

УДК 611-018.13:616.61-006

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НУКЛЕОЛЯРНОГО АППАРАТА И БЕЛКА НУКЛЕОФОЗМИНА (B23) ПРИ ЛОКАЛИЗОВАННОМ И МЕТАСТАТИЧЕСКОМ РАКЕ ПОЧКИ**

**<sup>1</sup>Бобров И.П., <sup>1</sup>Черданцева Т.М., <sup>1</sup>Климачев В.В., <sup>2</sup>Лазарев А.Ф., <sup>2</sup>Авдалян А.М.,**

**<sup>1</sup>Долгатов Ю.А., <sup>1</sup>Самарцев Н.С., <sup>1</sup>Лапштаев В.А., <sup>1</sup>Попов В.А.**

*<sup>1</sup>ГОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет»,*

*Барнаул, e-mail: drakon@agmu.ru;*

*<sup>2</sup>Алтайский филиал РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Барнаул, e-mail: ashot\_avdalyan@mail.ru*

В работе авторы провели анализ особенностей параметров нуклеолярного аппарата и экспрессии белка нуклеофозмина (B23) в опухолевых клетках при локализованном и метастатическом почечно-клеточном раке. Исследовано 103 почки, резецированных по поводу рака, метастазы были выявлены в 16 случаях. С помощью серебрения по методу Dascal Y. et al (1980) проводили анализ параметров ядрышек: среднего количество ядрышек на 1 ядро; среднее количество фибриллярных центров (ФЦ) на 1 ядро; среднее количество кольцевидных (КЯд), переходных (ПЯд) и нуклеолонемных (НЯд) морфофункциональных типов ядрышек на 1 ядро и среднее количество ФЦ на 1 ядрышко. Экспрессию белка нуклеофозмина выявляли иммуногистохимическим методом. Показано, что все параметры нуклеолярного аппарата и экспрессия белка нуклеофозмина (B23) были достоверно выше в клетках метастатического рака по сравнению с локализованным. Изучение нуклеолярной активности и экспрессия белка нуклеофозмина в опухолевых клетках в первичной карциноме может быть использовано при оценке риска развития метастазов в регионарные лимфотические узлы на дооперационном этапе, планирования объема хирургического лечения и прогнозирования течения рака почки.

**Ключевые слова:** ядрышко, нуклеофозмин, рак почки

**MORPHOFUNCTIONAL ACTIVITY OF NUCLEOLAR APPARATUS AND PROTEIN NUCLEOPHOSMIN/B23 FOR LOCALIZED AND METASTATIC RENAL CELL CARCINOMA**

**<sup>1</sup>Bobrov I.P., <sup>1</sup>Cherdantseva T.M., <sup>1</sup>Klimachev V.V., <sup>2</sup>Lazarev A.F., <sup>2</sup>Avdalyan A.M.,**

**<sup>1</sup>Dolgatov A.Y., <sup>1</sup>Samartsev N.S., <sup>1</sup>Lapshtaev V.A., <sup>1</sup>Popov V.A.**

*<sup>1</sup>Altai State Medical University, Barnaul, e-mail: drakon@agmu.ru;*

*<sup>2</sup>Altai branch of Russian Oncologic Research Center named after N.N. Blokhin,*

*Barnaul, e-mail: ashot\_avdalyan@mail.ru*

In this paper the authors have analyzed the features of nucleolar parameters and protein expression of nucleophosmin (B23) in tumor cells in localized and metastatic renal cell carcinoma. Was studied 103 kidney resected with cancer, metastases were found in 16 cases. With silvering method Dascal Y. et al (1980) conducted an analysis of parameters of nucleoli. Medium number nucleoli in one core; the medium number of fibrillar centers (FC) in 1 core; the average number of annular, transitional and nucleolonemic morphofunctional types of nucleoli in 1 core and the average number of FC in 1 nucleolus. Protein expression of nucleophosmin was detected by immunohistochemistry method. It is shown that all parameters nucleolar apparatus and protein expression of nucleophosmin (B23) were significantly higher in metastatic cancer cells compared with localized. Study nucleolar activity and protein expression of nucleophosmin in tumor cells in primary carcinoma may be used when assessing the risk of metastasis in regional lymph nodes on preoperative planning of surgical treatment and prognosis of renal cell carcinoma.

