

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

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

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

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

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

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.B. 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 клинко-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 клинко-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 34βE12), 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 автоклавились 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 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 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 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. В аденокарциноме легкого площадь Ag-ЯОР-белков в MIB-1 позитивных клетках составила $10,56 \pm 2,96$ мкм². Отмечалось последовательное увеличение площади Ag-ЯОР-белков в MIB-1 позитивных клетках в группах T 1, T 2 и T 3 – соответственно $9,08 \pm 2,21$ мкм², $11,05 \pm 3,11$ мкм² и $12,32 \pm 2,49$ мкм²; 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 $9,17 \pm 2,55$ мкм² и $11,76 \pm 2,77$ мкм². 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 $9,76 \pm 2,60$ мкм² и $12,03 \pm 3,03$ мкм². 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 $9,63 \pm 2,45$ мкм², $11,77 \pm 3,19$ мкм² и $11,62 \pm 3,14$ мкм². 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 $8,25 \pm 1,99$ мкм², $11,28 \pm 3,02$ мкм² и $10,59 \pm 2,77$ мкм². 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 $10,56$ мкм² и более считались с большой площадью (44 случая – 47%), до $10,56$ мкм² – 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 MIB-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 MIB-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 MIB-1 позитивных клетках с клинично-морфологическими параметрами по системе TNM, однако, достоверные отличия получены только при начальных этапах развития: T 1, наибольшем размере опухоли менее 3 см, N0, I стадии и высокой дифференцировке. В других исследованиях также показана взаимосвязь отдельных клинично-морфологических параметров по системе TNM с Ag-ЯОР-белками в MIB-1 позитивных клетках. Yamaguchi S. при немелкоклеточном раке легкого нашел увеличение количества Ag-ЯОР-белков в MIB-1 позитивных клетках при T 4 по сравнению с T 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 MIB-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 MIB-1 позитивных клетках в группах T 1, T 2, T 3 и достоверное отличие только для T 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 MIB-1 позитивных клетках лучше по сравнению с большой. При проведении одно- и многофакторного регрессионного анализа площадь Ag-ЯОР-белков в MIB-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 MIB-1 позитивных клетках взаимосвязана с разными темпами пролиферации аденокарциномы легкого: при большой площади Ag-ЯОР-белков в MIB-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 MIB-1 позитивных клетках взаимосвязана с клинично-морфологическими параметрами по системе TNM и выживаемостью при аденокарциноме легкого.

Выводы:

1. В аденокарциноме легкого площадь Ag-ЯОР-белков в MIB-1 позитивных клетках взаимосвязана с клинично-морфологическими параметрами по системе TNM: показателем T, наибольшим размером опухоли, показателем N, стадией заболевания и дифференцировкой.
2. Выживаемость больных аденокарциномой легкого с небольшой площадью Ag-ЯОР-белков в MIB-1 позитивных клетках лучше по сравнению с большой.
3. Площадь Ag-ЯОР-белков в MIB-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., Hufnagel 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., Browarny 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.