

ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Кафедра Патологии

Допускается к защите
Заведующий кафедрой
доц. к.м.н. Чурилов Л.П.
«__»_____2017 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

на тему

**ВЗАИМОСВЯЗЬ ИНВАЗИВНЫХ СВОЙСТВ И ИММУНОФЕНОТИПА
НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ ОПУХОЛЕЙ ЛЁГКИХ**

Выполнил: студент 608
группы
Поляцкин Илья Леонидович

Научный руководитель:
д.м.н., профессор Цинзерлинг
Всеволод Александрович

Санкт-Петербург

2017 год

Содержание

Перечень условных обозначений и символов.....	4
Введение.....	6
Глава 1. Обзор литературы.....	8
1.1. Характеристика нейроэндокринных опухолей лёгкого.....	8
1.1.1. Общая патология нейроэндокринных опухолей лёгкого.....	8
1.1.2. Эпидемиология нейроэндокринных опухолей лёгкого.....	12
1.1.3. Клиническая картина нейроэндокринных опухолей лёгкого.....	13
1.1.4. Диагностика нейроэндокринных опухолей лёгкого.....	13
1.1.5. Лечение и прогноз нейроэндокринных опухолей лёгкого.....	21
1.2. Характеристика ненейроэндокринных иммуногистохимических маркёров, использованных в работе.....	24
1.2.1. Особенности экспрессии цитокератинов опухолями лёгкого.....	24
1.2.2. Маркёры для дифференциальной диагностики плоскоклеточного рака лёгкого.....	27
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	28
Глава 3. Результаты собственных исследований.....	42
3.1. Результаты оценки морфологических особенностей исследованного материала.....	42
3.2. Результаты сравнительной оценки иммунофенотипа в исследуемых группах.....	49
3.3. Результаты корреляционного анализа иммунофенотипа и инвазивных свойств опухоли в исследуемых группах.....	55
Заключение.....	82
Выводы.....	85

Список использованной литературы.....	86
Приложение.....	92

Перечень условных обозначений и символов:

- ВОЗ (WHO — world health organization) — всемирная организация здравоохранения
- Ki-67 – маркер клеточной пролиферации
- Synaptophysin — синаптофизин
- CD-56 — cluster of differentiation (кластер дифференцировки 56)
- NSE — neuron-specific enolase (нейрон-специфическая энлаза),
- Chromogranin A - хромогранин А
- TTF-1 — thyroid transcription factor (тиреоидный транскрипционный фактор)
- СК - cytokeratin (цитокератин, далее с соответствующим номером)
- p-63 — protein 63 (протеин 63)
- p-40 — protein 40 (протеин 40)
- NET — neuroendocrine tumor (нейроэндокринная опухоль)
- LCNEC – large cell neuroendocrine carcinoma (крупноклеточная нейроэндокринная карцинома)
- SCLC – small cell lung carcinoma (мелкоклеточная нейроэндокринная карцинома)
- NSCLC – non-small cell lung carcinoma (немелкоклеточная нейроэндокринная карцинома)
- APUD – система – amine precursor uptake and decarboxilation – system (система захвата аминов-предшественников и их декарбоксилирования)
- TC — typical carcinoid (типичный карциноид)
- AC – atypical carcinoid (атипичный карциноид)
- SSTR – somatostatin-receptor (рецептор соматостатина)
- ADC – adenocarcinoma (аденокарцинома)
- SCC – small-cell carcinoma (мелкоклеточная карцинома)
- NE-маркеры – neuroendocrine markers (нейроэндокринные маркеры)
- NSCLC-NED - non-small cell lung carcinoma – (with) neuroendocrine differentiation (немелкоклеточная нейроэндокринная карцинома с

нейроэндокринной дифференцировкой)

NSCLC-NEM - non-small cell lung carcinoma – (with) neuroendocrine morphology (немелкоклеточная нейроэндокринная карцинома с нейроэндокринной морфологией)

EGFR – epidermal growth factor receptor (рецептор эпидермального фактора роста)

VEGF – vascular endothelial growth factor (фактор роста эндотелия сосудов)

c-KIT - tyrosine-protein kinase Kit (тирозинкиназа Kit)

HER2 - human epidermal growth factor receptor 2 (рецептор эпидермального фактора роста человека 2)

НИИФП — научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии
группа N3 — группа лимфатических узлов, определяющая стадию N3 по системе стадирования TNM

TNM - tumor – nodes-metastasis – (система стадирования опухоли: опухоль-лимфатические узлы - метастазы)

Введение

Актуальность проблемы

Интенсивные показатели частоты возникновения нейроэндокринных опухолей лёгкого имеют тенденцию к увеличению [6, 52, 53]. Этот факт делает проблематику исследований данной группы опухолей всё более актуальной. Учитывая агрессивный характер этих опухолей с одной стороны, и разницу в прогнозе отдельных типов опухолей этой группы, с другой [6, 52], встаёт проблема необходимости чётко индивидуально определять прогноз для пациентов с такими диагнозами, и следовательно наиболее точно понимать, какими конкретно характеристиками опухоли определяется прогноз. Прогноз, определяемый в процессе диагностики опухоли влияет на тактику лечения пациента, выбор конкретных методов лечения (хирургическое лечение, лекарственная терапия как в варианте химиотерапии, так и в варианте таргетной терапии, лучевая терапия), выбор комбинации возможных методов лечения [1, 7, 8].

Отмечено, что у разных типов нейроэндокринных опухолей признаки, характеризующие инвазивность, также имеют разную степень проявления [7]. Исходя из разного прогноза этих типов опухолей и разницы в степени проявления инвазивных свойств, можно предполагать наличие влияния на прогноз степени выраженности инвазивных свойств конкретной опухоли.

Иммуногистохимия, широко применяемая в последнее время в процессе диагностики разного рода новообразований, применяется и в диагностике нейроэндокринных опухолей лёгкого. Установлена корреляция результатов данного исследования с конкретным типом опухолей лёгкого [1, 47, 50, 52]. Принимая во внимание факт разного прогноза разных типов опухолей данной группы, можно предположить и наличие взаимосвязи между характером иммуногистохимического окрашивания и признаками инвазивности, определяющими прогноз.

Потенциальная информация о взаимосвязи степени экспрессии иммуногистохимических маркёров, традиционно применяемых в

диагностике нейроэндокринных опухолей лёгкого, и инвазивности этих опухолей способна дополнительно помочь в определении прогноза и тактики лечения пациентов с данными диагнозами.

Для рассмотрения выбраны иммуногистохимические маркёры, как подтверждающие лёгочное происхождение данных опухолей, так и их нейроэндокринную дифференцировку, основываясь на данных литературы, свидетельствующих о разной степени экспрессии этих маркёров в разных типах нейроэндокринных опухолей лёгкого [1, 47, 50, 52].

Цель исследования: определить наличие взаимосвязи между выраженностью экспрессии диагностически значимых маркёров (Ki-67, Synaptophysin, CD-56, NSE, Chromogranin A, TTF-1, CK-8, CK-18, CK-7), определяемых иммуногистохимическим методом, и инвазивными свойствами нейроэндокринных опухолей лёгкого.

Задачи:

1. Провести морфологическую оценку препаратов нейроэндокринных опухолей лёгкого, окрашенных гематоксилин-эозином, и определить такие характеристики, как: морфологический тип опухоли, согласно классификации опухолей лёгкого ВОЗ 2015 г.; определить наличие или отсутствие следующих признаков инвазивности: наличие и степень метастазирования в лимфатические узлы, наличие периневральной и сосудистой инвазии, наличие вторичного прорастания опухоли в плевру или крупный бронх, что определяется как местные признаки инвазивности.

2. Определить степень экспрессии ряда следующих маркёров, определяемых иммуногистохимически в рассматриваемом опухолевом материале: Ki-67, Synaptophysin, CD-56, NSE, Chromogranin A, TTF-1, CK-8, CK-18, CK-7, p-63 или p-40.

3. Статистически оценить наличие корреляции между признаками, имеющими количественный эквивалент (степень метастазирования в лимфатические узлы и экспрессия выбранных маркёров, определяемая иммуногистохимически); статистически оценить достоверность разницы

экспрессии выбранных маркёров, при её наличии, между группами случаев с наличием выбранных признаков инвазивности и без них.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Характеристика нейроэндокринных опухолей лёгкого

1.1.1. Общая патология нейроэндокринных опухолей лёгкого

Нейроэндокринные опухоли встречаются во многих органах человека, наиболее часто возникая в желудочно-кишечном тракте и бронхолегочной системе. По данным Всемирной организации здравоохранения Организация (WHO), нейроэндокринные опухоли легких имеют ряд общих морфологических, иммуногистохимических и молекулярных характеристик и могут быть разделены на три основные формы по степени биологической агрессивности (G1-G3) и 2 группы по степени дифференцировки (хорошо дифференцированные / плохо дифференцированные). Хорошо дифференцированные новообразования включают типичные (G1) и атипичные (G2) карциноиды. Крупноклеточные нейроэндокринные карциномы, а также мелкоклеточные карциномы (G3) являются плохо дифференцированными опухолями [12]. Разделение карциноидов на типичные и атипичные, а карцином на крупно- и мелкоклеточные необходимо для выбора тактики лечения и определения прогноза. Критериями диагноза конкретного вида легочных нейроэндокринных опухолей являются: количество некроза относительно всей опухолевой массы, митотическая активность, специфические структуры палисадников, розеток, трабекул, гнёзд. Наибольшее количество разногласий в классификации нейроэндокринных опухолевых возникает при дифференцировании типичных карциноидов от атипичных, атипичных карциноидов от крупноклеточных нейроэндокринных карцином и крупноклеточных нейроэндокринных карцином от мелкоклеточного рака лёгкого [1, 52].

По сравнению с немелкоклеточными ненейроэндокринными раками

лёгкого было проведено лишь небольшое количество исследований, направленное на открытие новых молекулярных мишеней, что способствовало бы усовершенствованию классификации и алгоритма дифференциальной диагностики нейроэндокринных опухолей легкого.

В одном из таких исследований поднимался вопрос о большем сходстве крупноклеточной нейроэндокринной карциномы (LCNEC) с мелкоклеточной карциномой легкого (SCLC) по сравнению с немелкоклеточными карциномами лёгкого (NSCLC), что могло бы поспособствовать изменению взглядов на ведение пациентов с LCNEC, сделать лечение более этиотропным. Для того, чтобы прояснить взаимоотношения данных двух нозологических форм, были проанализированы геномные изменения в LCNEC по сравнению с другими типами карцином легкого [44].

В ходе анализа генетического материала пары (n = 45) LCNEC-опухоль/норма были подвергнуты целевому секвенированию по 241 ассоциированному с канцерогенезом гену с помощью платформы Memorial Sloan Kettering - Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets (MSK-IMPACT). Геномные данные сравнивали с MSK-IMPACT-анализами другого гистологического материала других легочных карцином (n = 242).

К мутантным генам в случаях с LCNEC относились TP53 (78%), RB1 (38%), STK11 (33%), KEAP1 (31%) и KRAS (22%). Относительно геномных профилей можно разделить LCNEC на 2 основных и 1 минорное подмножества: SCLC-подобные, характеризующиеся совместной мутацией в ген TP53 и RB1 и другими изменениями типа SCLC, включая амплификацию MYCL; NSCLC-подобные, характеризующиеся отсутствием совместной мутации по TP53 и RB1 и почти постоянно возникающей мутацией типа NSCLC (STK11, KRAS и KEAP1); и карциноидоподобные, характеризующиеся низкой мутационной нагрузкой (мутацией в гене MEN1). SCLC-подобные и NSCLC-подобные подмножества имеют несколько клинико-патологических различий, более высокая пролиферативная активность наблюдалась в данном исследовании в SCLC-подобных опухолях,

а более высокая экспрессия маркеров дифференцировки в направлении железистого рака в опухолях подгруппы NSCLC-подобных. Несмотря на преобладающее сходство с аденокарциномой легких, у NSCLC-подобных опухолей было несколько отличительных геномных изменений, в том числе более частые мутации в генах семейства NOTCH (28%), которые являются ключевыми регуляторами нейроэндокринной дифференцировки [44].

Таким образом, было установлено, что LCNEC представляет собой биологически гетерогенную группу опухолей, включающую отдельные подмножества с генетическими комбинациями, характерными для SCLC, NSCLC (преимущественно аденокарцином) и редко - высоко дифференцированных карциноидов. Принятие во внимание этого факта должно способствовать изменению взглядов на тактику ведения пациентов с LCNEC [44].

Гистогенез нейроэндокринных новообразований, также называемых эпителиальными новообразованиями с нейроэндокринной дифференцировкой, как правило вызывал споры, однако большинство исследователей считают, что эти опухоли возникают из клеток Кульчицкого (энтерохромаффинных клеток), которые обычно присутствуют в слизистой оболочке бронхов в составе диффузной нейроэндокринной системы, включающей отдельные клетки или группы (4-10 шт) клеток [6-8]. Все инвазивные злокачественные новообразования легкого представлены примерно 20-25% нейроэндокринных опухолей (НЭ) и 75% немелкоклеточного рака легкого разных его вариантов [6-8]. Нейроэндокринные опухоли были впервые описаны в варианте карциноидных опухолей Зигфридом Оберндорфером в 1904 году. Наиболее распространённой локализацией является тонкий кишечник (30,4%), на втором месте находятся легкие (29,8%) [8,9].

Данные опухоли обладают рядом свойств, характерных для нейронов. Это послужило основой названию «нейроэндокринные опухоли». Примерно одна треть этих опухолей представлена гормонально-неактивными

опухолями. Как правило нейроэндокринные опухоли легкого характеризуются секреторными способностями декарбоксилировать предшественники аминов, как все клетки системы APUD [10-12].

Прединвазивные поражения могут возникать у пациентов любого возраста и включают 2 основных типа нейроэндокринной гиперплазии. Нейроэндокринная гиперплазия в основном наблюдается у пациентов с хроническими интерстициальными поражениями, такими как бронхоэктазы, лёгочный фиброз и другие заболевания нижних дыхательных путей. Нейроэндокринная гиперплазия представлена клетками с бледной цитоплазмой, связанными со сжатой подлежащей стромой или респираторными эпителиальными внутрипросветными пальцевидными выступами [1, 7, 11].

1. Микрокарциноиды

Так называемые «опухольки» (анг. tumorlets), иначе именуемые микрокарциноидами, встречаются преимущественно у женщин, часто обнаруживаются случайно при гистологическом исследовании паренхимы легких и микроскопически представлены перибронхиолярными узловатыми агрегатами однородных, округлых, овальных или веретенообразных клеток с умеренным количеством цитоплазмы [2, 3, 11].

Также можно наблюдать расположенные на периферии структуры палисадников и краплёный хроматин опухолевых клеток [10]. Эти изменения обнаруживаются в виде множественных поражений в легких пациентов с хроническими воспалительными процессами, фиброзом, туберкулезом, бронхоэктазами, вокруг рубцовой ткани и в 75% случаев карциноидов, что может привести к облитерации смежных бронхиол [2-4, 6, 8].

Морфологически, микрокарциноиды идентичны типичным карциноидам, но имеют меньшие размеры ($\leq 0,5$ см). Микрокарциноиды следует дифференцировать от мелких менинготелиоидных узелков, которые не имеет клинического значения, но сходны по цитологическим характеристикам, однако не дают положительной иммуногистохимической

окраски на нейроэндокринные маркеры и цитокератины в отличие от микрокарциноидов [1, 7].

2. Диффузная идиопатическая нейроэндокринная гиперплазия

Как и микрокарциноиды, диффузная идиопатическая нейроэндокринная гиперплазия ассоциирована с обструкцией дыхательных путей, но в свою очередь встречаются редко. Такой вид гиперплазии характеризуется диффузной пролиферацией нейроэндокринных клеток, образующих небольшие узелки (нейроэндокринные тельца) или линейные пролифераты в пределах эпителиального пласта стенки бронхиол. [1, 5, 7, 13].

Подобные предшествующие инвазивным опухолям состояния часто диагностируются, когда поражение уже является множественным [1]. Множественные узелки в легком при КТ-исследовании могут быть ошибочно восприняты как метастазы из неизвестного первичного очага.

Множественные микрокарциноиды и диффузная идиопатическая нейроэндокринная гиперплазия могут быть диагностированы в следующих трёх ситуациях: [1, 6, 7, 14, 15]: при хроническом повреждении легких при бронхоэктазах или лёгочном фиброзе, когда прогрессирование в карциноиды, как правило, не происходит; в случае уже диагностированной DIPNECH у женщин при наличии обструкции дистальных дыхательных путей (в таком случае обычно происходит прогрессирование с образованием карциноидов); при сосуществовании нейроэндокринной гиперплазии и нейроэндокринной опухоли (часто регистрируются в уже резецированных по поводу карциноидов лёгких) [16].

1.1.2. Эпидемиология нейроэндокринных опухолей лёгкого

Частота возникновения нейроэндокринных опухолей растёт линейно [15, 16]. Нейроэндокринные опухоли составляют 0,5-2% от всех злокачественных новообразований, возникающих во взрослом возрасте [9]. Пациенты с SCLC и LCNEC (большинство из них лица мужского пола), значительно моложе пациентов с карциноидными опухолями. Относительно факторов риска, приблизительно 20-40% пациентов с типичными или атипичными

карциноидами являются некурящими, тогда как почти все пациенты с SCLC и LCNEC являются тяжелыми курильщиками [7]. Опухоли легких представлены 1-2% карциноидов, 3% LCNEC, 15-20% SCLC и 75-80% нейроэндокринных карцином [1, 6-8, 17]. Пациенты как с синдром множественной эндокринной неоплазии I типа (MEN I), наследуемым аутосомно-доминантно, так и с другими, но наследственными патологиями, имеют более высокий уровень злокачественных нейроэндокринных новообразований [18].

1.1.3. Клиническая картина нейроэндокринных опухолей лёгкого

Локализация опухоли и степень её биологической агрессивности определяют клиническую картину. В случае центрально расположенных опухолей имеют место рецидивирующие инфекции, боли в груди, кашель, одышка, может возникать пневмония. Периферически расположенные опухоли являются, как правило, случайными находками. В отличие от полноценных NET, карциноиды возникают примерно у 5% пациентов с унаследованным синдромом множественной нейроэндокринной неоплазии [7]. Высоко дифференцированные нейроэндокринные опухоли способны продуцировать гормоны, идентичные гормонам нервной системы, но по сравнению с поражением гастроэнтеропанкреатической нейроэндокринной системы, карциноиды лёгких редко ассоциированы с наличием гиперсекреции и паранеопластическими синдромами [7]. Карциноидный синдром и синдром Кушинга преимущественно обнаруживаются у пациентов с карциноидами и очень редко у пациентов с LCNEC или SCLC [7].

1.1.4. Диагностика нейроэндокринных опухолей лёгкого

Для выявления нейроэндокринных опухолей применяется несколько методов визуализации [17, 18]:

1. Компьютерная томография;
2. Рентгенография грудной клетки;
3. Бронхоскопия, эндосонография и биопсия;
4. Сцинтиграфия с октреотидом;

5. Позитронно-эмиссионная томография.

При визуализации лучевыми методами карциноиды представлены в виде уплотнений или массы (ТС с гладкими краями и АС с неровными краями), которые могут быть ошибочно восприняты как метастазы из известного или неизвестного источника внелёгочной первичной опухоли. Эндобронхиальная локализация этих опухолей может быть хорошо визуализирована на КТ. Примерно в 30-55% случаях карциноидов, помимо самой опухоли, имеются лобарный ателектаз, обструктивный пневмонит и частичная бронхиальная обструкция. [17, 18]. Благодаря тому, что их строма васкуляризована, после внутривенного введения контраста становится возможным визуализировать усиление рисунка в проекции опухоли.

В случаях SCLC обычно определяется центрально расположенное образование, представленное комбинацией первичной опухоли и вовлечёнными в процесс лимфатическими узлами. В основном при рентгенологическом исследовании определяются вовлечённые в процесс, расширенные медиастинальные лимфатические узлы. Данные изменения имеются в большинстве случаев (5-10% опухолей представлены периферическим образованием без вовлечения в процесс лимфатических узлов). Сужение и смещение крупных сосудов и бронхов в результате сдавления опухолью и плевральный выпот также являются частыми находками. [9].

ПЭТ (позитронно-эмиссионная томография) играет важную роль в оценке локализации, размера опухоли, степени инвазии, а также наличия метастазов. В данном исследовании используется фтордезоксиглюкоза (ФДГ) [8]. Низкий уровень поглощения ФДГ отмечается в карциноидных опухолях, а высокий - в полноценных NSCLC. [8,18]. Другим методом идентификации высоко дифференцированных нейроэндокринных опухолей является сцинтиграфия с лигандом к рецептору соматостатина (SSTR), которые находятся на клетках опухоли. Эти рецепторы экспрессируются примерно в 80-90% NETs [19]. В отличие от высоко дифференцированных

нейроэндокринных опухолей, низко дифференцированные экспрессируют SSTR (преимущественно субтип SSTR2) реже и с меньшей плотностью [20]. Соматостатин может связываться с пятью различными подтипами специфических рецепторов, расположенных на поверхности опухолевых клеток (SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4 и SSTR5), он действует как важный регулятор эндокринной функции этих клеток путем ингибирования секреции различных гормонов [19]. Синтетические аналоги соматостатина связываются главным образом с SSTR2 и намного меньше с SSTR5. Эти синтетические аналоги (октреотид и ланреотид) (даже в случае неоперабельных карциноидов), являются наиболее широко используемыми препаратами для контроля карциноидного синдрома у пациентов с высоко дифференцированными нейроэндокринными опухолями. [8,18,21]. Reghi и его коллеги сравнили иммуногистохимическое окрашивание на SSTR с SSTR-сцинтиграфией. Они установили, что иммуногистохимия в данном случае является менее чувствительным методом по сравнению с SSTR-сцинтиграфией, что может быть объяснено гетерогенностью опухоли [21].

Окончательный диагноз устанавливается исключительно после проведения морфологической диагностики. Цитология и небольшие биопсийные образцы позволяют достаточно точно оценить факт нейроэндокринной природы опухоли [22]. Дифференциальный диагноз между типичными и атипичными карциноидами проводится только на материале резекции лёгкого. [2]. SCLC и карциноидные опухоли диагностируются с помощью биопсии достаточно хорошо, а LCNEC по результатам предоперационного цитологического исследования наиболее часто распознается как NSCLC или аденокарцинома, без уточнения нейроэндокринной природы [1]. В критических случаях индекс пролиферации Ki-67 (MiB1) является полезным вспомогательным методом отличия карциноидов низкой степени злокачественности от нейроэндокринных новообразований высокой степени злокачественности.

К признакам, оцениваемым морфологически относятся: митотическая

активность (количество митозов на 2 мм²/10 полей зрения на большом увеличении(40), наличие таких паттернов, как: розеткоподобные структуры, структуры палисадников, трабекулярный рисунок, органоидность с формированием гнёзд и большая доля некроза от всей опухолевой ткани. [2, 5, 6, 8, 11]. Нейросекреторные гранулы могут быть визуализированы с помощью электронной микроскопии.

Наиболее часто разногласия возникают при дифференцировании LCNEC от SCLC, типичного карциноида от атипичного и атипичного карциноида от LCNEC [1, 11].

В качестве дополнения к морфологической диагностике нейроэндокринных опухолей лёгкого широко используется иммуногистохимическое исследование. Для диагностики данных опухолей могут быть применены такие нейроэндокринные маркеры, как хромогранин, синаптофизин, CD56, нейрон-специфическая энолаза (NSE) а также соматостатин [1, 52].

Митотический индекс позволяет различить низкодифференцированные и высокодифференцированные NET и коррелирует с индексом пролиферации Ki-67 [23]. Ki-67 может отражать уровень злокачественности опухоли и прогнозировать выживаемость пациентов с нейроэндокринными опухолями, однако не является прогностически значимым для ряда пациентов с мелкоклеточным раком лёгкого [24, 25]. Индекс пролиферации Ki-67 ($p < 0,001$) значительно увеличивается у AC по сравнению с TC и у низкодифференцированных нейроэндокринных опухолей по сравнению с AC [21]. С целью отличить LCNEC от базалиоидной SCLC (положительной на маркёры p63 и высокомолекулярный цитокератин), требуется 1 нейроэндокринный маркер [1].

Типичные карциноиды (G1) характеризуются органоидным ростом, наличием признаков нейроэндокринной дифференцировки: трабекулярные структуры, островки и палисадники клеток, образование лент и розеткоподобных структур. Опухолевые клетки однородные, полигональные,

с эозинофильной цитоплазмой, ядра с мелкозернистым хроматином (иногда напоминая картину соли, перемешенной с перцем), ядрышки мало заметны, количество цитоплазмы от незначительного до умеренного [1]. Некроз практически отсутствует. Также характерны хорошо васкуляризованная фиброзная строма, иногда с гиалинозом, образованием хряща или кости. Возможно образование амилоида. 2 главных признака: отсутствие некроза и максимум 1 митоз на 10 полей зрения на увеличении 40 характеризуют нейроэндокринную опухоль как ТС [1].

Атипичные (G2) и типичные (G1) карциноиды имеют очень схожие морфологические характеристики. В отличие от типичных карциноидов, атипичные содержат 2-10 митозов в 2 мм² или на 10 полей зрения при увеличении 40. Также часто характеризуются наличием некроза, однако не массивного, а фокального, подобного комедонекрозу. АС демонстрируют больший ядерный полиморфизм, по сравнению с ТС. Ядро может содержать ядрышки, ядерная мембрана имеет неровности, однако это не является частью диагностических критериев АС [1, 7]. Атипичные карциноиды не обязательно экспрессируют все нейроэндокринные маркеры [7]. Например, 80% карциноидов являются цитокератин-положительными [1, 7], что ограничивает возможность дифференцировать веретёноклеточные карциноиды от мезенхимальных опухолей и гнездовые карциноиды от параганглиом (положительных по S-100-маркёру) [7].

Дифференциальный диагноз при карциноидных опухолях включает [1, 6, 7]:

1. Типичные и атипичные карциноиды;
2. Крупноклеточная нейроэндокринная карцинома,
3. Мелкоклеточный рак;
4. Аденокарцинома;
5. Мукоэпидермоидная карцинома (с железистым паттерном);
6. Параганглиома;
7. Гломусная опухоль.

Следующей по степени злокачественности после атипичных карциноидов нейроэндокринной опухолью является крупноклеточный нейроэндокринный рак лёгкого(LCNEC) [1].

В 84% LCNEC расположены периферически и недоступны для бронхоскопа; в 16% - центрально, с эндобронхиальным ростом в виде полипоидной массы коричневого цвета, проникающей в просвет дыхательных путей. Поведение этих опухолей, связанное с биологической агрессивностью, подобно таковому при мелкоклеточной карциноме легкого, но в отличие от SCLC характеризуются плохой реакцией на химиотерапию, поэтому вариантом выбора является хирургическое лечение [1, 52].

LCNEC имеют типичные гистологические признаки нейроэндокринных опухолей, характерные и для карциноидов: органоидное гнездообразование, трабекулярный рост, розетки и периферический рисунок палисадника. Также характерны большие зоны некроза (сравнимые с таковыми в SCLC), крупные опухолевые клетки, наличие обычно обильной эозинофильной цитоплазмы, заметные и частые ядрышки, что отличает LCNEC от SCLC, но не всегда, поэтому не следует изолированно использовать размер клеток как признак различия между SCLC и LCNEC). Количество митозов обычно ≥ 11 На 2 мм² жизнеспособной ткани опухоли, также при ИГХ-исследовании по крайней мере один нейроэндокринный маркер должен быть положительным. 50% LCNEC являются положительными по маркёру TTF1 [1].

Крупноклеточные нейроэндокринные карциномы должны быть дифференцированы от SCLC, типичных карциноидов и NSCLC, что влияет на варианты и прогноз терапевтического лечения [1, 52].

Также существует такая нозологическая форма, как комбинированная крупноклеточная нейроэндокринная карцинома. Данное понятие включает крупноклеточные нейроэндокринные карциномы с компонентами [1, 52]:

1. аденокарцином,
2. плоскоклеточных карцином,
3. гигантоклеточной карциномы и/или карциномы из веретеновидных клеток.

Небольшой процент LCNEC представлен гетерогенными опухолями, которые должны рассматриваться как другие NSCLC [1, 52].

NSCLC может обладать рядом цитологических характеристик, которые являются общими с LCNEC (наличие ядрышек, везикулярного хроматина, обширного некроза и высокой митотической скорости (в недифференцированном NSCLC)). Также одиночные или крибриформные гнезда с фокально встречающимися структурами палисадников в некоторых низкодифференцированных аденокарциномах могут имитировать LCNEC. В таких случаях дифференциальная диагностика основана на экспрессии NE-маркёров. Однако в 10-20% NSCLC (чаще всего в ADC/SCC) имеют положительное окрашивание на NE-маркёры, независимо от характера роста и обозначаются как NSCLC с нейроэндокринной дифференцировкой (NSCLC-NED), однако правильность данного утверждения часто оспаривается. При этом, опухоли имеющие морфологию, характерную для LCNEC, но не экспрессирующие нейроэндокринные маркеры не описываются как NSCLC с нейроэндокринной морфологией (NSCLC-NEM). Данные случаи очень редки и их клиничко-патологические характеристики не установлены. Предполагается, что NSCLC-NEM имеют плохой прогноз, аналогичный LCNEC [1, 52].

