Ouyang W., Huang C. Inflammation, a key event in cancer development //Mol. Cancer Res. 2006. V. 4. P. 221–33.
250. Lu Y., Wang L., Liu P., Yang P., You M. Gene-Expression Signature Predicts Postoperative Recurrence in Stage I Non-Small Cell Lung Cancer Patientspublished.PLoSOne. 2012;7(1):e30880.doi:10.1371/journal.pone.0030880.
251. Lui N., Yang Y., van Zante A., et al. SULF2 Expression Is a Potential Diagnostic and Prognostic Marker in Lung Cancer. PLoS One. 2016;11(2):e0148911. doi: 10.1371/journal.pone.0148911. eCollection 2016.
252. Maddau C, Confortini M, Bisanzi S, et al. Prognostic significance of p53 and Ki-67 antigen expression in surgically treated non-small cell lung cancer: immunocytochemical detection with imprint cytology. Am J Clin Pathol 2006;125:425-31. [PubMed]
253. Maeda R., Yoshida J., Ishii G., et al. Risk factors for tumor recurrence in patients with early-stage (stage I and II) non-small cell lung cancer: Patient selection criteria for adjuvant chemotherapy according to the 7th edition TNM classification. 2011. Chest 139: 855-861.
254. Maeshima A., Tochigi N., Yoshida A., Asamura H., Tsuta K., Tsuda H. Clinicopathologic analysis of multiple (five or more) atypical adenomatous hyperplasias (AAHs) of the lung: evidence for the AAH-adenocarcinoma sequence. J Thorac Oncol. 2010;5:466-471.[PubMed]
255. Mahipal A., Malafa M. Importins and exportins as therapeutic targets in cancer. Pharmacol Ther 2016;164. P. 135-143.

256. Mannino D.M. Epidemiology and global impact of chronic obstructive pulmonary disease// *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2005. V. 26. P. 204–210.
257. Mannino D., Watt G., Hole D., et al. The natural history of chronic obstructive pulmonary disease // *Europ. Respir. J.* 2006. V. 27. № 3. P. 627 – 643
258. Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):436–444.
259. Maohua X., Yun Y., Taofeek K., et al. Bcl-2 induces DNA replication stress by inhibiting rib nucleotide reductase. *Cancer Res.* 2014;74(1):212–223.
260. Markou A., Liang Y., Lianidou E Prognostic, therapeutic and diagnostic potential of microRNAs in non-small cell lung cancer// *Clin. Chem. Lab. Med.* 2011. Vol. 10. P. 1591-603.
261. Martin B., Verdebout J., Mascaux C., Paesmans M., Rouas G., Verhest A., Ninane V., Sculier J. Expression of p53 in preneoplastic and early neoplastic bronchial lesions. *Oncol Rep*, 2002; 9(2): 223-229
262. Martin B., Paesmans M., Mascaux C., et al., “Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: Systematic review of the literature with meta-analysis,” *British Journal of Cancer*, 2004. vol. 91, no. 12, pp. 2018–2025,
263. Martinet N., Alla F., Farre G., et al. Retinoic acid receptor and retinoid X receptor alterations in lung cancer precursor lesions. *Cancer Res* 2000;60:2869–2875
264. Mascaux C., Laes J., Anthoine G., Haller A., Ninane V., Burny A., et al. Evolution of microRNA expression during human bronchial squamous carcinogenesis. *Eur Respir J.* 2009;33(2):352–9.

265. Mascaux C., Coldren C., Haibe-Kains B., Anthoine G., Haller A., Ninane V., Burny A., Sculier J., Hirsch F. Gene expression differences in current versus former smokers lung squamous preneoplasia // *Journal of Clinical Oncology*, 2010 Vol 28, No 15_suppl 10575
266. Mascaux C., Coldren C., Haibe-Kains B., Anthoine G., Haller A., Ninane V., Burny A., Sculier J., Hirsch F. "Gene Expression Differences in Current versus Former Smokers' Lung Squamous Preneoplasia", *Proceedings of the American Thoracic Society*, (2011) Vol. 8, No. 2, pp. 208-209.
267. Massion P., Zou Y., Uner H., Kiatsimkul, P., Wolf H., Baron, A., et al. Recurrent genomic gains in preinvasive lesions as a biomarker of risk for lung cancer. *PLoS ONE*, 2009. 4(6), e5611.
268. McMillan D.C. The systemic inflammation-based Glasgow Prognostic Score: A decade of experience in patients with cancer. *Cancer Treat Rev*. 2012. 39(5): 534–540.
269. Mebratu Y., Schwalm K., Smith K., Schuyler M., Tesfaigzi Y. Cigarette smoke suppresses Bik to cause epithelial cell hyperplasia and mucous cell metaplasia // *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Jun 1;183(11):1531-8. doi: 10.1164/rccm.201011-1930OC. Epub 2011 Feb 11.
270. Meert A., Feoli F., Martin B., Verdebout J., Mascaux C., Verhest A., Ninane V., Sculier J. Ki67 exoression in bronchial preneoplastic lesions and carcinoma in situ defined according to the new 1999 WHO/IASLC criteria: a preliminary study. *Histopathology*, 2004; 44: 47-53
271. Mehra D., Geraghty P., Hardigan A., Foronjy R. A comparison of the inflammatory and proteolytic effects of dung biomass and cigarette smoke exposure in the lung. *PLoS ONE*. 2012; 7:e52889.

