

УДК 616.24 – 006:363.04:577

ВЗАИМОСВЯЗЬ АРГИРОФИЛЬНЫХ БЕЛКОВ ЯДРЫШКООБРАЗУЮЩИХ РАЙОНОВ В MIB-1 ПОЗИТИВНЫХ КЛЕТКАХ С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ И ВЫЖИВАЕМОСТЬЮ ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО

¹Кобяков Д.С., ²Авдалян А.М., ²Лазарев А.Ф., ³Лушникова Е.Л., ³Непомнящих Л.М.

¹БУ «Когалымская городская больница», Когалым, e-mail: dskob@yandex.ru;

²Лаборатория молекулярной диагностики Алтайского филиала РОНЦ

им. Н.Н. Блохина РАМН, Барнаул, e-mail: ashot_avdalyan@mail.ru;

³ФГБУ «НИИ региональной патологии и патоморфологии» СО РАМН, Новосибирск,
e-mail: pathol@soramn.ru

Цель. Исследовать аргирофильные белки, ассоциированные с ядрышкообразующими районами (Ag-ЯОР-белки) в пролиферирующих клетках во взаимосвязи с клинико-морфологическими параметрами и выживаемостью при немелкоклеточном раке легкого. Материал и методы. Исследованы 207 операционных материалов немелкоклеточного рака легкого с помощью двойного окрашивания на антиген Ki-67 (клон MIB-1) методом иммуногистохимии и на Ag-ЯОР-белки азотнокислым серебром. Результаты. В немелкоклеточном раке легкого площадь Ag-ЯОР-белков в MIB-1 позитивных клетках взаимосвязана с клинико-морфологическими параметрами по системе TNM: показателем T, наибольшим размером опухоли, показателем N, стадией заболевания и дифференцировкой. Выживаемость больных с небольшой площадью Ag-ЯОР-белков в MIB-1 позитивных клетках лучше по сравнению с большой. Площадь Ag-ЯОР-белков в MIB-1 позитивных клетках – независимый фактор прогноза при немелкоклеточном раке легкого. Заключение. Площадь Ag-ЯОР-белков в MIB-1 позитивных клетках взаимосвязана с клинико-морфологическими параметрами по системе TNM и выживаемостью при немелкоклеточном раке легкого.

Ключевые слова: аргирофильные белки ядрышкообразующих районов в MIB-1 позитивных клетках, выживаемость, немелкоклеточный рак легкого

RELATION OF ARGYROPHILIC NUCLEOLAR ORGANIZER REGION ASSOCIATED PROTEINS IN MIB-1 POSITIVE CELLS TO CLINICAL MORPHOLOGICAL PARAMETERS AND SURVIVAL IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER

¹Kobyakov D.S., ²Avdalyan A.M., ²Lazarev A.F., ³Lushnikova E.L., ³Nepomnyaschikh L.M.

¹Budget institution «Kogalymskaya City Hospital», Kogalym, e-mail: dskob@yandex.ru;

²Laboratory of Molecular Diagnosis, Altai branch N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center,
Barnaul, e-mail: ashot_avdalyan@mail.ru;

³FGBU (Federal State Budgetary Institution) Research Institute of regional pathology and
pathomorphology SO (Siberian Department) RAMS, Novosibirsk, e-mail: pathol@soramn.ru

Objective. Study argyrophilic proteins associated with nucleolar organizer regions (AgNOR) in proliferating cells in relation with clinical morphological parameters and survival in non-small cell lung cancer (NSCLC). Methods: We studied 207 surgical specimen of NSCLC with double staining for antigen Ki-67 (clone MIB-1) using immunohistochemistry and for AgNOR using silver nitrate. Results: Area of AgNOR in MIB-1 positive cells of NSCLC is related to clinical and morphological parameters under TNM system: parameter T, greatest tumor dimension, parameter N, disease stage, and differentiation. Survival of patients with small area of AgNOR in MIB-1 positive cells is better compared to those with larger one. The area of AgNOR in MIB-1 positive cells and greatest tumor dimension, value N, histogenesis are independent predictive factors at NSCLC. Conclusion: Area of AgNOR in MIB-1 positive cells is related to clinical and morphological parameters under TNM system and survival in NSCLC.