Особой задачей является дифференциальная диагностика мелкоклеточного рака лёгкого (SCLC) от всех остальных форм рака лёгкого. Большинство (около 90%) мелкоклеточных раков легкого имеют центральную локализацию (привязаны к долевному или основному бронхам), при этом часто распространяются в окружающий интерстиций. Только биопсийные образцы чрезбронхиальной биопсии, окрашенные HE, захватывающие слизистую оболочку и собственную пластинку слизистой позволяют достоверно установить диагноз мелкоклеточного рака. Гистологический диагноз по небольшим биопсийным образцам в около 90% базируется на следующих микроскопических чертах: признаки нейроэндокринной дифференцировки, отражающиеся на определённой модели роста: в виде

органовидных гнёзд, розеток, периферических структур палисадников и иногда встречающегося псевдопапиллярного паттерна; в некоторых случаях имеют место эпителиоидные или кубические клетки, трабекулярные структуры: рыхлые и нерегулярные (или подобные синцитию) кластеры и одиночные, обычно небольшие клетки (линейно расположенные, круглые, овальные и веретенообразные), сопоставимые по размерам с двумя-тремя зрелыми лимфоцитами. Для SCLC характерен обширный, иногда называемый «географическим» некроз. Подобно LCNEC, в SCLC наблюдается большое количество митозов (как правило 50-60 митозов на 2 мм²). Как правило отмечается высокое ядерно-цитоплазматическое отношение, цитоплазма скудная, также типичным является мелкодисперсный хроматин, напоминающий картину «соли, перемешанной с перцем». Ядрышки не определяются. Легочные нейроэндокринные маркеры (синаптофизин, хромогранин А) экспрессируются примерно в 70% [1, 52].

Необходимость дифференциальной диагностики с лимфоидным инфильтратом должна учитываться при подпоре иммуногистохимической панели. В случае внелёгочного расположения метастазов SCLC-подобного рака из неизвестного первичного очага, лёгкие должны рассматриваться как возможный источник. Трудность морфологической диагностики SCLC заключается в том, что размер клеток в SCLCs может значительно варьировать и не должен использоваться в качестве основного критерия для дифференциального диагноза с LCNEC. Таким образом, в случае большего размера ядра, а иногда и более выраженной избыточной цитоплазмы опухоль обозначается как «промежуточная» SCLC. Наиболее надёжными микроскопическими признаками отличия SCLC от LCNEC являются: отсутствие выраженных ядрышек или, как правило, их полное отсутствие, однородный или мелкодисперсный хроматин [52].

SCLC могут имитировать лимфому, базалиоидный плоскоклеточный рак, мелкоклеточный вариант плоскоклеточного рака, LCNEC, низкодифференцированный NSCLC, карциному из клеток Меркеля и

примитивные нейроэктодермальные опухоли (PNET), которые могут быть исключены с помощью иммуногистохимии. Около 20-30% SCLC представляют собой комбинированные мелкоклеточные карциномы, 70%-80% представляют собой чистый SCLC [26, 28]. О комбинированном мелкоклеточном раке легких говорят, если опухоль состоит исключительно из незначительного компонента NSCLC, который может быть представлен плоскоклеточным компонентом, участками аденокарциномы, крупноклеточной карциномы, веретенновидноклеточной карциномы или гигантоклеточной карциномы [52].

Тактика ведения пациента, однако, соответствует таковой с чистым мелкоклеточным раком легкого. Далее при отсутствии ответа опухоли на химиотерапию, обсуждается смена режима на режим, используемый для лечения NSCLC или, если возможно, хирургическое вмешательство. Таким образом, NSCLC компонент опухоли можно лечить оперативно после неoadьювантной химиотерапии. Посмертно, у 50% пациентов с нейроэндокринными опухолями, которые ранее все были расценены как чистые SCLCs, далее по результатам гистологического исследования аутопсийного материала NSCLC определяется самостоятельно или в сочетании с SCLC [7, 29, 30].

Для постановки диагноза комбинированной мелкоклеточно-крупноклеточной карциномы должно присутствовать не менее 10% крупноклеточного компонента. Обычно подобные опухоли определяются в виде опухолей с более крупными клетками, содержащими крупные ядрышки, и имеющих более четкие границы между клетками, чем между отдельными кластерами клеток [1]. В сравнении с чистым SCLCs, чувствительность к химиотерапии у комбинированных SCLCs меньше [7, 31].

1.1.5. Лечение и прогноз нейроэндокринных опухолей лёгкого

Поведение этих новообразований варьирует в зависимости от степени злокачественности от неагрессивного течения при ТК до быстро наступающего летального исхода при SCLC. Таким образом

дифференцирование AC от TC, а LCNEC от SCLC является важным этапом диагностики [10]. Пятилетняя выживаемость пациентов с типичными карциноидами составляет 92-100%, с атипичными 61-88%, у пациентов с LSNLC – 16-57%, а у пациентов с SCNLC - 2-5% [6, 7, 27, 32, 33].

Согласно Johnson и соавторам, именно определённая гистологическая картина, а не вовлечённость лимфатических узлов в процесс, способна спрогнозировать выживаемость пациентов с карциноидами лёгкого [34].

Предпочтительными вариантами лечения карциноидов являются [8]:

1. орган-сохраняющая радикальная резекция легких, с лимфодиссекцией;
2. анатомическая резекция (пульмонэктомия или лобэктомия) - 60-70% случаев;
3. рукавная резекция (для центрально расположенных карциноидных опухолей);
4. сохраняющие лёгкое процедуры (клиновидная резекция, сегментэктомия или рукавная резекция).

Хирургическое лечение нейроэндокринных опухолей лёгкого низкой степени дифференцировки представлено резекциями долей лёгкого в сочетании с лимфодиссекцией.

Помимо хирургического лечения применяется лекарственная терапия. Режим терапии определяется стадией процесса: при локализованной опухоли с хорошим прогнозом (типичный карциноид) достаточно хирургического лечения, в случае крупноклеточного нейроэндокринного рака возможна как адьювантная лекарственная терапия, при локализованном процессе, так и неoadьювантная лекарственная терапия, если требуется уменьшить размеры опухоли и повысить её резектабельность. Наиболее часто используемыми в настоящий момент препаратами являются препараты платины (цисплатин) и производные подофиллотоксина (этопозид). [1, 7]

В многочисленных исследованиях было показано, что химиотерапия на основе препаратов платины и схем для лечения SCLC также эффективна и для пациентов с LCNEC.

Что касается новых химиотерапевтических схем, Kenmotsu и соавторы сообщают, что надаплатин в комбинации с иринотеканом относительно эффективны и безопасны для пациентов с LCNEC [35]. Также изучалась эффективность монотерапии антрациклинами (амрубицином) у пациентов с уже ранее леченными запущенными формами LCNEC, но в результате было показано, что ответ опухоли на амрубицин имеет частоту 27,7% [36].

В ряде исследований рассматривали возможность воздействовать на нейроэндокринные опухоли блокаторами тирозинкиназ сигналинга EGFR, при наличии мутаций EGFR в данном типе опухолей. Было установлено, что в действительности немногие пациенты с нейроэндокринными опухолями имеют мутации EGFR, однако в этих случаях терапия гефитинибом приводит к хорошему результату. [37, 38, 39-42].

Iyoda с соавторами и ряд других исследователей рассматривали иные возможные мишени для терапии пациентов с LCNEC и предложили потенциальную роль анти-VEGF, анти-c-KIT, и анти-HER2 агентов при лечении LCNEC. [42, 43]

Что касается SCLC, то по настоящий момент не отмечено значительных успехов в терапии первой линии с момента введения стандартного сочетания платина-этопозид, более 30 лет назад. Однако в последнее десятилетие в качестве потенциальных альтернатив рассматриваются препараты других классов (ингибиторы топоизомеразы, антрациклины, алкилирующие агенты), которые могут эффективно дополнять стандартные препараты. В особенности такие свойства отмечены у амрубицина и белотекана [45].

Охарактеризовать спектр мутаций, характерных для SCLC, для формирования потенциальных мишеней таргетной терапии долгое время было трудной проблемой, поскольку данный вид рака обычно диагностируется в небольших тканевых образцах по биопсии или при помощи цитологических исследований. Появление высокочувствительных технологий секвенирования ДНК нового поколения сделало возможным выявление генных аномалий, характерных для SCLC. Геномные изменения

были описаны в классических онкогенах и генах онкосупрессоров, часть из которых совпадают с генными аномалиями аденокарцином и плоскоклеточных раков, но также и в различных генах, участвующих в регуляции транскрипции и модификации стабильности хроматина, которые, вероятно, играют основную роль в возникновении и прогрессировании именно этого типа опухолей лёгкого. Таким образом, изменение в регуляции экспрессии генов на претранскрипционном и транскрипционном уровнях может служить отличительной чертой SCLC. Основываясь на этих данных, были разработаны и испытаны новые молекулы. Однако большинство исследований, посвященных таргетной терапии, включая терапию блокаторами рецепторных и нерцепторных тирозинкиназ дало отрицательные результаты. Причём в части исследований, особенно тех, в которых рассматривались препараты, ингибирующие ангиогенез, была отмечена чрезмерная выраженность побочных эффектов. В качестве нового варианта лечения пациентов с NSCLC недавно была внедрена иммунотерапия PD1-блокаторами (ниволумаб), позднее были начаты исследования по использованию данных препаратов и в терапии SCLC. Предварительные результаты этих исследований указывают на эффективность данных препаратов в терапии SCLC. В настоящий момент существует необходимость в разработке новых таргетных препаратов для терапии SCLC [46].

1.2. Характеристика ненейроэндокринных иммуногистохимических маркёров, использованных в работе

1.2.1. Особенности экспрессии цитокератинов опухолями лёгкого

Цитокератины в течении многих лет изучались как маркеры различных карцином. При раке легкого они могут использоваться для дифференцирования первичной опухоли лёгкого от вторичного метастатического поражения, а также для уточнения гистологического варианта опухоли.

Одна из первых работ по изучению экспрессии цитокератинов была проведена Nhung N.V. (1999 г.). В данном исследовании экспрессия CK7,

СК10/13, СК18, СК19, СК20 изучалась иммуногистохимическим методом в группе из 72 хирургически резецированных образцов легкого, включая 31 аденокарциному, 30 плоскоклеточных карцином и 11 нейроэндокринных карцином. Иммунофенотипы опухолей соотносили с их гистологическими характеристиками, стадией по системе TNM и уровнем выживаемости пациентов [47].

В ходе исследования был сделан вывод, что такие маркёры, как: СК7, СК10/13 и СК18 могут быть использованы для дифференциальной диагностики аденокарциномы легкого от плоскоклеточного рака легкого. Как правило фенотип соответствующих групп выглядит следующим образом: СК7 (+), СК10/13 (-), СК18 (+) - для аденокарцином; СК7 (-), СК10/13 (+), СК18 (-) - для плоскоклеточного рака. При этом как аденокарциномы, так и плоскоклеточные раки проявляли выраженную экспрессию СК19 (90,3% и 86,7% соответственно), но значительно реже экспрессировали СК20 (9,7% и 3,3% соответственно). Нейроэндокринные опухоли легкого в свою очередь практически не экспрессировали данные цитокератины, за исключением СК18, который все карциноидные опухоли экспрессировали в значительной степени [47].

Также в работе Johansson L. (2004 г.) была рассмотрена способность основных гистологических типов карцином легких экспрессировать тиреоидный транскрипционный фактор 1 (ТТФ-1) и различные типы цитокератинов. Сорок пять случаев рака легких (12 случаев плоскоклеточного рака, 13 случаев мелкоклеточного рака, 11 аденокарцином, 9 крупноклеточных и полиморфных карцином) были иммуногистохимически окрашены антителами к СК7/8 (клон САМ5.2), СК5, СК7, СК20 и ТТФ-1. Все 45 случаев были положительными по САМ5.2, 16 из 45 случаев - по СК5, 34 из 45 случаев - по СК 7, 4 из 45 случаев по СК 20, и 29 из 45 - по ТТФ-1. Плоскоклеточная карцинома имела иммунофенотип СК5 (+), ТТФ-1 (-) и в около 20% случаев также была положительной по СК7. Все мелкоклеточные карциномы имели следующий иммунофенотип: СК5 (-), СК8 (+), ТТФ-1 (+),

все аденокарциномы CK5 (-), CK7 (+), TTF-1 (+); более половины крупноклеточных карцином: CK5 (-), CK7 (+), TTF-1 (+). Таким образом, более половины опухолей этой группы имели тот же фенотип, что и аденокарциномы [31].

С целью выяснения иммунофенотипических различий между крупноклеточной нейроэндокринной карциномой (LCNEC) и мелкоклеточной карциномой легких (SCLC) исследовательская группа в составе Nitadori J., Ishii G., Tsuta K. и соавторов (2006 г.) провела анализ тканевых матриц (ТМА) операционного материала резекций легкого с крупноклеточными нейроэндокринными и гистологического материала мелкоклеточных карцином. Иммуногистохимическое окрашивание на 48 маркёров оценивали по интенсивности окрашивания и проценту клеток, которые окрашивались положительно. Четыре белка значительно чаще экспрессировались в LCNEC по сравнению с SCLC: CK7 (113 против 49, $P < 0.0301$); CK18 (171 против 60, $P < 0.0008$); E-кадгерин (77 против 9, $P < 0,0073$); и бета-катенин, 191 против 120 ($P < 0,0286$). Иммуногистохимическое окрашивание срезов комбинированных морфологических вариантов, содержащих компоненты как LCNEC, так и SCLC, выявило более выраженную экспрессию CK7, CK18 и бета-катенина в компоненте LCNEC по сравнению с компонентом SCLC в 2 из 3 случаев. Результаты данного исследования показывают, что значительная экспрессия CK7, CK18, E-кадгерина и бета-катенина более характерна для LCNEC, чем для SCLC. Эти данные в очередной раз подтверждают, что эти типы опухолей являются отдельными нозологическими формами с точки зрения морфологии и иммуногистохимии [49].

Группа исследователей из Канагавы, университета Kitasato (Nagashio R1, Sato Y, Matsumoto T, и соавторы, 2010 г.) для уточнения белкового профиля SCLC и LCNEC провела протеомный анализ, используя метод двухмерного гель-электрофореза и клеточный лизат из двух клеточных линий N231, полученный из SCLC, и LCN1, полученный из LCNEC. В данном исследовании было зарегистрировано наличие 25 белковых пятен с

количественными различиями более чем в два раза, сравнивая клетки LCN1 и N231. В составе 25 идентифицированных белков присутствовали некоторые типы цитокератинов: СК7, СК8, СК18 и СК19, которые экспрессировались значительно больше в клетках LCN1 по сравнению с клетками N231. Экспрессия СК7, 8, 18 и 19 была дополнительно изучена при помощи иммуногистохимии на материале 81 случая ткани лёгочных карцином, фиксированной формалином и заключённой в парафин, в составе 27 SCLC, 30 LCNEC, 14 аденокарцином и 10 плоскоклеточных карцином. Хотя экспрессия СК7, СК8, СК18 и СК19 наблюдалась во всех гистологических типах, средняя интенсивность иммуногистохимического окрашивания СК7, СК8, СК18 и СК19 была значительно выше в случаях LCNEC, чем в случаях SCLC ($P < 0,001$, $P < 0,001$, $P < 0,01$ и $P < 0,001$, соответственно). Из полученных данных был сделан вывод, что биологические характеристики LCNEC и SCLC различаются, а экспрессия различных СК может служить в качестве дифференциально-диагностического критерия [50].

1.2.2. Маркёры для дифференциальной диагностики плоскоклеточного рака лёгкого

При помощи иммуногистохимии также проводится дифференциальная диагностика между аденокарциномами лёгкого и плоскоклеточной карциномой, что влияет на выбор терапии. Долгое время использовался маркер р63, отличающийся высокой чувствительностью, однако характеризующийся низкой специфичностью в связи с его реактивностью в значительной части случаев других опухолей лёгкого, особенно лимфом. Позже был разработан маркёр Р40, антитела к которому распознают $\Delta Np63$ -а изоформу р63. Предполагается, что она высокоспецифична для опухолей из плоского эпителия. Vishor J.A. и соавторы (2012 г.) сравнили стандартное антитело к р63 (клон 4A4) и р40 на выборке из 470 опухолей, которые включали плоскоклеточный рак лёгкого ($n = 81$), аденокарциномы ($n = 237$) и крупноклеточные лимфомы ($n = 152$). Окрашивание на Р63 было положительным в 100% плоскоклеточных карцином, в 31% аденокарцином и

в 54% крупноклеточных лимфом, таким образом чувствительность его составила 100%, а специфичность 60%. Окрашивание на маркёр p40 было также положительным в 100% плоскоклеточного рака, однако только 3% аденокарцином и ни одна из крупноклеточных лимфом не экспрессировала антиген p40. Таким образом чувствительность этого антитела составила 100%, а специфичность 98%. Средний процент клеток с положительным окрашиванием на маркёр p63 в сравнении с маркёром p40-иммунореактивными клетками в плоскоклеточной карциноме был сравнительно одинаковым (97% против 96%, соответственно, $P = 0,73$). Редкие аденокарциномы с позитивным окрашиванием к p40 имели такую особенность не более чем в 5% опухолевых клеток, тогда как средний процент p63-позитивных клеток в аденокарциномах и лимфомах составлял 26% (с разбросом 1-90%) и 48% (с разбросом 2-100%), соответственно. Таким образом, маркёр p40 эквивалентен маркёру p63 по чувствительности к плоскоклеточному раку, но он значительно превосходит p63 по специфичности, что, с точки зрения авторов, устраняет потенциально ошибочное трактование p63-позитивной аденокарциномы или ранее непредвиденной крупноклеточной лимфомы как плоскоклеточного рака [51].

Глава 2. Материалы и методы исследования

Материалы исследования:

Материалом исследования послужили гистологические препараты операционного материала резекций лёгкого, представленный краями резекции бронха и лёгочных сосудов, лимфатическими узлами и клетчаткой, а также материал эксцизионной биопсии внутригрудных лимфатических узлов группы N3 с метастазами нейроэндокринных опухолей лёгкого. У всех данных пациентов был установлен диагноз нейроэндокринных опухолей лёгкого. Данный материал был предоставлен архивом лаборатории морфологии опухолей НИИ онкологии им. Петрова и патологоанатомическим отделением НИИФП г. Санкт-Петербург. Общее количество исследованных случаев — 40.

Критерии включения: пациенты с диагнозом нейроэндокринных опухолей лёгкого, не получавшие лекарственной терапии (использовался только операционный материал и материал метастазов в лимфатические узлы, определивших стадию N3 по системе TNM).

Критерии исключения: пациенты с любыми другими нозологическими формами опухолей лёгкого. Также не использовался материал пункционных биопсий лёгкого пациентов с диагнозами нейроэндокринных опухолей и операционный материал пациентов, получавших предоперационную терапию.

Пациенты, материал которых был использован в работе, относились к разным возрастным категориям (от 30 до 70 лет) и имели разный пол (26 человек — мужского и 14 человек — женского пола). Пациенты проходили диагностику или лечение в названных учреждениях в период с 2010 по 2017 год.

Методы исследования:

На первом этапе оценивались гистологические препараты, окрашенные гематоксилином-эозином. Данные препараты были подготовлены по следующей методике. Операционный материал до фиксации описывался и измерялся. Затем материал фиксировался в течение 10-12 часов в 10% забуференном нейтральном формалине. Далее производилась вырезка материала. Забирались фрагменты ткани лёгкого, первичной опухоли, края резекции бронха и лёгочных сосудов, лимфатических узлов и клетчатки. Полученные фрагменты укладывались в гистологические кассеты, в которых дополнительно фиксировались в 10% забуференном нейтральном формалине в течение 24 часов. Далее материал проводился в процессоре карусельного типа Leica TP 1020 в 9 емкостях с абсолютизированным изопропиловым спиртом по 2,5 часа в каждой и в 3 емкостях с расплавленным парафином при температуре 58-60°C в течение 2,5 часов в каждой, материал из НИИФП подвергался проводке вручную. Далее материал заливался в парафин с использованием заливочной станции Leica EG1150H, блоки охлаждались на специальном столике Leica EG1150C. Далее с готовых парафиновых блоков

изготавливались срезы толщиной 4-5 мкм на санном (Leica SM2000R) или роторном (Thermo Microm HM340E) микротоме, которые монтировались на предметные стекла (Menzel), затем срезы окрашивались гематоксилином и эозином и заключались под покровное стекло с использованием автоматического гистостейнера Leica ST5020 и coverslipер Leica CV 5030. Далее изготовленные срезы, окрашенные гематоксилином и эозином, изучались в светлом поле с использованием микроскопа Leica DM 1000 или Olympus BX46.

При исследовании описанных гистологических препаратов, отмечались следующие параметры: гистологический тип опухоли и степень злокачественности (в соответствии с классификацией опухолей лёгкого ВОЗ), признаки, характеризующие инвазию опухоли по отношению к окружающим анатомическим структурам (прорастание в плевру, прорастание в долевой бронх, опухолью, расположенной изначально периферически, локализация опухоли исключительно в пределах бронха), степень метастатического поражения в соответствии с классификацией TNM. При отнесении случая к одному из возможных вариантов нейроэндокринных опухолей лёгкого, учитывались морфологические и иммуногистохимические характеристики, описанные в классификации опухолей лёгкого ВОЗ. К признакам, ассоциированным с нейроэндокринной дифференцировкой, относились: образование розеток и розетко-подобных структур, сплошное формирование гнёзд, разделённых тонкими прослойками фиброзной стромы, формирование структур палисадников, паттерн, напоминающий «рассыпанную овсяную крупу», а также менее специфичные признаки, такие, как формирование трабекулярных структур и плотно расположенных, утолщённых псевдососочков. Последние два признака рассматривались в сочетании с другими признаками и цитологическими особенностями, характерными для нейроэндокринных опухолей. К последним относились: клетки вытянутой формы с гиперхромными ядрами (в сочетании с описанными тканевыми характеристиками), чёткие границы между клетками при образовании

органовидных структур, наличие мелкодисперсного хроматина, напоминающего картину «перца, перемешенного с солью», в ряде случаев наличие практически полностью гомогенного хроматина. В исследованных опухолях присутствовали признаки, не являющиеся специфичными для нейроэндокринных опухолей. Данные признаки также последовательно описывались, как варианты описываемых параметров и заносились в сводную таблицу в формате Excel. Также определялись дополнительные параметры, такие как наличие сосудистой и периневральной инвазии.

Методика иммуногистохимического исследования.

Иммуногистохимическое исследование выполнялось на материале срезов с парафиновых блоков. Срезы, содержащие первичную опухоль, толщиной 2-3 мкм помещали на покрытые поли-L-лизинном предметные стёкла MENZEL. В течение 18-20 часов подготовленные срезы хранились в термостате 37°C, затем срезы переносили в термостат 60°C на 30 минут. Далее срезы подвергались депарафинизации в двух сменах ксилола по 3 мин, и дегидратации в абсолютном спирте с четырьмя сменами по 3 минуты в каждой. Активность эндогенной пероксидазы ингибировалась в 3% растворе перекиси водорода в течение 5 минут при комнатной температуре.

На следующем этапе термостойкие кюветы с растворами для демаскирования изучаемых антигенов (TRS или TRS-pH 9.0 буферы) нагревались на водяной бане до 96°C. Стекла с депарафинизированными срезами помещали в соответствующий предварительно прогретый буфер, согласно протоколу обработки каждого антитела. По истечении 40 минут кюветы со стеклами охлаждались при комнатной температуре еще 20 минут. После извлечения из обрабатывающих буферов стекла помещались в трис-NaCl-буфере с добавлением 0,1% TWEEN20 и промывались в нем две смены по 5 минут.

Инкубирование с первичными антителами производилось во влажных камерах при комнатной температуре в течение 30 минут. Каждое первичное антитело разводилось буфером для разведения первичных антител в

соответствии с протоколом, разработанным в лаборатории, утвержденным после проведения контрольных экспериментов. Так, для маркера Ki-67 контрольным являлось выраженное окрашивание ядер клеток фолликулов в миндалине.

После инкубации с первичными антителами стекла два раза по 5 минут промывались в трис-NaCl-буфере с добавлением 0,1% TWEEN20 и инкубировались со вторичными антителами, с учётом клональности первичных антител в течение 30 минут при комнатной температуре, затем два раза по 5 минут промывались в трис-NaCl-буфере с добавлением 0,1% TWEEN20.

Образование комплексов антиген-антитело проявлялось при помощи 3,3'-диаминобензидина. На заключительном этапе срезы докрашивались гематоксилином Майера, подвергались дегидратации и заключались в монтирующую жидкость.

Процедура оценки экспрессии иммуногистохимических маркеров

Для маркера клеточной пролиферации Ki-67: положительным результатом являлось наличие специфического коричневого окрашивания определённого количества ядер опухолевых клеток, выраженная в процентах от 1000 проанализированных клеток. Оценка окрашивания остальных маркеров проводилась согласно схеме, изначально предложенной Allred в 1989 году для иммуногистохимического окрашивания рецепторов к прогестерону и эстрогену, подробно схема представлена в таблице 1.

В ходе работы иммуногистохимически определялась степень экспрессии ряда следующих маркеров: Ki-67, Synaptophysin, CD-56, NSE, Chromogranin A, TTF-1, CK-8, CK-18, CK-7, p-63 или p-40.

Исходя из данных, полученных в ходе недавних исследований, в настоящий момент рационально использовать маркер p40 для дифференциальной диагностики плоскоклеточных форм рака лёгкого от других опухолей [51]. Это же является актуальным для дифференциальной диагностики нейроэндокринных опухолей лёгкого от плоскоклеточного рака,

особенно низкодифференцированного крупноклеточного нейроэндокринного рака. Таким образом, в части случаев, исследованных в более поздние годы (2013-2017), для дифференциальной диагностики нейроэндокринных опухолей от плоскоклеточного рака, вместо маркера р63, был использован маркер р40.

Таблица 1.

Протокол иммуногистохимического исследования

Антиген	Антитело (клон)	Разведение первичного антитела	Способ демаскировки	Производитель	Система визуализации
Ki-67	SP6	1:100	Трис-эдта буфер pH 9,0; Diagnostic BioSystems, ref: K043	Diagnosti c BioSyste ms	Ventana Envision System: HRP Multimer Ultra + Ventana DAB Substrate buffer, DAB+ Chromogen
Синаптофизи н	MRQ- 40	1:200	Трис-эдта буфер pH 9,0; Diagnostic BioSystems, ref: K043	Cell Marque	Dako Real Envision +System HRP Labelled Rabbit/Anti- Mouse + Dako DAB Substrate buffer, DAB+ Chromogen

CD-56	MOB 261	1:50	Трис-эдта буфер pH 9,0; Diagnostic BioSystems, ref: K043	Diagnosti c BioSyste ms	Dako Real Envision +System HRP Labelled Rabbit/Anti- Mouse + Dako DAB Substrate buffer, DAB+ Chromogen
Нейрон- специфическ ая эноллаза (NSE)	MRQ- 55	1:100	Цитратный буфер pH 6,0; DAKO, ref: TRSS1699	Cell Marque	Dako Real Envision +System HRP Labelled Rabbit/Anti- Mouse + Dako DAB Substrate buffer, DAB+ Chromogen
Хромогранин А	DAK- A3 poly	1:5000	Трис-эдта буфер pH 9,0; Diagnostic BioSystems, ref: K043	DAKO	Dako Real Envision +System HRP Labelled Rabbit/Anti- Mouse + Dako DAB Substrate buffer, DAB+ Chromogen

TTF-1	SPT24	1:150	Трис-эдта буфер pH 9,0; Diagnostic BioSystems, ref: K043	Leica	Dako Real Envision +System HRP Labelled Rabbit/Anti- Mouse + Dako DAB Substrate buffer, DAB+ Chromogen
CK-8	EP17	1:150	Трис-эдта буфер pH 9,0; Diagnostic BioSystems, ref: K043	Cell Marque	Dako Real Envision +System HRP Labelled Anti- Rabbit + Dako DAB Substrate buffer, DAB+ Chromogen
CK-18	DC-10	1:50	Трис-эдта буфер pH 9,0; Diagnostic BioSystems, ref: K043	DAKO	Dako Real Envision +System HRP Labelled Rabbit/Anti- Mouse + Dako DAB Substrate buffer, DAB+ Chromogen
CK-7	OV-TL 12/30	1:150	Трис-эдта буфер pH 9,0; Diagnostic BioSystems,	DAKO	Dako Real Envision +System HRP Labelled Rabbit/Anti-

			ref: K043		Mouse + Dako DAB Substrate buffer, DAB+ Chromogen
p-40	PDR 055, polyclonal	1:150	Цитратный буфер pH 6,0; DAKO, ref: TRSS1699	Diagnosti c BioSyste ms	Dako Real Envision +System HRP Labelled Rabbit/Anti- Mouse + Dako DAB Substrate buffer, DAB+ Chromogen
p-63	DAK- p63	1:300	Трис-эдта буфер pH 9,0; Diagnostic BioSystems, ref: K043	DAKO	Dako Real Envision +System HRP Labelled Rabbit/Anti- Mouse + Dako DAB Substrate buffer, DAB+ Chromogen

Таблица 2.

Полуколичественная оценка иммуногистохимического определения уровня экспрессии маркёров, использованных в работе (за исключением маркёра пролиферации Ki-67)

Иммуногистохимический признак	Баллы
Доля позитивно окрашенных клеток	

Нет окрашенных клеток	0
0- 1% окрашенных клеток	1
1% – 10%	2
10% – 30%	3
30% – 60%	4
60% – 100%	5
Интенсивность окраски	
Нет окрашенных клеток	0
Слабое окрашивание	1
Умеренное окрашивание	2
Выраженное окрашивание	3

Показатели доли и интенсивности окрашенных клеток суммируются. Маркер пролиферативной активности Ki-67 исследовался путём непосредственного подсчета клеток, ядра которых экспрессировали Ki-67, в микроскопе на 1000 клеток.

