

# Взаимосвязь клинико-морфологических параметров и выживаемости при аденокарциноме легкого с активностью ядрышковых организаторов в mib-1 позитивных клетках

**КОБЯКОВ Д.С., АВДАЛЯН А.М., ЛАЗАРЕВ А.Ф., КЛИМАЧЕВ В.В., БОБРОВ И.П.**

**Цель:** Исследовать аргирофильные белки, ассоциированные с ядрышкообразующими районами (Ag-ЯОР-белки) в пролиферирующих клетках во взаимосвязи с клинико-морфологическими параметрами и выживаемостью при аденокарциноме легкого.

**Материал и методы.** Исследованы 94 операционных материалов аденокарциномы легкого с помощью двойного окрашивания на антиген Ki-67 (клон MIB-1, DAKO) методом иммуногистохимии и на Ag-ЯОР-белки азотнокислым серебром.

**Результаты:** В аденокарциноме 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 аденокарциноме легкого.

**Заключение:** Площадь Ag-ЯОР-белков в MIB-1 позитивных клетках взаимосвязана с клинико-морфологическими параметрами по системе TNM и выживаемостью при аденокарциноме легкого.

**Ключевые слова:** аргирофильные белки ядрышкообразующих районов в MIB-1 позитивных клетках, выживаемость, аденокарцинома легкого.

**Purpose.** Study of argyrophilic proteins associated with nucleolar organizer regions (AgNOR) in proliferating cells in conjunction with clinical and morphological parameters and survival in lung adenocarcinoma.

**Material and methods.** Investigated 94 surgery samples of lung adenocarcinoma by double staining for Ki-67 antigen (clone MIB-1, DAKO) with immunohistochemistry and AgNOR with silver nitrate.

**Results.** In lung adenocarcinoma area of AgNOR in MIB-1 positive cells correlated with clinical and morphological parameters on TNM system: value T, greatest tumor dimension, value N, stage and differentiation. Survival of patients with small area of AgNOR in MIB-1 positive cells is better than with large one. Area of AgNOR in MIB-1 positive cells – independent prognostic factor in lung adenocarcinoma.

**Conclusion.** Area of AgNOR in MIB-1 positive cells correlate with clinical and morphological parameters on TNM system and survival in lung adenocarcinoma.

**Keywords:** argyrophilic proteins associated with nucleolar organizer regions in MIB-1 positive cells, survival, lung adenocarcinoma.

Контактная информация:

**Кобяков Дмитрий Сергеевич (Kobyakov Dmitriy Sergeevich)** – кандидат медицинских наук, врач патологоанатом, Бюджетное учреждение «Когалымская городская больница», +7 (922) 774-27-24, e-mail: [dskob@yandex.ru](mailto:dskob@yandex.ru)

**Авдалян Ашот Меружанович (Avdalyan Ashot Merudzhanovich)** – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, Лаборатория молекулярной диагностики, ФГБУ Алтайский филиал РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, +7 (3853) 68-86-89, e-mail: [ashot\\_avdalyan@mail.ru](mailto:ashot_avdalyan@mail.ru)

**Лазарев Александр Федорович (Lazarev Aleksandr Fedorovich)** – доктор медицинских наук, профессор, директор Алтайского филиала РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, +7 (3853) 63-26-20, e-mail: [aoc@ctmed.ru](mailto:aoc@ctmed.ru)

**Климачев Владимир Васильевич (Klimatchev Vladimir Vasilievitch)** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии, АГМУ, Барнаул, +7 (3853) 40-15-44, e-mail: [pathology\\_agmu@mail.ru](mailto:pathology_agmu@mail.ru)

**Бобров Игорь Петрович (Bobrov Igor Petrovitch)** – кандидат медицинских наук, ассистент, ассистент кафедры патологической анатомии, АГМУ, Барнаул, +7 (3853) 40-15-44, e-mail: [pathology\\_agmu@mail.ru](mailto:pathology_agmu@mail.ru)

## Введение

Аденокарцинома легких составляет не менее трети от всех гистологических типов неоплазии этой локализации. На сегодняшний день актуальным является изучение морфологических критериев, связанных с важнейшими клинико-морфологическими параметрами аденокарциномы легкого и выживаемостью больных, способными с большой долей вероятности прогнозировать течение заболевания.