Keywords: argyrophilic proteins associated with nucleolar organizer regions in MIB-1 positive cells, survival, non-small cell lung cancer

На сегодняшний день актуальным является изучение морфологических критериев, связанных с важнейшими клинико-морфологическими параметрами немелкоклеточного рака легкого (НМКРЛ), выживаемостью больных и способностью с большой долей вероятности прогнозировать течение заболевания. Пролиферация – основополагающий процесс в возникнове-

нии и развитии опухоли, а также фактор прогноза ее биологического поведения. На сегодняшний день существуют определенные трудности в достоверной оценке пролиферативного потенциала опухоли, так как пролиферация включает в себя не только количество пролиферирующих клеток (пролиферативная активность, фракция роста), но и скорость прохождения

фаз клеточного цикла (продолжительность клеточного цикла).

Для оценки пролиферативной активности общепризнанным и доступным является иммуногистохимическое определение антигена Ki-67. Антиген Ki-67 выявляется в клетках в позднюю G₁, S, G₂, M фазы, однако функциональное значение этого ядерного белка в процессе пролиферации до конца не известно [1]. Аргирофильные белки, ассоциированные с ядрышкообразующими районами (Ag-ЯОР-белки), являются маркером скорости клеточного цикла. До 75% окрашивания Ag-ЯОР-белков составляют два главных аргирофильных белка C23 (нуклеолин) и B23 (нуклеофозмин), играющих важнейшую роль в синтезе рибосомальной РНК. Эти белки выявляются в ядрах клеток на протяжении всего клеточного цикла, количественно увеличиваясь в 1,5–3 раза в S- и G₂-фазы [2]. Показана обратная зависимость между Ag-ЯОР-белками и длительностью клеточного цикла [3], временем удвоения НМКРЛ [4, 5].

Munakata S. и Hendricks J.V. предложили метод двойного окрашивания на антиген Ki-67 и Ag-ЯОР-белки, позволяющий оценивать активность ядрышковых организаторов (продолжительность клеточного цикла) в пролиферирующих клетках [6]. В мировой литературе работы, посвященные исследованию пролиферативного потенциала опухоли с использованием двойного окрашивания на антиген Ki-67 и Ag-ЯОР-белки, немногочисленны [7–13]. Отсутствуют работы, в которых результаты двойного окрашивания на антиген Ki-67 и Ag-ЯОР-белки

оцениваются с использованием компьютерного анализа изображений и во взаимосвязи с клинико-морфологическими параметрами и выживаемостью при НМКРЛ.

Исходя из вышеизложенного целью работы стало исследование Ag-ЯОР-белков в М1В-1 позитивных клетках во взаимосвязи с клинико-морфологическими параметрами и выживаемостью при НМКРЛ.

Материал и методы исследования

Исследованы 207 операционных материалов НМКРЛ, удаленных за период 2007–2009 гг. в Алтайском краевом онкологическом диспансере (случаи с М1 и множественными опухолями исключены из исследования). Средний возраст пациентов составил 59 лет (от 35 до 75 лет), 177 мужчин (86%) и 30 женщин (14%). Выполнена лобэктомия 145 пациентам (70%) и пневмонэктомия 62 пациентам (30%). Предоперационная химиотерапия и лучевая терапия не проводились. Постоперационная химиотерапия проведена 30 пациентам (14%), чаще использовались цисплатин и этопозид. Постоперационная лучевая терапия проведена 64 пациентам (31%), суммарной очаговой дозой 50–60 Гр. Патогистологическая характеристика опухолей определена согласно классификации TNM 7 пересмотра [14] и представлена в таблице.