Примеры вариантов иммуногистохимического окрашивания нейроэндокринных опухолей, исследованных в работе.

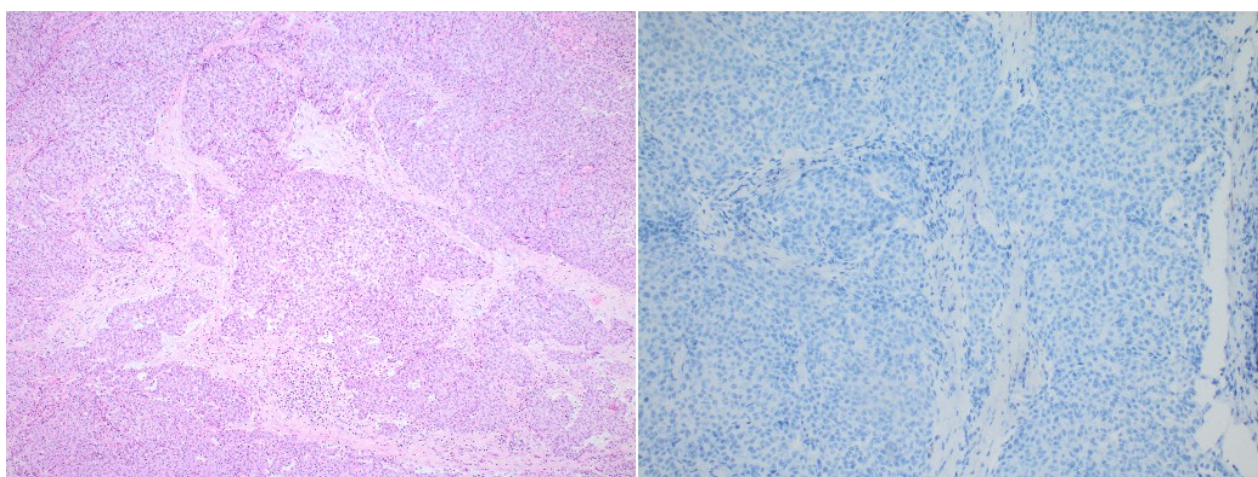


Рис. 1

Пример негативного иммуногистохимического окрашивания (окрашивание на СК-7 ткани крупноклеточного нейроэндокринного рака, в левой части рисунка окраска гематоксилин-эозином данного фрагмента ткани, объективы x2 и x10, соответственно).

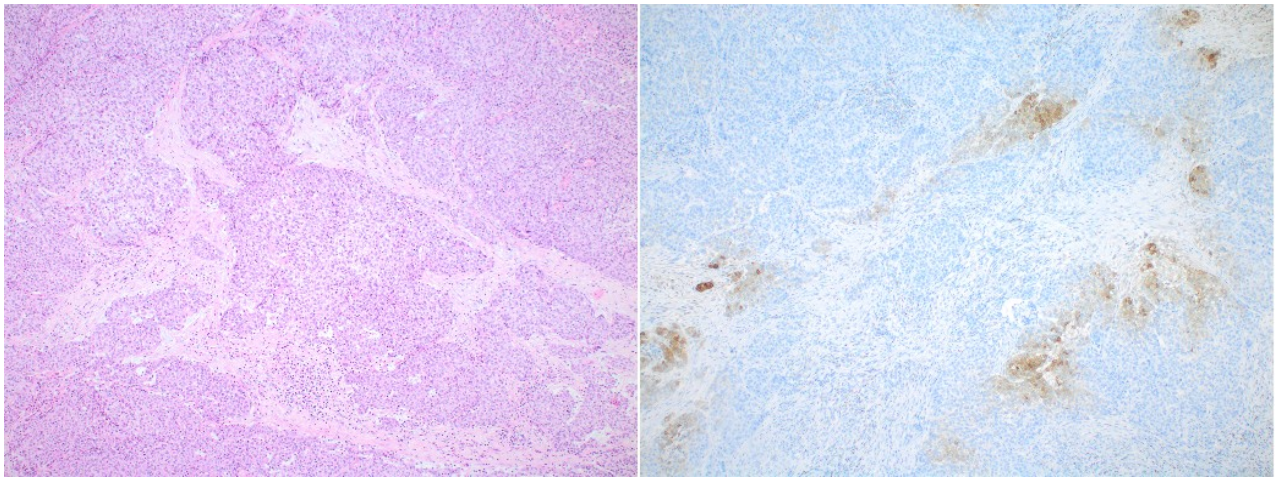


Рис. 2

Пример слабого мозаично распределённого цитоплазматического иммуногистохимического окрашивания, имеющего интенсивность 1 балл в части клеток (окрашивание на маркёр NSE ткани крупноклеточного нейроэндокринного рака, в левой части рисунка окраска гематоксилин-эозином данного фрагмента ткани, объективы x2 и x2, соответственно)

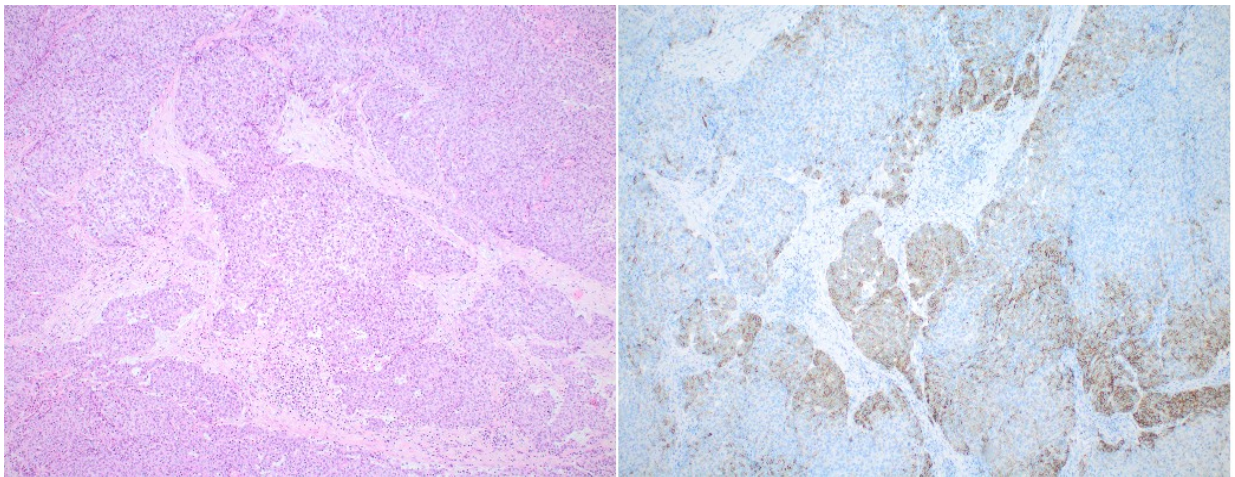


Рис. 3

Пример мозаично распределённого мембранного иммуногистохимического окрашивания, имеющего интенсивность 2 балла в небольшой части клеток (окрашивание на маркёр CD-56 ткани крупноклеточного нейроэндокринного рака, в левой части рисунка окраска гематоксилин-эозином данного фрагмента ткани, объективы x2 и x2, соответственно)

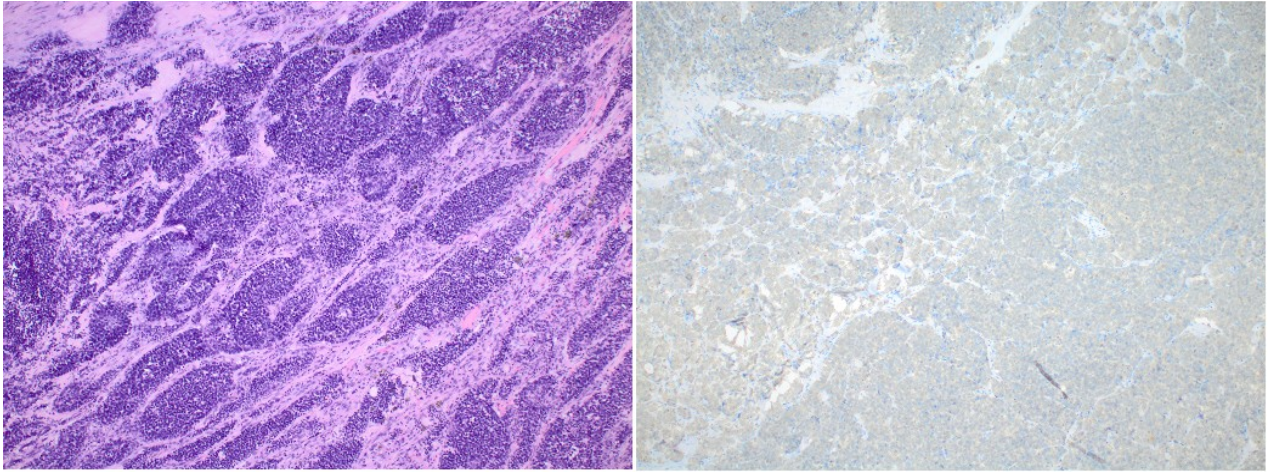


Рис. 4

Пример слабого равномерно распределённого цитоплазматического окрашивания, имеющего интенсивность 1 балл (окрашивание на маркёр NSE ткани атипичного карциноида, в левой части рисунка окраска гематоксилин-эозином данного фрагмента ткани, объективы x5 и x5, соответственно)

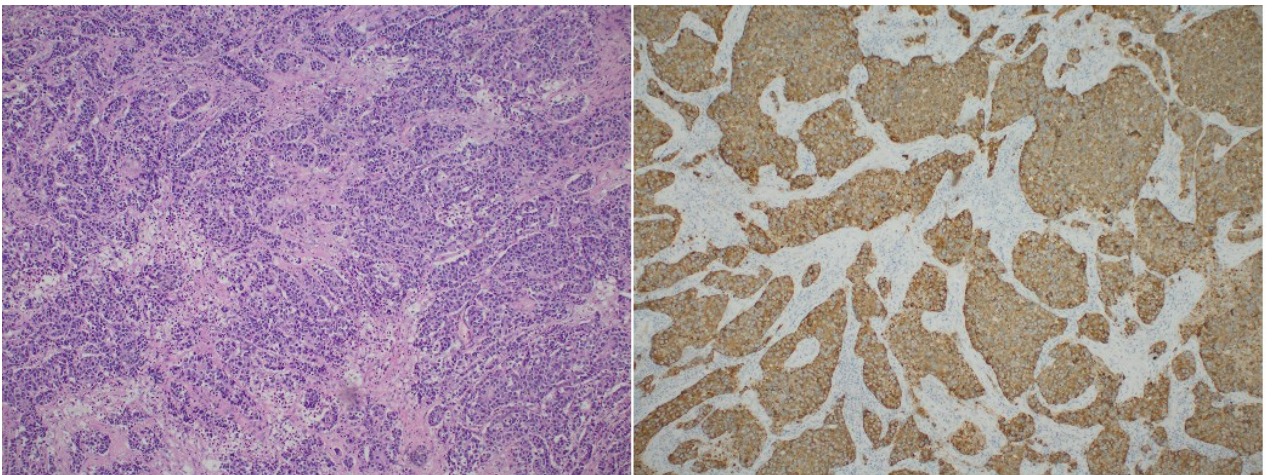


Рис. 5

Пример умеренного равномерно распределённого цитоплазматического иммуногистохимического окрашивания, имеющего интенсивность 2 балла (окрашивание на маркёр Chromogranin A ткани крупноклеточного нейроэндокринного рака, в левой части рисунка окраска гематоксилин-эозином данного фрагмента ткани, объективы x5 и x5, соответственно)

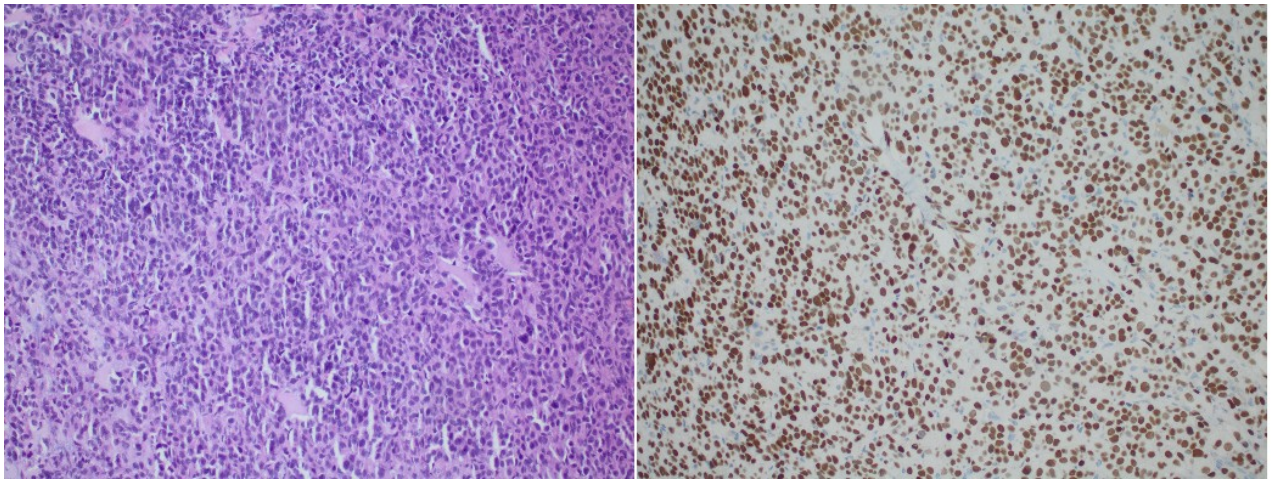


Рис. 6

Пример мозаично распределённого иммуногистохимического ядерного окрашивания с разной степенью интенсивности, преимущественно в 1 или 2 балла; окрашено около 95% клеток (окрашивание на маркёр TTF-1 ткани атипичного карциноида, в левой части рисунка окраска гематоксилин-эозином данного фрагмента ткани, объективы x10 и x10, соответственно)

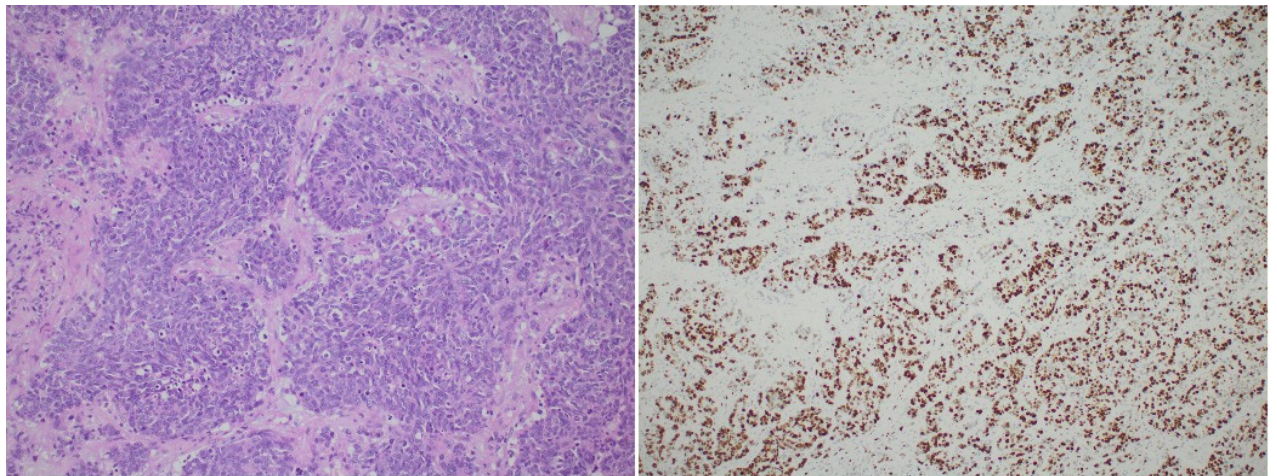


Рис. 7

Пример ядерного иммуногистохимического окрашивания на маркёр пролиферативной активности Ki-67 ткани крупноклеточного нейроэндокринного рака (специфическое окрашивание около 80% опухолевых клеток, в левой части рисунка окраска гематоксилин-эозином данного фрагмента ткани, объективы x5 и x5, соответственно).

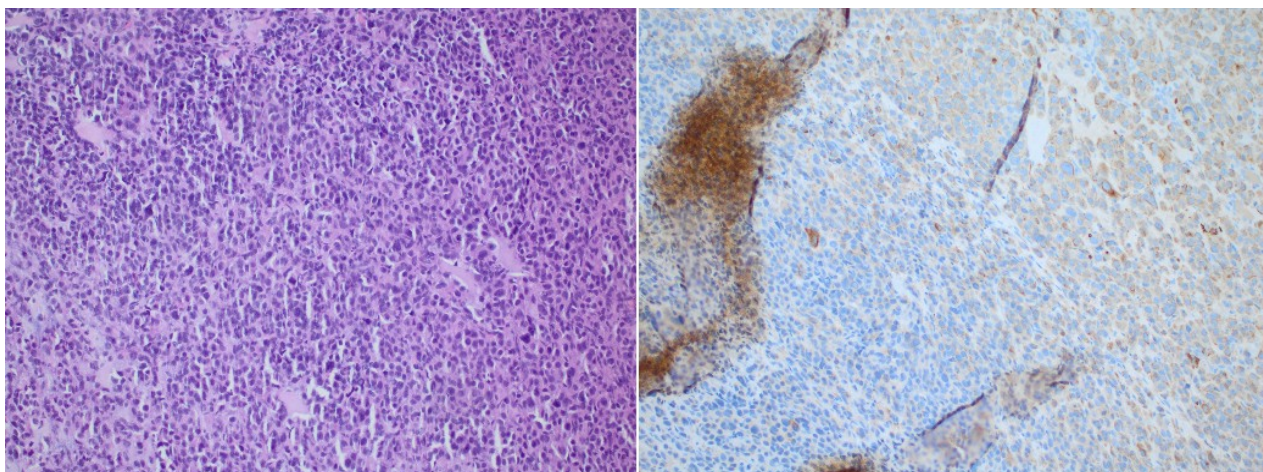


Рис. 8

Пример слабого мембранно-цитоплазматического иммуногистохимического окрашивания на маркер СК-8 с наличием артефакта окрашивания в виде его локального усиления в связи с особенностями рельефа среза ткани, которое не учитывается как истинно выраженное окрашивание при интерпретации результата исследования (окрашивание ткани атипичного карциноида, в левой части рисунка окраска гематоксилин-эозином данного фрагмента ткани, объективы x10 и x10, соответственно).

Статистическая обработка результатов исследования

Статистическая обработка результатов проводилась в пакете программ IBM SPSS Statistics 20. Результаты статистической обработки полученных данных были представлены в виде таблиц с пояснениями. Для описания количественных показателей приводились показатели взвешенного среднего арифметического и средней ошибки ($M \pm m$). Для оценки качественных показателей приводились проценты, отражающие долю от всех случаев выборки, для которой характерны данные показатели.

Для сравнения выборок данных использовались следующие статистические критерии: непараметрический критерий Манна-Уитни (для сравнения двух независимых, ненормально распределенных выборок), причём различия считались статистически достоверными, если значение полученного U-критерия было меньше табличного значения, при

установленном уровне вероятности «р» < 0,05; коэффициент корреляции Спирмена (для оценки тесноты связи двух явлений).

Глава 3. Результаты собственных исследований

3.1. Результаты оценки морфологических особенностей

исследованного материала

Материал, рассмотренный в работе был представлен нейроэндокринными опухолями лёгкого с различной степенью дифференцировки и разными названиями нозологических форм. В состав всего материала входило 40 случаев, из них: 11 случаев типичного карциноида (27,5%), 3 случая атипичного карциноида (7,5%), 22 случая крупноклеточного нейроэндокринного рака (55%), 1 случай комбинированного крупно-мелкоклеточного нейроэндокринного рака (2,5%), 3 случая мелкоклеточного рака (7,5%).

Из 40 исследованных опухолей 6 случаев (15%) было представлено препаратами лимфатических узлов группы N3 с метастазами нейроэндокринных опухолей без наличия препаратов первичного опухолевого узла. Оставшиеся 34 случая (85%) имели препараты первичного опухолевого узла. Из них 50% случаев (17) имели признаки как сосудистой инвазии, так и местные признаки инвазивности (прорастание в плевру или вторичное врастание в крупный бронх с изъязвлением), 50% - не имели данных признаков; 8 случаев (23,5%) имели метастазы в лимфатических узлах, 26 (76,5%) — не имели.

Характерные для нейроэндокринных опухолей морфологические признаки были представлены следующим образом: сформированные паттерны розеток имели 11 случаев (27,5%), паттерны палисадников в отсутствии розеток — другие 11 случаев (27,5%), трабекулярный паттерн — 13 случаев (32,5%), паттерн сформированных органоидных гнёзд — 32 случая (80%), папиллярный паттерн — 3 случая (7,5%), паттерн, напоминающий картину «рассыпанной овсяной крупы» - 4 случая (10%). Чисто солидный рост без характерных признаков нейроэндокринной дифференцировки имел 1

случай. Характерные для нейроэндокринных опухолей «географические некрозы» отмечались в 9 случаях (22,5%), а характерный однородный нежный или мелко-дисперсный хроматин в 22 случаях (55%). Таким образом самым постоянным признаком было образование гнёзд с или без наличия розеток или периферически расположенных палисадников.

Далее представлены иллюстрации признаков, определявших в ходе исследования нейроэндокринную принадлежность опухоли.

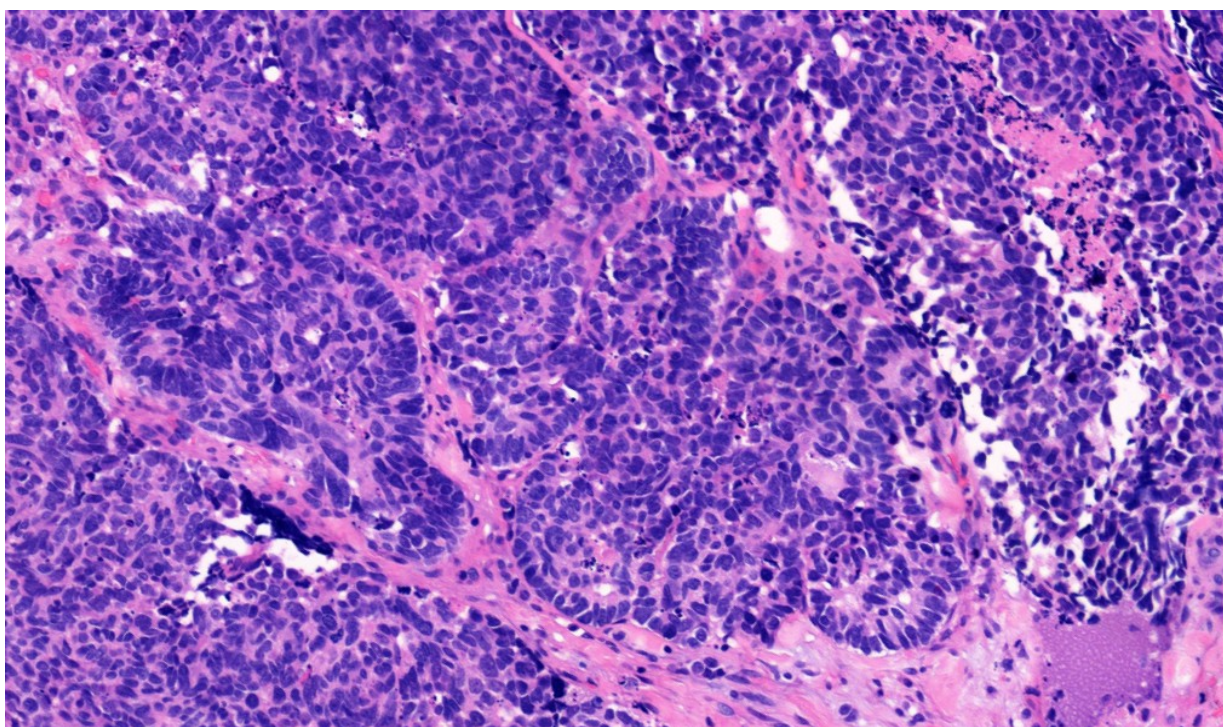


Рис. 9

Морфологическая картина паттерна розеток в ткани крупноклеточного нейроэндокринного рака (окраска гематоксилин-эозин, объектив x20)

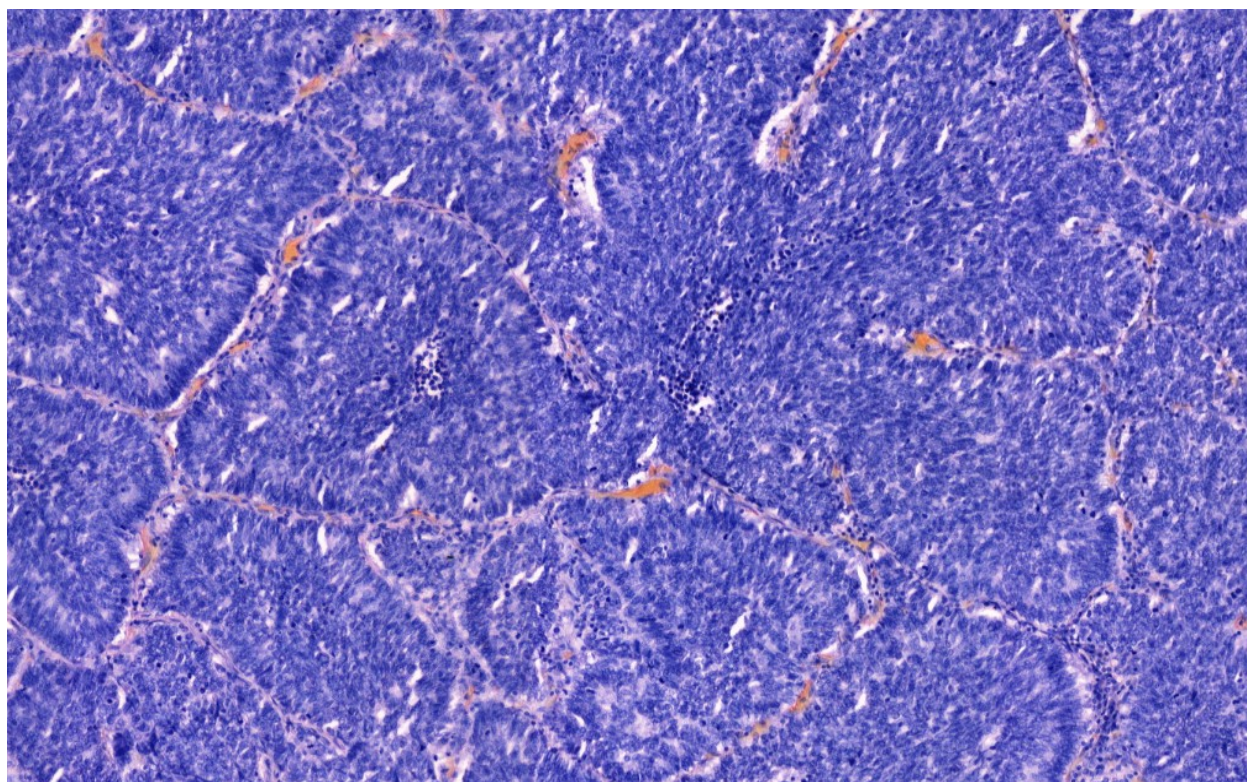


Рис. 10

Морфологическая картина паттерна палисадников по периферии гнёзд, образуемых опухолью (крупноклеточный нейроэндокринный рак, окраска гематоксилин-эозин, объектив x10)

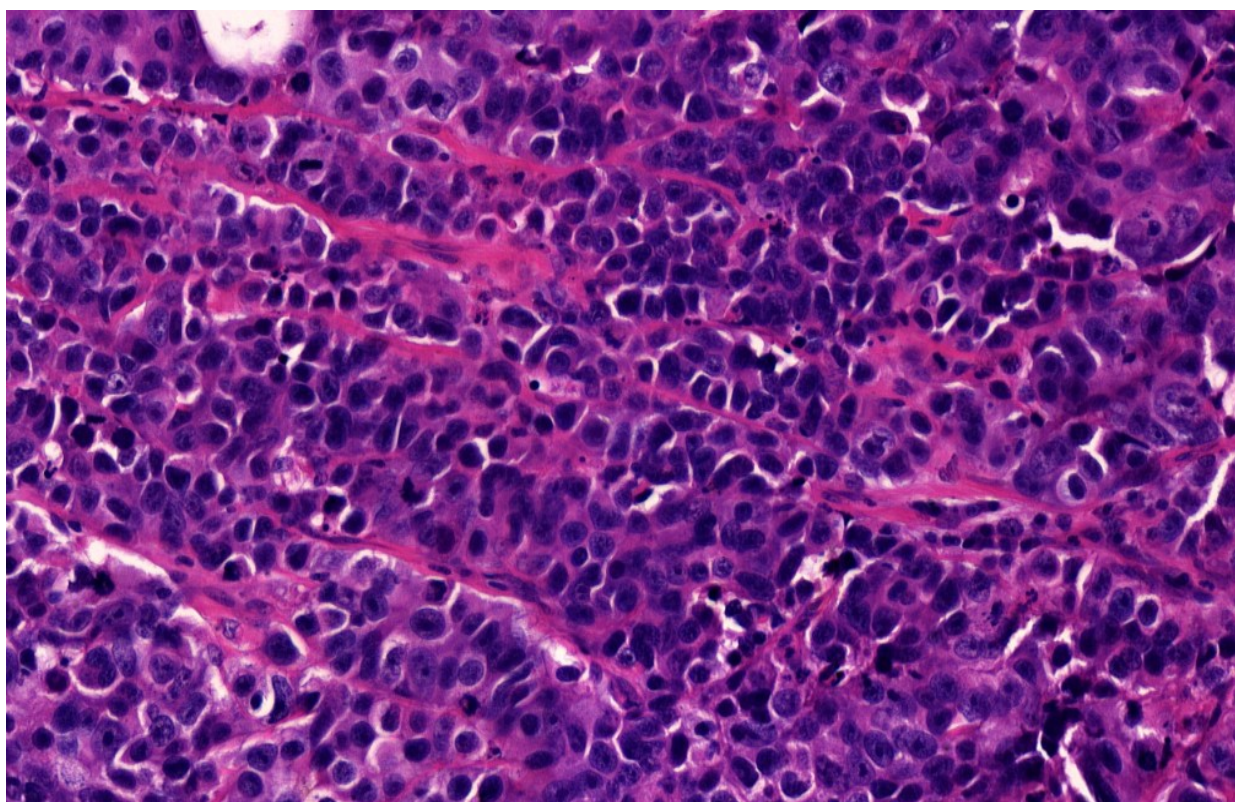


Рис. 11

Морфологическая картина трабекулярного паттерна в ткани крупноклеточного нейроэндокринного рака (окраска гематоксилин-эозин, объектив x40)