**Keywords:** nucleolus, nucleophosmin, renal cell carcinoma

Ядрышко – это самая динамичная структура клетки, и каждый его морфологический тип отражает уровни трех основных процессов, связанных с биогенезом рибосом: синтез прерибосомальной РНК, процессинг и миграцию рибонуклеопротеидных частиц в нуклеоплазму [8]. Для дифференцированных интерфазных клеток наиболее характерны ядрышки кольцевидного типа, а для активно пролиферирующих и синтезирующих – нуклеолонемные нуклеолы. Промежуточное положение между кольцевидными и нуклеолонемными типами занимают нуклеолы переходного типа [1].

Способность к ассоциации ядрышковых организаторов, наряду с амплификацией рибосомных генов, приводит к образованию функционально активных типов ядрышек из менее активных, путем их слияния [3]. Одним из основных признаков уровня морфофункциональной активности ядрышка является количество фибриллярных центров (ФЦ). Так, для кольцевидного ядрышка характерен один крупный ФЦ, для нуклеолонемного 5 и более ФЦ, а для переходного типа – промежуточное количество ФЦ (от 2 до 4).

Белок нуклеофозмин (B23) является мультифункциональным протеином и по современным данным – это основной аргентофильный белок ядрышка. Морфофункциональная активность белка B23 тесно взаимосвязана с регуляцией клеточного цикла. Данный белок слабо экспрессируется покоящимися клетками (в фазе G0), но его количество начинает увеличиваться сразу же после стимуляции клеток к делению и прогрессивно возрастает вплоть до G2-периода [14].

Морфофункциональная активность нуклеолярного аппарата клеток при метастазировании исследована в опухолях некоторых локализаций [5, 6, 15, 11]. Так, данными Toshikazu Matsuo (1993) показано, что при раке желудка количество ядрышковых организаторов увеличивалось в опухолях, которые имели метастазы в регионарные лимфатические узлы. Гиперэкспрессия нуклеофозмина была взаимосвязана с наличием метастазов при раке толстой кишки, плоскоклеточной карциноме полости рта [12, 10]. В то же время при раке желудка при наличии метастазов в первичной опухоли наблюдали уменьшение экспрессии нуклеофозмина [13].

Исследования активности нуклеолярного аппарата клеток первичной опухоли рака почки при метастазировании в литературе нами не обнаружено.

**Целью исследования** настоящей работы явилось изучение морфофункциональной активности нуклеолярного аппарата опухолевых клеток локализованного и метастатического почечно-клеточного рака почки (ПКР).

#### Материалы и методы исследования

Материалом для исследования послужили 103 почки, резецированные по поводу рака в Алтайском филиале РОНЦ им. Блохина РАМН. Регионарные и отдаленные метастазы были обнаружены в 16 случаях. Средний возраст больных составил  $59,1 \pm 0,9$  лет. Мужчин было 49 (47,6%), женщин – 54 (52,4%). Выполняли гистохимическое и иммуногистохимическое окрашивание ядрышковых организаторов. Гистохимическое окрашивание ядрышек проводили по методу Daskal Y., et al., 1980 [9] в нашей модификации [2]. Докраску ядра осуществляли 1% раствором метилового зеленого. Высчитывали следующие параметры нуклеолярного аппарата: среднее количество ядрышек на 1 ядро; среднее количество ФЦ на 1 ядро; среднее количество кольцевидных (КЯд), переходных (ПЯд) и нуклеолонемных (НЯд) морфофункциональных типов ядрышек на 1 ядро и среднее количество ФЦ на 1 ядрышко.

