

ВЛИЯНИЕ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ НА СПЕКТР И ЭКСПРЕССИОННЫЙ ПРОФИЛЬ ДИСРЕГЕНЕРАТОРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В СЛИЗИСТОЙ БРОНХА ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО

О.В. Панкова¹, В.М. Перельмутер^{1,2}, С.А. Тузиков^{1,2}, О.В. Савенкова¹

*ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН, г. Томск¹
ФГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет»
Минздравсоцразвития России, г. Томск²
634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, e-mail: pancova@oncology.tomsk.ru¹*

Проведен анализ влияния неоадьювантной химиотерапии (НАХТ) на характер и иммунофенотип дисрегенераторных процессов и дисплазии, развивающихся в смежных с опухолью участках слизистой бронха у 112 больных, оперированных по поводу немелкоклеточного рака легкого, из них 48 (42,8 %) пациентов получали НАХТ по схеме паклитаксел + карбоплатин. Материалом для морфологического исследования были опухоль и фрагменты ткани удаленного легкого на расстоянии 4–5 см от новообразования. Для оценки влияния НАХТ на характер дисрегенерации сравнивали экспрессию показателей пролиферативной активности, апоптоза (Ki67, p53, bcl-2) и дифференцировки плоского эпителия (CD138) в клетках каждого варианта дисрегенераторных изменений. Установлено, что проведение НАХТ при немелкоклеточном раке легкого не оказывает влияния на частоту встречаемости разных типов дисрегенераторных изменений, возникающих в смежных с опухолью участках слизистой бронха, и их экспрессионный профиль.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, неоадьювантная химиотерапия, дисрегенераторные изменения бронхиального эпителия.

EFFECT OF NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY ON THE SPECTRUM AND EXPRESSION PROFILE OF DISREGENERATORY CHANGES IN THE BRONCHIAL MUCOSA IN PATIENTS WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER

O.V. Pankova¹, V.M. Perelmutter^{1,2}, S.A. Tuzikov^{1,2}, O.V. Savenkova¹

*Cancer Research Institute, SB RAMS, Tomsk¹,
Siberian State Medical University, Tomsk²
5, Kooperativny Street, 634050-Tomsk, Russia,
e-mail: pancova@oncology.tomsk.ru¹*

Effect of neoadjuvant chemotherapy (NACT) on the character and immune phenotypes of disregeneratory processes and dysplasia in bronchial mucosa adjacent to the tumor was analyzed in 112 patients who underwent surgery for non-small cell lung cancer. Of these patients, 48 (42,8 %) received neoadjuvant paclitaxel and carboplatin chemotherapy. Tumor and tissue fragments of the removed lung at the distance of 4–5 cm from the lesion were the material for histological examination. In order to evaluate the effect of NACT on the character of disregeneratory processes, the levels of proliferative activity, apoptosis (Ki67, p53, bcl-2) and pavement epithelium differentiation (CD138) in cells of each version of disregeneratory changes were compared. It was found that NACT for non-small cell lung cancer influences no on the frequency of different types of disregeneratory changes occurring in bronchial mucosa adjacent to the tumor and on their expression profile.

Key words: non-small cell lung cancer, neoadjuvant chemotherapy, disregeneratory changes in the bronchial epithelium.

В настоящее время многое известно о морфологических изменениях бронхиального эпителия, которые предшествуют развитию инвазивного плоскоклеточного рака. К ним относятся базально-клеточная гиперплазия (БКГ), плоскоклеточная метаплазия (ПМ) и диспластические (неопластические)

изменения (Д) [2–7, 9–11]. Данные типы дисрегенерации встречаются и в смежных с опухолью участках слизистой оболочки бронхов. Однако сведения о влиянии неоадьювантной химиотерапии (НАХТ) на дисрегенераторные процессы в бронхиальном эпителии в доступной литературе отсутствуют.

Цель исследования – оценить влияние неoadъювантной химиотерапии на характер дисрегенераторных процессов, развивающихся в смежных с опухолью участках слизистой бронха, и их иммунофенотип.

Материал и методы

В исследование вошли 112 больных в возрасте от 41 до 73 лет, прооперированных в клинике НИИ онкологии СО РАМН по поводу немелкоклеточного рака легкого $T_{1-4}N_{0-x}M_0$ стадии. В исследуемой выборке преобладали мужчины – 96 (88,1 %), женщин было 13 (11,9 %).