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 [10]. Маркером скорости клеточного цикла являются аргирофильные белки, ассоциированные с ядрышкообразующими районами (Ag-ЯОР-белки) – два основных белка C23 (нуклеолин)

и B23 (нуклеофозмин). Эти белки участвуют в синтезе рРНК и выявляются в ядрах клеток на протяжении всего клеточного цикла, количественно увеличиваясь в 1,5–3 раза в S- и G2-фазы [11]. Показана обратная зависимость между Ag-ЯОР-белками и длительностью клеточного цикла [4], временем удвоения аденокарциномы легкого [8].

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 [7]. В мировой литературе работы посвященные исследованию пролиферативного потенциала опухоли с использованием двойного окрашивания на антиген Ki-67 и Ag-ЯОР-белки немногочисленны [1–3, 5, 6, 13, 15]. 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 аденокарциноме легкого.

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

Материал и методы. Исследованы 94 операционных материалов аденокарциномы легкого, удаленных за период 2007–2009 гг. в Алтайском краевом онкологическом диспансере (случаи с M1 и множественными опухолями исключены из исследования). Средний возраст пациентов составил 59 лет (от 35 до 75 лет), 68 мужчин (72%) и 26 женщин (28%). Выполнена лобэктомия 76 пациентам (81%) и пневмонэктомия 18 пациентам (19%). Предоперационная химиотерапия и лучевая терапия не проводились. Патогистологическая характеристика опухолей определена согласно классификации TNM 7 пересмотра [12]. Количество опухолей с T 1–31 случай (33%), с T 2–50 случаев (53%), с T 3–13 случаев (14%); с наибольшим размером опухоли менее 3 см – 43 случая (46%), более 3 см – 51 случай (54%); с N0–60 случаев (64%), с N1–3–34 случая (36%); с I стадией – 51 случай (54%), со II стадией – 24 случая (26%), с III стадией – 19 случаев (20%); с высокой дифференцировкой – 14 случаев (15%), с умеренной дифференцировкой – 46 случаев (49%), с низкой дифференцировкой – 34 случая (36%).

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, ШИК-реактивом/альциановым синим, по Крейбергу. Для уточнения гистогенеза опухоли и с дифференциально-диагностической целью иммуногистохимическим методом определяли цитокератины 7 (клон SP52), 20 (клон SP33), High Molecular Weight (клон 34BE12), цитокератины 5/6 (клон D5/16B4) в автоматическом стейнере Ventana XT (контроль окрашивания – эпидермис кожи и слизистая оболочка желудка).

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 M цитратном буфере (pH=6,0). После инкубации с хромогеном срезы отмывали в бидистиллированной воде. Далее

срезы окрашивали азотнокислым серебром по одностадийной методике [7, 14]: 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 мкм<sup>2</sup>) 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 мкм<sup>2</sup> исключены из анализа.

