

**ЭКСПРЕССИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ
МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ БРОНХИАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ**

А.А. Щеголева, Т.С. Геращенко, Л.А. Таширева

Научные руководители: к.б.н. Е.В. Денисов

Томский государственный университет, Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

Томский НИИ онкологии, Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, 634050

E-mail: shegolmay@gmail.com

**EXPRESSION FEATURES OF DIFFERENT VARIANTS OF MORPHOLOGICAL
CHANGES IN THE BRONCHIAL EPITHELIUM**

A.A. Shchegoleva, T.S. Gerashchenko, L.A. Tashireva

Scientific Supervisors: E.V. Denisov, PhD

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenina Str. 36, 634050

Tomsk Cancer Research Institute, Russia, Tomsk, Kooperativny Str. 5, 634050

E-mail: shegolmay@gmail.com

***Abstract.** In this study, we analyzed the expression profiles of various changes in the bronchial epithelium (basal cell hyperplasia and squamous metaplasia in different combinations). As a result, the expression profiles of basal cell hyperplasia depended on the presence/absence of squamous metaplasia in this bronchus. Similarly, the profile of squamous metaplasia was also determined by the presence/absence of basal cell hyperplasia or dysplasia.*

Введение. Предопухольный процесс при плоскоклеточном раке лёгких, одной из форм немелкоклеточного рака лёгких (НМРЛ), является сложным многоступенчатым процессом, характеризующимся последовательным накоплением генетических и молекулярных нарушений и идущим параллельно с морфологическими изменениями от нормального эпителия через базальноклеточную гиперплазию (БКГ) и плоскоклеточную метаплазию (ПМ) к дисплазии (Д, I-III степени) [1]. В предыдущих исследованиях нами было показано, что в зависимости от сочетания друг с другом реактивные изменения эпителия бронхов (БКГ и ПМ) характеризуются специфической экспрессией белков p53, Ki-67, Vcl-2 и CD138 [2]. Кроме того, наличие изолированной БКГ в мелких бронхах больных с НМРЛ было связано с высокой частотой гематогенного метастазирования [3], а сочетание БКГ и ПМ – с повышенной вероятностью рецидивирования заболевания [2]. В данном исследовании мы предположили, что разные варианты БКГ и ПМ демонстрируют специфический характер экспрессии генов.

Материалы и методы. В исследовании использовались образцы бронхов, отдаленные от опухолевого очага больных НМРЛ и содержащие различные варианты морфологических изменений бронхиального эпителия: изолированная БКГ (иБКГ; БКГ+ПМ–; n=2), БКГ, сочетающаяся с ПМ (пмБКГ; БКГ+ПМ+; n=2), ПМ, сочетающаяся с БКГ (бкгПМ; БКГ+ПМ+; n=2) и ПМ, сочетающаяся с дисплазией (дПМ; БКГ–ПМ+Д+; n=1). С помощью лазерной микродиссекции (PALM, Carl Zeiss, Германия) из гематоксилин и эозин окрашенных срезов (толщина 5 мкм) были получены образцы

иБКГ, пмБКГ, бкгПМ, дПМ, и нормального бронхиального эпителия. Микродиссектированные образцы использовались для выделения РНК (RNeasy Plus Micro Kit, Qiagen, США) и последующего проведения полнотранскриптомной амплификации (Ovation PicoSL WTA System V2 kit, Nugen, США). Образцы кДНК метились флуоресцентным красителем Cy3 (SureTag DNA labeling kit, Agilent Technologies, Inc., США) и гибридизовались на микроматрицах SurePrint G3 Human GE v2, 8x60K (Agilent Technologies, Inc., США). Полученные данные подвергали обработке в среде R (R Development Core Team, 2008) с помощью программного пакета limma [4]. Функциональное аннотирование проводили с помощью онлайн инструмента GO Enrichment Analysis [5].

Результаты. Кластерный анализ показал, что БКГ и ПМ в значительной степени отличались от нормального эпителия, а также друг от друга. Тем не менее, варианты БКГ были более схожи друг с другом, чем с ПМ. Более того, бкгПМ по экспрессионному профилю была ближе к кластеру иБКГ+пмБКГ, чем к дПМ (рис. 1. А).