В предоперационном периоде 48 (42,8 %) больным было проведено 2–3 курса НАХТ по схеме: паклитаксел 175 мг/м² в/в 1-й день + карбоплатин АУС 6 в/в в 1-й день, интервал между курсами – 3 нед. Во время радикальной операции 30 (27,5 %) пациентам проведен сеанс интраоперационного облучения в однократной дозе 10–15 Гр, из них 18 (60 %) – перед облучением вводили цисплатин или гемзар в радиосенсибилизирующих дозировках.

Морфологический диагноз рака легкого устанавливался согласно «Гистологической классификации опухолей легкого» (ВОЗ, Женева, 2003). Пренеопластические (Д I степени) и неопластические процессы (Д II–III степени) оценивались согласно критериям, изложенным S. Lantué-joul et al. [8]. В 72 (64,3 %) случаях был диагностирован плоскоклеточный рак, в 40 (35,7 %) – аденокарцинома легкого различной степени дифференцировки. Плоскоклеточный рак чаще всего имел центральную локализацию (65,2 % случаев), аденокарцинома – периферическую (70 % случаев). Плоскоклеточный рак чаще встречался у мужчин – в 69 (61,6 %) наблюдениях. У всех женщин, вошедших в исследование, была выявлена аденокарцинома различной степени дифференцировки.

Материалом для морфологического исследования были опухоль и находящиеся от нее на расстоянии 4–5 см фрагменты ткани удаленного легкого. Ткань фиксировалась в нейтральном формалине, проводилась по стандартной методике и заливалась в парафин. Срезы бронхов толщиной 5–6 мкм окрашивались гематоксилином и эозином. Морфологическое исследование осуществлялось с помощью светового микроскопа «Axiostar plus» фирмы «K. Zeiss», Германия.

Иммуногистохимическое исследование проводилось по общепринятой методике. Демаскировку

антигенов осуществляли путем инкубации срезов в микроволновой печи в течение 20 мин в цитратном буфере или ЭДТА-8. В качестве хромогена применяли диаминобензидин (ДАБ). Визуализацию реакции антиген – антитело осуществляли с помощью системы «Super Sensitive Polymer – HRP Detection System» (Bio Genex, США). Для подтверждения неметастатической природы аденокарцином легкого использовалась панель антител, включающая Ttf-1 (clone Dako), CK7 (clone OV-TL 12/30, Novocastra), CK20 (clone K_s 20.08, Novocastra), CEA (clone AMT28, Novocastra), CDX2 (clone AMT28, Novocastra). Для исследования респираторного эпителия в смежных с опухолью участках использовались моноклональные антитела к белкам p53 (clone CM1, рабочее разведение 1:150, «Novocastra»), выявляющий «дикий» и «мутантный» варианты протеина, bcl-2 (clone bcl-2/100/D5, рабочее разведение 1:80, «Novocastra») и Ki 67 (clone MIB – 1, RTU, «Dako»). Результаты иммуногистохимической реакции оценивали по процентному содержанию окрашенных клеток при любой степени положительной экспрессии маркера в разных участках препарата, соответствующих различным морфологическим процессам – гиперплазии бокаловидных клеток (ГБК), БКГ, ПМ, пренеоплазии (дисплазии I степени) и неоплазии (дисплазии II–III степени).

Результаты и обсуждение

Из 72 больных с плоскоклеточным раком легкого НАХТ получали 32 (44,4 %) человека. Из 40 пациентов с аденокарциномой легкого НАХТ проводилась – 16 (40 %) (табл. 1). В этих группах рассматривался спектр дисрегенераторных изменений, встречающихся в участках респираторного эпителия, смежного с опухолью. По результатам микроскопического исследования гистологического материала в респираторном эпителии бронхов, пограничном с опухолью, наблюдались разные варианты дисрегенераторных изменений – ГБК, БКГ, ПМ и дисплазия различной степени выраженности. Данные дисрегенераторные изменения встречались в наших наблюдениях как самостоятельные процессы, так и в различных сочетаниях в пределах исследуемого фрагмента ткани. При сопоставлении различных вариантов сочетаний дисрегенераторных процессов, наблюдаемых в смежных с опухолью участках слизистой бронха, обнаружено, что частота их встречаемости не зависела от проведения НАХТ как при плоскоклеточном