Статистический анализ данных осуществляли в программе STATISTICA 6.0. Так как полученные данные в выборках соответствовали критериям нормального распределения (критерий Шапиро-Уилка  $W=0,98$ ,  $p>0,05$ ), то меру центральной тенденции в группах представляли в виде среднего (M), а меру рассеяния в виде стандартного отклонения (SD). При проверке статистических гипотез применяли непараметрические методы: однофакторный тест Краскела-Уоллиса, U-тест Манна-Уитни, коэффициент корреляции рангов Спирмена. Определяли пятилетнюю 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. В аденокарциноме легкого площадь Ag-ЯОР-белков в MIB-1 позитивных клетках составила  $10,56 \pm 2,96$  мкм<sup>2</sup>. Отмечалось последовательное увеличение площади Ag-ЯОР-белков в MIB-1 позитивных клетках в группах T 1, T 2 и T 3 – соответственно  $9,08 \pm 2,21$  мкм<sup>2</sup>,  $11,05 \pm 3,11$  мкм<sup>2</sup> и  $12,32 \pm 2,49$  мкм<sup>2</sup>; однако, статистически значимое отличие найдено только между группами T 1 и T 2 ( $p=0,003$ ), T 1 и T 3 ( $p<0,001$ ). При размере первичной опухоли менее 3 см площадь Ag-ЯОР-белков в MIB-1 позитивных клетках была меньше, чем в опухоли более 3 см ( $p<0,001$ ) – соответственно  $9,17 \pm 2,55$  мкм<sup>2</sup> и  $11,76 \pm 2,77$  мкм<sup>2</sup>. Найдено статистически значимое увеличение площади Ag-ЯОР-белков в MIB-1 позитивных клетках в аденокарциноме легкого с наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах по сравнению с опухолью без метастазов ( $p<0,001$ ) – соответственно  $9,76 \pm 2,60$  мкм<sup>2</sup> и  $12,03 \pm 3,03$  мкм<sup>2</sup>. Площадь Ag-ЯОР-белков в MIB-1 позитивных клетках достоверно меньше при 1 стадии по сравнению со 2 стадией ( $p=0,005$ ) и 3 стадией ( $p=0,01$ ) – соответственно  $9,63 \pm 2,45$  мкм<sup>2</sup>,  $11,77 \pm 3,19$  мкм<sup>2</sup> и  $11,62 \pm 3,14$  мкм<sup>2</sup>. Также площадь Ag-ЯОР-белков в MIB-1 позитивных клетках достоверно меньше при высокодифференцированной аденокарциноме по сравнению с умеренно дифференцированной ( $p<0,001$ ) и низко дифференцированной ( $p=0,003$ ) – соответственно  $8,25 \pm 1,99$  мкм<sup>2</sup>,  $11,28 \pm 3,02$  мкм<sup>2</sup> и  $10,59 \pm 2,77$  мкм<sup>2</sup>. В аденокарциноме легкого площадь Ag-ЯОР-белков в MIB-1 позитивных клетках имела умеренную корреляцию с показателем T ( $r=0,40$ ,  $p<0,001$ ), наибольшим размером опухоли ( $r=0,46$ ,  $p<0,001$ ), показателем N ( $r=0,35$ ,  $p<0,001$ ), стадией процесса ( $r=0,33$ ,  $p=0,001$ ) и дифференцировкой ( $r=0,36$ ,  $p<0,001$ ).

Случаи с площадью Ag-ЯОР-белков в MIB-1 позитивных клетках  $10,56$  мкм<sup>2</sup> и более считались с большой площадью (44 случая – 47%), до  $10,56$  мкм<sup>2</sup> – с небольшой (50 случаев – 53%). Общая скорректированная выживаемость больных аденокарциномой легкого за пятилетний период после операции составила  $29,8 \pm 5,6\%$ . Выживаемость больных аденокарциномой легкого имела статистически значимое отличие ( $p<0,001$ ) в зависимости от площади Ag-ЯОР-белков в MIB-1 позитивных клетках:  $45,0 \pm 8,9\%$  – при небольшой площади и  $7,9 \pm 4,8\%$  – при

большой. При однофакторном регрессионном анализе площадь Ag-ЯОР-белков в мИВ-1 позитивных клетках аденокарциномы легкого имела влияние на выживаемость больных ( $\chi^2=25,5$ ,  $\beta=1,43$ , стандартная ошибка 0,29,  $p<0,001$ ). При проведении многофакторного регрессионного анализа ( $\chi^2=49,9$ ) влияние на выживаемость больных имели площадь Ag-ЯОР-белков в мИВ-1 позитивных клетках ( $\beta=0,95$ , стандартная ошибка 0,33,  $p=0,004$ ), стадия процесса ( $\beta=1,00$ , стандартная ошибка 0,46,  $p=0,03$ ) и наибольший размер опухоли ( $\beta=0,96$ , стандартная ошибка 0,40,  $p=0,02$ ).

