

ЯДРЫШКОВЫЕ ОРГАНИЗАТОРЫ В Ki-67 ПОЗИТИВНЫХ КЛЕТКАХ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО: КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАЛЛЕЛИ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ

Д.С. Кобяков¹, А.Ф. Лазарев², Е.Л. Лушникова³, Л.М. Непомнящих³

Бюджетное учреждение «Когалымская городская больница», г. Когалым¹

Алтайский филиал РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, г. Барнаул²

ФГБУ «НИИ региональной патологии и патоморфологии» СО РАМН, г. Новосибирск³

628480, Тюменская область, г. Когалым, ул. Молодежная, 19, e-mail: dskob@yandex.ru¹

Аннотация

Цель. Исследовать аргирофильные белки, ассоциированные с ядрышкообразующими районами (Ag-ЯОР-белки) в пролиферирующих клетках, во взаимосвязи с клинико-морфологическими параметрами и выживаемостью при плоскоклеточном раке легкого. **Материал и методы.** Исследованы 113 образцов операционного материала плоскоклеточного рака легкого с помощью двойного окрашивания: на антиген Ki-67 (клон MIB-1, DAKO) – методом иммуногистохимии и на Ag-ЯОР-белки – азотнокислым серебром. **Результаты.** В плоскоклеточном раке легкого площадь Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках связана с клинико-морфологическими параметрами: показателем T, наибольшим размером опухоли, показателем N, стадией заболевания и дифференцировкой. При небольшой площади Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках выше показатели отдаленной выживаемости больных. Площадь Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках – независимый фактор прогноза при плоскоклеточном раке легкого.

Ключевые слова: ядрышковые организаторы, Ki-67, выживаемость, плоскоклеточный рак легкого.

Изучение морфологических критериев, связанных с важнейшими клинико-морфологическими параметрами плоскоклеточного рака легкого и прогнозом течения заболевания, является актуальным [1]. Пролиферация – основополагающий процесс возникновения и развития опухоли, а также фактор прогноза. Существуют определенные трудности в оценке пролиферативного потенциала опухоли, так как он включает в себя не только количество пролиферирующих клеток, но и скорость прохождения клеткой фаз митоза (продолжительность клеточного цикла). Принятым критерием оценки пролиферативной активности является иммуногистохимическое определение антигена Ki-67. Антиген Ki-67 выявляется в клетках в G₁-, S-, G₂-, M-фазы, однако функциональное значение этого ядерного белка в процессе пролиферации до конца не известно [11]. 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 – С23 (нуклеолин) и В23 (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 [12]. Показана обратная зависимость между Ag-ЯОР-белками, длительностью клеточного цикла

[6] и временем удвоения плоскоклеточного рака легкого [3].

Предложен метод двойного окрашивания на антиген Ki-67 и Ag-ЯОР-белки, позволяющий оценивать активность ядрышковых организаторов (продолжительность клеточного цикла) в пролиферирующих клетках [9]. Работ, посвященных исследованию пролиферативного потенциала опухоли с использованием двойного окрашивания на антиген Ki-67 и Ag-ЯОР-белки, немного [4, 5, 7, 8, 14, 16]. 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 плоскоклеточном раке легкого.

Цель исследования – изучение Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках во взаимосвязи с клинико-морфологическими параметрами и выживаемостью при плоскоклеточном раке легкого.

Материал и методы

Исследованы 113 образцов плоскоклеточного рака легкого, полученных при операциях в Алтайском краевом онкологическом диспансере за период 2007–2009 гг. (случаи с отдаленными метастазами и множественными опухолями исключены из исследования). Средний возраст пациентов

Таблица

Площадь Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках (в мкм²) при плоскоклеточном раке легкого

Характеристика	Кол-во случаев	Площадь Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках
Первичная опухоль		
1. T ₁	24 (21 %)	9,53 ± 2,42 (p ₁₋₂ =0,1)
2. T ₂	72 (64 %)	10,54 ± 2,73 (p ₁₋₃ <0,001)
3. T ₃	17 (15 %)	12,79 ± 2,41 (p ₂₋₃ =0,003)
Размер первичной опухоли		
4. <3 см	44 (39 %)	9,46 ± 2,60
5. >3 см	69 (61 %)	11,44 ± 2,63 (p ₄₋₅ <0,001)
Лимфатические узлы		
6. N ₀	72 (64 %)	9,96 ± 2,58
7. N ₁₋₃	41 (36 %)	11,91 ± 2,70 (p ₆₋₇ <0,001)
Стадия опухолевого процесса		
8. I	56 (50 %)	9,83 ± 2,64 (p ₈₋₉ =0,058)
9. II	39 (34 %)	10,92 ± 2,61 (p ₈₋₁₀ <0,001)
10. III	18 (16 %)	12,71 ± 2,51 (p ₉₋₁₀ =0,02)
Дифференцировка опухоли		
11. Высокая	38 (34 %)	9,70 ± 2,61 (p ₁₁₋₁₂ =0,04)
12. Умеренная	52 (46 %)	10,82 ± 2,60 (p ₁₁₋₁₃ =0,007)
13. Низкая	23 (20 %)	11,93 ± 2,97 (p ₁₂₋₁₃ =0,1)

составил 59 лет (40–75 лет), из них – 109 (96 %) мужчин и 4 (4 %) женщины. Больным выполнены 69 (61 %) лобэктомии и 44 (39 %) пневмонэктомии. Предоперационная химиотерапия и лучевая терапия не проводились. Патогистологическая характеристика опухолей определена согласно классификации TNM 7-го пересмотра [13] и представлена в таблице.