272. Melamed M.R. Lung cancer screening results in the National Cancer Institute New York study. *Cancer*. 2000. V. 89. № 1. P. 2356 - 2362.
273. Mercer R., Russell M., Roggli V., Crapo J. Cell number and distribution in human and rat airways. *Am. J. Respir Cell Mol Biol*. 1994. 10, 613–624
274. Mijović Ž., Karyometric Analysis of Squamous Metaplasia, Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *Scientific Journal of the Faculty of Medicine*. 2014; 31(3):177-182
275. Mijović Ž., Mihailović D. Severe dysplasia can be distinguished from moderate and mild dysplasia of bronchial mucosa by changes in Ki-67 index// *Pol J Pathol*. 2015;66(1):38-43
276. Mlakar V., Strazisar M., Sok M., Glavac D. Oligonucleotide DNA microarray profiling of lung adenocarcinoma revealed significant downregulation and deletions of vasoactive intestinal peptide receptor 1. *Cancer Invest* 2010;28(5):487-494.
277. Mohamed Z., Pinato D., Mauri F., Chen K., Chang P., Sharma R. Inflammation as a validated prognostic determinant in carcinoma of unknown primary site. *Br J Cancer*. 2014. 110(1): 208–213.
278. Moiseyenko V.M., Procenko S.A., Ivantsov A.O., et al. High efficacy of first-line gefitinib in non-Asian patients with EGFR-mutated lung adenocarcinoma. *Onkologie*. 2010. № 33. P. 231-8.
279. Molina-Pinelo S., Gutierrez G., Pastor M., Hergueta M., Moreno-Bueno G., et al. MicroRNA-Dependent Regulation of Transcription in Non-Small Cell. *Lung Cancer*. 2014. *PLoS ONE* 9(3): e90524. doi:10.1371/journal.pone.0090524
280. Moro-Sibilot D., Fievet F., Jeanmart M., et. al. Clinical prognostic indicators of high-grade pre-invasive bronchial lesions. *Eur. Respir. J*. 2004. V. 24. P. 24–29.

281. Morton M., Bai X., Merry C., Linden P., Khalil A., Leidner R., Thompson C. Identification of mRNAs and lincRNAs associated with lung cancer progression using next-generation RNA sequencing from laser micro-dissected archival FFPE tissue specimens // *Lung Cancer*. 2014 Jul; 85(1):31-9. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.03.020.
282. Moskalev E., Jandaghi P., Fallah M., Manoochehri M., Botla S., Kolychev O., et al. GHSR DNA hypermethylation is a common epigenetic alteration of high diagnostic value in a broad spectrum of cancers. *Oncotarget*. 2015; 6(6):4418–27.
283. Müller P., Rothschild S.I, Arnold W., Hirschmann P., Horvath L., Bubendorf L., Savic S., Zippelius A.. Metastatic spread in patients with non-small cell lung cancer is associated with a reduced density of tumor-infiltrating T cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2016 Jan; 65(1): 1-11. doi: 10.1007/s00262-015-1768-3.
284. Nakagawa T., Okumura N, Ohata K., et al. Postrecurrence survival in patients with stage I non-small cell lung cancer// *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* - 2008. Vol. 34. P. 499-504.
285. Nakahara R., Yokose T., Nagai K., Nishiwaki Y., Ochiai A. Atypical adenomatous hyperplasia of the lung: a clinicopathological study of 118 cases including cases with multiple atypical adenomatous hyperplasia. *Thorax*, 2001; 56: 302-305
286. Nakanishi K., Kawai T., Kumaki F., Hirot S., Mukai M., Ikeda E. Expression of human telomerase RNA component and telomerase reverse transcriptase mRNA in atypical adenomatous hyperplasia of the lung. *Hum Pathol*, 2002; 33: 697-702
287. Nana-Sinkam S., Powell C. Molecular biology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*.

- 2013; 143(5 Suppl):e30S–9S. Epub 2013/05/10. doi: 10.1378/chest.12-2346.
288. Niklinski J., Niklinska W., Chyczewski L., Becker H., Pluygers E. Molecular genetic abnormalities in premalignant lung lesions: biological and clinical implications. *Eur J Cancer Prev*, 2001; 10(3): 213-226
289. Noguchi M. Stepwise progression of pulmonary adenocarcinoma--clinical and molecular implications. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29:15-21.[PubMed]
290. O'Callaghan D., O'Donnell D., O'Connell F., O'Byrne K. The role of inflammation in the pathogenesis of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2010;5(12):2024–36.
291. O'Connell F., Pinkus J., Pinkus G.. CD138 (syndecan-1), a plasma cell marker immunohistochemical profile in hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms. *Am J Clin Pathol.* 2004 Feb;121(2):254-63.
292. Okudela K., Yazawa T., Woo T., Sakaeda M., Ishii J., Mitsui H., Shimoyamada H., Sato H., Tajiri M., Ogawa N., Masuda M., Takahashi T., Sugimura H., Kitamura H. Down-regulation of DUSP6 expression in lung cancer: its mechanism and potential role in carcinogenesis. *Am J Pathol* 2009;175(2):867-881.
293. Olkhanud P.B., Damdinsuren B., Bodogai M., Gress R.E., Sen R., Wejksza K., Malchinkhuu E., Wersto R.P., Biragyn A. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4⁺ T cells to T-regulatory cells. // *Cancer Res.* 2011. V. 71. P. 3505–15.doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4316. Epub 2011 Mar 28.
294. Ooi A.T., Zhang K.X. Gower A.C., et al. Presence of a putative tumor-initiating progenitor cell population predicts poor prognosis in smokers with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2010;70(16):6639–6648.