Таблица 1

**Частота встречаемости различных типов сочетаний дисрегенераторных процессов
в зависимости от полученного лечения и гистотипа опухоли**

Вариант дисрегенерации	Количество больных в группах			
	Плоскоклеточный рак		Аденокарцинома легкого	
	I. НАХТ-	II. НАХТ+	III. НАХТ-	IV. НАХТ+
БКГ+ПМ+	13/23	10/23	4/6	2/6
	$\chi^2_{I-II}=0,01; p=0,91$		$\chi^2_{III-IV}=0,01; p=0,92$	
БКГ+ПМ-	14/30	16/30	13/22	9/22
	$\chi^2_{I-II}=1,65; p=0,19$		$\chi^2_{III-IV}=0,04; p=0,84$	
БКГ-ПМ+Д+	8/10	2/10	-	-
	$\chi^2_{I-II}=1,78; p=0,18$			
БКГ-ПМ-	5/9	4/0	7/12	5/12
	$\chi^2_{I-II}=0,13; p=0,71$		$\chi^2_{III-IV}=0,04; p=0,83$	

Таблица 2

**Зависимость экспрессии исследуемых маркеров от вида лечения и характера
дисрегенераторных изменений при плоскоклеточном раке легкого**

ДРИ (НАХТ-/ НАХТ+)	% клеток с позитивной экспрессией в исследуемых группах							
	Ki 67		p53		Bcl-2		CD 138	
	I. НАХТ-	II. НАХТ+	I. НАХТ-	II. НАХТ+	I. НАХТ-	II. НАХТ+	I. НАХТ-	II. НАХТ+
«норма» n=14 (6/8)	10,4 ± 7,9	16,3 ± 2,5 p _{I-II} =0,06	6,0 ± 1,7	5,1 ± 2,2 p _{I-II} =0,43	8,8 ± 2,8	7,9 ± 5,16 p _{I-II} =0,71	9,9 ± 5,2	6,2 ± 2,3 p _{I-II} =0,13
ГБК n=4 (2/2)	11,5 ± 0,7	10,0 ± 5,6 p _{I-II} =0,74	6,5 ± 2,1	7,0 ± 1,4 p _{I-II} =0,81	5,0 ± 4,2	10,5 ± 2,1 p _{I-II} =0,24	7,1 ± 1,8 p _{I-II} =0,03	5,8 ± 3,1 p _{I-II} =0,63
БКГ n=53 (27/26)	31,5 ± 16,1	26,1 ± 13,8 p _{I-II} =0,30	14,3 ± 5,6	13,2 ± 6,3 p _{I-II} =0,57	11,0 ± 4,8	9,1 ± 4,4 p _{I-II} =0,21	3,9 ± 2,2	5,3 ± 3,1 p _{I-II} =0,15
ПМ n=33 (21/12)	61,2 ± 12,1	57,4 ± 10,6 p _{I-II} =0,39	30,5 ± 6,5	27,4 ± 9,2 p _{I-II} =0,32	21,4 ± 4,2	18,0 ± 6,7 p _{I-II} =0,11	-	-
Д n=10 (8/2)	73,5 ± 16,3	84,0 ± 12,7 p _{I-II} =0,42	40,3 ± 13,5	46,5 ± 2,1 p _{I-II} =0,55	28,3 ± 8,1	33,0 ± 11,3 p _{I-II} =0,51	-	-

раке, так и при аденокарциноме легкого (табл. 1). Представлял интерес анализ влияния НАХТ на экспрессионный профиль дисрегенераторных процессов, встречающихся в смежных с опухолью участках бронхиального эпителия. Исследовались факторы, отражающие уровень пролиферативной активности и участвующие в апоптозе (Ki 67, p53, bcl-2). Изучалась экспрессия маркера syndican-1 (CD 138), тесно связанного с сохранением дифференцировки клеток плоского эпителия. Как отмечалось выше, в разных участках слизистой бронха одновременно наблюдались неодинаковые дисрегенераторные процессы. Поэтому для оцен-

ки влияния НАХТ на характер дисрегенерации сравнивали экспрессию показателей пролиферативной активности, апоптоза и дифференцировки плоского эпителия в клетках каждого варианта дисрегенераторных изменений, независимо от наличия или отсутствия других форм патологии. Например, для оценки параметров БКГ в одну группу объединяли все случаи с наличием этого варианта изменений без учета других форм дисрегенерации (табл. 2, 3).