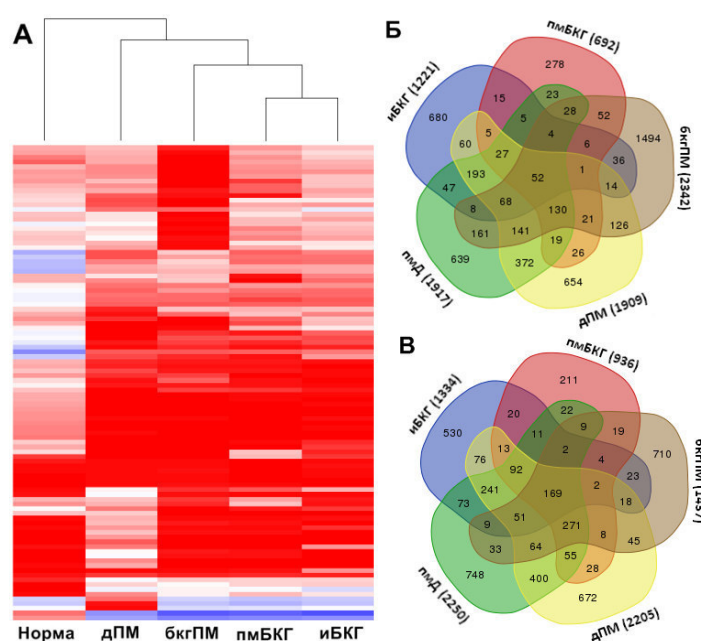


Рис. 1. Тепловая карта уровня экспрессии генов (ТОП 100) в морфологических изменениях эпителия мелких бронхов, отдаленных от НМРЛ, и кластерный анализ их экспрессионной близости друг к другу (А). Количество общих и специфических гипер- (Б) и гипохэкспрессирующихся (В) генов в различных вариантах морфологических изменений бронхиального эпителия.

В иБКГ обнаружена гиперэкспрессия 1221 и гипохэкспрессия 1334 генов. Специфическая гиперэкспрессия, свойственная этому варианту БКГ, была характерна для 680, а гипохэкспрессия – для 530 генов (рис. 1. Б,В). Функциональное аннотирование гиперэкспрессирующихся генов показало отсутствие связи иБКГ с какими-либо биологическими процессами, однако анализ сигнальных путей показал значимую регуляцию в иБКГ метаболизма ретинола, ксенобиотиков через систему цитохромов 450 и химического канцерогенеза. При анализе гипохэкспрессирующихся генов была показана связь иБКГ с разнообразными процессами и сигнальными путями, большинство из которых ассоциированы с иммунным ответом.

При пмБКГ обнаружены 692 гипер- и 936 гипоэкспрессирующихся генов, из них 278 и 211, соответственно, были специфическими (рис. 1. Б,В). Экспрессия гиперэкспрессирующихся генов не была статистически значимо связана как с какими-либо процессами, так и с сигнальными путями. Анализ гипоэкспрессирующихся генов показал связь с регуляцией процессов и путей, участвующих в организации внеклеточного матрикса, продукции молекул адгезии и клеточной пролиферации.

При бкгПМ резко увеличилось число гиперэкспрессирующихся генов – до 2342, а гипоэкспрессирующихся генов – до 1437, из них 1494 и 710, соответственно, были специфическими (рис. 1. Б,В). Данный вариант ПМ характеризовался гиперэкспрессией генов, вовлеченных в G-белок-связанный и ольфакторный сигнальные пути. Помимо этого гипоэкспрессирующиеся гены были ассоциированы с контролем различных процессов: репарации ДНК, клеточного цикла, роста и старения, метаболизма и т.д.

При дПМ наблюдалась гиперэкспрессия 1909 и гипоэкспрессия 2205 генов, из них 654 и 672 – специфические, соответственно (рис. 1. Б,В). Экспрессия гиперэкспрессирующихся генов в дПМ была ассоциирована с процессами клеточного цикла, ответом на ксенобиотики и развитием эпителия. Аннотирование гипоэкспрессирующихся генов показало значительную связь с процессом сборки реснитчатого эпителия и аксонемы, организацией внеклеточного матрикса, миграцией и хемотаксисом лейкоцитов, регуляцией клеточной пролиферации и дифференцировки пневмоцитов II-го типа.

Заключение. Экспрессионный профиль БКГ зависел от того, сочетается она с ПМ или нет. Аналогичным образом профиль ПМ также определялся наличием БКГ или дисплазии. Различия каждого из вариантов сочетаний морфологических изменений бронхиального эпителия отмечались на уровне количества дифференциально гипер- или гипоэкспрессирующихся генов и регуляции биологических процессов и сигнальных путей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kadara H., Wistuba I.I. (2014) Molecular Biology of Lung Preneoplasia. Lung Cancer, Ch. 6, pp. 110-128.
2. Pankova O.V., Denisov E.V., Ponomaryova A.A., Gerashchenko T.S., Tuzikov S.A., Perelmuter V.M. (2016) Recurrence of squamous cell lung carcinoma is associated with the co-presence of reactive lesions in tumor-adjacent bronchial epithelium. Tumor Biology, Vol. 37, no. 3, pp. 3599–3607.
3. Пат. 2489718 РФ. МПК G01N 33/48. Способ прогнозирования возникновения гематогенных метастазов при плоскоклеточном раке легкого / О.В. Панкова, В.М. Перельмутер. Заявлено 22.06.2012; Опубл. 10.08.2013, Бюл. № 22.
4. Ritchie M.E., Phipson B., Wu D., Hu Y., Law C.W., Shi W., Smyth G.K.. (2015) limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. Nucleic Acids Res, Vol. 43, no. 7, pp. Es.47.
5. Gene Ontology Consortium (2015) Gene Ontology Consortium: going forward. Nucleic Acids Res, Vol. 43, pp. D1049-56.