295. Ooi A.T., Gower A.C., Zhang K.X., Vick J.L., Hong L., Nagao B., Wallace W.D., Elashoff D.A., Walser T.C., Dubinett S.M., Pellegrini M., Lenburg M.E., Spira A., Gomperts B.N. Molecular profiling of premalignant lesions in lung squamous cell carcinomas identifies mechanisms involved in stepwise carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2014, 7(5):487-495. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-13-0372
296. Ooi A. T., Gower A.C., Zhang K.X., et al. Molecular profiling of premalignant lesions in lung squamous cell carcinomas identifies mechanisms involved in stepwise carcinogenesis // *Cancer Prev Res* Published OnlineFirst March 11, 2014.
297. Paik K. H., Park Y. H., Ryoo B. Y. et al., “Prognostic value of immunohistochemical staining of p53, bcl-2, and Ki-67 in small cell lung cancer,” *Journal of Korean Medical Science*, 2006, vol. 21, no. 1, pp. 35–39.
298. Palaiologou M., Delladetsima I., Tiniakos D. CD138 (syndecan-1) expression in health and disease//*Histol Histopathol*. 2013 Oct 23. [Epub ahead of print] PMID:24045542 PubMed
299. Palcic B. Nuclear texture: Can it be used as a surrogate endpoint biomarker? *J Cell Biochem Suppl*. 1994; 19: 40-6.
300. Pankiewicz W., Minarowski L., Niklińska W., et. al. Immunohistochemical markers of cancerogenesis in the lung // *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2007. V. 45. № 2. P. 65-74.
301. Papi A., Casoni G., Caramori G., Guzzinati I., Boschetto P., Ravenna F., et.al. COPD increases the risk of squamous histological subtype in smokers who develop non-small cell lung carcinoma//*Thorax*. 2004. V. 59. P. 679–681.
302. Patnaik S., Kannisto E., Knudsen S., et. al. Evaluation of microRNA expression profiles that may predict recurrence of localized

- stage I non-small cell lung cancer after surgical resection// *Cancer Res.* – 2010. Vol. 70(1). P. 36-45.
303. Pauly J.L., Smith L.A., Rickert M.H., Hutson A., Paszkiewicz G.M. Review: is lung inflammation associated with microbes and microbial toxins in cigarette tobacco smoke? *Immunologic Research.* 2010; 46(1–3):127–136.[PubMed].
304. Peifer M., Fernandez-Cuesta L., Sos M., George J., Seidel D., Kasper L., et al. Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nat Genet.* 2012; 44(10):1104–10. doi: 10.1038/ng.2396 pmid:22941188.
305. Pietras K., Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res.* 2010;316:1324–31.
306. Pinato D., Shiner R., Seckl M., Stebbing J., Sharma R., Mauri F. (2014) Prognostic performance of inflammation-based prognostic indices in primary operable non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 110, 1930–1935. doi:10.1038/bjc.2014.145
307. Poblete C. E., Fulla J., Gallardo M., et al. Increased SNAIL expression and low syndecan levels are associated with high Gleason grade in prostate cancer. *International Journal of Oncology.* 2014; 44(3):647–654. doi: 10.3892/ijo.2014.2254
308. Poleri C., Morero J., Nieva B., Vazquez M., Rodriguez C., de Titto E., et al. Risk of recurrence in patients with surgically resected stage I non-small cell lung carcinoma: histopathologic and immunohistochemical analysis. *Chest.* 2003; 123(6):1858–67.
309. Polleri K., Morero J., et. al. Risk of Recurrence in Patients With Surgically Resected Stage I Non-small Cell Lung Carcinoma. *Histopathologic and Immunohistochemical Analysis* 2008.1: 121-128.

310. Ponticiello A., Barra E., Giani U., et al. P53 immunohistochemistry can identify bronchial dysplastic lesions proceeding to lung cancer: a prospective study// *Eur. Respir. J.* 2000. V.15. P.547–552.
311. Powell H.A., Iyen-Omofoman B., Baldwin D.R., Hubbard R.B., Tata L.J. Chronic obstructive pulmonary disease and risk of lung cancer: the importance of smoking and timing of diagnosis. *J Thorac Oncol.* 2013; 8:6–11.
312. Preoperative chemotherapy for non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of individual participant data // *Lancet.* – 2014. – Vol. 383, №9928. – P. 1561-1571.
313. Puchelle E., Zahm J., Tournier J., Coraux C. Airway Epithelial Repair, Regeneration, and Remodeling after Injury in Chronic Obstructive Pulmonary Disease// *The Proceedings of the American Thoracic Society.* 2006. V.3. P.726-733.
314. Punturieri A., Szabo E., Croxton T., Shapiro S., Dubinett S. Lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease: needs and opportunities for integrated research // *J. Nat. Cancer Inst.* 2009. V. 101. P. 554–559.
315. Purdue M., Gold L., Jarvholm B., et.al. Impaired lung function and lung cancer incidence in a cohort of Swedish construction workers // *Thorax.* 2007. V. 62. P. 51–56.
316. Qian B.Z. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature.* 2011; 475(7355):222–225.
317. Qiang G., Liang C., Xiao F., Yu Q., Wen H., Song Z., Tian Y., Shi B., Guo Y., Liu D. Impact of chronic obstructive pulmonary disease on postoperative recurrence in patients with resected non-small-cell lung cancer. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2015 Dec 29;11:43-9. Doi: 10.2147/COPD.S97411.