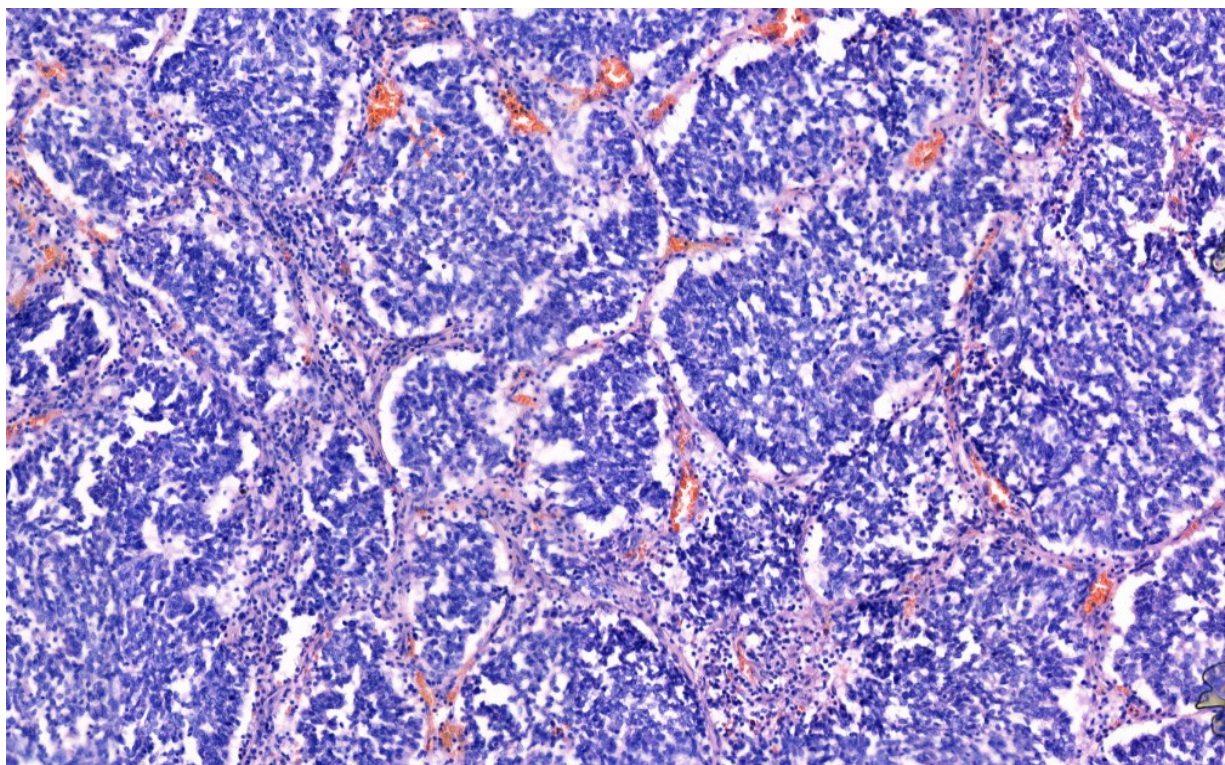


Рис. 12

Морфологическая картина паттерна гнёзд (крупноклеточный нейроэндокринный рак, окраска гематоксилин-эозин, объектив x10)

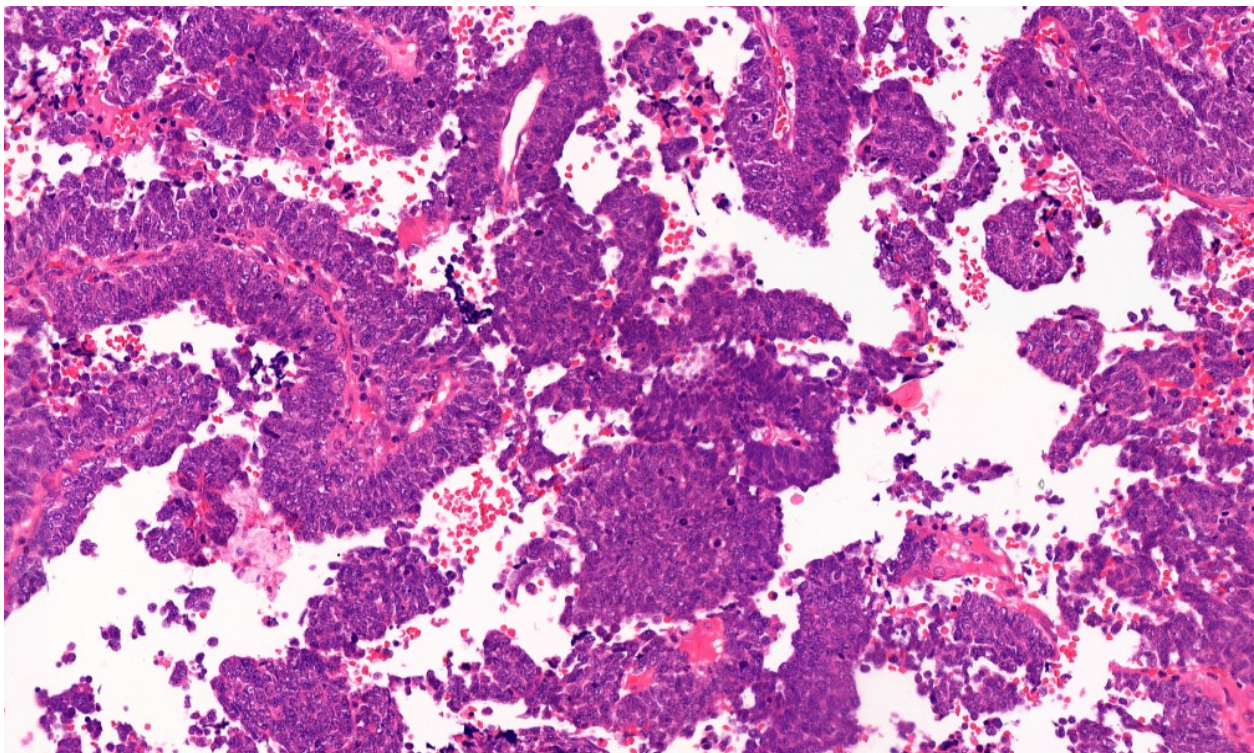


Рис. 13

Морфологическая картина папиллярного паттерна (крупноклеточный нейроэндокринный рак, окраска гематоксилин-эозин, объектив x20)

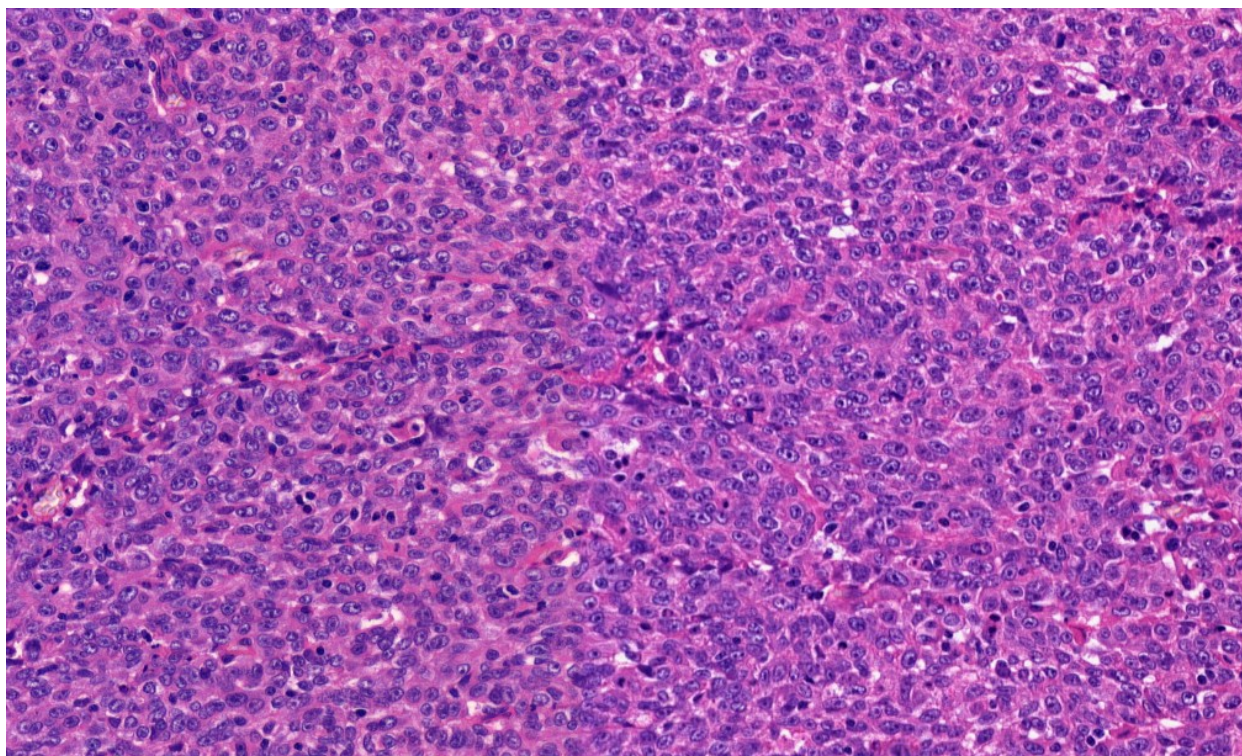


Рис. 14

Морфологическая картина солидного роста практически без формирования каких-либо органоидных структур (крупноклеточный нейроэндокринный рак, окраска гематоксилин-эозин, объектив x20).

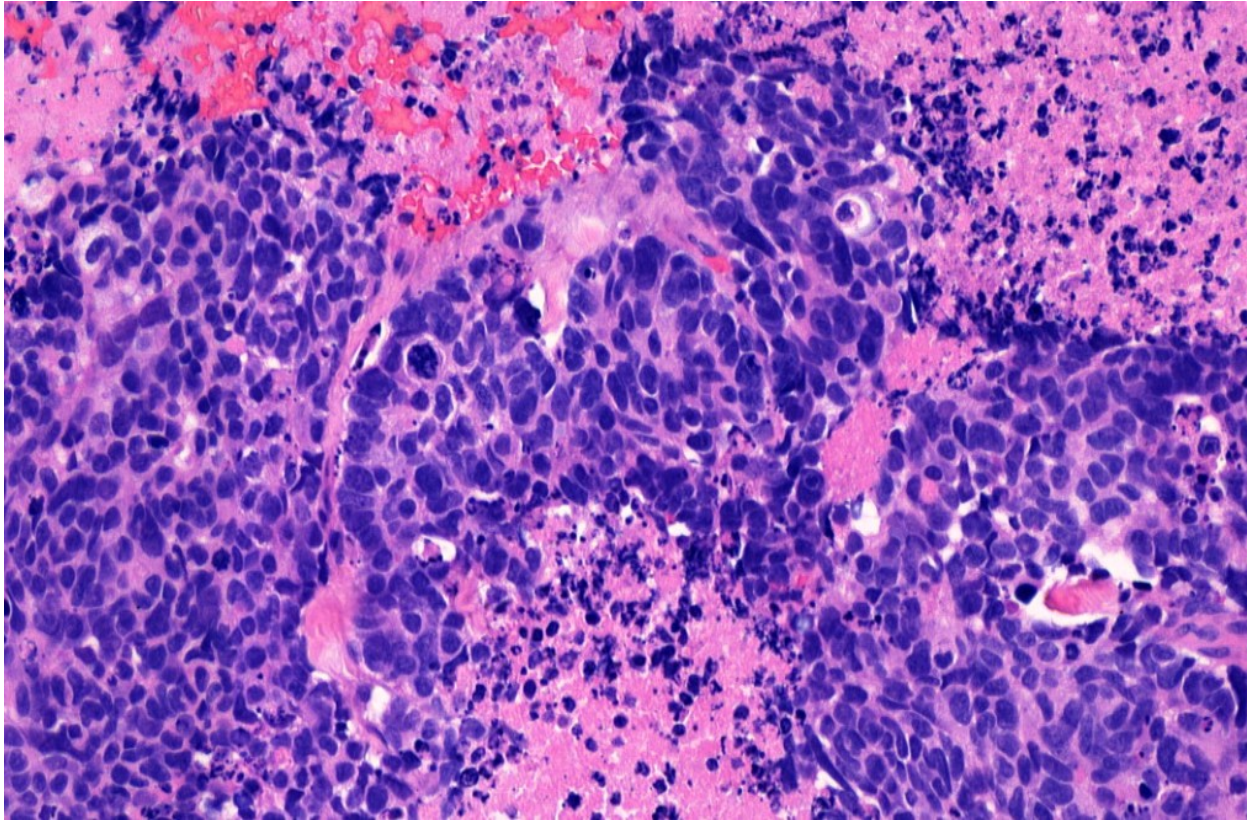


Рис. 15

Морфологическая картина характерного для нейроэндокринных опухолей гомогенного хроматина, также в левой части фотографии определяется паттерн, напоминающий картину «рассыпанной овсяной крупы», характерный для нейроэндокринных опухолей низкой степени дифференцировки, являющийся признаком низкой внутренней органоидной организации опухоли (окраска гематоксилин-эозин, объектив x40).

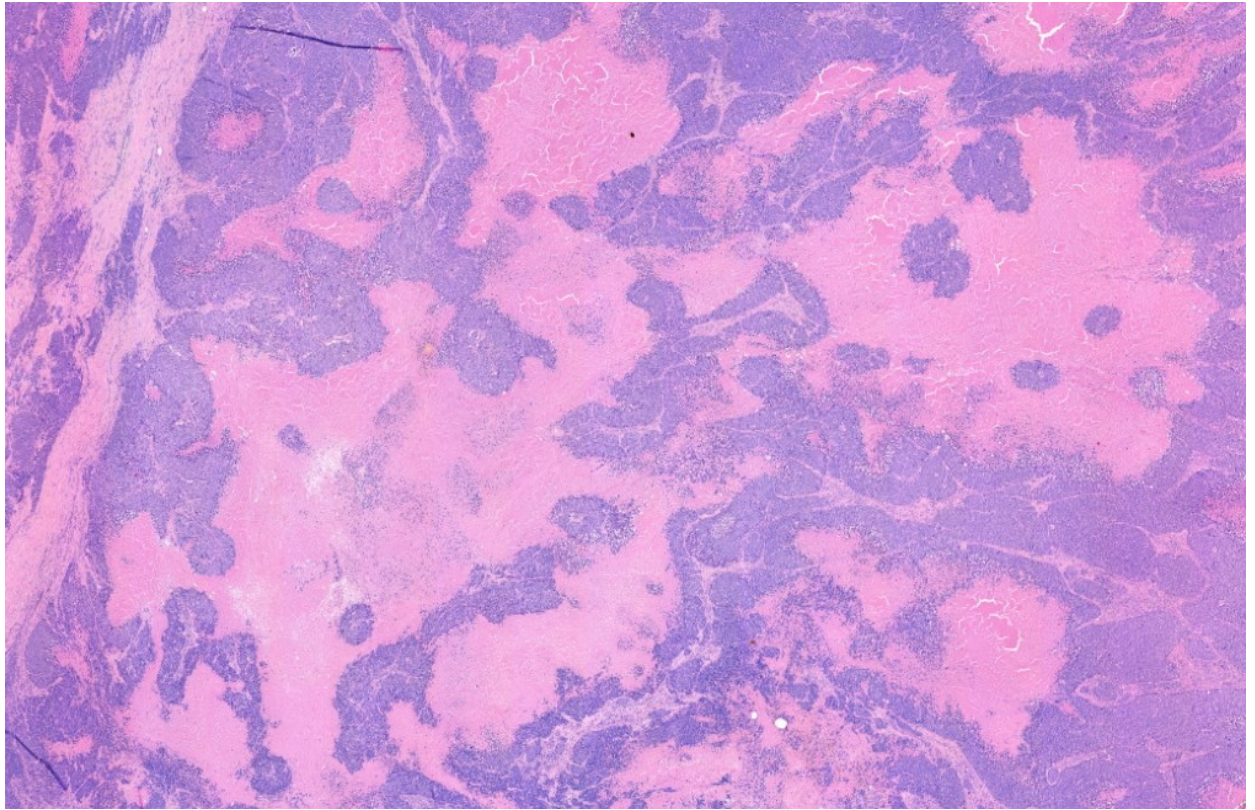


Рис. 16

Морфологическая картина массивных «географических» некрозов, характерных для нейроэндокринных опухолей низкой степени дифференцировки (крупноклеточный нейроэндокринный рак, окраска гематоксилин-эозин, объектив х5)

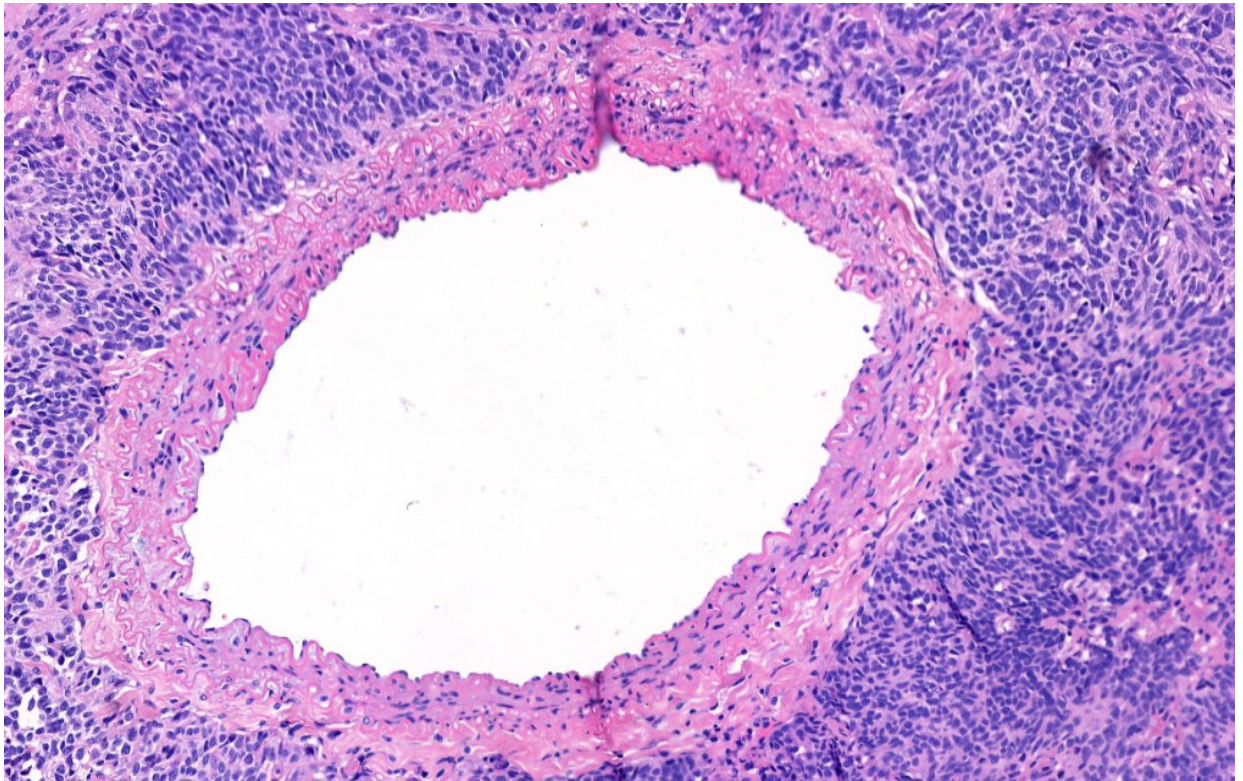


Рис. 17

Морфологическая картина инвазии нейроэндокринной опухоли в стенку сосуда мышечного типа (окраска гематоксилин-эозин, объектив x20).

3.2. Результаты сравнительной оценки иммунофенотипа в исследуемых группах

Для оценки взаимосвязи экспрессии иммуногистохимических маркёров и инвазивности нейроэндокринных опухолей выбраны следующие маркёры: Ki-67, Synaptophysin, CD-56, NSE, Chromogranin A, TTF-1, CK-8, CK-18, CK-7. Маркёры CK-8, CK-18 дополнительно подтверждают лёгочное происхождение опухоли, а маркёр p63, ранее единственный использовавшийся для дифференциальной диагностики плоскоклеточного рака лёгкого, и маркёр p40 использовались для исключения диагноза плоскоклеточного рака. Во всех, рассмотренных в работе случаях, оба названных маркёра не обнаруживали иммуногистохимического окрашивания.

Таблица 3.

Сравнение экспрессии маркёров, в группе случаев с метастазами в лимфатических узлах без первичного опухолевого узла (Группа 1) и в

узлах первичной опухоли, имеющей метастазы в лимфатических узлах (Группа 2), определяемых иммуногистохимическим методом.

Маркёры	Ki-67	Synaptophysin	CD-56	NSE	Chromogranin A	TTF-1	Ck-8	Ck-18	Ck-7	p40	p63
Группа 1	50 ±3,85	5 ±0,65	4,67 ±0,58	1,0 ±0,78	5,25 ±0,37	6,0 ±0,44	4,0 ±0,59	4,14 ±0,65	1,14 ±0,50	0	0
Группа 2	35,0 ±12,6	5,5 ±0,25	4,0 ±0,50	3,0 ±1,50	4,0 ±0,50	7,0 ±0,50	4,63 ±0,50	4,0 ±0,31	1,38 ±0,54	0	0

В данной таблице сравнивается экспрессия выбранных маркёров в группе случаев с метастазами в лимфатических узлах, полученных путём эксцизионной биопсии и, не имеющих препаратов первичного опухолевого узла, и их экспрессия в группе случаев с наличием метастазов в лимфатических узлах и препаратов первичного опухолевого узла. Исходя из данных, представленных в таблице, можно сделать вывод об отсутствии статистической значимости различий экспрессии между этими двумя группами (при анализе Манна-Уитни для $p < 0,05$, U-критерий был во всех случаях больше табличного значения). Этот факт даёт возможность далее объединять эти две группы при сравнении с другими группами (Таблица 4).

Таблица 4.

Сравнение экспрессии маркёров, в группе случаев с метастазами в лимфатических узлах как без первичного опухолевого узла, так и с первичным опухолевым узлом (Группа 1), и в узлах первичной опухоли, не имеющей метастазов в лимфатических узлах (Группа 2), определяемых иммуногистохимическим методом.

Маркёры	Ki-67	Synaptophysin	CD-56	NSE	Chromogranin A	TTF-1	Ck-8	Ck-18	Ck-7	p40	p63
Группа 1	44 ±5,30	5,2 ±0,33	4,4 ±0,33	1,67 ±0,68	4,83 ±0,44	6,33 ±0,31	4,33 ±0,37	4,07 ±0,33	1,27 ±0,36	0	0
Группа 2	56,25 ±5,44	5,67 ±0,26	5,25 ±0,44	4,92 ±0,56	3,0 ±0,36	5,47 ±0,52	6,08 ±0,27	5,58 ±0,36	4,31 ±0,56	0	0

Исходя из данных, представленных в таблице, можно сделать вывод об отсутствии статистической значимости различий экспрессии между этими двумя группами (при анализе Манна-Уитни для $p < 0,05$, U-критерий был во всех случаях больше табличного значения).

Таблица 5.

Сравнение экспрессии маркёров, в группе случаев с метастазами в лимфатических узлах группы N3 (Группа 1), и в узлах первичной опухоли, не имеющей метастазов в лимфатических узлах (Группа 2), определяемых иммуногистохимическим методом.

Маркёры	Ki-67	Synaptophysin	CD-56	NSE	Chromogranin A	TTF-1	Ck-8	Ck-18	Ck-7	p40	p63
Группа 1	50 ±3,85	5 ±0,65	4,67 ±0,58	1,0 ±0,78	5,25 ±0,37	6,0 ±0,44	4,0 ±0,59	4,14 ±0,65	1,14 ±0,50	0	0
Группа 2	56,25 ±5,44	5,67 ±0,26	5,25 ±0,44	4,92 ±0,56	3,0 ±0,36	5,47 ±0,52	6,08 ±0,27	5,58 ±0,36	4,31 ±0,56	0	0

Для дополнительной точности исследования в данной таблице сравнивается экспрессия выбранных маркёров в группе случаев с метастазами в лимфатических узлах, полученных путём эксцизионной биопсии и не имеющих препаратов первичного опухолевого узла, и их экспрессия в группе случаев с наличием препаратов первичного опухолевого

узла, но не имеющих метастазов в лимфатических узлах. Исходя из данных, представленных в таблице, можно сделать вывод об отсутствии статистической значимости различий экспрессии между этими двумя группами (при анализе Манна-Уитни для $p < 0,05$, U-критерий был во всех случаях больше табличного значения).

Таблица 6.

Сравнение экспрессии маркёров в первичных опухолевых узлах в группе случаев с метастазами в лимфатических узлах (Группа 1) и в группе случаев, не имеющей метастазов в лимфатических узлах (Группа 2), определяемых иммуногистохимическим методом.

Маркёры	Ki-67	Synaptophysin	CD-56	NSE	Chromogranin A	TTF-1	Ck-8	Ck-18	Ck-7	p40	p63
Группа 1	35,0 ±12,6	5,5 ±0,25	4,0 ±0,50	3,0 ±1,50	4,0 ±0,50	7,0 ±0,50	4,63 ±0,50	4,0 ±0,31	1,38 ±0,54	0	0
Группа 2	56,25 ±5,44	5,67 ±0,26	5,25 ±0,44	4,92 ±0,56	3,0 ±0,36	5,47 ±0,52	6,08 ±0,27	5,58 ±0,36	4,31 ±0,56	0	0

В данной таблице также для дополнительной точности сравнивается экспрессия выбранных маркёров в группе случаев с метастазами в лимфатических узлах, имеющих препараты первичного опухолевого узла, и их экспрессия в группе случаев с наличием препаратов первичного опухолевого узла без метастазов в лимфатических узлах. Исходя из данных, представленных в таблице, можно сделать вывод об отсутствии статистической значимости различий экспрессии между этими двумя группами (при анализе Манна-Уитни для $p < 0,05$, U-критерий был во всех случаях больше табличного значения).

В следующей таблице приводятся данные экспрессии выбранных маркёров в двух группах, представленных случаями с разной степенью

выраженности таких двух инвазивных свойств, как местная инвазия, представленная инвазией в плевру или вторичной инвазией в крупный бронх, определяемой по характеру макроскопического препарата (форме и расположении опухолевого узла), наличию эрозивно-язвенного поражения бронха, и сосудистая инвазия, представленная опухолевыми эмболами и врастанием опухоли в стенку лёгочных сосудов. Наличие обоих признаков полностью совпадало в одних и тех же случаях, что дало возможность сформировать единую группу. Периневральная инвазия не оценивалась из-за технической сложности её оценки в препаратах данной локализации.

Таблица 7.

Сравнение экспрессии маркёров в первичных опухолевых узлах в группе случаев с признаками местной инвазии и сосудистой инвазии (Группа 1) и в группе случаев, не имеющей данных признаков (Группа 2), определяемых иммуногистохимическим методом.

Маркёры	Ki-67	Synaptophysin	CD-56	NSE	Chromogranin A	TTF-1	Ck-8	Ck-18	Ck-7	p40	p63
Группа 1	56,5 ±6,95 *	5,5 ±0,37	5,0 ±0,51	2,0 ±0,60	3,33 ±0,45	4,67 ±0,72	5,35 ±0,33	4,35 ±0,46 *	1,24 ±0,41 *	0	0
Группа 2	45,25 ±7,46 *	5,75 ±0,25	5,13 ±0,50	6,44 ±0,35	3 ±0,42	6,18 ±0,53	6,12 ±0,37	6,06 ±0,26 *	6 ±0,27 *	0	0

* Имеются статистически значимые различия, $p < 0,05$

Исходя из данных, представленных в таблице, можно сделать вывод о наличии статистической значимости различий экспрессии между этими двумя группами (при анализе Манна-Уитни для $p < 0,05$, U-критерий был в маркированных подгруппах меньше табличного значения). Таким образом,

средний уровень экспрессии Ki-67 в группе с наличием названных инвазивных свойств достоверно выше, чем в группе без проявления данных свойств, обратная зависимость наблюдается для маркёров СК-18, СК-7.