Кусочки ткани фиксировали 18–24 часа в 10% нейтральном забуференном формалине. После стандартной проводки операционного материала готовили гистологические срезы толщиной 4 мкм. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином, ПШИК-реактивом/альциановым синим, по Крейбергу. Для уточнения гистогенеза опухоли и с дифференциально-диагностической целью иммуногистохимическим методом определяли цитokerатины 7 (клон SP52), 20 (клон SP33), High Molecular Weight (клон 34βE12), 5/6 (клон D5/16B4) в автоматическом стейнере Ventana XT (контроль окрашивания – эпидермис кожи и слизистая оболочка желудка).

Площадь Ag-ЯОР-белков в М1В-1 позитивных клетках при НМКРЛ.

Характеристика	Количество случаев (абс. (%))	Площадь Ag-ЯОР-белков в М1В-1 позитивных клетках (в мкм ²)	
		Me (и.и.)	p
Первичная опухоль			
Т 1	55 (27)	8,95 (7,60–10,91)	< 0,001
Т 2-3	152 (73)	11,08 (8,92–13,16)	
Наибольший размер			
< 3 см	87 (42)	8,93 (7,60–10,92)	< 0,001
> 3 см	120 (58)	11,60 (9,37–13,42)	
Лимфатические узлы			
N 0	132 (64)	9,43 (8,04–11,88)	< 0,001
N 1-3	75 (36)	11,89 (10,37–14,23)	
Стадия			
I	107 (52)	9,35 (7,89–11,87)	< 0,001
II-III	100 (48)	11,41 (9,21–13,75)	
Гистогенез			
аденокарцинома	94 (45)	10,20 (8,79–12,53)	0,8
плоскоклеточный рак	113 (55)	10,58 (8,37–12,69)	
Дифференцировка			
высокая	52 (25)	8,79 (7,73–10,95)	< 0,001
умеренная-низкая	155 (75)	11,01 (8,97–13,04)	

Из парафиновых блоков забраны столбики ткани иглой-панчером с внутренним диаметром 1,5 мм, на основании просмотра соответствующих гистологических препаратов. Для исключения гетерогенности окрашивания изготовлена тканевая матрица, с которой приготовлены гистологические срезы толщиной 4 мкм. Тканевая матрица окрашена иммуногистохимическим методом, согласно протоколу производителя: стрептавидин-биотиновым методом с первичными антителами к Ki-67 (клон MIB-1, DAKO) и хромогеном – new fuchsin. Перед окрашиванием срезы автоклавировали при 120°C 20 минут, в 0,01 М цитратном буфере (рН = 6,0). После инкубации с хромогеном срезы отмывали в бидистиллированной воде. Далее срезы окрашивали азотнокислым серебром по одностадийной методике [6, 15]: во влажной камере при 37°C 19 минут. Докрашивание ядер не проводили, срезы заключали в водную среду Faramount (DAKO). В каждом случае определяли площадь Ag-ЯОР-белков (в мкм²) в ядрах 100 случайно выбранных MIB-1 позитивных клеток с 10–30 цифровых изображений, полученных с соответствующих полей зрения микроскопа при увеличении x1000 (объектив x100, 1.25, oil). Компьютерный анализ изображений проводили в программе ImageJ 1.42. Для исключения ошибки измерений гранулы размером менее 0,1 мкм² исключены из анализа.

Статистический анализ данных осуществляли в программе Statistica 6.0. Так как полученные данные в выборках не соответствовали критериям нормального распределения, то меру центральной

тенденции в группах представляли в виде медианы (Me), а меру рассеяния в виде интерквартильного интервала (и.и.). При проверке статистических гипотез применяли непараметрические методы: однофакторный тест Краскела – Уоллиса, U-тест Манна – Уитни, для определения корреляции – χ^2 тест. Определяли общую скорректированную выживаемость больных за пятилетний период после операции, использовали метод Каплана – Мейера, логарифмический ранговый тест, регрессионную модель Кокса. Достоверность полученных критериев оценивали при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Результат иммуногистохимического окрашивания срезов с первичными антителами MIB-1 и последующей окраской азотнокислым серебром определялся в виде округлых гранул черного цвета (Ag-ЯОР-белки), расположенных на фоне красного ядра (в MIB-1 позитивных клетках) или на фоне коричневого ядрышка или бледно-желтого ядра (в MIB-1 негативных клетках) (рис. 1). Результаты определения Ag-ЯОР-белков в MIB-1 позитивных клетках НМКРЛ во взаимосвязи с морфологическими параметрами опухоли, а также результаты сравнения между этими группами представлены в таблице.