318. Rackley C., Stripp B. Building and maintaining the epithelium of the lung // *J Clin Invest.*2012;122(8):2724–2730.doi:10.1172/JCI60519.
319. Radović S., Babić M., Dorić M., et. al. Non-small cell lung carcinoma: cyclin D1, bcl-2, p53, Ki-67 and HER-2 proteins expression in resected tumors// *Bosn. J. Basic Med. Sci.* – 2007. Vol. 3. – P. 205-11.
320. Rahman S. M. J., Gonzalez A. L., Li M., Seeley E. H., Zimmerman L. J., Zhang X. J., Manier M. L. , Olson S. J., Shah R. N., Miller A. N. Lung Cancer Diagnosis from Proteomic Analysis of Preinvasive Lesions // *Cancer Res.*, April 15, 2011; 71(8): 3009 - 3017.
321. Rao S., Rao Sh., Lal A., Barathi G., Dhanasekar T., Duvuru P. Bronchial wash cytology: A study on morphology and morphometry // *J Cytol.* 2014 Apr-Jun; 31(2): 63–67. doi: 10.4103/0970-9371.138664
322. Rao X.M., Zheng X., Waigel S., Zacharias W., McMasters K.M., Zhou H.S. Gene expression profiles of normal human lung cells affected by adenoviral E1B. *Virology* 2006;350(2):418-428.
323. Raponi M., Dossey L., Jatko T., et. al. MicroRNA classifiers for predicting prognosis of squamous cell lung cancer// *Cancer Res.* 2009. Vol. 69(14). P.5776-83.
324. Rauch T.A., Wang Z., Wu X., Kernstine K.H., Riggs A.D., Pfeifer G.P. DNA methylation biomarkers for lung cancer. *Tumour Biol* 2012; 33(2):287-296.
325. Raviv S., Hawkins K., De Camp M., Kalhan R. Lung Cancer in Chronic Obstructive Pulmonary Disease // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2011. 183 (9):1138-1146.
326. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2015.Vienna, Austria.

327. Remark R., Becker C., Gomez J., Damotte D., Dieu-Nosjean M., Sautes-Fridman C., et al. The non-small cell lung cancer immune contexture. A major determinant of tumor characteristics and patient outcome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015; 191(4):377–90. Epub 2014/11/05. doi: 10.1164/rccm.201409-1671PP pmid:25369536.
328. Riabov V., Gudima A., Wang N., Mickley A., Orekhov A., Kzhyshkowska J. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Front Physiol.* 2014;5:75.
329. Ritchie M., Phipson B., Wu D., et al. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(7):e47. doi: 10.1093/nar/gkv007.
330. Rivera M.P. Preinvasive lesions of the bronchus. *Clin Chest Med.* 2011 Dec; 32(4):693-702. doi: 10.1016/j.ccm.2011.08.008.
331. Rock J.R., Randell S.H., Hogan B.L. Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis Model Mech.* 2010;3(9–10):545–556. doi: 10.1242/dmm.006031.
332. Rom W.N., Hay J.G., Lee T.C., Jiang Y., Tchou-Wong K. Molecular and Genetic Aspects of Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000. Vol 161. pp 1355–1367
333. Ryan D.M., Vincent T.L., Salit J., Walters M.S., Agosto-Perez F., Shaykhiev R., Strulovici-Barel Y., Downey R.J., Buro-Auriemma L.J., Staudt M.R., Hackett N.R., Mezey J.G., Crystal R.G. Smoking dysregulates the human airway basal cell transcriptome at COPD risk locus 19q13.2. // *PLoS One.* 2014 Feb 3;9(2):e88051. doi: 10.1371/journal.pone.0088051.
334. Saad R.S., Silverman J.F. Respiratory cytology: Differential diagnosis and pitfalls. *Diagn Cytopathol.*2010; 38:297–307. [PubMed].
335. Sackett M.K., Salomão D.R., Donovan J.L., Yi E.S., Aubry M.C. Diagnostic concordance of histologic lung cancer type between bronchial