Иммуногистохимическое исследование нуклеофозмина (B23) проводили с применением моноклональных антител – nucleophosmin p/B23, клон mouse mAb23 (фирма «Labvision»). Оценивали интегральную оптическую плотность нуклеофозмина

в ядрышке с использованием системы компьютерного анализа изображений, состоящей из микроскопа Leica DME, цифровой камеры Leica EC3 (Leica Microsystems AG, Германия), персонального компьютера и программного обеспечения ВидеоТест-Морфология 5.2. Количество белка B23 выражали в условных единицах (у.е.).

Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 6.0. При сопоставлении средних величин использовали критерий значимости Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Коррелятивные взаимоотношения оценивали с помощью критерия Пирсона.

#### Результаты исследования и их обсуждение

При окраске нитратом серебра ядрышки опухолевых клеток имели коричневатую окраску, на фоне которой были четко видны ФЦ в виде округлых или продолговатых гранул черного цвета.

Результаты исследования показали, что в клетках локализованного рака количество ядрышек составило  $1,5 \pm 0,02$ , а в опухолях с наличием метастазов число ядрышек достоверно возрастало до  $1,9 \pm 0,05$  на 1 ядро ( $p = 0,0000001$ ) (таблица).

При рассмотрении морфофункциональных типов ядрышек показано, что количество КЯд в клетках локализованных опухолей составило  $26,5\% \pm 2,5$ , а в метастатических оно достоверно уменьшалось до  $5,0\% \pm 1,4$  ( $p = 0,0001$ ) (рис. 1). Уменьшение числа КЯд коррелировало с наличием метастазов ( $r = -0,40$ ;  $p = 0,0001$ ).

Число ПЯд в локализованных опухолях составило  $48,8\% \pm 2,6$ , а в метастатических оно было равно  $22,9\% \pm 3,6$  ( $p = 0,00002$ ). Количество ПЯд было взаимосвязано с наличием метастазов ( $r = -0,44$ ;  $p = 0,0001$ ). Число ФЦ в ПЯд локализованных опухолей составило  $2,8 \pm 0,02$ , в метастазующих оно увеличивалось до  $3,0 \pm 0,05$  ( $p = 0,02$ ).

Содержание НЯд в локализованных опухолях было равно  $24,7\% \pm 3,4$ , а в метастатических оно возрастало до  $72,1\% \pm 4,05$  ( $p = 0,0000001$ ) (рис. 1). Возрастание содержания НЯд в ядрах клеток опухолей коррелировало с наличием метастазов ( $r = 0,57$ ;  $p = 0,0001$ ). При этом содержание ФЦ в НЯд локализованных опухолей было равно  $7,0 \pm 0,1$ , а в метастазующих опухолях оно возрастало до  $12,3 \pm 0,3$  ( $p = 0,001$ ).

В опухолях без наличия метастазов среднее число ФЦ составило  $5,0 \pm 0,1$ , а в метастазующих оно достоверно возрастало до  $17,5 \pm 0,4$  ( $p = 0,001$ ) (таблица). Количество гранул серебра на 1 ядро было взаимосвязано с наличием метастазов ( $r = 0,68$ ;  $p = 0,0001$ ).