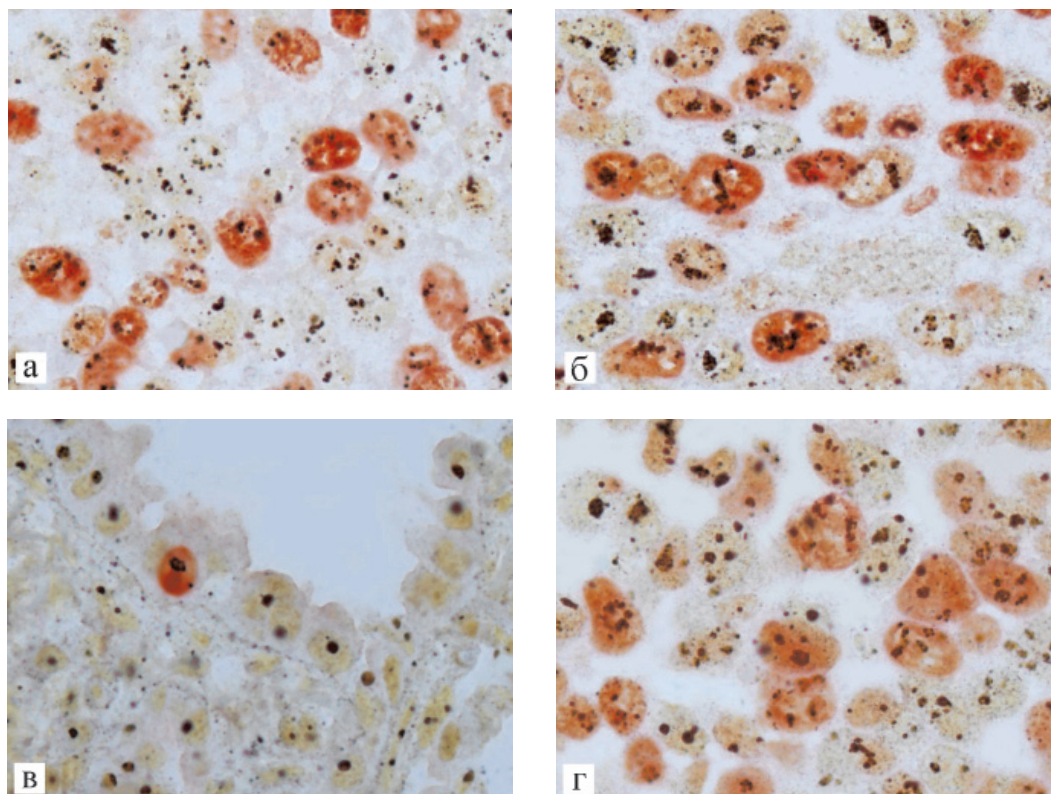


Рис. 1. Аргирофильные белки, ассоциированные с ядрышкообразующими районами (Ag-ЯОР-белки) в MIB-1 позитивных и негативных клетках мелкоклеточного рака легкого: в плоскоклеточном раке с отсутствием (а) и наличием (б) метастазов в лимфатические узлы, в аденокарциноме с высокой (в) и низкой (г) дифференцировкой. Двойная окраска на Ki-67 (клон MIB-1) методом иммуногистохимии и на Ag-ЯОР-белки азотнокислым серебром, x1000