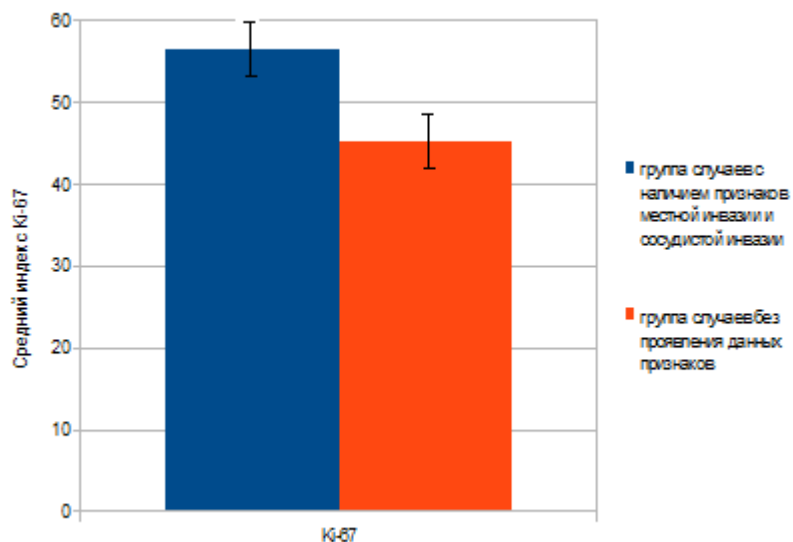


Рис. 18

Диаграмма, иллюстрирующая средний индекс Ki-67 в двух названных группах случаев.

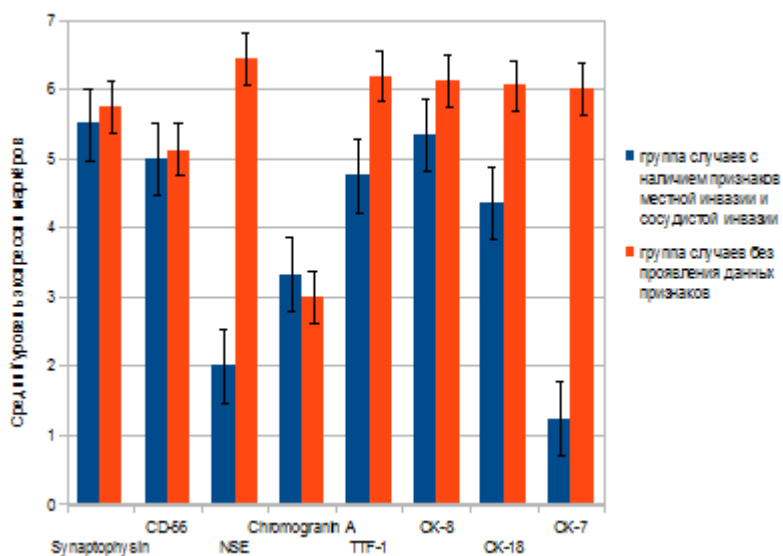


Рис. 19

Диаграмма, иллюстрирующая средний уровень экспрессии выбранных маркёров в двух названных группах случаев.

3.3. Результаты корреляционного анализа иммунофенотипа и инвазивных свойств опухоли в исследуемых группах

Полученные в ходе анализа препаратов данные были подвергнуты корреляционному анализу Спирмена, который проводился в двух вариантах: как на выборке, не включающей случаи с метастазами в лимфатические узлы группы N3, не имеющие препаратов первичного опухолевого узла, так и на выборке всех случаев, включённых в работу

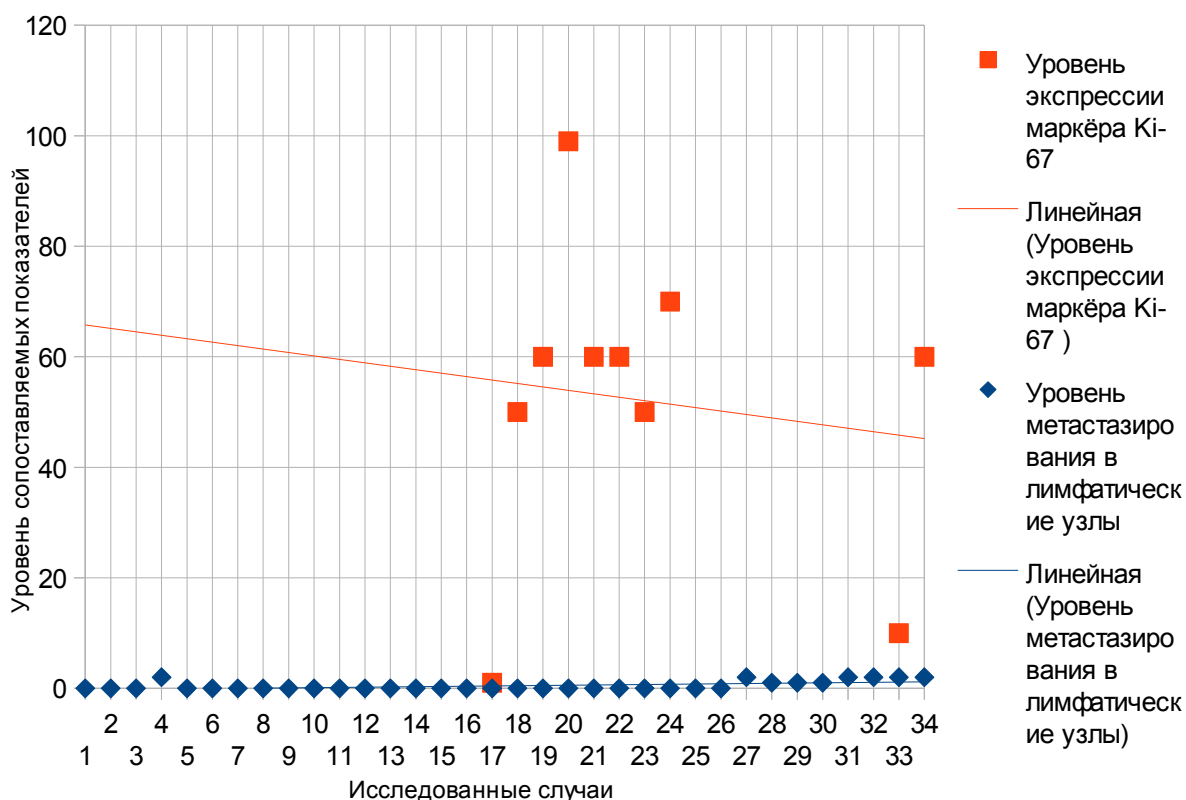


Рис. 20

График корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркёра Ki-67, измеренная случаях только с наличием первичного опухолевого узла.

Коэффициент корреляции Спирмена для данной пары признаков имеет

значение $-0,32$, что говорит об обратной связи между двумя данными явлениями средней степени, что также отображено на представленной ниже диаграмме, на которой определяются противоположные направления приращения площади областей, образованных функциями двух данных явлений.

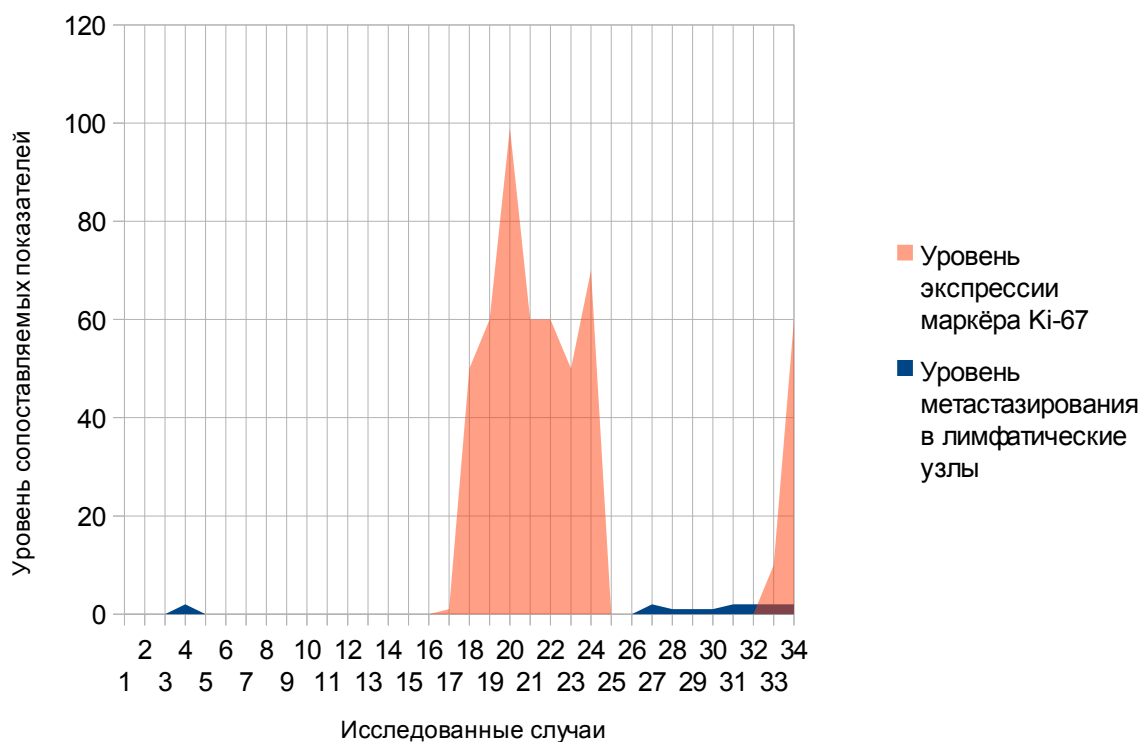


Рис. 21

Диаграмма корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера Ki-67, измеренная только на случаях с наличием первичного опухолевого узла.

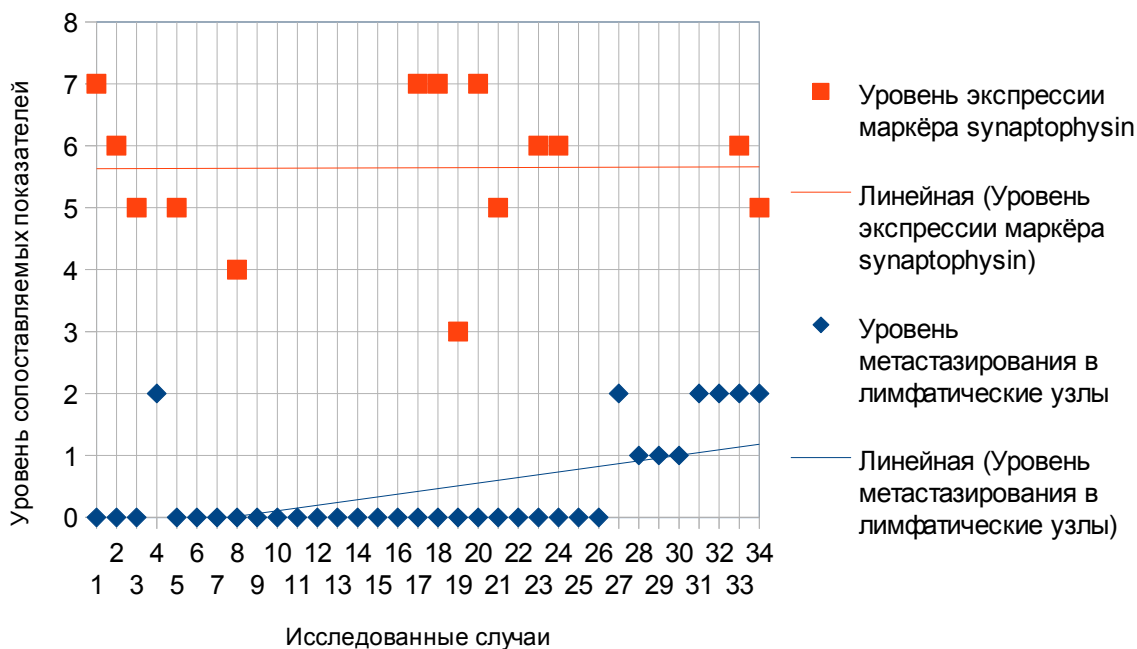


Рис. 22

График корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера Synaptophysin, измеренная только на случаях с наличием первичного опухолевого узла.

Коэффициент корреляции Спирмена для данной пары признаков имеет значение $-0,05$, что говорит о практически отсутствующей связи между двумя данными явлениями, что также видно из представленной ниже диаграммы, на которой участки с противоположным направлением приращения площади областей, образованных функциями двух данных явлений, чередуются с частичным перекрытием областей.

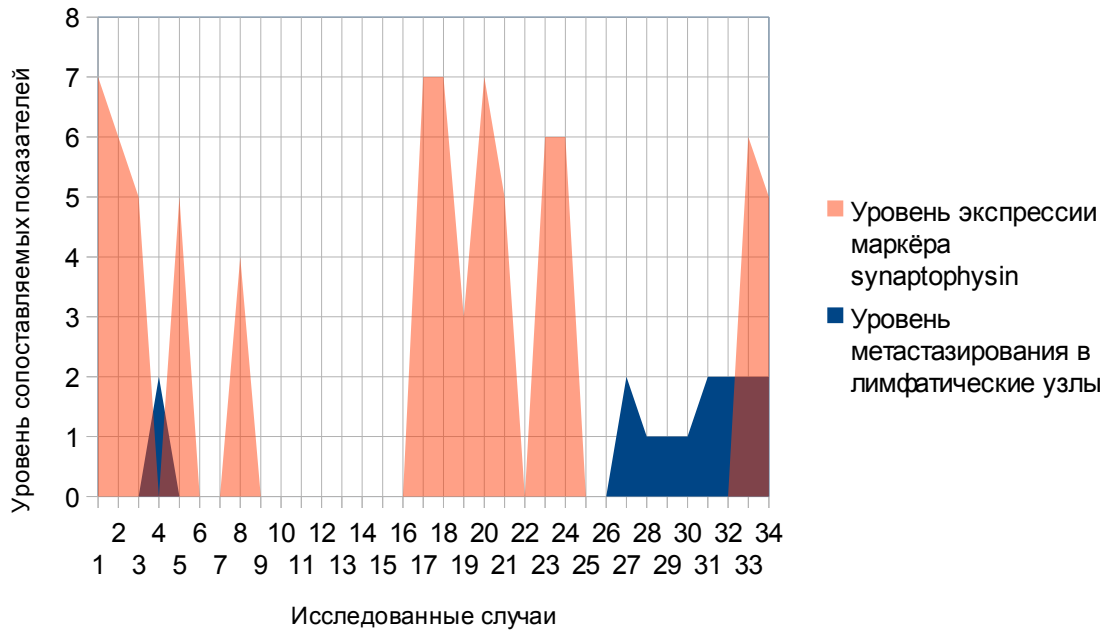


Рис. 23

Диаграмма корреляция степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера Synaptophysin, измеренная только на случаях с наличием первичного опухолевого узла.

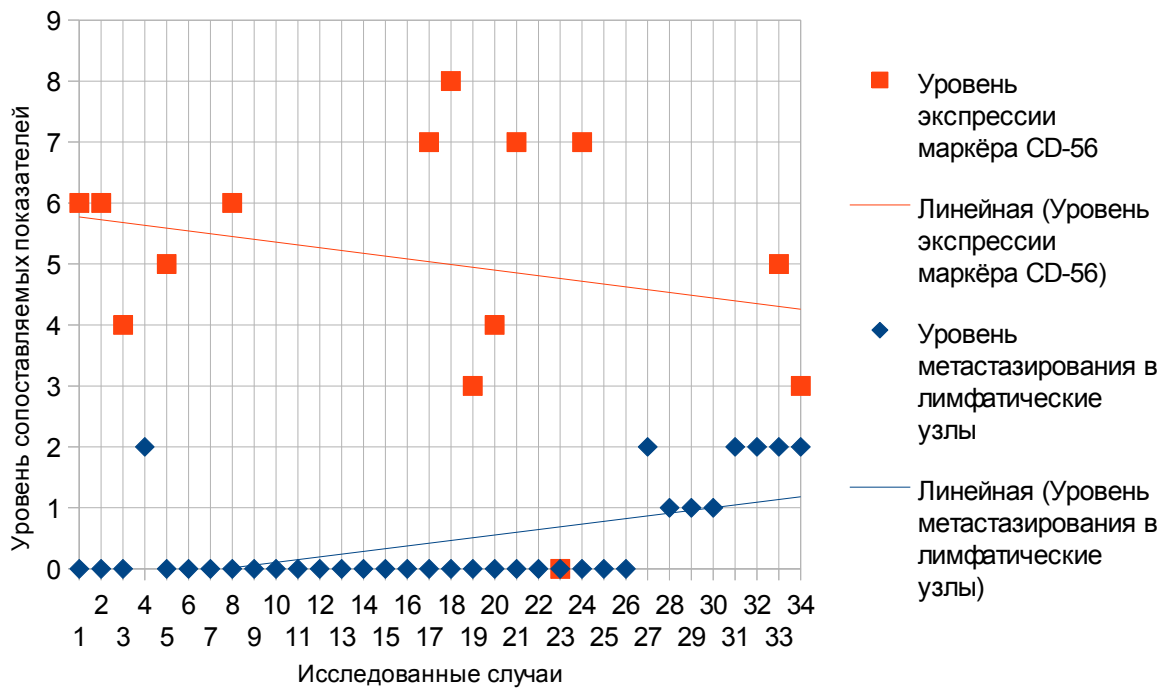


Рис. 24

График корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера CD-56, измеренная на случаях с наличием первичного опухолевого узла.

Коэффициент корреляции Спирмена для данной пары признаков имеет значение $-0,21$, что говорит о слабой обратной связи между двумя данными явлениями, что также отображено на представленной ниже диаграмме, на которой имеются противоположные направления приращения площади областей, образованных функциями двух данных явлений.

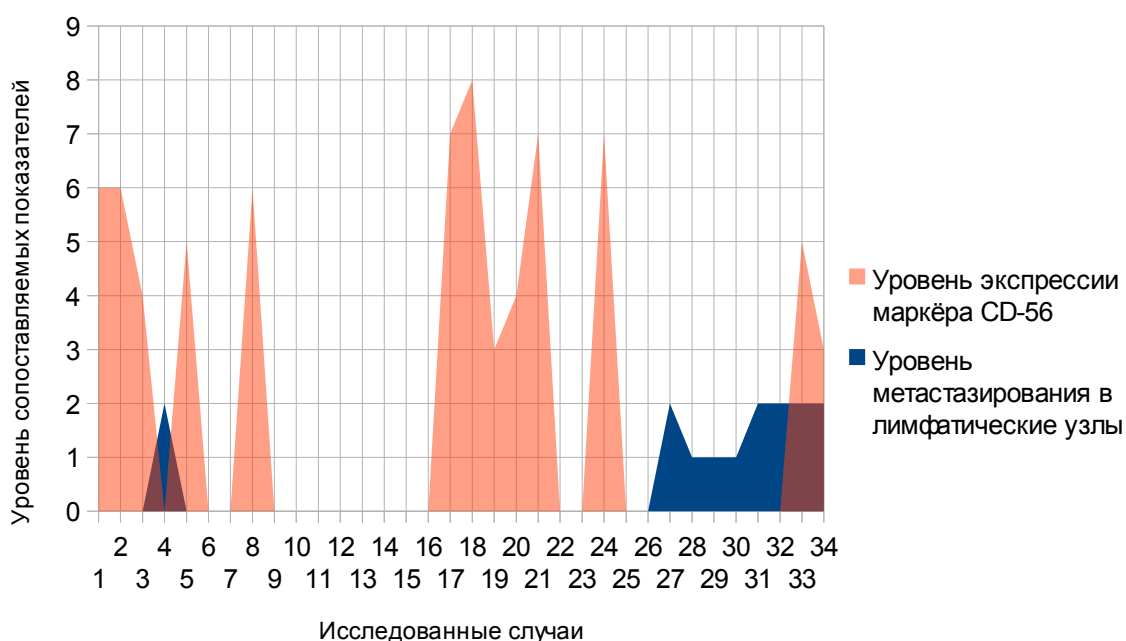


Рис. 25

Диаграмма корреляция степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера CD-56, измеренная только на случаях с наличием первичного опухолевого узла.

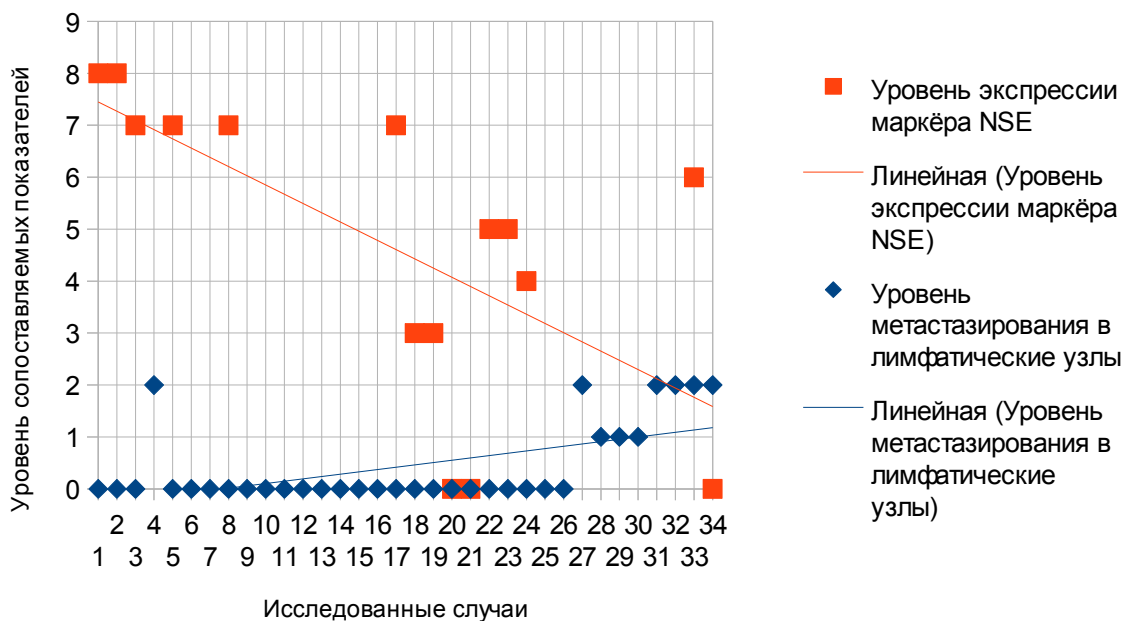


Рис. 26

График корреляция степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера NSE, измеренная на случаях с наличием первичного опухолевого узла.

Коэффициент корреляции Спирмена для данной пары признаков имеет значение $-0,23$, что говорит о слабой обратной связи между двумя данными явлениями, как и в предыдущем случае, что также отображено на представленной ниже диаграмме, на которой определяются противоположные направления приращения площади областей, образованных функциями двух данных явлений.

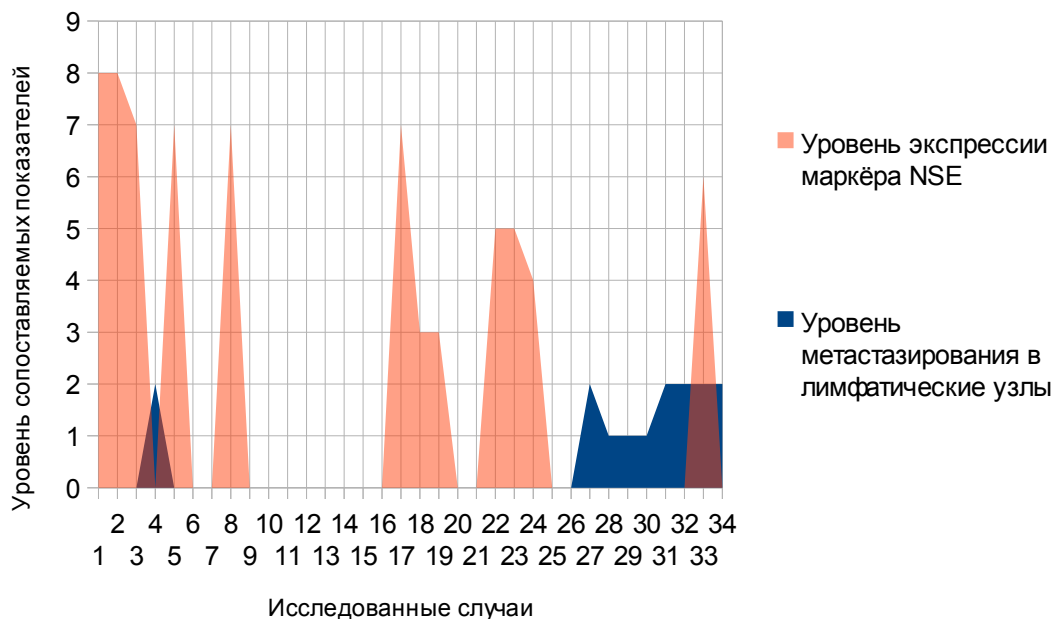


Рис. 27

Диаграмма корреляция степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера NSE, измеренная только на случаях с наличием первичного опухолевого узла.

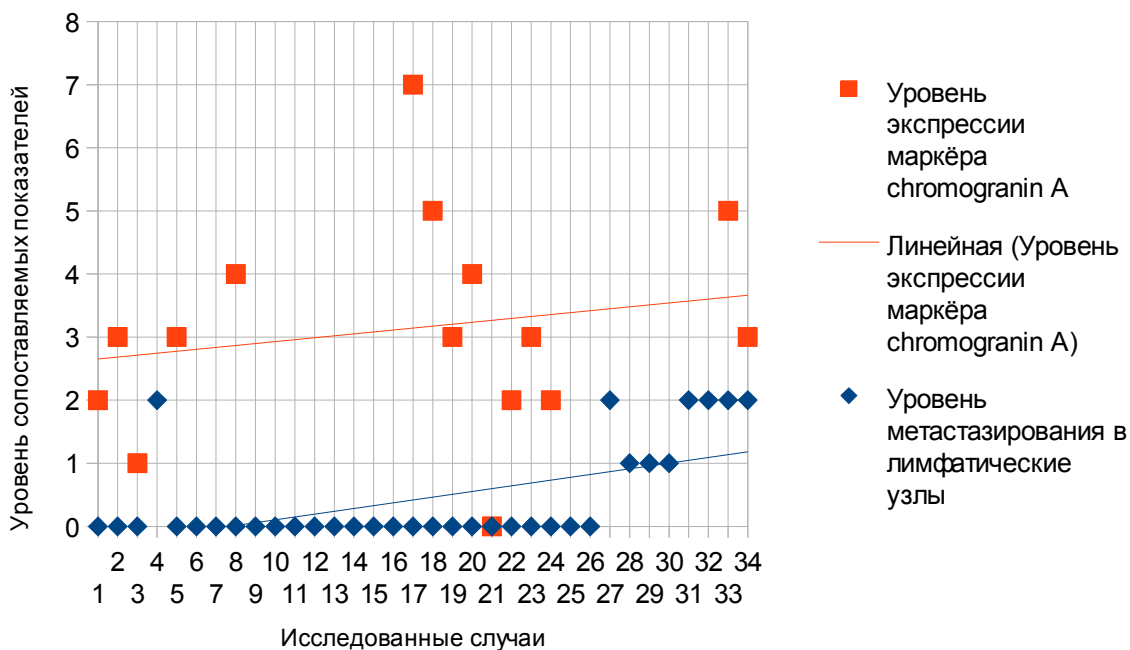


Рис. 28

График корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера Chromogranin A, измеренная на случаях с наличием первичного опухолевого узла.

Коэффициент корреляции Спирмена для данной пары признаков имеет значение 0,20, что говорит о слабой прямой связи между двумя данными явлениями, что также отображено на представленной ниже диаграмме, на которой имеется незначительное количество участков с общим направлением приращения площади областей, образованных функциями двух данных явлений.

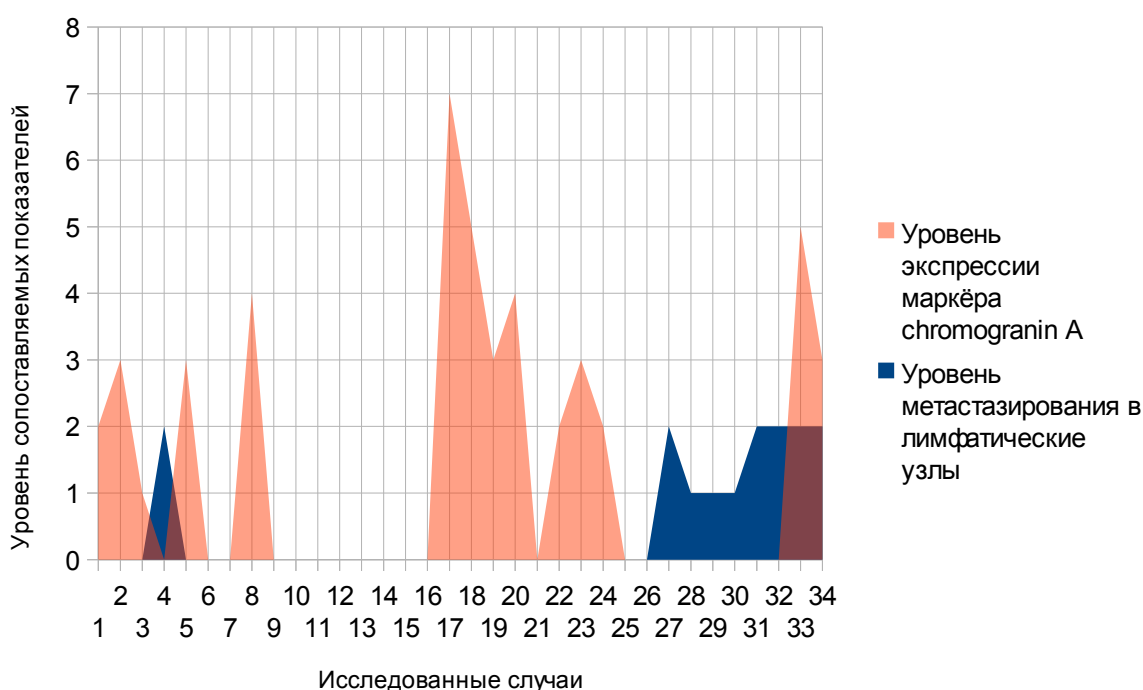


Рис. 29

Диаграмма корреляция степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера Chromogranin A, измеренная только на случаях с наличием первичного опухолевого узла.