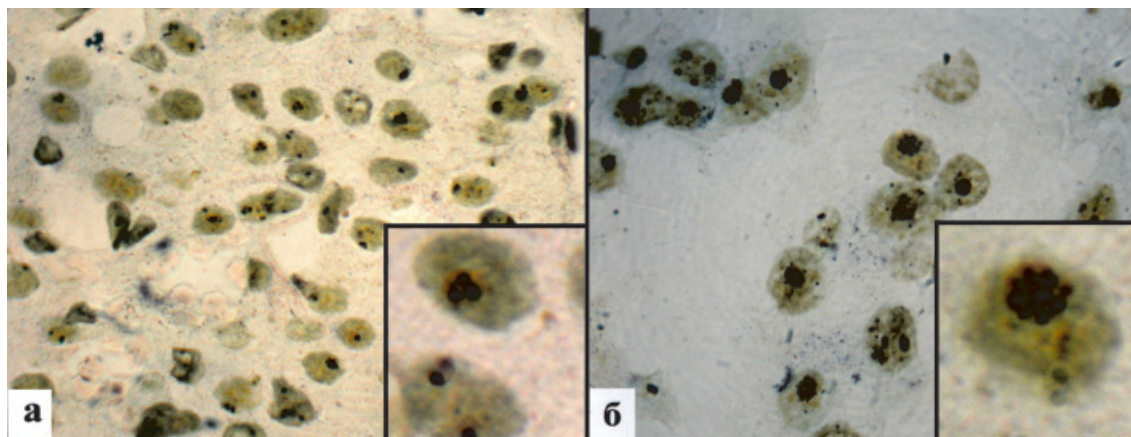


Рис. 1. Нуклеолярный аппарат локализованного и метастатического рака почки: а – ядрышки кольцевидного и переходного типов в ядрах опухолей без метастазов; б – ядрышки нуклеолонемного типа в ядрах клеток метастазирующих опухолей. Окраска нитратом серебра по Y. Daskal, докрасивание метиловым зеленым. Увеличение  $\times 1000$

Параметры активности нуклеолярного аппарата опухолевых клеток ПКР  
в зависимости от наличия или отсутствия метастазов

Параметры нуклеолярной активности	Наличие метастазов	
	M(0)	M(+)
Среднее число ядрышек на 1 ядро	$1,5 \pm 0,02^*$	$1,9 \pm 0,05^*$
Среднее количество КЯд на 1 ядро (%)	$26,5\% \pm 2,5^*$	$5,0\% \pm 1,4^*$
Среднее количество ПЯд на 1 ядро (%)	$48,8\% \pm 2,6^*$	$22,9\% \pm 3,6^*$
Среднее количество НЯд на 1 ядро (%)	$24,7\% \pm 3,4^*$	$72,1\% \pm 4,05^*$
Среднее количество ФЦ на 1 ПЯд	$2,8 \pm 0,02^*$	$3,0 \pm 0,05^*$
Среднее количество ФЦ на 1 НЯд	$7,0 \pm 0,1^*$	$12,3 \pm 0,3^*$
Среднее число ФЦ на 1 ядро	$5,0 \pm 0,1^*$	$12,3 \pm 0,3^*$

Примечание. \* $p < 0,05$ .

Для более детальной оценки морфо-функциональной активности клеток по данным серебрения ядрышковых организаторов опухолевые клетки были нами распределены на группы в зависимости от числа ФЦ. Сравнительное сопоставление распределения клеточных элементов локализованных опухолей с метастатическими в зависимости от числа ФЦ выявило принципиально различный характер их группировки. В локализованных опухолях большинство клеток (72%) имело от 1 до 5 ФЦ и 28% клеток содержали от 6 до 30 ФЦ. Гистограмма, характеризующая распределение клеток, отличалась сдвигом влево, одновершинностью и высоким пиком. Иной вид имела гистограмма карцином с наличием метастазов. Большинство клеток (99,3%) принадлежало к классам клеток, содержащих от 6 до 51 более ФЦ. Гистограмма была растянута вправо за счет клеточных элементов с большим содержанием ФЦ на 1 ядро. Другими особенностями гистограммы были многовершинность

и отсутствие высоких пиков, что является отражением широкой вариабельности клеточных элементов метастазирующих опухолей по количеству ФЦ (рис. 2).