В НМКРЛ площадь Ag-ЯОР-белков в М1В-1 позитивных клетках составила 10,47 (8,57–12,69) мкм². Отмечалось увеличение площади Ag-ЯОР-белков в М1В-1 позитивных клетках в группе Т2-3 по сравнению с Т1. При размере первичной опухоли менее 3 см площадь Ag-ЯОР-белков в М1В-1 позитивных клетках была меньше, чем в опухоли более 3 см. Найдено увеличение площади Ag-ЯОР-белков в М1В-1 позитивных клетках НМКРЛ с наличием метастазов в лимфатические узлы по сравнению с опухолью без метастазов (рис. 1 а, б). Площадь Ag-ЯОР-белков в М1В-1 позитивных клетках меньше в I стадии заболевания по сравнению с II–III стадиями. Отсутствовало отличие площади Ag-ЯОР-белков в М1В-1 позитивных клетках между аденокарциномой и плоскоклеточным раком. Площадь Ag-ЯОР-белков в М1В-1 позитивных клетках больше при умеренной и низкой дифференцировке по сравнению с высокодифференцированной

ванная выживаемость больных НМКРЛ за пятилетний период после операции составила 39,3 ± 3,8%. Выживаемость больных НМКРЛ имела статистически значимое отличие ($p < 0,001$) в зависимости от площади Ag-ЯОР-белков в М1В-1 позитивных клетках: 61,2 ± 5,4% – при небольшой площади и 16,2 ± 4,2% – при большой (рис. 2). При однофакторном регрессионном анализе площадь Ag-ЯОР-белков в М1В-1 позитивных клетках НМКРЛ имела влияние на выживаемость больных ($\chi^2 = 59,9$, $\beta = 1,51$, стандартная ошибка 0,21, $p < 0,001$). При проведении многофакторного регрессионного анализа ($\chi^2 = 60,3$) влияние на выживаемость больных имели площадь Ag-ЯОР-белков в М1В-1 позитивных клетках ($\beta = 1,05$, стандартная ошибка 0,23, $p < 0,001$), наибольший размер опухоли ($\beta = 0,90$, стандартная ошибка 0,33, $p = 0,007$), показатель N ($\beta = 0,81$, стандартная ошибка 0,33, $p = 0,01$) и гистогенез НМКРЛ ($\beta = 0,22$, стандартная ошибка 0,10, $p = 0,03$).

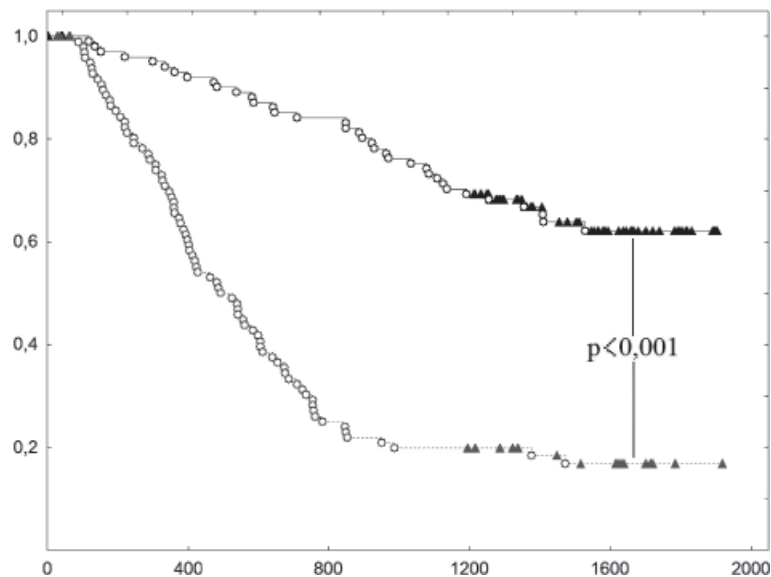


Рис. 2. График выживаемости по Каплану – Мейеру больных немелкоклеточным раком легкого с небольшой (сплошная линия) и большой (прерывистая линия) площадью Ag-ЯОР-белков в М1В-1 позитивных клетках. По оси абсцисс – время жизни (в днях), по оси ординат – доля выживших больных

карциномой (рис. 1 в, г). В НМКРЛ площадь Ag-ЯОР-белков в М1В-1 позитивных клетках имела корреляцию с показателем Т ($p < 0,001$), наибольшим размером опухоли ($p < 0,001$), показателем N ($p < 0,001$), стадией заболевания ($p < 0,001$) и дифференцировкой ($p < 0,001$).