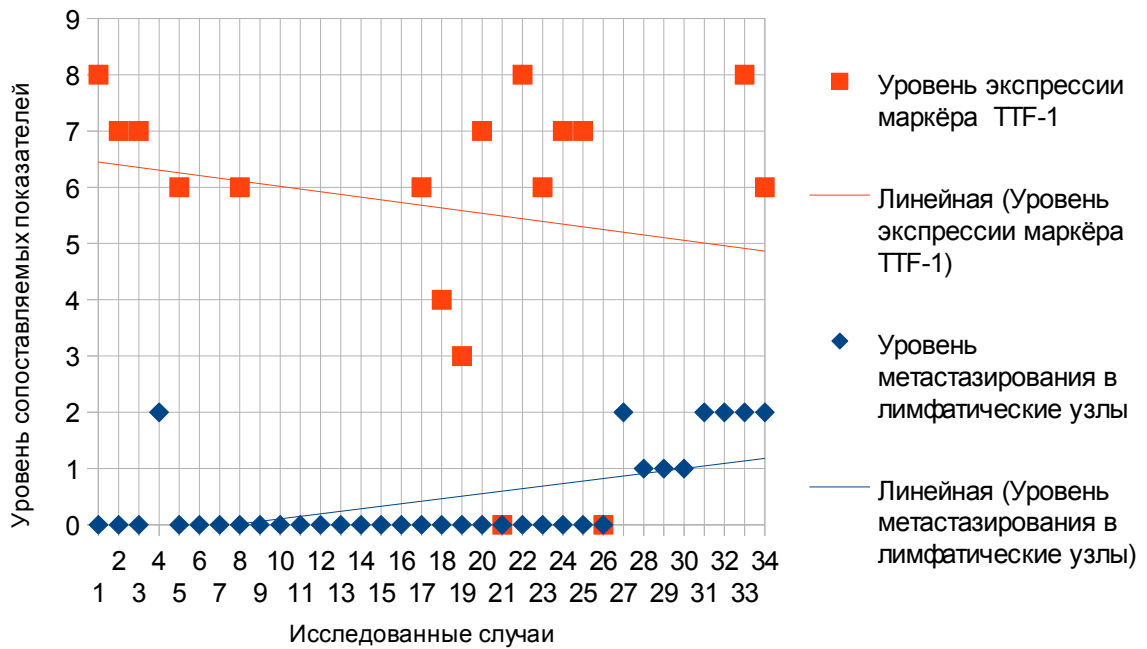


Рис. 30

График корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера ТТФ-1, измеренная только на случаях с наличием первичного опухолевого узла.

Коэффициент корреляции Спирмена для данной пары признаков имеет значение 0,20, как и в предыдущем случае, что говорит о слабой прямой связи между двумя данными явлениями, что также видно на представленной ниже диаграмме, на которой определяется незначительное количество участков с общим направлением приращения площади областей, образованных функциями двух данных явлений.

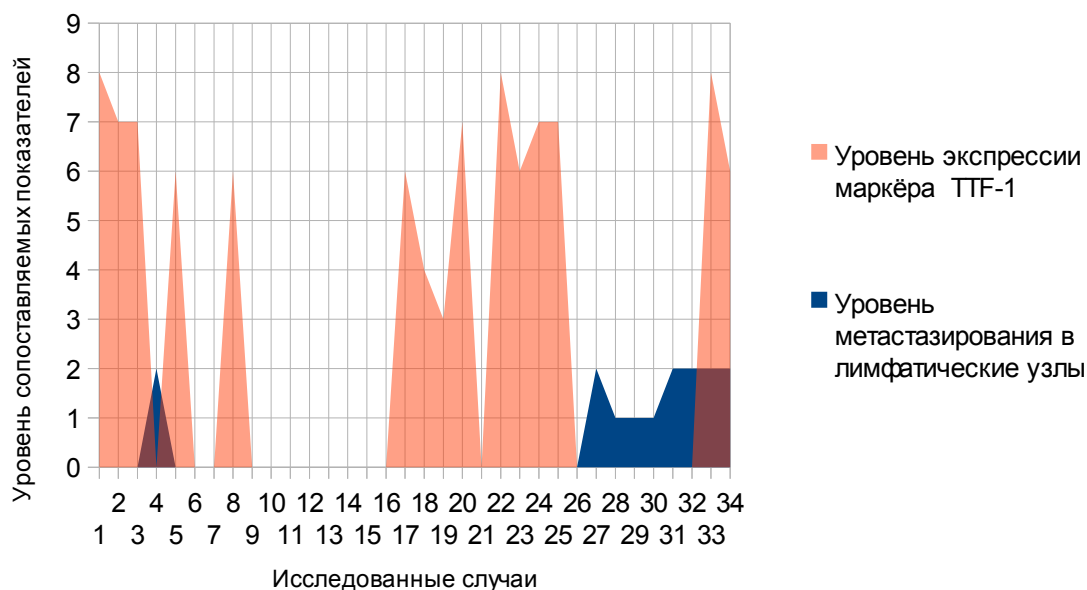


Рис. 31

Диаграмма корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера ТТФ-1, измеренная только на случаях с наличием первичного опухолевого узла.

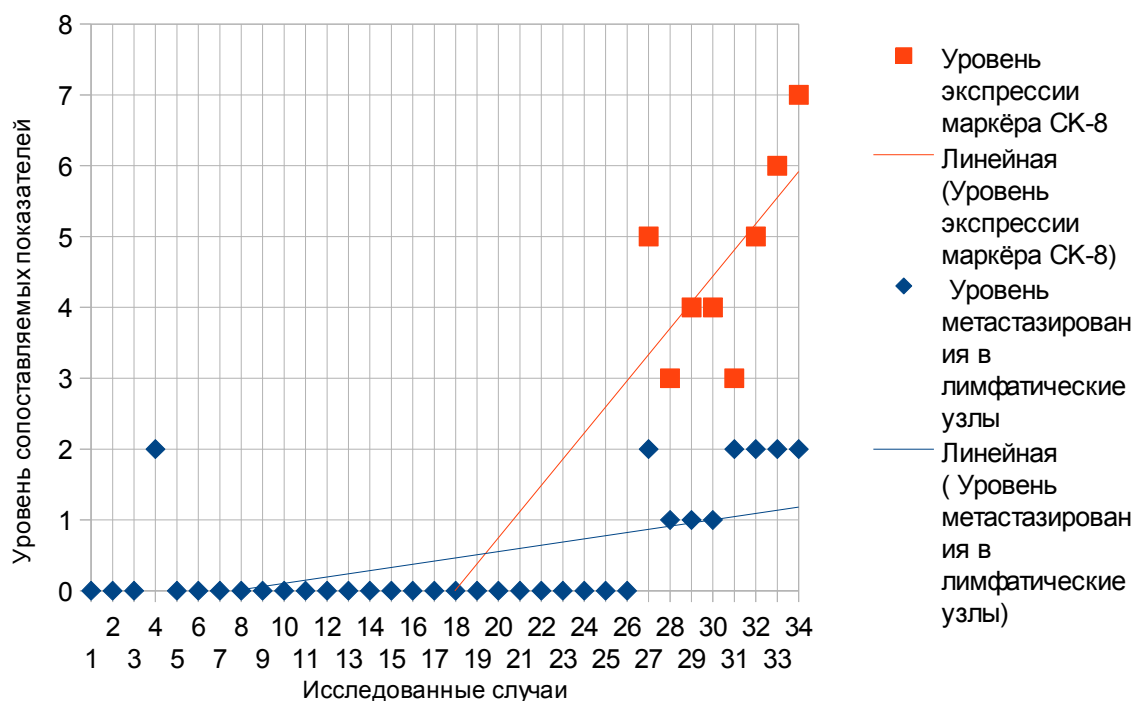


Рис. 32

График корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера Ск-8, измеренная только на случаях с наличием

первичного опухолевого узла.

На графике корреляции двух данных явлений имеется область общего расположения точек, отображающих значения данных признаков. Коэффициент корреляции Спирмена для данной пары признаков имеет значение 0,56, что говорит о прямой связи между двумя данными явлениями средней степени, что также видно на представленной ниже диаграмме, на которой имеются участки областей, образованных функциями двух данных явлений, имеющие общее направление приращения площади.

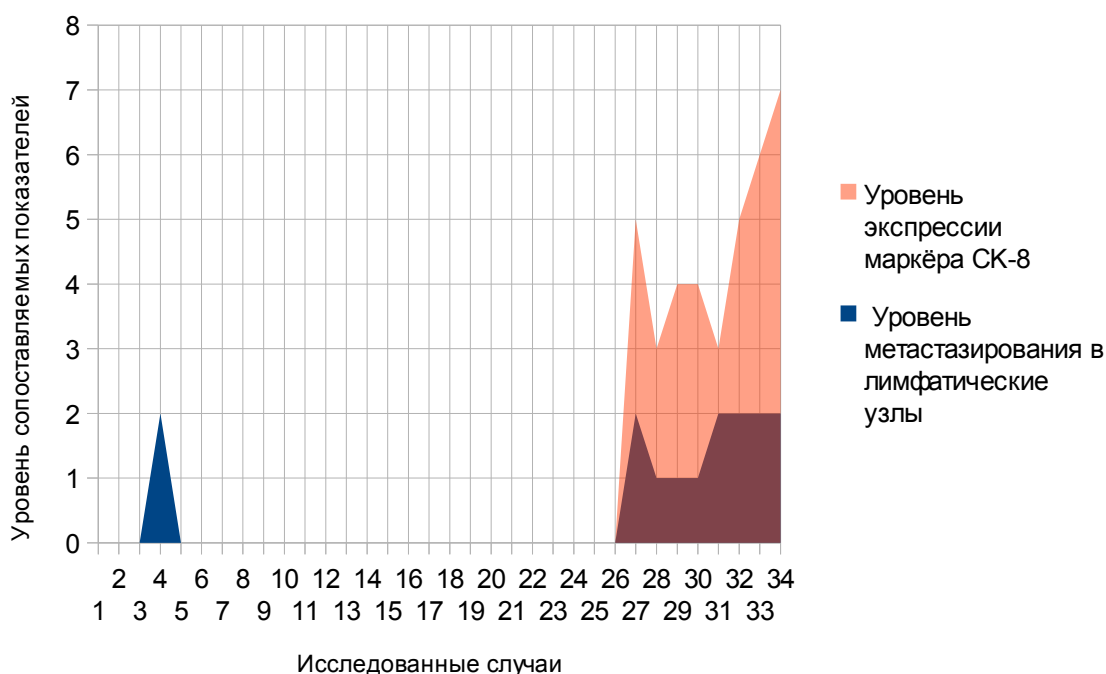


Рис. 33

Диаграмма корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера Ск-8, измеренная только на случаях с наличием первичного опухолевого узла.

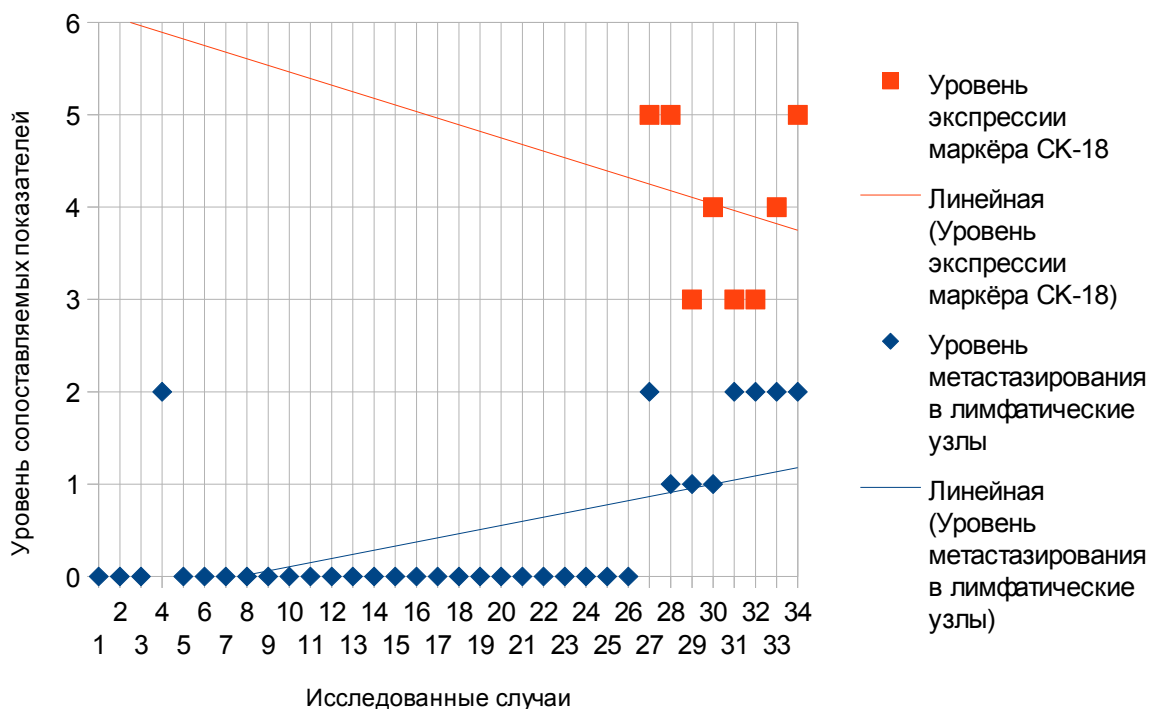


Рис. 34

График корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера Ск-18, измеренная только на случаях с наличием первичного опухолевого узла.

Коэффициент корреляции Спирмена для данной пары признаков имеет значение 0, что говорит об отсутствии связи между двумя данными явлениями. Данный результат также определяется как на графике корреляции в виде минимально синхронизированного расположения точек, отображающих значение признаков, так и на приведённой ниже диаграмме, на которой участки синхронного возрастания чередуются с участками противоположного направления приращения площади областей, образованных функциями двух данных параметров.

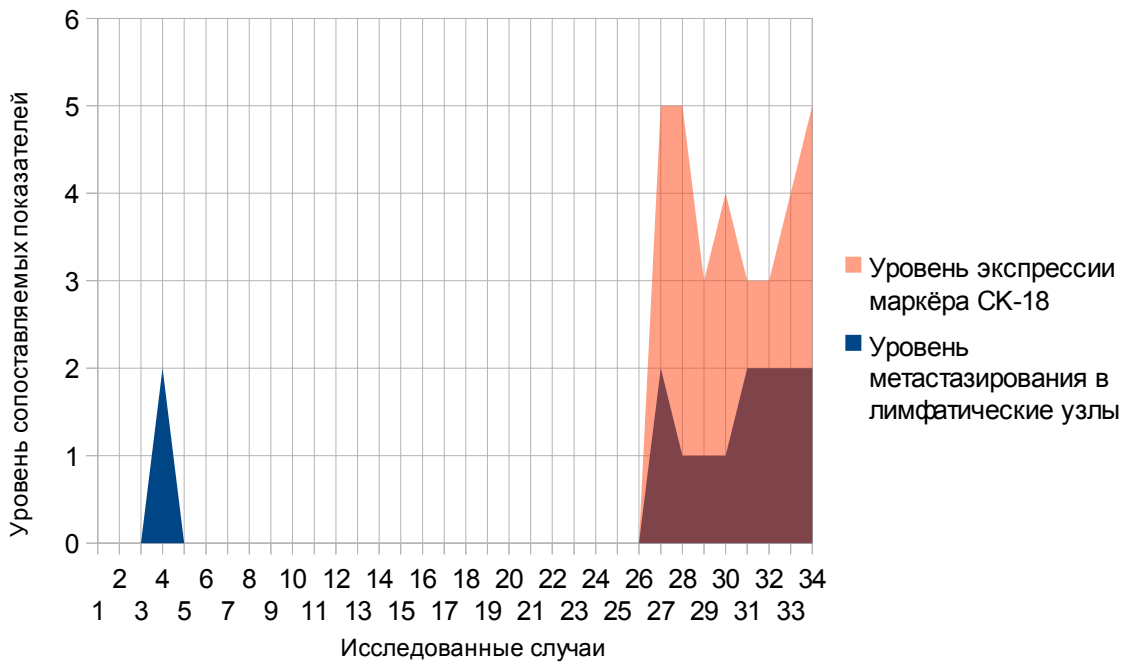


Рис. 35

Диаграмма корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера Ск-18, измеренная только на случаях с наличием первичного опухолевого узла.

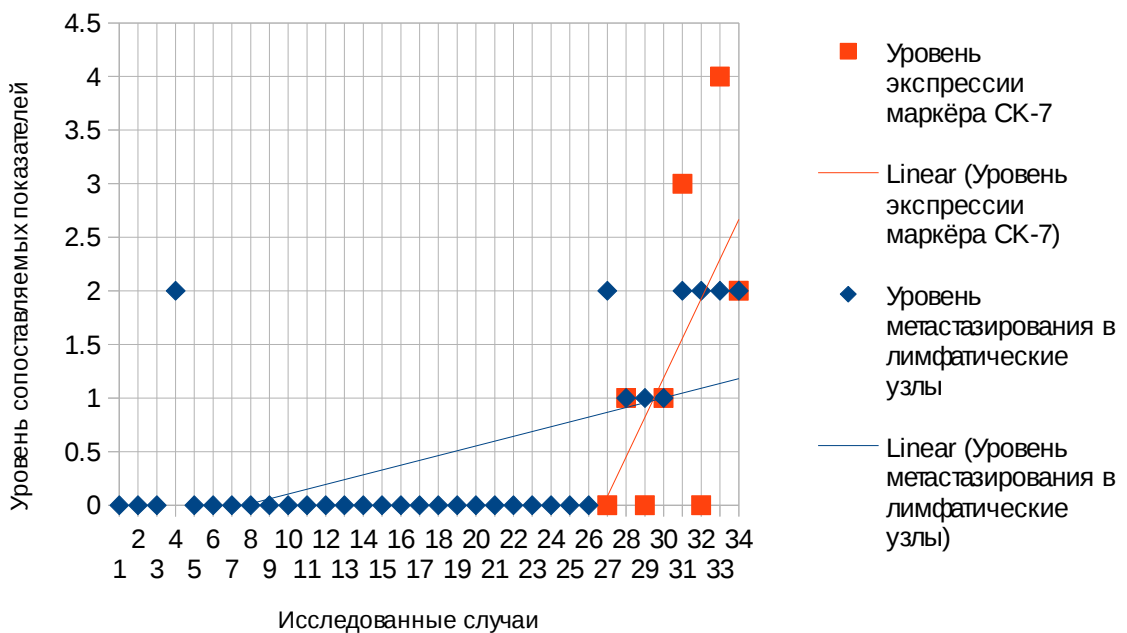


Рис. 36

График корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера Ск-7, измеренная только на случаях с наличием первичного опухолевого узла.

На графике корреляции двух данных явлений имеется область общего расположения точек, отображающих значения данных признаков. Коэффициент корреляции Спирмена для данной пары признаков имеет значение 0,39, что говорит о прямой связи между двумя данными явлениями средней степени, что также видно на представленной ниже диаграмме, на которой имеются участки перекрывания областей, образованных функциями двух данных явлений, которые в ряде случаев имеют общее направление приращения площади.

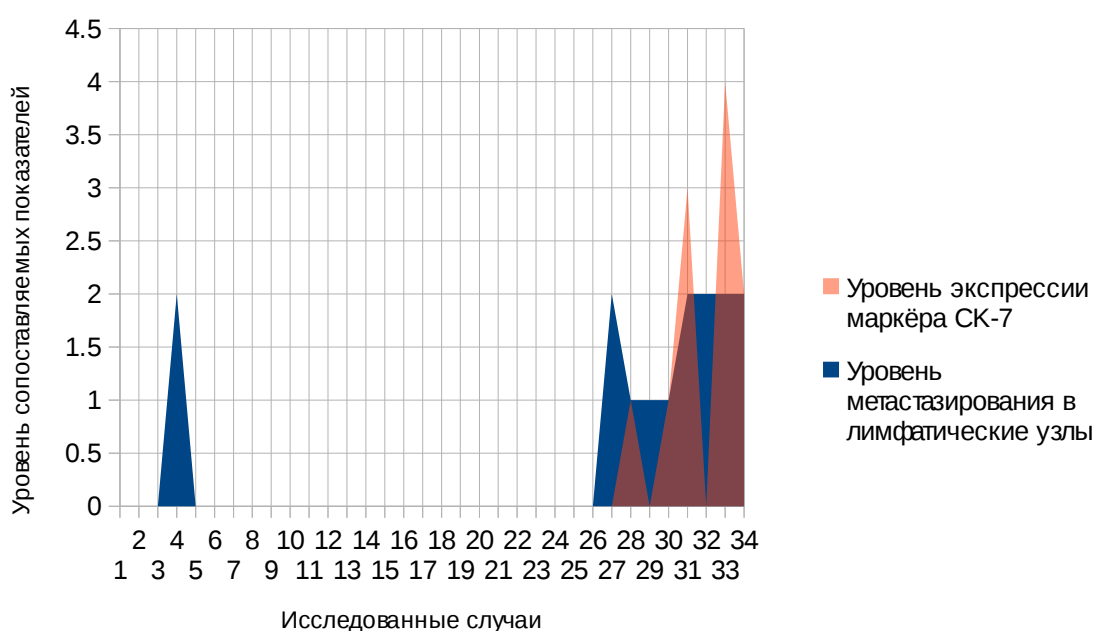


Рис. 37

Диаграмма корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера Ск-7, измеренная только на случаях с наличием первичного опухолевого узла.

Далее для дополнительной репрезентативности представлены показатели корреляции уровня метастазирования включая группу случаев с

метастазами во внутригрудных лимфатических узлах, не имеющих препарата первичной опухоли.

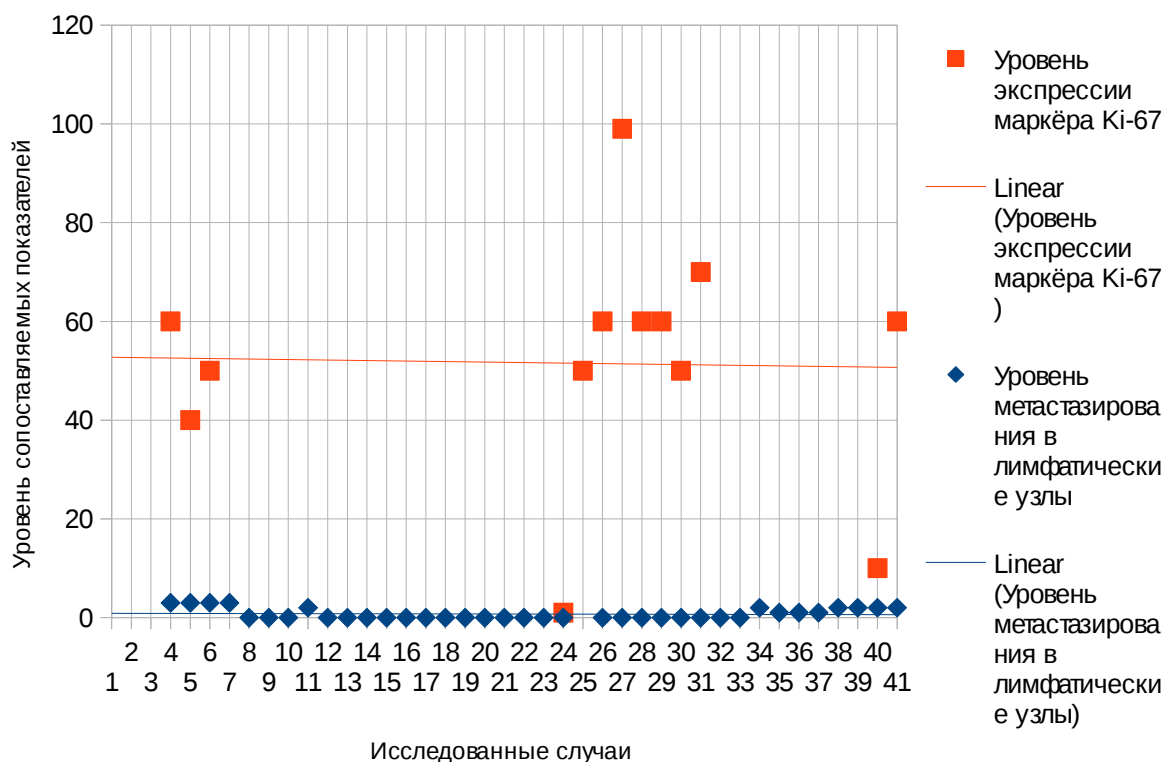


Рис. 38

График корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера Ki-67, измеренная на случаях с наличием первичного опухолевого узла и с метастазами в лимфатические узлы группы N3.

Коэффициент корреляции Спирмена для данной пары признаков имеет значение $-0,21$, что говорит о слабой обратной связи между данными явлениями, что также видно из представленной ниже диаграммы, на которой видно минимальное перекрытие областей, образованных функциями двух данных явлений.

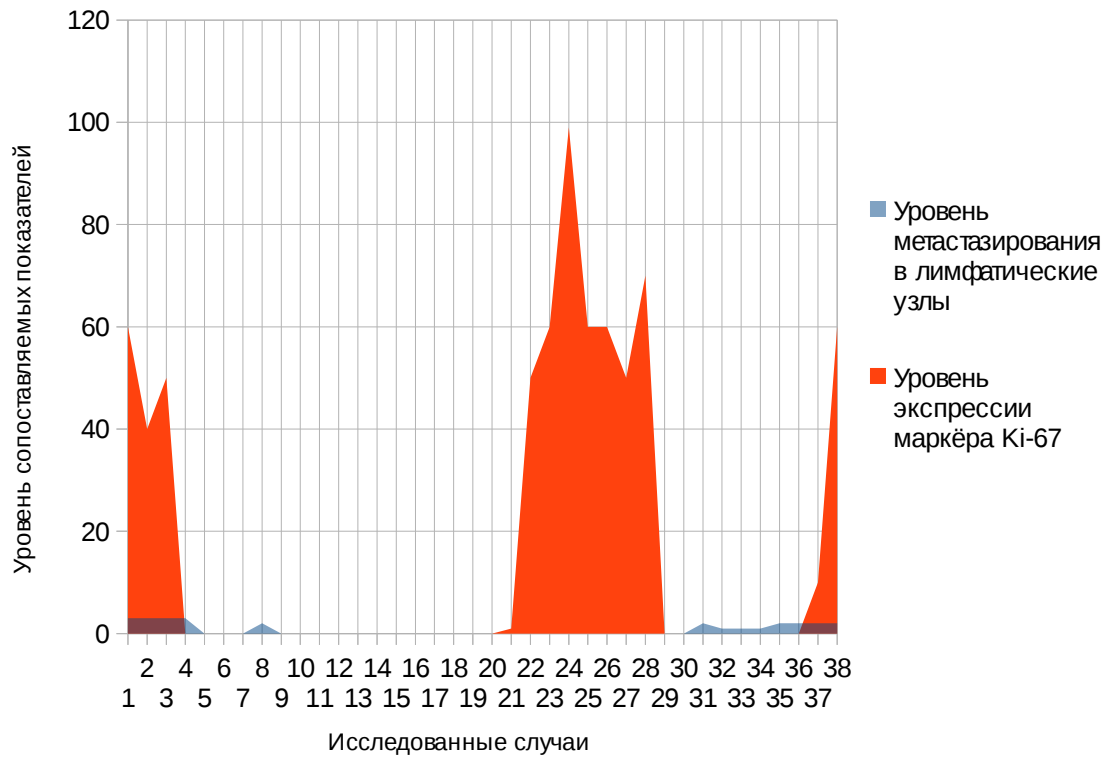


Рис. 39

Диаграмма корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера Ki-67, измеренная на случаях с наличием первичного опухолевого узла и с метастазами в лимфатические узлы группы N3.