При плоскоклеточном раке легкого в группе без НАХТ экспрессия изучаемых маркеров зависела от характера дисрегенераторных процессов. Показа-

Таблица 3

**Зависимость экспрессии исследуемых маркеров от вида лечения
и характера дисрегенераторных изменений при аденокарциноме легкого**

ДРИ (НАХТ-/ НАХТ+)	% клеток с позитивной экспрессией в исследуемых группах							
	Ki 67		p53		Bcl-2		CD 138	
	I. НАХТ-	II. НАХТ+	I. НАХТ-	II. НАХТ+	I. НАХТ-	II. НАХТ+	I. НАХТ-	II. НАХТ+
«норма» n=17 (12/5)	11,1 ± 3,5	16,2 ± 7,1 p _{I-II} =0,06	4,9 ± 1,7	6,4 ± 1,8 p _{I-II} =0,14	6,5 ± 4,8	7,2 ± 3,7 p _{I-II} =0,77	7,6 ± 4,2	7,8 ± 1,7 p _{I-II} =0,92
ГБК n=6 (3/3)	11,5 ± 0,7	10,0 ± 5,6 p _{I-II} =0,74	6,5 ± 2,1	7,0 ± 1,4 p _{I-II} =0,81	5,0 ± 4,2	10,5 ± 2,1 p _{I-II} =0,24	7,1 ± 1,8	5,8 ± 3,1 p _{I-II} =0,63
БКГ n=28 (17/11)	23,1 ± 12,2	28,1 ± 21,8 p _{I-II} =0,52	12,6 ± 5,8	12,3 ± 5,6 p _{I-II} =0,92	9,9 ± 5,3	10,3 ± 7,6 p _{I-II} =0,52	4,7 ± 1,6	5,6 ± 2,5 p _{I-II} =0,33
ПМ n=6 (4/2)	67,0 ± 5,6	66,0 ± 15,5 p _{I-II} =0,93	29,0 ± 7,0	26,0 ± 11,3 p _{I-II} =0,78	25,0 ± 4,2	26,5 ± 12,0 p _{I-II} =0,88	-	-

Таблица 4

**Экспрессия исследуемых маркеров в зависимости от характера дисрегенераторных
изменений и эффекта НАХТ при немелкоклеточном раке легкого**

ДРИ /эффект НАХТ (ЧР/Ст)	% клеток с позитивной экспрессией в исследуемых группах							
	Ki 67		p53		Bcl-2		CD 138	
	I. ЧР	II. Ст	I. ЧР	II. Ст	I. ЧР	II. Ст	I. ЧР	II. Ст
1. БКГ (ПР) n=26 (10/16)	25,8 ± 8,9	30,5 ± 14,9 p _{I-II} =0,46	11,3 ± 4,4	13,9 ± 7,2 p _{I-II} =0,40	10,3 ± 3,9	10,2 ± 5,1 p _{I-II} =0,96	5,6 ± 1,8	3,5 ± 2,2 p _{I-II} =0,05
2. ПМ (ПР) n=12 (5/7)	58,0 ± 15,9	58,6 ± 7,2 p _{I-II} =0,93	21,2 ± 8,4	32,3 ± 8,6 p _{I-II} =0,06	21,5 ± 9,9	16,8 ± 3,7 p _{I-II} =0,28	-	-
3. БКГ (АК) n=11 (4/7)	16,0 ± 6,2	35,8 ± 23,7 p _{I-II} =0,21	11,3 ± 4,6	14,8 ± 5,9 p _{I-II} =0,42	8,6 ± 2,1	12,4 ± 7,5 p _{I-II} =0,44	3,4 ± 1,7	5,2 ± 2,9 p _{I-II} =0,37

Примечание: ЧР – частичная регрессия опухоли; Ст – стабилизация.

тели пролиферативной активности и апоптоза постепенно возрастали в ряду: ГБК – БКГ – ПМ – Д. В проведенном нами ранее исследовании было отмечено достоверное увеличение показателей пролиферативной активности и апоптоза по мере нарастания степени тяжести дисрегенераторных процессов (БКГ – ПМ – Д) [1]. Экспрессия CD 138 была выше в клетках неизмененного бронхиального эпителия и заметно снижалась при базальноклеточной гиперплазии. В клетках плоскоклеточной метаплазии и дисплазии экспрессия CD138 в наших наблюдениях отсутствовала (табл. 2).