При иммуногистохимической окраске ядрышек на белок нуклеофозмин (В23) ядрышки опухолей при локализованном ПКР окрашивались в светло-коричневый или темно-коричневый цвет. Интегральная оптическая плотность белка на 1 ядрышко при этом составила  $1339,45 \pm 198,1$  у.е. При метастатическом раке почки ядрышки выглядели темно-коричневыми или черными, а оптическая плотность белка достоверно возрастала по сравнению с локализованным раком почки до  $2674,45 \pm 45,6$  у.е. на 1 ядрышко (рис. 3, 4). Экспрессия нуклеофозмина (В23) коррелировала: с наличием регионарных и отдаленных метастазов ( $r = 0,36$ ;  $p = 0,01$ ), с числом ФЦ в ядрышках клеток ( $r = 0,79$ ;  $p = 0,0001$ ) и количеством НЯд в клетках опухоли ( $r = 0,59$ ;  $p = 0,002$ ). В наиболее активных НЯд с большим количеством ФЦ оптическая плотность белка достигала до 15779,1 у.е.

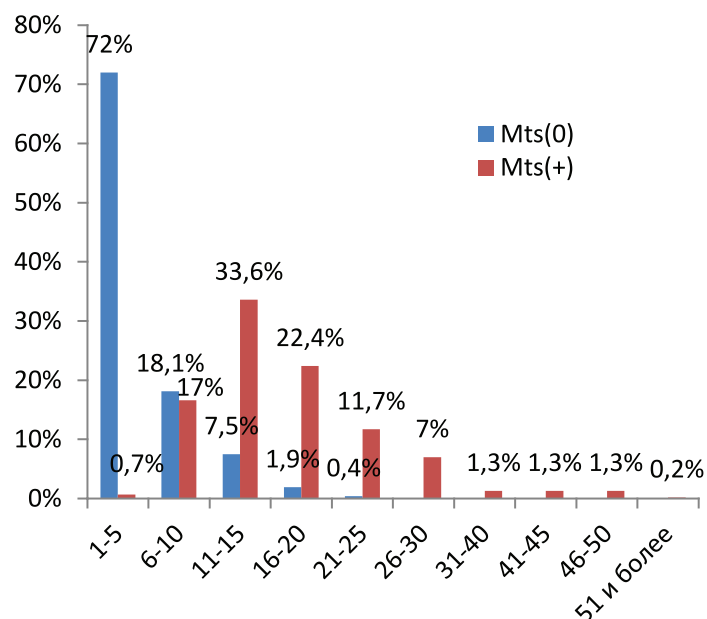


Рис. 2. Гистограмма, характеризующая распределение клеток по числу ФЦ на 1 ядро в метастазирующих Mts (+) опухолях и опухолях без метастазов Mts (-). По оси абсцисс – количество гранул серебра на 1 ядро; по оси ординат – процентное содержание клеток

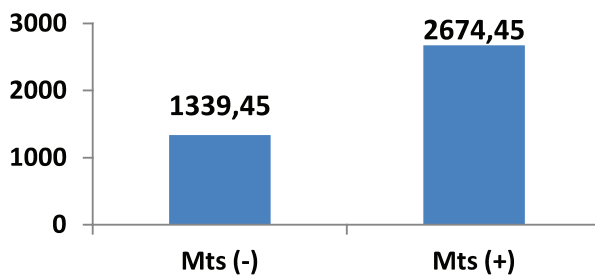


Рис. 3. Гистограмма, характеризующая интегральную оптическую плотность экспрессии белка нуклеофозмина (B23) в метастазирующих Mts (+) опухолях и опухолях без метастазов Mts (-). По оси абсцисс – наличие метастазов; по оси ординат – интегральная оптическая плотность нуклеофозмина (B23)