Случаи с площадью Ag-ЯОР-белков в М1В-1 позитивных клетках 10,47 мкм² и более считались с большой площадью (101 случай – 49%), до 10,47 мкм² – с небольшой (106 случаев – 51%). Общая скорректиро-

В нашем исследовании НМКРЛ найдена взаимосвязь площади Ag-ЯОР-белков в М1В-1 позитивных клетках с клинко-морфологическими параметрами по системе TNM: показателем Т, наибольшим размером опухоли, показателем N, стадией заболевания и дифференцировкой опухоли. В других исследованиях также показана взаимосвязь отдельных клинко-морфологических параметров по системе TNM с Ag-ЯОР-белками в М1В-1 позитивных клетках. Yamaguchi S. при НМКРЛ нашел увеличение количества

Ag-ЯОР-белков в МІВ-1 позитивных клетках при Т4 по сравнению с Т1-3 и при N 2, 3 по сравнению с N 0, 1 [13]. Kidogawa H. с соавторами при раке молочной железы нашли увеличение количества Ag-ЯОР-белков в МІВ-1 позитивных клетках в опухоли с наибольшим размером более 2 см по сравнению с опухолью менее 2 см [10]. Tomobe M. с соавторами при раке мочевого пузыря нашли последовательное увеличение количества Ag-ЯОР-белков в МІВ-1 позитивных клетках в группах Т1, Т2, Т3 [12]. Однако, результаты в этих работах получены при субъективном анализе (визуальном подсчете количества Ag-ЯОР-белков) в отличие от наших результатов, полученных при объективном анализе (компьютерном программном анализе изображений).

Выживаемость больных НМКРЛ с небольшой площадью Ag-ЯОР-белков в МІВ-1 позитивных клетках лучше по сравнению с большой. При проведении одно- и многофакторного регрессионного анализа площадь Ag-ЯОР-белков в МІВ-1 позитивных клетках имела независимое влияние на выживаемость больных НМКРЛ. Результаты, аналогичные нашим, получены при исследовании НМКРЛ [9], рака молочной железы [7, 8, 10, 11] и мочевого пузыря [12]. Многочисленные исследования Ag-ЯОР-белков в злокачественных опухолях указывают, что содержание Ag-ЯОР-белков – независимый фактор прогноза [16]. Прогностическая значимость содержания Ag-ЯОР-белков в МІВ-1 позитивных клетках взаимосвязана с разными темпами пролиферации НМКРЛ: при большой площади Ag-ЯОР-белков в МІВ-1 позитивных клетках – короткий клеточный цикл пролиферирующих клеток и высокая скорость пролиферации и наоборот, при небольшой площади – длинный клеточный цикл пролиферирующих клеток и низкая скорость пролиферации.

Таким образом, площадь Ag-ЯОР-белков в МІВ-1 позитивных клетках взаимосвязана с клинико-морфологическими параметрами по системе TNM и выживаемостью при НМКРЛ.

Выводы

1. В НМКРЛ площадь Ag-ЯОР-белков в МІВ-1 позитивных клетках взаимосвязана с клинико-морфологическими параметрами по системе TNM: показателем Т, наибольшим размером опухоли, показателем N, стадией заболевания и дифференцировкой.

2. Выживаемость больных НМКРЛ с небольшой площадью Ag-ЯОР-белков в МІВ-1 позитивных клетках лучше по сравнению с большой.

3. Площадь Ag-ЯОР-белков в МІВ-1 позитивных клетках – независимый фактор прогноза при НМКРЛ.