- biopsy and cytology specimens taken during the same bronchoscopic procedure. *Arch Pathol Lab Med.* 2010; 134:1504–12. [[PubMed](#)].
336. Sakamoto H., Shimizu J., Horio Y., Ueda R., Takahashi T., Mitsudomi T., Yatabe Y. Disproportionate representation of KRAS gene mutation in atypical adenomatous hyperplasia, but even distribution of EGFR gene mutation from preinvasive to invasive adenocarcinomas. *J Pathol.* 2007; 212:287-294.[[PubMed](#)].
337. Salaun M., Sesboue R., Moreno-Swire S., Metayer J., Bota S., Bourguignon J., et al. Molecular predictive factors for progression of high-grade preinvasive bronchial lesions. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2008. 177, 880–886.
338. Salaun M., Bota S., Thiberville L. Long-term followup of severe dysplasia and carcinoma in-situ of the bronchus. *JThorac Oncol*, 2009. 4, 1187–1188.
339. Saldivar J., Miuma S., Bene J., Hosseini S., Shibata H., Sun J., Wheeler L., et.al. Initiation of Genome Instability and Preneoplastic Processes through Loss of Fhit Expression. *PLoS Genet.* 2012; 8(11):e1003077. doi: 10.1371/journal.pgen.1003077.
340. Sanchez-Mora N., Cebollero Presmanes M., Monroy V., Herranz Aladro M., A´lvarez-Fernandez E. Expression of histo-blood group antigens in bronchial squamous metaplasia. *Eur Respir J* 2007; 29: 268–272 DOI: 10.1183/09031936.00009806
341. Sangaletti S., Tripodo C., Sandri S., et al. Osteopontin shapes immunosuppression in the metastatic niche. *Cancer Res.* 2014; 74(17):4706-19. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3334. Epub 2014 Jul 17.
342. Sa’Rah McNeal, Pincas Bitterman, Janice M. Bahr, et al., “Association of Immunosuppression with DR6 Expression during the Development and Progression of Spontaneous Ovarian Cancer in Laying

- Hen Model,” *Journal of Immunology Research*, 2016, Article ID 6729379, 11 pages. doi:10.1155/2016/6729379.
343. Sato T., Arai E., Kohno T., Takahashi Y., Miyata S., Tsuta K., Watanabe Sh., Soejima K., Betsuyaku T., Kanai Y. Epigenetic clustering of lung adenocarcinomas based on DNA methylation profiles in adjacent lung tissue: Its correlation with smoking history and chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Cancer*: 2014. 135, 319–334
344. Sceneay J., Smyth M., Möller A. The pre-metastatic niche: finding common ground. *Cancer Metastasis Rev.* 2013; 32:449–464. DOI 10.1007/s10555-013-9420-1
345. Schabath M., Delclos G., Martynowicz M. et. al. Opposing effects of emphysema, hay fever, and select genetic variants on lung cancer risk// *Am. J. Epidemiol.* 2005. V.161. P.412–422.
346. Schamberger A., Staab-Weijnitz C., Mise-Racek N, Eickelberg O. Cigarette smoke alters primary human bronchial epithelial cell differentiation at the air-liquid interface. *SCIENTIFIC REPORTS.* 5: 8163. DOI: 10.1038/srep08163 1.
347. Schamberger, A. C. Cigarette smoke-induced disruption of bronchialepithelial tight junctions is prevented by transforming growth factor-beta. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014. 50; 1040–1052, doi:10.1165/rcmb.2013-0090OC.
348. Schmall A., Al-Tamari H., Herold S., Kampschulte M., Weigert A., Wietelmann A., et al. Macrophage and cancer cell cross-talk via CCR2 and CX3CR1 is a fundamental mechanism driving lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015; 191(4):437–47. doi: 10.1164/rccm.201406-1137OC.
349. Schmidt L., Görlich D., Spieker T., et al. Prognostic impact of Bcl-2 depends on tumor histology and expression of MALAT-1 lncRNA in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2014; 9(9):1294–1304.

350. Schottenfeld D., Beebe-Dimmer J. Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. *CA Cancer J. Clin.* 2006.V. 56. P. 69–83.
351. Selamat S., Galler J., Joshi A., Fyfe M., Campan M., Siegmund K., Kerr K., Laird-Offringa I. DNA methylation changes in atypical adenomatous hyperplasia, adenocarcinoma in situ, and lung adenocarcinoma. *PLoS One.* 2011; 6:e21443. [[PubMed](#)].
352. Sell S., Guest I., McKinstry K., Strutt T., Kohlmeier J. , Brincks E., Tighe M., et.al. Intraepithelial T-cell cytotoxicity, induced bronchus-associated lymphoid tissue, and proliferation of pneumocytes in experimental mouse models of influenza. *Viral Immunol.* 2014 Dec;27(10):484-96. doi: 10.1089/vim.2014.0077.
353. Seo J.S., Ju Y.S., Lee W.C., et al. The transcriptional landscape and mutational profile of lung adenocarcinoma. *Genome Res.* 2012; 22(11):2109-19. doi: 10.1101/gr.145144.112.
354. Shah L., Walter K., Borczuk A., Kawut S., Sonett J., Gorenstein L., et al. Expression of syndecan-1 and expression of epidermal growth factor receptor are associated with survival in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer.* 2004; 101:1632–1638.
355. Shaykhiev R., Crystal R.G. Early events in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. Smoking-induced reprogramming of airway epithelial basal progenitor cells *Ann Am Thorac Soc.* 2014 Dec; 11 Suppl 5:S252-8. doi: 10.1513/AnnalsATS.201402-049AW.
356. Shevde L.A., Samant R.S. Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer. *Matrix Biol.* 2014; 37:131-41. doi: 10.1016/j.matbio.2014.03.001.