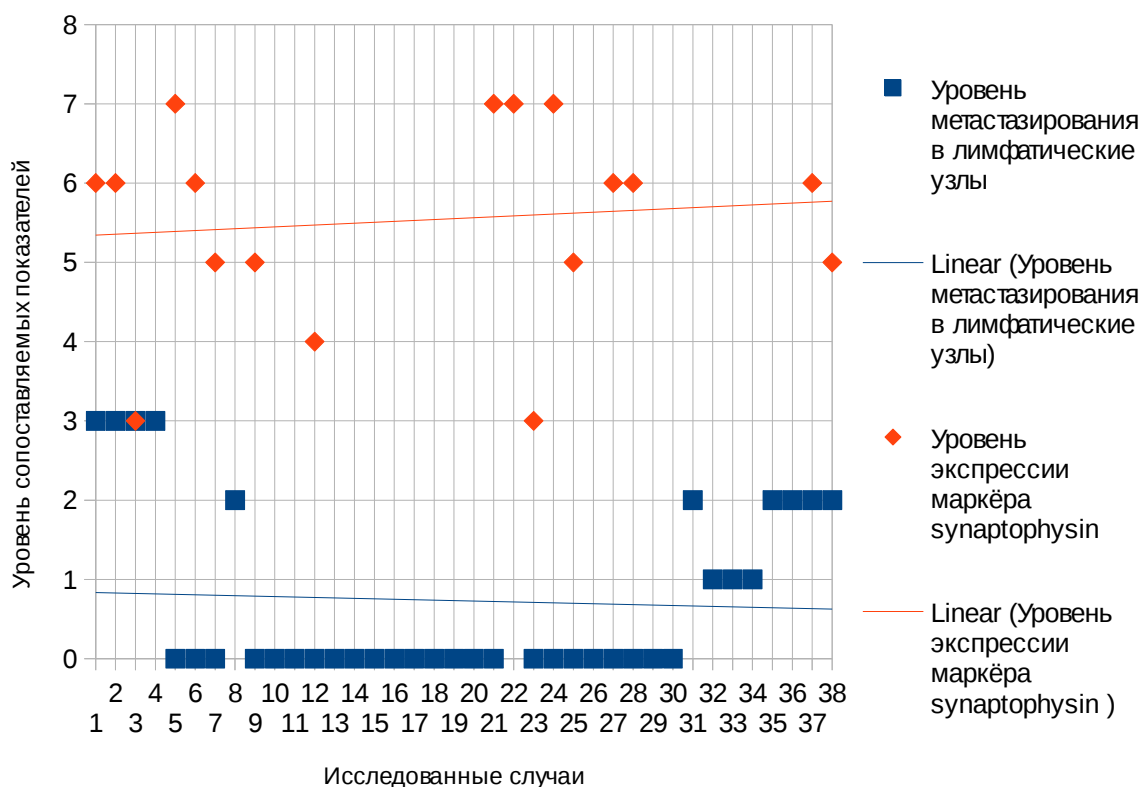


Рис. 40

График корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера Synaptophysin, измеренная на случаях с наличием первичного опухолевого узла и с метастазами в лимфатические узлы группы N3.

Коэффициент корреляции Спирмена для данной пары признаков имеет значение $-0,15$, что говорит о слабой обратной связи между двумя данными явлениями, что также отображено на представленной ниже диаграмме, на которой видно минимальное перекрывание областей, образованных функциями этих явлений.

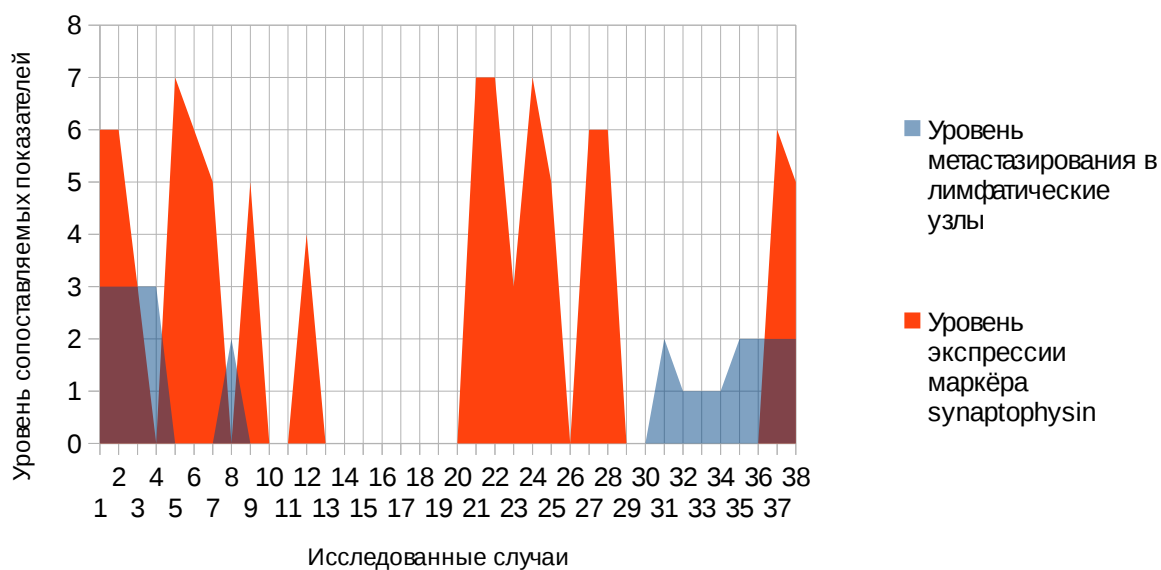


Рис. 41

Диаграмма корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера Synaptophysin, измеренная на случаях с наличием первичного опухолевого узла и с метастазами в лимфатические узлы группы N3.

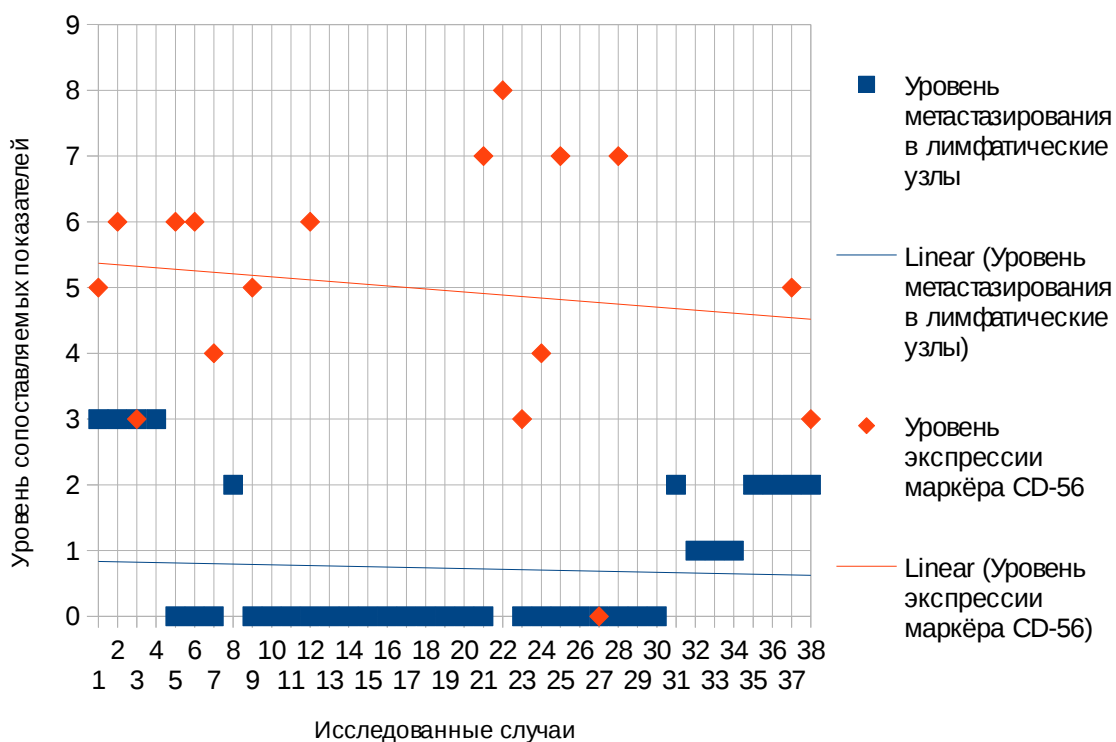


Рис. 42

График корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера CD-56, измеренная на случаях с наличием первичного опухолевого узла и с метастазами в лимфатические узлы группы N3.

Коэффициент корреляции Спирмена для данной пары признаков имеет значение $-0,13$, что говорит о слабой обратной связи между двумя данными явлениями, что также следует из приведённой ниже диаграммы, на которой определяется минимальное перекрытие областей, образованных функциями двух данных параметров.

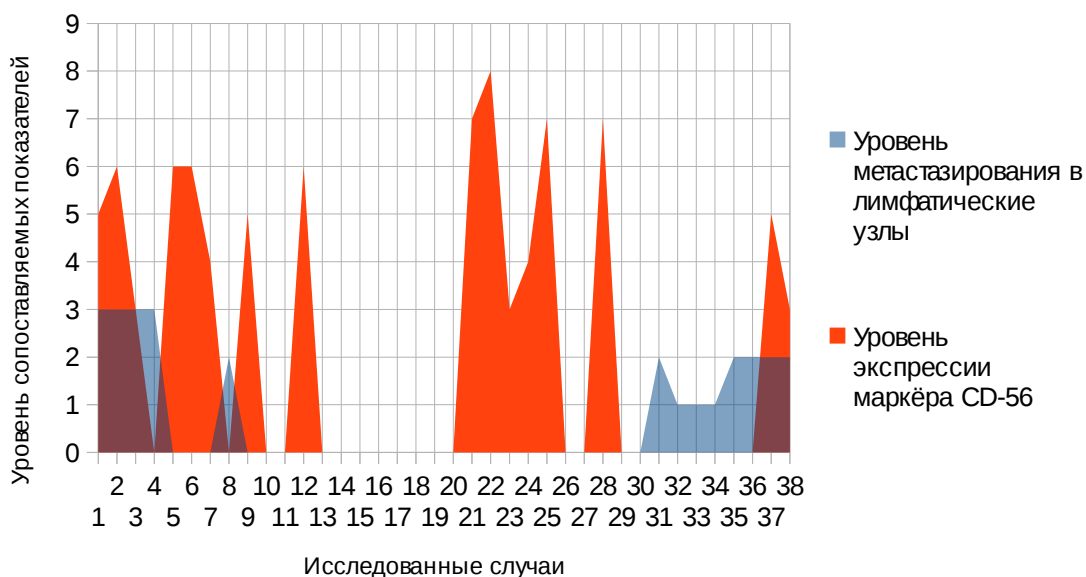


Рис. 43

Диаграмма корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера CD-56, измеренная на случаях с наличием первичного опухолевого узла и с метастазами в лимфатические узлы группы N3.

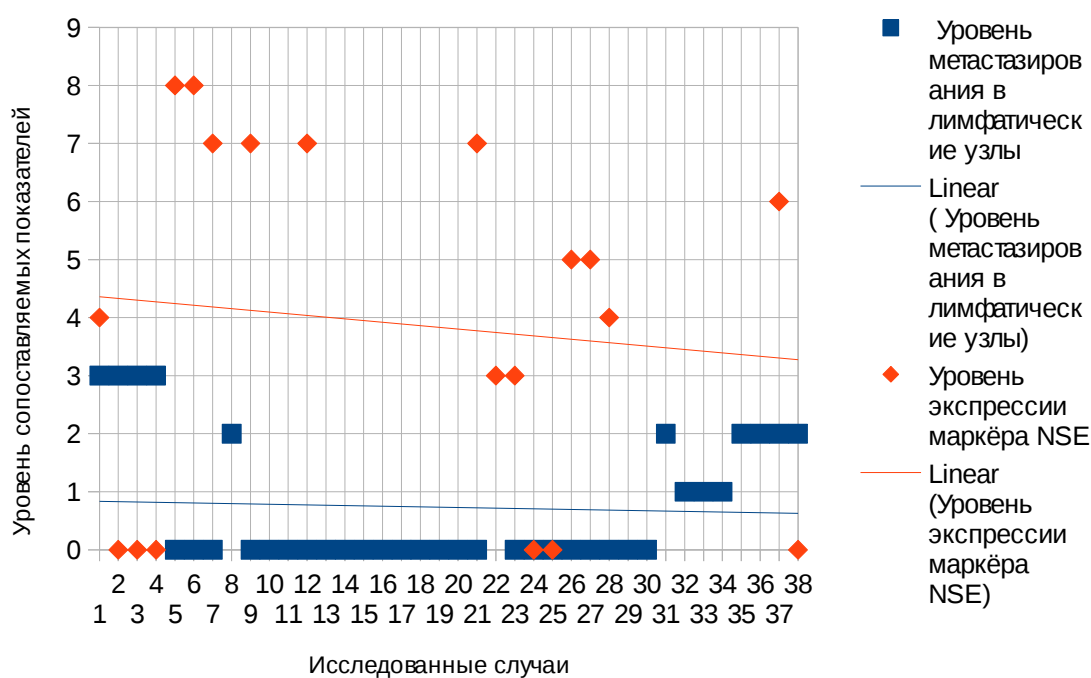


Рис. 44

График корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера NSE, измеренная на случаях с наличием первичного опухолевого узла и с метастазами в лимфатические узлы группы N3.

Линии тренда двух данных явлений имеют разную величину угла наклона. Коэффициент корреляции Спирмена для данной пары признаков имеет значение $-0,55$, что говорит об обратной связи между двумя данными явлениями средней степени, что также отображено на представленной ниже диаграмме, на которой определяются противоположные направления заполнения областей, образованных функциями двух данных явлений.

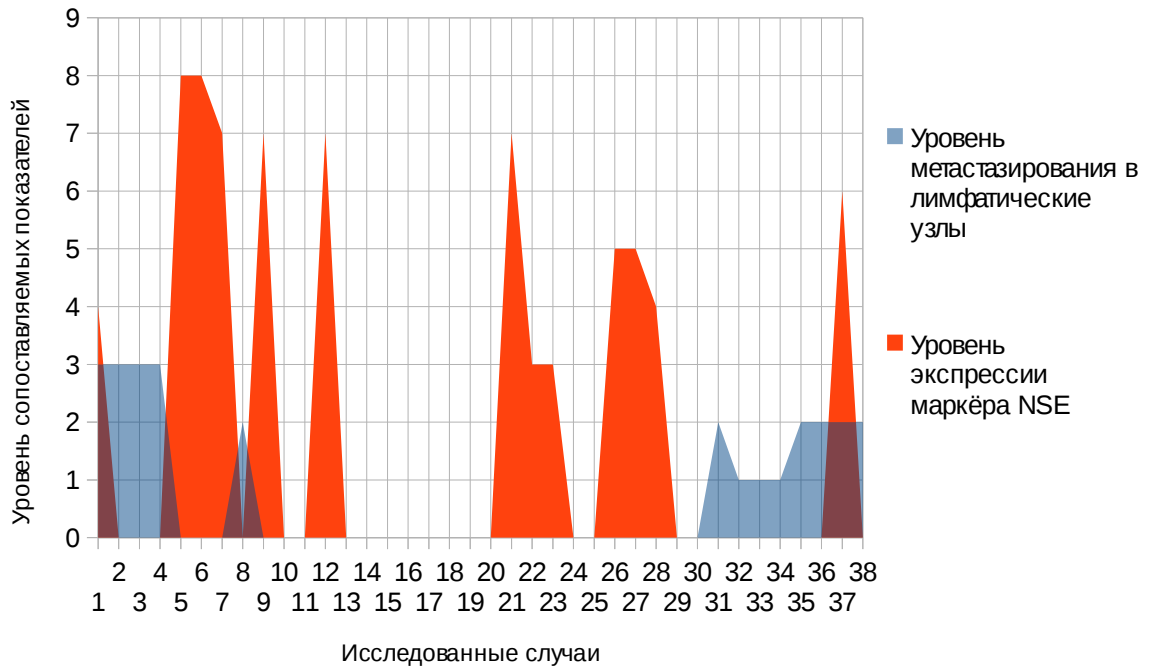


Рис. 45

Диаграмма корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера NSE, измеренная на случаях с наличием первичного опухолевого узла и с метастазами в лимфатические узлы группы N3.

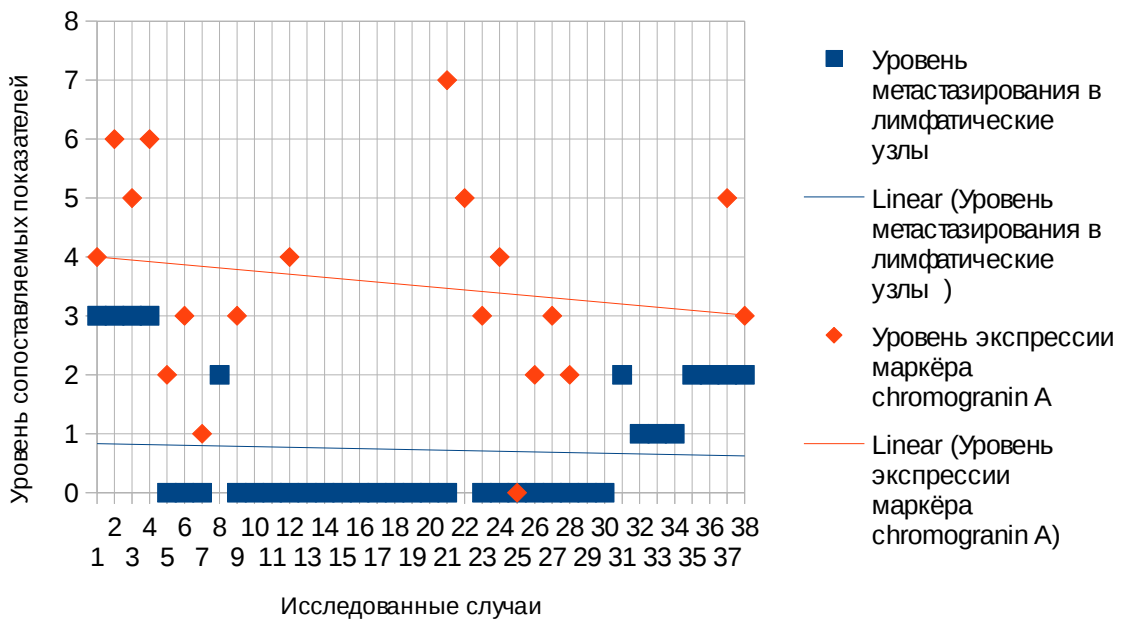


Рис. 46

График корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера Chromogranin A, измеренная на случаях с наличием первичного опухолевого узла и с метастазами в лимфатические узлы группы N3.

Линии тренда двух данных явлений имеют близкий угол наклона. Коэффициент корреляции Спирмена для данной пары признаков имеет значение 0,6, что говорит о прямой связи между двумя данными явлениями средней степени, что также отображено на представленной ниже диаграмме, на которой имеются участки перекрытия областей, образованных функциями двух данных явлений.

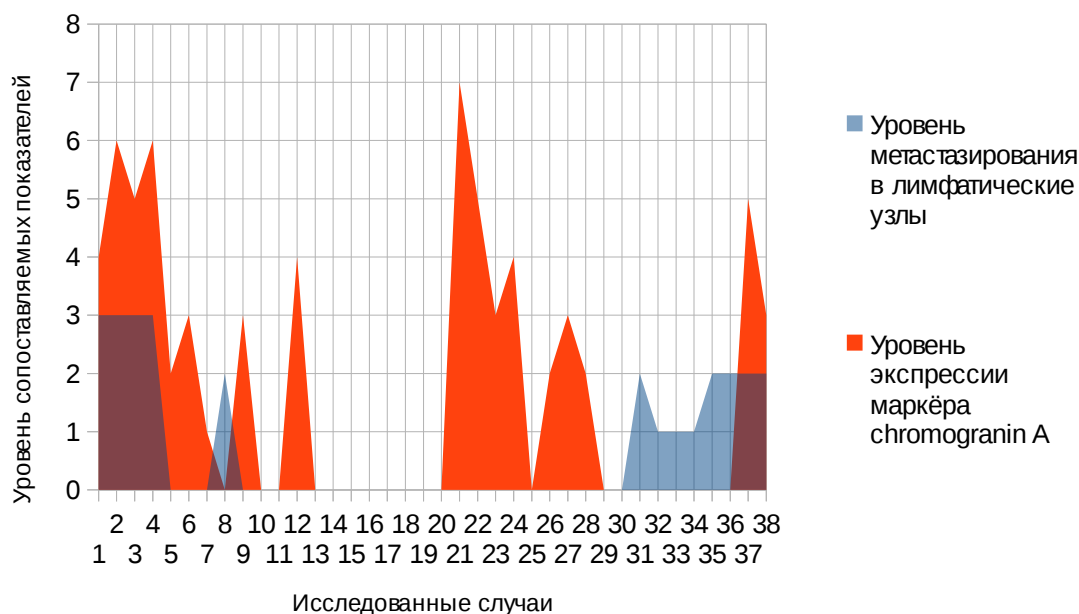


Рис. 47

Диаграмма корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера Chromogranin A, измеренная на случаях с наличием первичного опухолевого узла и с метастазами в лимфатические узлы группы N3.

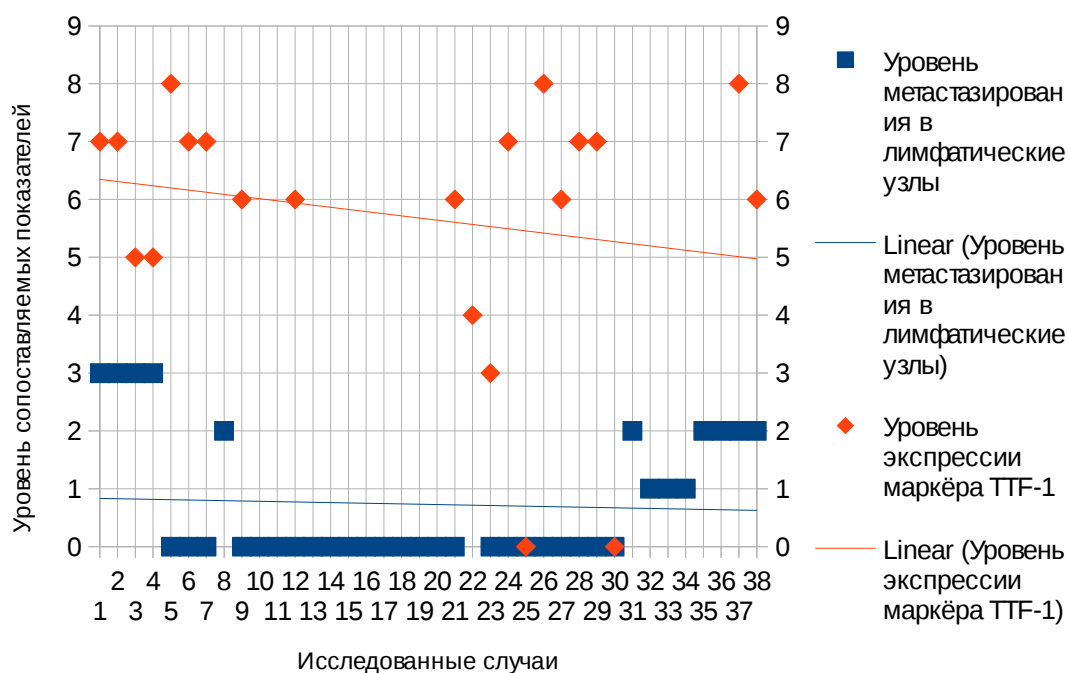


Рис. 48

График корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера TTF-1, измеренная на случаях с наличием первичного опухолевого узла и с метастазами в лимфатические узлы группы N3.

Коэффициент корреляции Спирмена для данной пары признаков имеет значение 0,13, что говорит о слабой прямой связи между двумя данными явлениями, что также следует из приведённой ниже диаграммы, на которой определяется минимальное перекрытие областей, образованных функциями двух данных параметров.

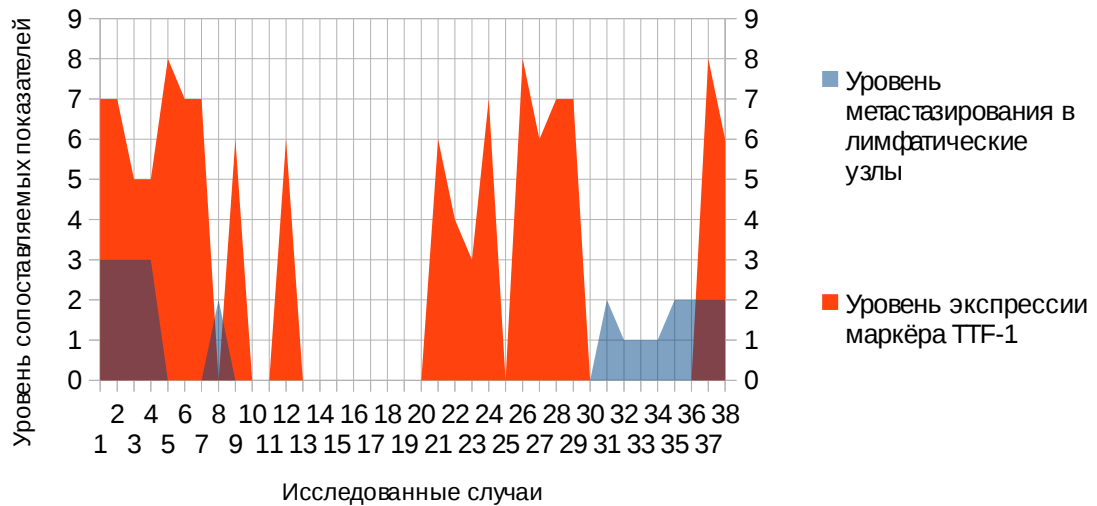


Рис. 49

Диаграмма корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера TTF-1, измеренная на случаях с наличием первичного опухолевого узла и с метастазами в лимфатические узлы группы N3.

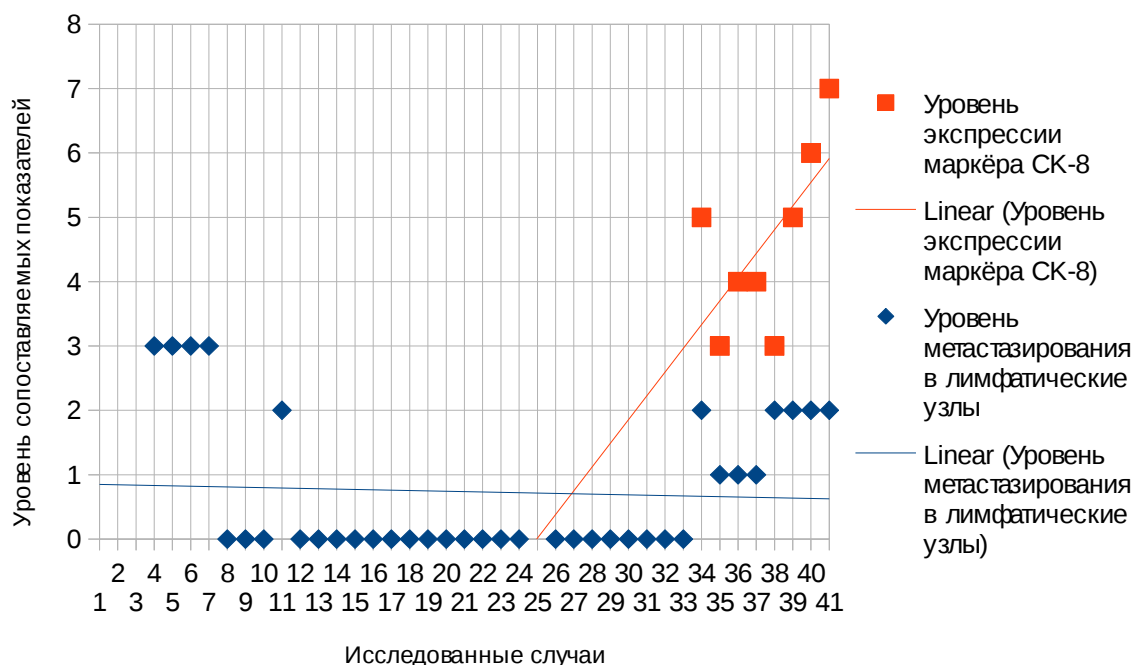


Рис. 50

График корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера CK-8, измеренная на случаях с наличием первичного

опухолевого узла и с метастазами в лимфатические узлы группы N3.

Линии тренда двух данных явлений имеют общее направление угла наклона. Коэффициент корреляции Спирмена для данной пары признаков имеет значение 0,56, что говорит о прямой связи между двумя данными явлениями средней степени, что также видно на представленной ниже диаграмме, на которой имеются участки областей, образованных функциями двух данных явлений, растущие синхронно.

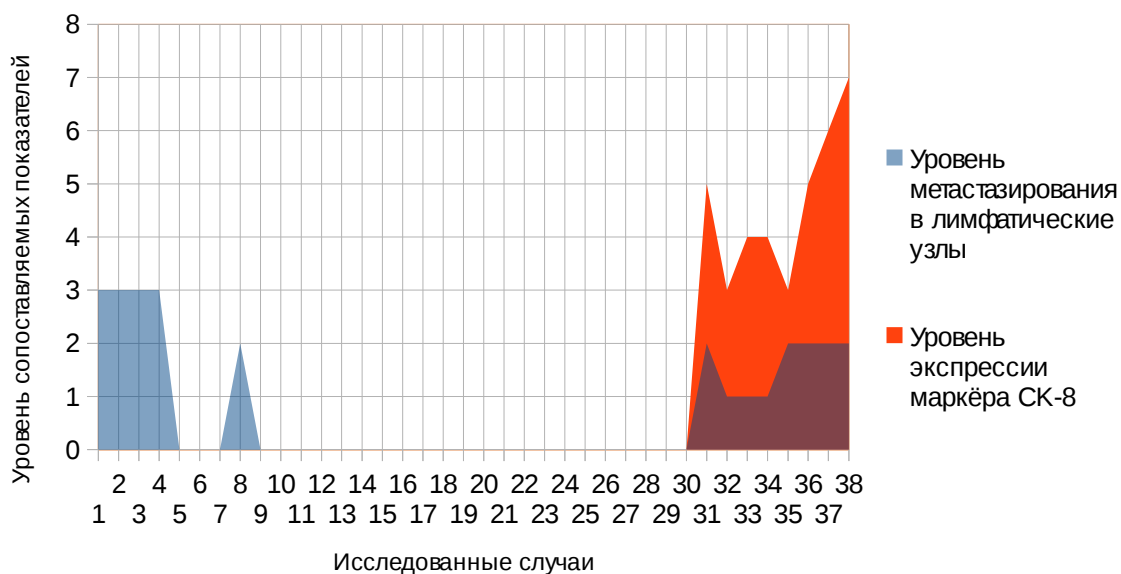


Рис. 51

Диаграмма корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера Ск-8, измеренная на случаях с наличием первичного опухолевого узла и с метастазами в лимфатические узлы группы N3.