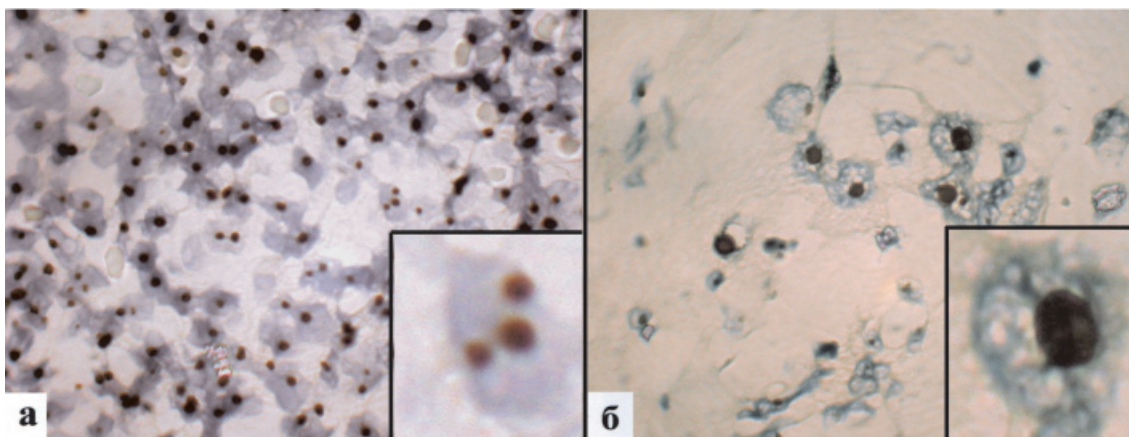


Рис. 4. Экспрессия белка нуклеофозмина (B23) в клетках локализованного и метастатического рака почки:  
 а – низкая экспрессия белка нуклеофозмина (B23) в ядрышках клеток локализованного рака почки;  
 б – гиперэкспрессия белка нуклеофозмина (B23) в ядрышках клеток метастатического рака почки.  
 Иммуногистохимическая реакция. Увеличение  $\times 1000$

Таким образом, значения показателей изученных нуклеолярных маркеров достоверно возрастали в первичных опухолях с метастазами по сравнению с локализованными новообразованиями. Констатируя данный факт, мы считаем возможным присоединиться к мнению тех авторов [4, 7], которые считают, что метастазирование злокачественных опухолей в целом и ПКР в частности осуществляется за счет определенных клонов опухолевых клеток, имеющих большую потенцию к злокачественному росту. Чем больше опухолевая клетка содержит нуклеолонемных ядрышек, ФЦ на 1 ядро и чем больше в ядрышках белка нуклеофозмина (B23), тем выше злокачественность рака почки. Широкая вариабельность клеточных популяций опухоли по активности нуклеолярного аппарата является результатом патологической эволюции опухолевых клеток при ПКР и составляет звено патогенеза селекции клеток с высоким метастатическим потенциалом. В метастазах такие пулы опухолевых клеток приобретают еще более выраженные злокачественные свойства. Поэтому нахождение субпопуляций опухолевых клеток с высокими показателями ядрышковой активности и гиперэкспрессией белка нуклеофозмина (B23) в первичной опухоли может указывать на риск развития метастазов и неблагоприятный прогноз течения заболевания. Изучение морфофункциональной активности нуклеол и экспрессии ядрышкового белка нуклеофозмина (B23) в опухолевых клетках может быть использовано при оценке риска развития метастазов на дооперационном этапе, планировании объема хирургического лечения и при прогнозировании течения почечно-клеточного рака.

### Список литературы

1. Арвеладзе Ю.Р. Оценка функционального состояния эндотелиоцитов сосудов микроциркуляторного русла у белых крыс // Морфология. – 2001. – № 6. – С. 27–29.
2. Бобров И.П., Авдалян А.М., Черданцева Т.М., Климачев В.В., Лазарев А.Ф., Брюханов В.М., Гервальд В.Я., Долгатов А.Ю., Ковригин М.В. Модифицированный метод выявления аргирофильных белков области ядрышкового организатора на парафиновых срезах // Морфология. – 2010. – № 5. – С. 65–67.
3. Жданова Н.С. Слияние ядрышек и ассоциации акроцентрических хромосом в клетках человека // Цитология. – 1974. – № 9. – С. 1095–1099.
4. Киселева Е.Г. Гетерогенность опухоли и механизмы естественной резистентности при метастазировании // Экспериментальная онкология. – 1988. – № 1. – С. 3–8.
5. Лазарев А.Ф., Бобров И.П., Климачев В.В., Авдалян А.М. Морфометрические особенности ядрышкового аппарата клеток рака желудка при метастазировании в регионар-

ные лимфатические узлы // Проблемы клинической медицины. – 2005. – № 1. – С. 18–21.