357. Shojaei F., Scott N., Kang X., et al. Osteopontin induces growth of metastatic tumors in a preclinical model of non-small lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2012; 31:26. doi: 10.1186/1756-9966-31-26.
358. Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012; 122(3):787–795. doi: 10.1172/JCI59643.
359. Siegel R., Naishadham D., Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* 2013; 63(1):11-30. doi: 10.3322/caac.21166.
360. Sin D.D., Man S.F. Systemic inflammation and mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Can. Physiol. Pharmacol.* 2007. V. 85. P. 141–147.
361. Singer M.S., Phillips J.J., Lemjabbar-Alaoui H., Wang Y.Q., Wu J., Goldman R., et al. SULF2, a heparan sulfate endosulfatase, is present in the blood of healthy individuals and increases in cirrhosis. *Clin Chim Acta* 2015. 440: 72–78. doi: 10.1016/j.cca.2014.10.038. pmid:25444749
362. Snoeck-Stroband J.B., Lapperre T.S., Gosman M.M., Boezen H.M., Timens W., ten Hacken N.H., Sonté J.K., Sterk P.J.. Chronic bronchitis sub-phenotype within COPD: inflammation in sputum and Biopsies. *Eur Respir J* 2008; 31: 70–77 DOI: 10.1183/09031936.00137006
363. Sobin L.H., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. New York, USA: Wiley-Blackwell; 2009. http://www.uicc.org/sites/main/files/private/TNM_Classification_of_Malignant_Tumours_Website_15%20MAy2011.pdf. Accessed May 25, 2016.
364. Soukka T., Pohjola J., Inki P., Happonen R. Reduction of syndecan-1 expression is associated with dysplastic oral epithelium. *J Oral Pathol Med.* 2000. 29(7):308-313. doi:10.1034/j.1600-0714.2000.290704.x

365. Sousa V., Santo J., Silva M., et al. EGFR/erB-1, HER2/erB-2, CK7, LP34, Ki67 and P53 expression in preneoplastic lesions of bronchial epithelium: an immunohistochemical and genetic study. *Virchows Arch* 2011; 458: 571-581.
366. Stamatidis G. Staging of lung cancer: the role of noninvasive, minimally invasive and invasive techniques // *Eur Respir J.* – 2015. - May 14. pii: ERJ 01267-2014. [Epub ahead of print]
367. Stavem K., Aaser E., Sandvik L., et al. Lung function, smoking and mortality in a 26-year follow-up of healthy middle-aged males // *Eur. Respir. J.* 2005. V. 25. №4. P. 618 - 25.
368. Steven A. Belinsky, Kristen J. Nikula, William A. Palmisano, et al. Aberrant methylation of p16INK4a is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(20): 11891–11896.
369. Syrjanen K.J. HPV infections and lung cancer. *Journal of Clinical Pathology.* 2002; 55:885–891.
370. Szatmári T., Ötvös R., Hjerpe A., Dobra K. Syndecan-1 in Cancer: Implications for Cell Signaling, Differentiation, and Prognostication. *Disease Markers* Volume 2015, Article ID 796052, 13 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/796052>
371. Tabata K., Tanaka T., Hayashi T., et al. Ki-67 is a strong prognostic marker of non-small cell lung cancer when tissue heterogeneity is considered. *BMC Clin Pathol* 2014; 14:23. [[PubMed](#)].
372. Tan G.J., Peng Z.K., Lu J.P., et al. Cathepsins mediate tumor metastasis. *World J Biol Chem.* 2013; 4(4):91-101. doi: 10.4331/wjbc.v4.i4.91.
373. Tang X., Shigematsu H., Bekele B., et al. EGFR tyrosine kinase domain mutations are detected in histologically normal respiratory epithelium in lung cancer patients. *Cancer Res.* 2005; 65; 7568–7572.

374. Tang X., Yin X., Xiang T., Li H., Li F., Chen L., Ren G. Protocadherin 10 is frequently downregulated by promoter methylation and functions as a tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Biomark* 2012;12(1):11-19.
375. Teng Y.H., Aquino R.S., Park P.W. Molecular functions of syndecan-1 in disease//*Matrix Biol.* 2012 Jan; 31(1):3-16. doi:10.1016/j.matbio.2011.10.001.
376. Tessema M., Yingling C., Thomas C., et al. SULF2 methylation is prognostic for lung cancer survival and increases sensitivity to topoisomerase-I inhibitors via induction of ISG15. *Oncogene.* 2012; 31(37):4107-16. doi: 10.1038/onc.2011.577.
377. Törmänen U., Nuorva K., Soini Y., Pääkkö P. Apoptotic activity is increased in parallel with the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence of the bronchial epithelium. *Br. J. Cancer.* 2001. V.79. № 5-6. P. 996-1002.
378. Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65(2):87–108.
379. Travis W., Brambilla E., Muller-Hermelink H., Harris C. Pathology and Genetics of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon, France. 2004. World Health Organization Classification of Tumours.
380. Travis W., Brambilla E., Noguchi M. Nicholson A., Geisinger K., Yatabe Y., et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2011; 6 (2):244–85.
381. Travis W., Brambilla E., Noguchi M., et al. Diagnosis of Lung Cancer in Small Biopsies and Cytology: Implications of the 2011