Обсуждение. В нашем исследовании аденокарциномы легкого найдена взаимосвязь площади Ag-ЯОР-белков в мИВ-1 позитивных клетках с клинико-морфологическими параметрами по системе TNM, однако, достоверные отличия получены только при начальных этапах развития: Т 1, наибольшем размере опухоли менее 3 см, N0, I стадии и высокой дифференцировке. В других исследованиях также показана взаимосвязь отдельных клинико-морфологических параметров по системе TNM с Ag-ЯОР-белками в мИВ-1 позитивных клетках. Yamaguchi S. при немелкоклеточном раке легкого нашел увеличение количества Ag-ЯОР-белков в мИВ-1 позитивных клетках при Т 4 по сравнению с Т 1–3 и при N 2, 3 по сравнению с N 0, 1 [15]. Kidogawa H. с соавторами при раке молочной железы нашли увеличение количества Ag-ЯОР-белков в мИВ-1 позитивных клетках в опухоли с наибольшим размером более 2 см по сравнению с опухолью менее 2 см [5]. Tomobe M. с соавторами при раке мочевого пузыря нашли последовательное увеличение количества Ag-ЯОР-белков в мИВ-1 позитивных клетках в группах Т 1, Т 2, Т 3 и достоверное отличие только для Т 1 [13]. 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 аденокарциномой легкого

с небольшой площадью Ag-ЯОР-белков в мИВ-1 позитивных клетках лучше по сравнению с большой. При проведении одно- и многофакторного регрессионного анализа площадь Ag-ЯОР-белков в мИВ-1 позитивных клетках имела независимое влияние на выживаемость больных аденокарциномой легкого. Результаты аналогичные нашим получены при исследовании немелкоклеточного рака легкого [3], рака молочной железы [1, 2, 5, 6] и мочевого пузыря [13]. Многочисленные исследования активности ядрышковых организаторов в злокачественных опухолях указывают, что содержание Ag-ЯОР-белков – независимый фактор прогноза [9]. Прогностическая значимость содержания Ag-ЯОР-белков в мИВ-1 позитивных клетках взаимосвязана с разными темпами пролиферации аденокарциномы легкого: при большой площади Ag-ЯОР-белков в мИВ-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 мИВ-1 позитивных клетках взаимосвязана с клинико-морфологическими параметрами по системе TNM и выживаемостью при аденокарциноме легкого.

### Выводы:

1. В аденокарциноме легкого площадь Ag-ЯОР-белков в мИВ-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 аденокарциномой легкого с небольшой площадью Ag-ЯОР-белков в мИВ-1 позитивных клетках лучше по сравнению с большой.
3. Площадь Ag-ЯОР-белков в мИВ-1 позитивных клетках – независимый фактор прогноза при аденокарциноме легкого.

### Литература:

1. 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):146.e1–7.
2. Biesterfeld S., Farokhzad F., Klüppel 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):478–84.
3. 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):183–98.
4. 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):110–6.
5. 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):3957–62.
6. Lorenzato M., Abboud P., Lechki C., Browarnyj F., O'Donohue M.F., Ploton D., Adnet J.J. 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):151–9.
7. 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):789–3.
8. Ogura S., Abe S., Sukoh N., Kunikane H., Nakajima I., Inoue K., Kawakami Y. Correlation between nucleolar organizer regions visualized by silver staining and the growth rate of lung adenocarcinoma. *Cancer.* 1992 70 (1):63–8.
9. Pich A., Chiusa L., Margaria E. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron.* 2000 31 (2):133–41.
10. Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000 182 (3):311–22.
11. Sirri V., Roussel P., Hernandez-Verdun D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron.* 2000 31 (2):121–6.
12. Sobin L., Gospodarowicz M., Wittekind C. (Eds.): TNM classification of malignant tumours. 7th edition. Oxford, Wiley-Blackwell, 2009. P. 138–46.
13. 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):63–8.
14. Trere D. AgNOR staining and quantification. *Micron.* 2000 31 (2):127–31.
15. 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): 147–52.