6. Лазарев А.Ф., Авдалян А.М., Бобров И.П., Климачев В.В., Круглова Н.М. Клинико-морфологические факторы риска развития рецидива и метастазирования лейомиосаркомы тела матки // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2013. – № 1. – С. 27–33.

7. Лобанов С.В. Значение опухолевой гетерогенности в метастазировании // Вопросы онкологии. – 1992. – № 4. – С. 396–405.

8. Челидзе П.В., Зацепина О.В. Морфофункциональная классификация ядрышек // Успехи современной биологии. – 1988. – № 2. – С. 252–268.

9. Daskal Y., Smetana K., Buch H. Evidence from studies on segregated nucleoli that nucleolar silver stained proteins C23 and B23 are in fibrillar components // Exp. Cell Res. – 1980. – Vol. 127. – P. 285–291.

10. Coutinho-Camillo C.M., Lourenço S.V., Nishimoto I.N., Kowalski L.P., Soares F.A. Nucleophosmin, p53, and Ki-67 expression patterns on an oral squamous cell carcinoma tissue microarray // Hum. Pathol. – 2010. – Vol. 41. – P. 1079–1086.

11. Ikeguchi M., Katano K., Oka A., Tsujitani S., Maeta M., Kaibara N. Number of argyrophilic nucleolar organiger regions is a good indicator of lymph node metastasis in patients with esophageal carcinoma // Langenbecks Arch. Chir. – 1995. – Vol. 380. – P. 197–202.

12. Yang Y.F., Zhang X.Y., Yang M., He Z.H., Peng N.F., Xie S.R., Xie Y.F. Prognostic role of nucleophosmin in colorectal carcinomas // Asian. Pac. J. Cancer Prev. – 2014. – Vol. 15. – P. 2021–2026.

13. Leal M.F., Mazzotti T.K., Calcagno D.Q., Cirilo P.D., Martinez M.C., Demachki S., Assumpção P.P., Chammass R., Burbano R.R., Smith M.C. Deregulated expression of Nucleophosmin 1 in gastric cancer and its clinicopathological implications // BMC Gastroenterol. 2014 Jan 10;14:9. doi: 10.1186/1471-230X-14-9.

14. Sirri V., Roussel P., Gendron M.C., Hernandez-Verdun D. The amount of the two major AgNOR proteins, nucleolin and protein B23 is cell – cycle dependent // Cytometry. – 1997. – Vol. 28. – P. 147–156.

15. Tashikazu M. Studies on the utility of sequential staining technique using PCNA and AgNORs for assessing the degree of malignancy of gastric carcinoma // Acta med. Nagasak. – 1993. – Vol. 38. – P. 226–231.