- International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification. Arch Pathol Lab Med 2013; 137:668-84. [PubMed]
382. Tropea K.A. Bronchioalveolar stem cells increase after mesenchymal stromal cell treatment in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2012; 302(9):L829–L837.
383. Trump B., McDowell E., Glavin F., et al. The respiratory epithelium. III Histogenesis of epidermoid metaplasia and carcinoma in situ in the human// J. Natl. Cancer Inst.1978. V. 61. P.563–575.
384. Tycko B. Genetic and epigenetic mosaicism in cancer precursor tissues. Ann N Y Acad Sci. 2003 Mar; 983:43-54.
385. Turner M., Chen Y., Krewski D., et al Cancer mortality among US men and women with asthma and hay fever. Am. J. Epidemiol. 2005. V. 162. P.212–221.
386. Ueno K., Kusunoki Y., Imamura F., et al. Clinical experience with autofluorescence imaging system in patients with lung cancers and precancerous lesions. Respiration. 2007; 74(3):304–308.
387. Ullman R., Bongiovanni M., Halbweld I., Petzmann S., Gogg-Kammerer M., Sapino A., Papotti M., Bussolati G., Popper H.. Bronchiolar columnar cell dysplasia - genetic analysis of a novel preneoplastic lesion of peripheral lung. Virchows Arch, 2003; 442: 429-436
388. Ulmeanu R., Râjnoveanu R., Halic E. et. al. Natural course of preneoplastic bronchial lesions. Pneumologia. 2011. V. 60. №2. P. 93-101.

389. Um S.W., Kim H.K., Jung S.H., et al. Endobronchial ultrasound versus mediastinoscopy for mediastinal nodal staging of non_small_cell lung cancer // *J Thorac Oncol*. 2015. Vol.10, №2. P.331-337.
390. Unal D., Eroglu C., Kurtul N., Oguz A., Tasdemir A. Are neutrophil/lymphocyte and platelet/lymphocyte rates in patients with non-small cell lung cancer associated with treatment response and prognosis? *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14(9): 5237-42.
391. van der Leest C., Amelink A., van Klaveren R., Hoogsteden H., Sterenborg H., Aerts J. Optical Detection of Preneoplastic Lesions of the Central Airways. *ISRN Oncol*. 2012; 2012: 957835. doi: 10.5402/2012/957835
392. van Herpen C.M., van der Voort R., van der Laak J.A., Klasen I.S., de Graaf A.O., van Kempen L.C., de Vries I.J., Boer T.D., Dolstra H., Torensma R. // *Int J Cancer*. 2008. V. 123. P. 2354–61.
393. Varlotto J., Recht A., Nikolov M., et al. Extent of lymphadenectomy and outcome for patients with stage I nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2009. Vol. 115. P.851-858.
394. Venmans B., Van der Linden J., Elbers J., et al. Observer variability in histopathological reporting of bronchial biopsy specimens: Influence on the results of autofluorescence bronchoscopy in detection of bronchial neoplasia. *J. Bronchol*. 2000.V. 7. P. 210–214.
395. Vicente C.M., Lima M.A., Nader H.B., et al. SULF2 overexpression positively regulates tumorigenicity of human prostate cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015;34:25. doi: 10.1186/s13046-015-0141-x.
396. Walker C., Robertson L., Myskow M., et al. P53 expression in normal and dysplastic bronchial epithelium and in lung carcinomas. *Br J Cancer* 1994; 70:297–303.

397. Wang G. F., Lai M. D., Yang R. R., et. al. Histological types and significance of bronchial epithelial dysplasia. *Modern Pathology*. 2006. V. 19. P. 429–437.
398. Wang H., Diepgen T. Is atopy a protective or a risk factor for cancer? A review from epidemiological studies // *Allergy*. 2005. V. 60. P. 1098–1111.
399. Wang J. The Innate Immune Response in House Dust Mite-Induced Allergic Inflammation. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2013; 5(2):68-74. doi.org/10.4168/aair.2013.5.2.68
400. Wang X., El Habib Dakir, Naizhen X., Jensen-Taubman S., DeMayo J. Achaete-scute Homolog-1 Linked to Remodeling and Preneoplasia of Pulmonary Epithelium. *Lab Invest*. 2007; 87(6):527-539.
401. Wang X-R., Yu .I, Chiu Y. et. al. Previous pulmonary disease and family cancer history increase the risk of lung cancer among Hong Kong women // *Cancer Causes Control*. 2009. V. 20. P.757–763.
402. Wang X, Li K. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts the survival in patients with post-operative recurrence of non-small cell lung cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2014. 36(4):298-302.
403. Wang Z.X., Bian H.B., Wang J.R., et.al. Prognostic significance of serum miRNA-21 expression in human non-small cell lung cancer. *Surg. Oncol*. 2011. Vol. 104(7). P.847-51.
404. Wang Z., Xue D., Liu Z., Lu B., Bian H., Pan X., Yin Y. Overexpression of polo-like kinase 1 and its clinical significance in human non-small cell lung cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012. 44: 200-210. 10.1016/j.biocel.2011.10.017.
405. Warth A., Muley T., Meister M., Stenzinger A., Thomas M., Schirmacher P., Schnabel P., Budczies J., Hoffmann H., Weichert W. The novel histologic International Association for the Study of Lung

- Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival. *J Clin Oncol.* 2012; 30:1438-1446. [PubMed].
406. Wayne S., Robinson R. Upper. Aerodigestive Tract Squamous Dysplasia Correlation With p16, p53, pRb, and Ki-67 Expression. *Arch Pathol Lab Med.* 2006, Vol 130, 1309-1314.
407. Wei L.X., Zhou R.S., Xu H.F., Wang J.Y., Yuan M.H. High expression of FOXC1 is associated with poor clinical outcome in non-small cell lung cancer patients. *Tumour Biol* 2013; 34(2):941-946.
408. Wisnivesky J.P., Yung R.C., Mathur P.N., Zulueta J.J. Diagnosis and treatment of bronchial intraepithelial neoplasia and early lung cancer of the central airways: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest.* 2013 143 (5, Suppl.): 263S-77S. doi: 10.1378/chest.12-2358.
409. Wistuba, I., Behrens C, Milchgrub S, et al. Sequential molecular abnormalities are involved in the multistage development of squamous cell lung carcinoma. *Oncogene.* 1999; 18(3):643-50.
410. Wistuba I.I., Gazdar A.F. Lung cancer preneoplasia. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.* 2006. V. 1. P. 331-348.
411. Wu X., Xiao Z., Chen Z., Li C., Li J., et.al. Differential analysis of two-dimension gel electrophoresis profiles from the normal-metaplasia-dysplasia-carcinoma tissue of human bronchial epithelium. *Pathology International.* 2004. -Volume 54, Issue 10. - p. 765–773.
412. Xiong D., Li G., Li K., Xu Q., Pan Z., Ding F., Vedell P., Liu P., Cui P., Hua X., Jiang H., Yin Y., Zhu Z., Li X., Zhang B., Ma D., Wang Y., You M. Exome sequencing identifies MXRA5 as a novel cancer gene

- frequently mutated in non-small cell lung carcinoma from Chinese patients. *Carcinogenesis* 2012; 33(9):1797-1805.
413. Xu X. Evidence for type II cells as cells of origin of K-Ras-induced distal lung adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109(13):4910–4915.
414. Yaguchi H., Okumura F., Takahashi H., Kano T., Kameda H., Uchigashima M., Tanaka S., Watanabe M., Sasaki H., Hatakeyama S. TRIM67 protein negatively regulates Ras activity through degradation of 80K-H and induces neuritogenesis. *J Biol Chem* 2012; 287(15):12050-12059.
415. Yamada R., Takahashi A., Torigoe T., Morita R., Tamura Y., Tsukahara T., Kanaseki T., Kubo T., Watarai K., Kondo T., Hirohashi Y., Sato N. Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel sub-category, cancer/testis/stem gene. *Tissue Antigens* 2013; 81(6):428-434.
416. Yanamoto S. Expression of p53R2, newly p53 target in oral normal epithelium, epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *Cancer Letters*, 2003. V. 190, Issue 2, P. 233–243.
417. Yang Y., Zhao W., Xu Q-W., Wang X-S., Zhang Y., Zhang J. IQGAP3 Promotes EGFR-ERK Signaling and the Growth and Metastasis of Lung Cancer Cells. 2014. *PLoS ONE* 9(5): e97578. doi:10.1371/journal.pone.0097578
418. Yao H., Rahman I. Current concepts on the role of inflammation in COPD and lung cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2009. V. 9. P. 375–383.
419. Yatabe Y., Mitsudomi T., Takahashi T. TTF-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2002. 26: 767–73.

420. Yatabe Y., Kosaka T., Takahashi T., Mitsudomi T. EGFR mutation is specific for terminal respiratory unit type adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*, 2005. 29: 633–9.
421. Yoshida Y., Shibata T., Kokubu A., et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in atypical adenomatous hyperplasia and bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2005; 50; 1–8.
422. Yoshizawa A., Sumiyoshi S., Sonobe M., et al. Validation of the IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification for prognosis and association with EGFR and KRAS gene mutations: analysis of 440 Japanese patients. *J Thorac Oncol*. 2013; 8:52-61. [PubMed].
423. Young R., Hopkins R., Christmas T., Black P., et.al. COPD prevalence is increased in lung cancer, independent of age, sex and smoking history. *Eur. Respir. J.* 2009. V. 34. P. 380–386.
424. Zaynagetdinov R., Sherrill T., Polosukhin V., Han W., Ausborn J., McLoed A., et al. A critical role for macrophages in promotion of urethane-induced lung carcinogenesis. *J Immunol*. 2011; 187(11):5703–11. doi: 10.4049/jimmunol.1100558 pmid:22048774; PubMed Central PMCID: PMC3221921.
425. Zhang J., Fujimoto J., Zhang J., et al. Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science*. 2014; 346:256-9.
426. Zhang J., Wang S., Wang L., Wang R., Chen S., Pan B., Sun Y., Chen H. Prognostic value of Bcl-2 expression in patients with non-small-cell lung cancer: a meta-analysis and systemic review *Onco Targets Ther*. 2015; 8: 3361–3369. doi: 10.2147/OTT.S89275

427. Zhang X., Wu Ch., Song J., Götte M., Sorokin L. Syndecan-1, a Cell Surface Proteoglycan, Negatively Regulates Initial Leukocyte Recruitment to the Brain across the Choroid Plexus in Murine Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. doi: 10.4049/jimmunol.1300931 The Journal of Immunology. 1. 2013. vol. 191 no. 9 4551-4561.
428. Zheng C.X., Gu Z.H., Han B., Zhang R.X., Pan C.M., Xiang Y., Rong X.J., Chen X., Li Q.Y., Wan H.Y. Whole-exome sequencing to identify novel somatic mutations in squamous cell lung cancers. *Int J Oncol* 2013; 43(3):755-764.
429. Zhu X., Li Y., Shen H., Li H., Long L., Hui L., Xu W. miR-137 inhibits the proliferation of lung cancer cells by targeting Cdc42 and Cdk6. *FEBS Lett* 2013. 587 (1):73-81.