Список литературы/References

- Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown // *J Cell Physiol.* – 2000. – № 182(3). – P. 311–322.
- Sirri V., Roussel P., Hernandez-Verdun D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. – *Micron*, 2000. – № 31(2). – P. 121–126.
- Canet V., Montmasson M.P., Usson Y., Giroud F., Brugal G. Correlation between silver-stained nucleolar organizer region area and cell cycle time // *Cytometry.* – 2001. – № 43(2). – P. 110–116.
- Abe S., Sukoh N., Ogura S., Kunikane H., Watanabe N., Nakajima I. et al. Nucleolar organizer regions as a marker of growth rate in squamous cell carcinoma of the lung. – *Thorax*, 1992. – № 47(10). – P. 778–780.
- Ogura S., Abe S., Sukoh N., Kunikane H., Nakajima I., Inoue K. et al. Correlation between nucleolar organizer regions visualized by silver staining and the growth rate of lung adenocarcinoma. – *Cancer*, 1992. – № 70(1). – P. 63–68.
- Munakata S., Hendricks J.B. A multilabeling technique for simultaneous demonstration and quantitation of Ki-67 and nucleolar organizer regions (AgNORs) in paraffin-embedded tissue // *J Histochem Cytochem.* – 1994. – № 42(6). – P. 789–793.
- Abboud P., Lorenzato M., Joly D., Quereux C., Birembaut P., Ploton D. Prognostic value of a proliferation index including MIB1 and argyrophilic nucleolar organizer regions proteins in node-negative breast cancer // *Am J Obstet Gynecol.* – 2008. – № 199(2). – P. 146.e1–7.
- Biesterfeld S., Farokhzad F., Kluppel D., Schneider S., Hufnagl P. Improvement of breast cancer prognostication using cell kinetic-based silver-stainable nucleolar organizer region quantification of the MIB-1 positive tumor cell compartment // *Virchows Arch.* – 2001. – № 438(5). – P. 478–484.
- Bigras G., Marcelpoil R., Brambilla E., Brugal G. Interest of targeting AgNORs measurement in cycling cells: in vivo cell kinetic evaluation of non-small cell lung cancer // *Anal Cell Pathol.* – 1996. – № 11(3). – P. 183–198.
- Kidogawa H., Nanashima A., Yano H., Matsumoto M., Yasutake T., Nagayasu T. Clinical significance of double staining of MIB-1 and AgNORs in primary breast carcinoma // *Anticancer Res.* – 2005. – № 25(6B). – P. 3957–3962.
- Lorenzato M., Abboud P., Lechki C., Browarnyj F., O'Donohue M.F., Ploton D. et al. Proliferation assessment in breast cancer: a double-staining technique for AgNOR quantification in MIB-1 positive cells especially adapted for image cytometry. – *Micron*, 2000. – № 31(2). – P. 151–159.
- Tomobe M., Shimazui T., Uchida K., Hinotsu S., Akaza H. Argyrophilic nucleolar organizer region in proliferating cell has a predictive value for local recurrence in superficial bladder tumor // *J Urol.* – 1999. – № 162(1). – P. 63–68.
- Yamaguchi S. Relationship between the responses to simultaneous double staining for Ki-67 and AgNOR and the clinicopathological features of non-small cell pulmonary carcinoma. *Acta Med Nagasaki.* – 1994. – № 39(4). – P. 147–152.
- Sobin L., Gospodarowicz M., Wittekind C. (Eds.): *TNM classification of malignant tumours.* 7th edition. – Oxford, Wiley-Blackwell, 2009.
- Trere D. AgNOR staining and quantification. *Micron*. 2000. – № 31(2). – P. 127–131.
- Pich A., Chiusa L., Margaria E. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. – *Micron*, 2000. – № 31(2). – P. 133–141.

Рецензенты:

Лепилов А.В., д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии с секционным курсом, ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет», г. Барнаул;

Талалаев С.В., д.м.н., профессор кафедры гистологии, ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет», г. Барнаул.