### References

1. Arveladze Yu.R. Otsenka funktsionalnogo sostoyaniya endoteliotsitov sududov mikrotsirkulyatornogo rusla u belyih kryis // Morfologiya, 2001, no. 6, pp. 27–29.
2. Bobrov I.P., Avdalyan A.M., Cherdantseva T.M., Klimachev V.V., Lazarev A.F., Bryuhanov V.M., Gervald V.Ya., Dolgato A.Yu., Kovrigin M.V. Modifitsirovannyiy metod vyiyavleniya argirofilnyih belkov oblasti yadryshkovogo organizatora na parafinovyyih srezah // Morfologiya, 2010, no. 5, pp. 65–67.
3. Zhdanova N.S. Sliyanie yadryishek i assotsiatsii akrotsentricheskikh hromosom v kletkah cheloveka // Tsitologiya, 1974, no.9, pp. 1095–1099.
4. Kiseleva E.G. Geterogennost opuholi i mehanizmyi estestvennoy rezistentnosti pri metastazirovani // Eksperimentalnaya onkologiya, 1988, no. 1, pp. 3–8.
5. Lazarev A.F., Avdalyan A.M., Bobrov I.P., Klimachev V.V., Kруглова N.M. Kliniko-morfologicheskie faktoryi riska razvitiya retsidiva i metastazirovaniya leyomiosarkomyi tela matki // Onkologiya. Zhurnal im. P.A. Gertsena, 2013, no. 1, pp. 27–33.
6. lazarev a.f., avdalyan a.m., bobrov i.p., klimachev v.v., kruglova n.m. kliniko-morfologicheskie faktoryi riska razvitiya

recidiva i metastazirovaniya lejomiosarkomy tela matki // onkologiya. zhurnal im. p.a. gercena., 2013, no. 1, pp. 27–33.

7. Lobanov S.V. Znachenie opuholevoy geterogennosti v metastazirovaniy // Voprosy onkologii, 1992, no. 4, pp. 396–405.

8. Chelidze P.V., Zatsypina O.V. Morfofunktsionalnaya klassifikatsiya yadryishek // Uspehi sovremennoy biologii, 1988, no. 2, pp. 252–268.

9. Daskal Y., Smetana K., Buch H. Evidence from studies on segregated nucleoli that nucleolar silver stained proteins C23 and B23 are in fibrillar components // Exp. Cell Res. 1980. Vol. 127. pp. 285–291.

10. Coutinho-Camillo C.M., Lourenço S.V., Nishimoto I.N., Kowalski L.P., Soares F.A. Nucleophosmin, p53, and Ki-67 expression patterns on an oral squamous cell carcinoma tissue microarray // Hum. Pathol. 2010. Vol. 41. pp. 1079–1086.

11. Ikeguchi M., Katano K., Oka A., Tsujitani S., Maeta M., Kaibara N. Number of argyrophilic nucleolar organiger regions is a good indicator of lymph node metastasis in patients with esophageal carcinoma // Langenbecks Arch. Chir. 1995. Vol. 380. pp. 197–202.

12. Yang Y.F., Zhang X.Y., Yang M., He Z.H., Peng N.F., Xie S.R., Xie Y.F. Prognostic role of nucleophosmin in colorectal carcinomas // Asian. Pac. J. Cancer Prev. 2014. Vol. 15. P. 2021–2026.

13. Leal M.F., Mazzotti T.K., Calcagno D.Q., Cirilo P.D., Martinez M.C., Demachki S., Assumpção P.P.,

Chammas R., Burbano R.R., Smith M.C. Deregulated expression of Nucleophosmin 1 in gastric cancer and its clinicopathological implications // BMC Gastroenterol. 2014 Jan 10;14:9. doi: 10.1186/1471-230X-14-9.

14. Sirri V., Roussel P., Gendron M.C., Hernandez-Verdun D. The amount of the two major AgNOR proteins, nucleolin and protein B23 is cell – cycle dependent // Cytometry. – 1997. – Vol. 28. – P. 147–156.

15. Tashikazu M. Studies on the utility of sequential staining technique using PCNA and AgNORs for assessing the degree of malignancy of gastric carcinoma // Acta med. Nagasak. – 1993. – Vol.38. – P. 226–231.

---

#### Рецензенты:

Цеймах Е.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой оперативной хирургии и патологической анатомии, ГБОУ ВПО АГМУ, г. Барнаул;

Высоцкий Ю.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой нормальной анатомии, ГБОУ ВПО АГМУ, г. Барнаул.

Работа поступила в редакцию 19.12.2014.