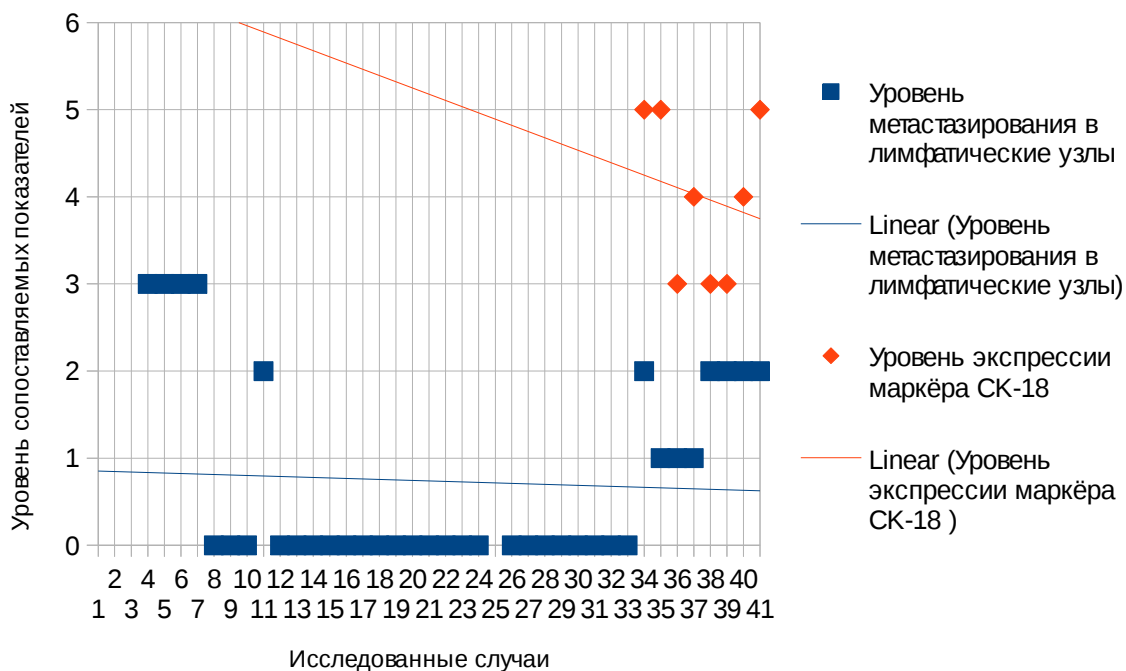


Рис. 52

График корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера Ск-18, измеренная на случаях с наличием первичного опухолевого узла и с метастазами в лимфатические узлы группы N3.

Коэффициент корреляции Спирмена для данной пары признаков имеет значение 0, что говорит об отсутствии связи между двумя данными явлениями. На приведённой ниже диаграмме участки синхронного возрастания чередуются с участками противоположного направления движения областей, образованных функциями двух данных параметров.

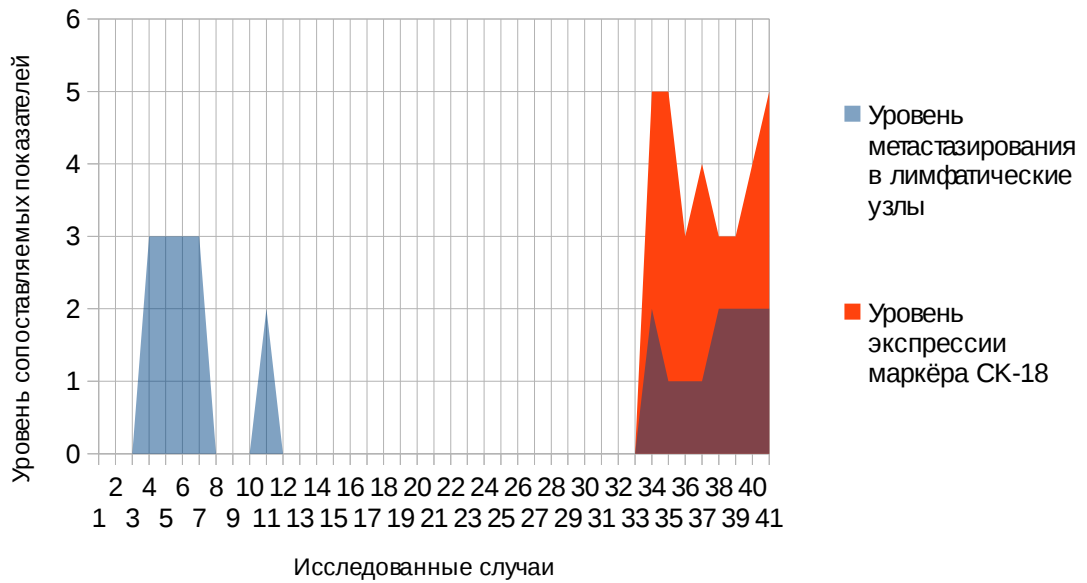


Рис. 53

График корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера Ск-18, измеренная на случаях с наличием первичного опухолевого узла и с метастазами в лимфатические узлы группы N3.

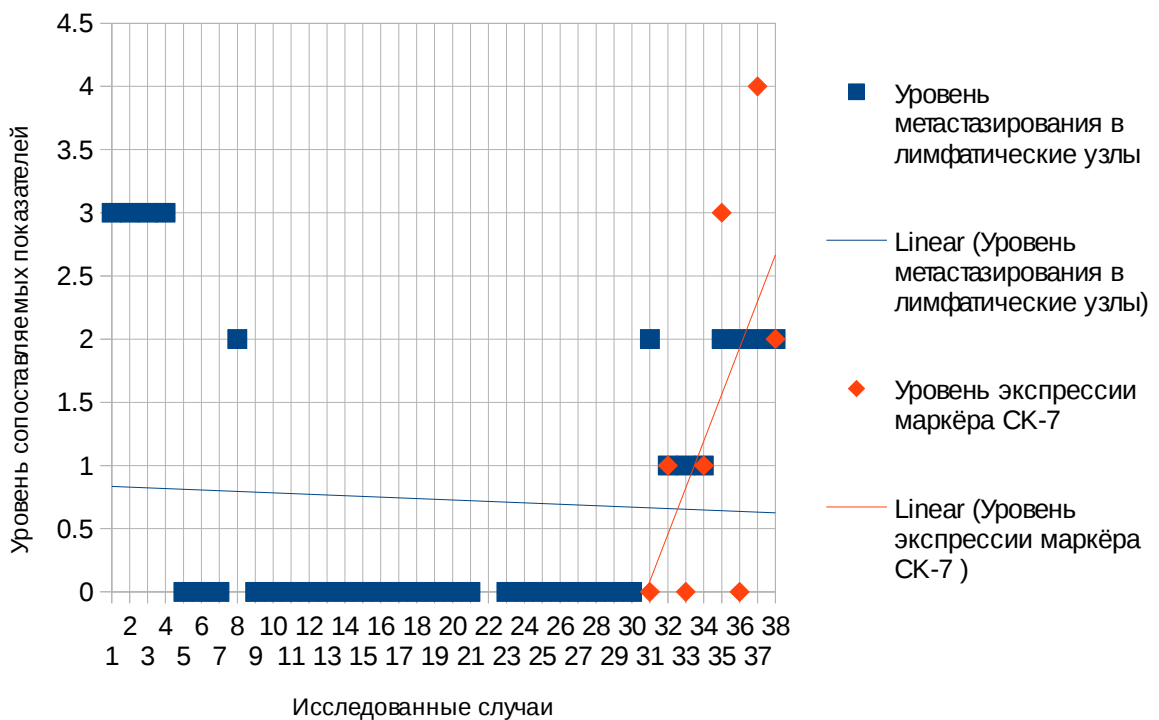


Рис. 54

График корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера Ск-7, измеренная на случаях с наличием первичного опухолевого узла и с метастазами в лимфатические узлы группы N3.

Линии тренда двух данных явлений имеют общее направление угла наклона. Коэффициент корреляции Спирмена для данной пары признаков имеет значение 0,39, что говорит о прямой связи между двумя данными явлениями средней степени, что также отображено на представленной ниже диаграмме, на которой имеются участки перекрытия областей, образованных функциями двух данных явлений.

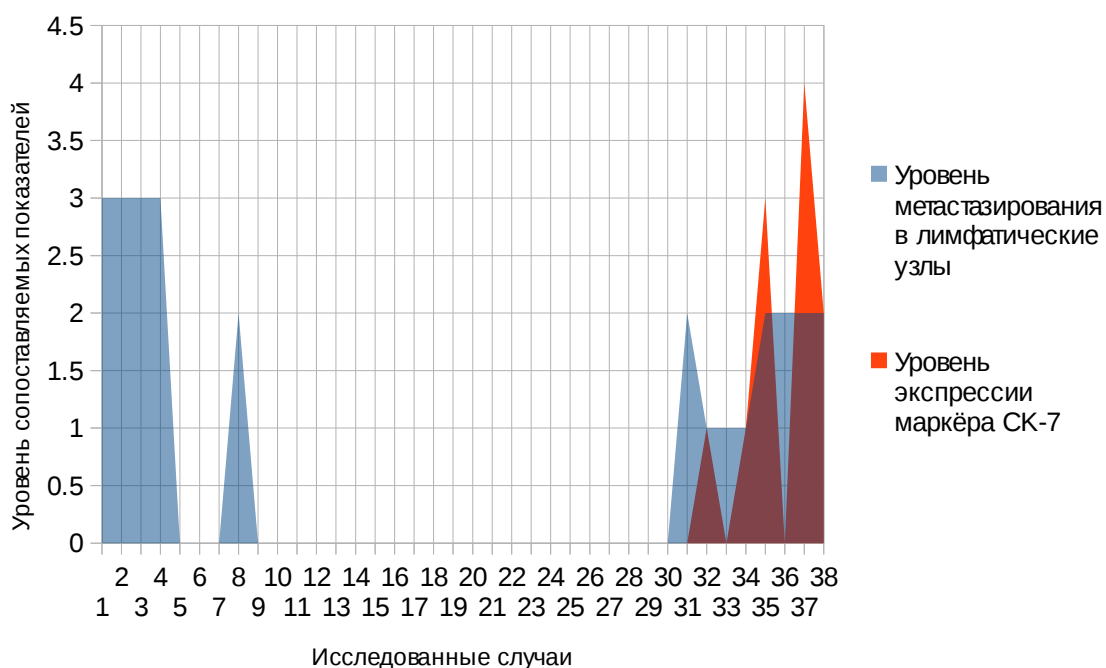


Рис. 55

Диаграмма корреляции степени метастазирования в лимфатические узлы с экспрессией маркера Ск-7, измеренная на случаях с наличием первичного опухолевого узла и с метастазами в лимфатические узлы группы N3.

Заключение

Сравнение экспрессии выбранных маркёров (Ki-67, Synaptophysin, CD-56, NSE, Chromogranin A, TTF-1, CK-8, CK-18, CK-7) в двух группах, представленных разными вариантами случаев с наличием метастазов в лимфатических узлах и случаями без метастазов в лимфатических узлах не выявило статистически значимой разницы между данными двумя группами случаев. U-критерий во всех вариантах сравнительного анализа был больше табличного значения для уровня значимости $p < 0,05$ (Таблицы 4,5,6). Данный факт не позволяет косвенно судить о возможном поражении лимфатических узлов, при их малом количестве в операционном материале, при наличии соответствующего профиля экспрессии данных маркёров.

Обратная картина наблюдается при сравнении экспрессии названных маркёров в двух группах, представленных случаями с наличием местных признаков инвазии (проращение в плевру, вторичное проращение в крупный бронх) и признаков сосудистой инвазии, и случаями, в которых данные признаки отмечены не были. Проведение непараметрического анализа Манна-Уитни выявило статистически значимую разницу между данными двумя группами случаев. U-критерий в ряде сравниваемых пар был меньше табличного значения для уровня значимости $p < 0,05$ (Таблица 7). Данный факт позволяет косвенно судить о наличии взаимосвязи названных признаков инвазивности и особенностями иммунофенотипа (более выраженной экспрессии маркёра Ki-67 и менее выраженной экспрессии CK-7, CK-18).

При исследовании тесноты связи таких явлений, как степень метастазирования в лимфатические узлы и экспрессия выбранных маркёров на материале случаев, содержащих исключительно препараты первичного опухолевого узла, выявлено наличие слабой обратной связи между экспрессией маркёров CD-56, NSE (Рис. 24-27) и уровнем метастазирования, слабой прямой связи между экспрессией маркёров Chromogranin A, TTF-1 и

уровнем метастазирования (Рис. 28-31), отсутствие связи между экспрессией маркёров Synaptophysin, СК-18 и уровнем метастазирования (Рис. 22, 23, 34, 35), и наличие средней прямой и обратной связи между степенью метастазирования и экспрессией маркёров СК-7, СК-8 (Рис. 32, 33, 36, 37) и Ki-67 (Рис. 20, 21) соответственно.

При проведении корреляционного анализа, учитывая также группу случаев, имеющих метастазы в лимфатических узлах группы N3 наблюдается несколько отличная картина взаимосвязи названных признаков. Таким образом, выявлено наличие слабой обратной связи между экспрессией маркёров Ki-67, Synaptophysin, CD-56 (Рис. 38-43) и уровнем метастазирования, слабой прямой связи между экспрессией маркёра TTF-1 и уровнем метастазирования (Рис. 48, 49), отсутствие связи между экспрессией маркёра СК-18 и уровнем метастазирования (Рис. 52, 53), и наличие средней прямой и обратной связи между степенью метастазирования и экспрессией маркёров Chromogranin A, СК-7, СК-8 (Рис. 46, 47, 50, 51, 54, 55) и NSE (Рис. 44, 45), соответственно.

Объединяя данные двух вариантов корреляционного анализа, можно отметить, что при включении в группу случаев, имеющих метастазы в лимфатических узлах группы N3, связь с уровнем экспрессии маркёра Ki-67 становится менее значимой, а связь с уровнем экспрессии маркёров NSE, Chromogranin A более значимой, сохраняя знак коэффициента корреляции.

Суммируя полученные данные, можно сделать вывод о слабой взаимосвязи между уровнем проявления инвазивных свойств нейроэндокринных опухолей лёгкого и экспрессией выбранных маркёров, которое тем не менее проявляется во взаимосвязи наличия признаков местной инвазии и сосудистой инвазии с уровнем экспрессии Ki-67, СК-7, СК-18.

Выводы

1. В ходе исследования установлено наличие в целом слабой взаимосвязи между уровнем проявления инвазивных свойств нейроэндокринных опухолей лёгкого и особенностями их иммунофенотипа, охарактеризованного путём определения уровня экспрессии следующих маркёров: Ki-67, Synaptophysin, CD-56, NSE, Chromogranin A, TTF-1, CK-8, CK-18, CK-7.

2. При общей слабой взаимосвязи инвазивности и экспрессии выбранных маркёров, более значимой является взаимосвязь между наличием признаков местной и сосудистой инвазии и уровнем экспрессии Ki-67, CK-7, CK-18. Для маркёра Ki-67 взаимосвязь является прямой, а для маркёров CK-7, CK-18 — обратной (при сравнении данных экспрессии маркёров в группах с наличием и без наличия названных признаков инвазивности методом непараметрического анализа Манна-Уитни, U-критерий был меньше табличного значения для уровня значимости $p < 0,05$).

3. Также обнаружена взаимосвязь между степенью метастазирования в лимфатические узлы и экспрессией маркёров Chromogranin A (коэффициент корреляции Спирмена = 0,6), CK-7 (коэффициент корреляции Спирмена = 0,39), CK-8 (коэффициент корреляции Спирмена = 0,56) и NSE (коэффициент корреляции Спирмена = -0,55). Таким образом, для первых трёх маркёров зависимость является прямой, а для маркёра NSE — обратной.

Список использованной литературы

1. Travis, W.D., Brambilla, E., Muller-Hermelink, H.K., Harris, C.C., Eds. World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Tymus and Heart; IARC Press: Lyon, France, 2004; pp.19–25.
2. Ginsberg, M.S.; Akin, O.; Berger, D.B.; Zakowski, M.F.; Panicek, D.M. Pulmonary tumorlets: CT findings. *Am. J. Roentgenol.* 2004, 183, 293–296.
3. Churg, A.; Warnock, M.L. Pulmonary tumorlet. A form of peripheral carcinoid. *Cancer* 1976, 37, 1469–1477.
4. Warnock, M.L.; McCowin, M.D. Practical pathology of chest disease—Case studies. Available online: <http://pathhsw5m54.ucsf.edu/introduction.html/> (accessed on 28 April 2012).
5. Pelosi, G.; Zancanaro, C.; Sbabo, L.; Bresaola, E.; Martignoni, G.; Bontempini, L. Development of innumerable neuroendocrine tumorlets in pulmonary lobe scarred by intralobar sequestration. Immunohistochemical and ultrastructural study of an unusual case. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1992, 116, 1167–1174.
6. Travis, W.D. Advances in neuroendocrine lung tumors. *Ann. Oncol.* 2010, 21, vii65–vii71.
7. Rekhtmann, N. Neuroendocrine tumors of the lung. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2010, 134, 1628–1638.
8. Bertino, E.M. Pulmonary neuroendocrine/carcinoid tumors. *Cancer* 2009, 115, 4434–4441.
9. Taal, B.G.; Visser, O. Epidemiology of neuroendocrine tumours. *Neuroendocrin* 2004, 80, 3–7.
10. Semin Chong, M.D. Teaching points for neuroendocrine tumors of the lung: Clinical, pathologic, and imaging findings. *Radiographics* 2006, 26, 41–58.
11. Moran, C.A. Neuroendocrine carcinomas of the lung. *Am. Soc. Clin. Pathol.* 2009, 131, 206–221.
12. Valente, M.; Catena, L.; Milione, M.; Pusceddu, S.; Formisano, B.;

Bajetta, E. Common diagnostic challenges in the histopathologic diagnosis of neuroendocrine lung tumors: A case report. *Case Rep. Oncol.* 2010, 3, 202–207.

13. Johney, E.C.; Pfannschmidt, J.; Rieker, R.J.; Schnabel, P.A.; Mechtersheimer, G.; Dienemann, H. Diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia and a typical carcinoid tumor. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2006, 132, 1207–1208.

14. Cagle, P.T. *Color Atlas and Text of Pulmonary Pathology*; Lippincott William & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2005.

15. Faggiano, A.; Ferella, P.; Grimaldi, F.; Campana, D.; Manzoni, M.; Davi, M.V.; Bianchi, A.; Valcavi, R.; Papini, E.; Giuffrida, D.; et al. Natural history of gastro-entero-pancreatic and thoracic neuroendocrine tumors. Data from a large prospective and retrospective Italian Epidemiological study: The NET management study. *J. Endocrinol. Invest.* 2011, PMID:22080849.

16. Gorshtein, A.; Gross, D.J.; Barak, D.; Strenov, Y.; Refaeli, Y.; Shimon, I.; Grozinsky-Glasberg, S. Diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia and the associated lung neuroendocrine tumors. *Am. Cancer Soc.* 2011, 118, 612–619.

17. Bakhshayesh Karam, M.; Zahirifard, S.; Tahbaz, M.O.; Kaynama, K.; Tolou, F.; Jabari Darjani, H. Bronchial carcinoid tumors: Clinical and radiological findings in 21 patients. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2005, 2, 111–116

18. Sayeg, Y.; Bonnet, R. Neuroendocrine tumors of the lung. Available online:

http://zentalklinik.de/fileadmin/files/bad_berka/Dokumente/Neuroendocrine_Tumors_of_the_Lung.pdf (accessed on 20 February 2012).

19. Grozinsky-Glasberg, S.; Shimon, I.; Korbonits, M.; Grossmann, A.B. Somatostatin analogues in the control of neuroendocrine tumours: Efficacy and mechanisms. *Endocr. Relat. Cancer* 2008, 15, 701–720.

20. Gatto, F.; Hofland, L.J. The role of somatostatin and dopamine D2 receptors in endocrine tumors. *Endocr. Relat. Cancer* 2011, 18, R233–R251.

21. Reghi, L.; Volante, M.; Tavaglione, V.; Bille, A.; Daniele, L.; Augusti, T.;

Inzani, F.; Pelosi, G.; Rindi, G.; Papotti, M. Somatostatin receptor tissue distribution in lung neuroendocrine tumours: A clinicopathologic and immunohistochemical study of 218 clinically aggressive cases. *Ann. Oncol.* 2010, 21, 548–555

22. Terada, T. Pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma diagnosed in brain metastasis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2012, 5, 159–162.

23. Lowe, K.; Khithani, A.; Lui, E.; Winston, T.; Christian, D.; Saad, J.; Jeyarajah, D.R. Ki-67 labeling: A more sensitive indicator of malignant phenotype than mitotic count or tumor size? *J. Surg. Oncol.* 2012, doi:10.1002/jso.23124.

24. Erler, B.S.; Presby, M.M.; Finch, M.; Hodges, A.; Horowitz, K.; Topilow, A.A.; Matulewicz, T. CD117, Ki-67, and p53 predict survival in neuroendocrine carcinomas, but not within the subgroup of small cell lung carcinoma. *Tumour Biol.* 2011, 32, 107–111.

25. Skov, B.G.; Holm, B.; Erreboe, A.; Skov, T.; Mellempgaard, A. ERCC1 and Ki-67 in small cell lung carcinoma and other neuroendocrine tumors of the lung: Distribution and impact on survival. *J. Thorac. Oncol.* 2010, 5, 453–459.

26. Nicholson, S.A.; Beasley, M.B.; Brambilla, E. Small cell lung carcinoma (SCLC): A clinicopathologic study of 100 cases with surgical specimens. *Am. J. Surg. Pathol.* 2002, 26, 1184–1197.

27. Fisseler-Eckhoff, A.; Laberke, H.G.; Fischer, M.; Müller, K.-M. Karzinoidtumoren der Lunge und Asbest. *Versicherungsmedizinische Aspekte. Pathologie* 1998, 19, 425–429.

28. Müller, K.M.; Fisseler-Eckhoff, A. Small cell bronchial cancer—Pathologic anatomy. *Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Kongressbd.* 1991, 1991, 534–543.

29. Elliott, J.A.; Osterlind, K.; Hirsch, F.R.; Hansen, H.H. Metastatic patterns in small-cell lung cancer: Correlation of autopsy findings with clinical parameters in 537 patients. *J. Clin. Oncol.* 1987, 5, 246–254.

30. Abeloff, M.D.; Eggleston, J.C.; Mendelsohn, G.; Ettinger, D.S.; Baylin, S.B. Changes in morphologic and biochemical characteristics of small cell

carcinoma of the lung: A clinicopathologic study. *Am. J. Med.* 1979, 66, 757–764.

31. Waddell, T.K.; Shepherd, F.A. Should aggressive surgery ever be part of the management of small cell lung cancer? *Thorac. Surg. Clin.* 2004, 14, 271–281.

32. Skuladottin, H.; Hirsch, F.H.; Hansen, H.H.; Olsen, J.H. Pulmonary neuroendocrine tumors: Incidence and prognosis of histological subtypes. A population-based study in Denmark. *Lung Cancer* 2002, 37, 127–135.

33. Isaka, M.; Nakagawa, K.; Ohde, Y.; Okumura, T.; Watanabe, R.; Ito, I.; Nakajima, T.; Kondo, H. A clinicopathological study of peripheral, small-sized high-grade neuroendocrine tumours of the lung: Differences between small-cell lung carcinoma and large-cell neuroendocrine carcinoma. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2012, 41, 841–846.

34. Johnson, R.; Trocha, S.; McLawhorn, M.; Worley, M.; Wheeler, G.; Thompson, L.; Schisler, N.; Schammel, D.; Schammel, C.; Stephenson, J.; Bolton, W. Histology, not lymph node involvement, predicts long-term survival in bronchopulmonary carcinoids. *Am. Surg.* 2011, 77, 1669–1674.

35. Kenmotsu Y, Oshita F, Sugiura M, Murakami S, Kondo T, Saito H, et al. Nedaplatin and irinotecan in patients with large-cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Anticancer Res.* 2012;32:1453–1456.

36. Yoshida H, Sekine I, Tsuta K, Horinouchi H, Nokihara H, Yamamoto N, et al. Amrubicin monotherapy for patients with previously treated advanced large-cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Jpn J Clin Oncol.* 2011;41:897–901. doi: 10.1093/jjco/hyr065.

37. De Pas TM, Giovannini M, Manzotti M, Trifirò G, Toffalorio F, Catania C, et al. Large-cell neuroendocrine carcinoma of the lung harboring EGFR mutation and responding to gefitinib. *J Clin Oncol.* 2011;29:e819–e822. doi: 10.1200/JCO.2011.36.2251.

38. Kozuki T, Fujimoto N, Ueoka H, Kiura K, Fujiwara K, Shiomi K, et al. Complexity in the treatment of pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005;131:147–151. doi: 10.1007/s00432-004-0626-z.

39. Yanagisawa S, Morikawa N, Kimura Y, Nagano Y, Murakami K, Tabata

T. Large-cell neuroendocrine carcinoma with epidermal growth factor receptor mutation: possible transformation of lung adenocarcinoma. *Respirology*. 2012;17:1275–1277. doi: 10.1111/j.1440-1843.2012.02258.x.

40. Yoshida Y, Ota S, Murakawa T, Takai D, Nakajima J. Combined large cell neuroendocrine carcinoma and adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor mutation in a female patient who never smoked. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2013 (Epub ahead of print).

41. Sakai Y, Yamasaki T, Kusakabe Y, Kasai D, Kotani Y, Nishimura Y, et al. Large-cell neuroendocrine carcinoma of lung with epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutation and co-expression of adenocarcinoma markers: a case report and review of the literature. *Multidiscip Respir Med*. 2013;8:47. doi: 10.1186/2049-6958-8-47.

42. Iyoda A, Travis WD, Sarkaria IS, Jiang SX, Amano H, Sato Y, et al. Expression profiling and identification of potential molecular targets for therapy in pulmonary large-cell neuroendocrine carcinoma. *Exp Ther Med*. 2011;2:1041–1045.

43. Yokouchi H, Kitahashi M, Oshitari T, Yamamoto S. Intravitreal bevacizumab for iris tumor metastasized from large cell neuroendocrine carcinoma of lung. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2013;251:2243–2245. doi: 10.1007/s00417-012-2218-y.

44. Natasha Rekhtman, Maria C. Pietanza, Matthew D. Hellmann, Jarushka Naidoo, Arshi Arora, Helen Won, Darragh F. Halpenny, Hangjun Wang, Shaozhou K. Tian, Anya M. Litvak, Paul K. Paik, Alexander E. Drilon, Nicholas Socci, John T. Poirier, Ronglai Shen, Michael F. Berger, Andre L. Moreira, William D. Travis, Charles M. Rudin and Marc Ladanyi. Next-Generation Sequencing of Pulmonary Large Cell Neuroendocrine Carcinoma Reveals Small Cell Carcinoma–like and Non–Small Cell Carcinoma–like Subsets. *Clin Cancer Res* July 15 2016 (22) (14) 3618-3629; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2946

45. Bryan A. Chan, Jermaine I. G. Coward. Chemotherapy advances in small-cell lung cancer. *J. Thorac Dis*. 2013 Oct; 5(Suppl 5): S565–S578. doi:

46. Santarpia M, Daffinà MG, Karachaliou N, et al. Targeted drugs in small-cell lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*. 2016;5(1):51-70. doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2016.01.12.

47. Nhung NV, Mirejovský P, Mirejovský T, Melínová L. Cytokeratins and lung carcinomas. *Cesk Patol*. 1999 Jul;35(3):80-4.

48. Johansson L. Histopathologic classification of lung cancer: Relevance of cytokeratin and TTF-1 immunophenotyping. *Ann Diagn Pathol*. 2004 Oct;8(5):259-67.

49. Nitadori J, Ishii G, Tsuta K, Yokose T, Murata Y, Kodama T, Nagai K, Kato H, Ochiai A. Immunohistochemical differential diagnosis between large cell neuroendocrine carcinoma and small cell carcinoma by tissue microarray analysis with a large antibody panel. *Am J Clin Pathol*. 2006 May;125(5):682-92.

50. Nagashio R, Sato Y, Matsumoto T, Kageyama T, Satoh Y, Ryuge S, Masuda N, Jiang SX, Okayasu I. Significant high expression of cytokeratins 7, 8, 18, 19 in pulmonary large cell neuroendocrine carcinomas, compared to small cell lung carcinomas. *Pathol Int*. 2010 Feb;60(2):71-7. doi: 10.1111/j.1440-1827.2009.02487.x.

51. Bishop JA1, Teruya-Feldstein J, Westra WH, Pelosi G, Travis WD, Rekhtman N. p40 (Δ Np63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Mod Pathol*. 2012 Mar;25(3):405-15. doi: 10.1038/modpathol.2011.173. Epub 2011 Nov 4.

52. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Nicholson, A. G. et al. WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. IARC Press; 2015. V.7 – P. 63-77

53. Pier Luigi Filosso1, Piero Ferolla, Francesco Guerrera, Enrico Ruffini, William D. Travis, Giulio Rossi, Paolo Olivo Lausi, Alberto Oliaro; Multidisciplinary management of advanced lung neuroendocrine tumors. *J Thorac Dis* 2015;7(S2):S163-S171. April 2015.

Приложение

Опубликованные работы по теме исследования:

1. И. Л. Поляцкин. Взаимосвязь метастазирования и иммунофенотипа нейроэндокринных опухолей лёгкого.// *Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье: Тезисы XX международной медико-биологической конференции молодых исследователей.* – СПб.: Изд-во СПбГУ.- 2017.- С.436-437