В тех случаях, когда больным проводилась НАХТ, при сопоставлении экспрессионных характеристик клеток одинаковых типов дисрегенераторных изменений при НАХТ и без таковой, статистически значимых различий ни по одному из показателей не обнаружено. Экспрессионный

профиль различных типов дисрегенераторных процессов изменялся подобно группе без НАХТ. Проллиферативная активность и показатели апоптоза были низкими в неизмененном эпителии и участках ГБК, резко увеличивались при ПМ и дисплазии, а экспрессия CD138 – уменьшалась (табл. 2). Экспрессионные характеристики клеток каждого из дисрегенераторных процессов при аденокарциноме легкого изменялись аналогично направленности, обнаруженной при плоскоклеточной карциноме легких (табл. 3).

Следует отметить, что экспрессионные характеристики клеток при наиболее часто встречаемых дисрегенераторных изменениях – БКГ и ПМ (n>10) – не зависели от эффекта, оказанного НАХТ на опухоль (табл. 4). Значения показателей пролиферативной активности и апоптоза в группе с частичной регрессией немелкоклеточной карциномы

не имели статистически значимых различий в сравнении с группой пациентов, у которых отмечены стабилизации или прогрессирование опухолевого процесса после НАХТ. Только экспрессия CD138 в клеточных элементах БКГ при плоскоклеточном раке легкого была выше в группе с частичной регрессией опухоли после НАХТ.

Таким образом, результаты настоящего исследования показывают, что проведение больным НАХТ при немелкоклеточном раке легкого не оказывает существенного влияния не только на частоту встречаемости дисрегенераторных изменений, возникающих в смежных с опухолью участках слизистой бронха, но и на их экспрессионный профиль. Данный факт свидетельствует в пользу того, что изучение особенностей дисрегенерационных изменений, предшествующих развитию рака легкого, может осуществляться и в случаях, если проводилась неoadьювантная химиотерапия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Панкова О.В., Перельмутер В.М., Савенкова О.В. Характеристика экспрессии маркеров пролиферации и регуляции апоптоза в зависимости от характера дисрегенераторных изменений в эпителии бронхов при плоскоклеточном раке легкого // Сибирский онкологический журнал. 2010. № 5 (41). С. 36–41.
2. Banerjee A.K. Preinvasive lesions of the bronchus // *Thorac. Oncol.* 2009. Vol. 4. P. 45–51.
3. Dacic S. Pulmonary Preneoplasia // *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2008. Vol. 132. P. 1073–1078.
4. Ishizumi T., Mc Williams A., Mc Aulay C. et al. Natural history of bronchial preinvasive lesions // *Cancer Metastasis Rev.* 2010. Vol. 29 (1). P. 5–14.
5. Jacobsen B., Santoni-Rugiu E., Illemann M. et al. Expression of C4.4A in precursor lesions of pulmonary adenocarcinoma and squamous cell carcinoma // *Int. J. Cancer.* 2011. Vol. 25. P. 10–12.
6. Kerr K.M. Pulmonary preinvasive neoplasia // *J. Clin. Pathol.* 2001. Vol. 54 (4). P. 257–271.
7. Lai M. Intraepithelial Neoplasia of the Lower Respiratory Tract // *Intraepithelial Neoplasia.* 2009. Chapter 1. P. 30–58.
8. Lantuejoul S., Salameire D., Salon C., Brambilla E. Pulmonary preneoplasia – sequential molecular carcinogenetic events // *Histopathology.* Vol. 54. P. 43–54.
9. Ulmeanu R., Răjnoveanu R., Halic E. et al. Natural course of preneoplastic bronchial lesions // *Pneumologia.* 2011. Vol. 60 (2). P. 93–101.
10. Wang G.F., Lai M.D., Yang R.R. et al. Histological types and significance of bronchial epithelial dysplasia // *Modern Pathol.* 2006. Vol. 19. P. 429–437.
11. Wistuba I., Gazdar A.F. Lung cancer preneoplasia // *Ann. Rev. Pathol.* 2006. Vol. 1. P. 331–348.

Поступила 22.02.12