Кусочки ткани фиксировали 18–24 ч 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), TTF-1 (клон SP141) 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 мин в 0,01 М цитратном буфере (pH=6,0). После инкубации с хромогеном срезы отмывали в бидистиллированной воде. Далее срезы окрашивали азотнокислым серебром по одностадийной методике [9, 15]: во влажной камере при 37°C 19 мин. Докрашивание ядер не проводили, срезы помещали в водную среду Faramount (DAKO). В каждом случае определяли площадь Ag-ЯОР-белков (в мкм²) в ядрах 100 случайно выбранных Ki-67 позитивных клеток с 10–30 цифровых изображений, полученных с соответствующих полей зрения микроскопа при увеличении ×1000 (объектив ×100, 1.25, oil). Компьютерный анализ изображений проводили в программе ImageJ 1.42. Во избежание ошибок в измерениях 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.

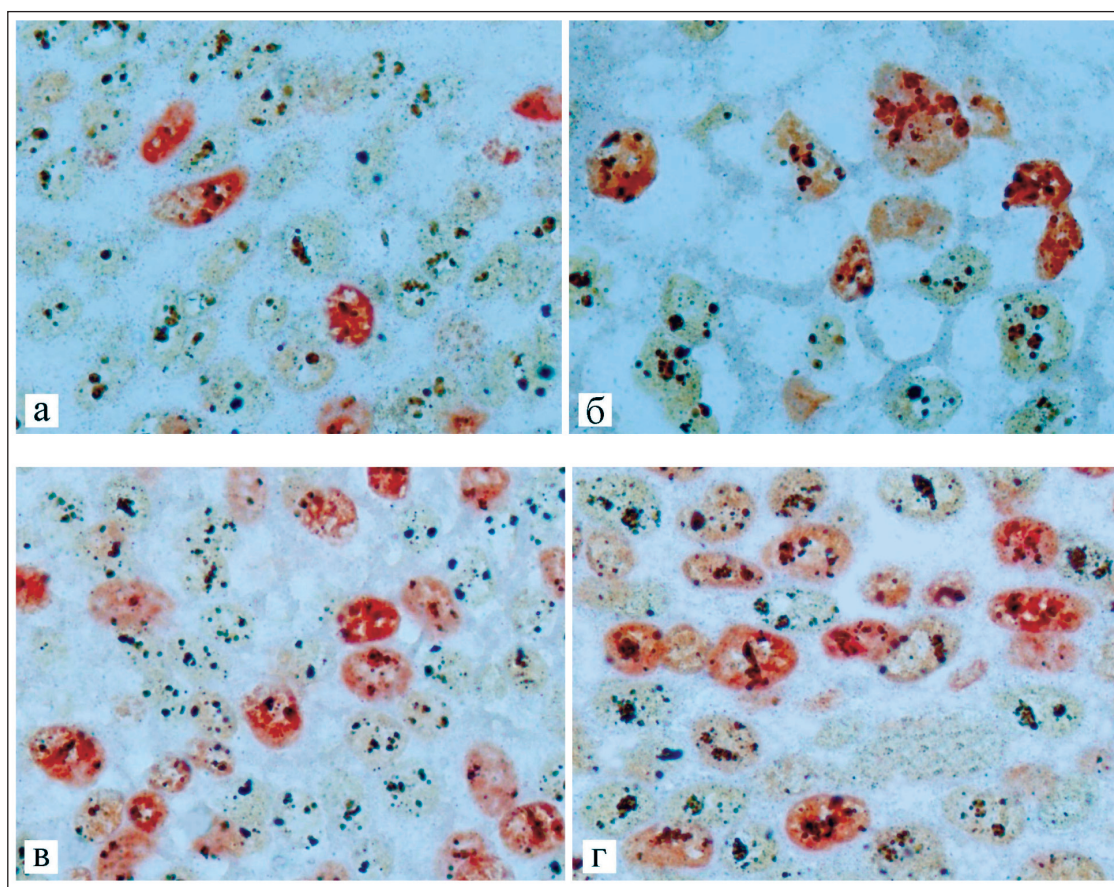


Рис. 1. Микрофото. Аргирофильные белки, ассоциированные с ядрышкообразующими районами (Аг-ЯОР-белки) в Ki-67 позитивных и негативных клетках плоскоклеточного рака легкого: с высокой (а) и низкой (б) дифференцировкой, в умеренно дифференцированном плоскоклеточном раке с отсутствием (в) и наличием (г) метастазов в регионарные лимфатические узлы. Двойная окраска: на антиген Ki-67 – методом иммуногистохимии и на Аг-ЯОР-белки – азотнокислым серебром, $\times 1000$

Результаты исследования

Результат иммуногистохимического окрашивания срезов с первичными антителами к антигену Ki-67 и последующей окраской азотнокислым серебром получали в виде округлых гранул черного цвета (Аг-ЯОР-белки), расположенных на фоне красного ядра (в Ki-67 позитивных клетках), или на фоне коричневого ядрышка, или бледно-желтого ядра (в Ki-67 негативных клетках) (рис. 1). Результаты определения Аг-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках плоскоклеточного рака легкого во взаимосвязи с клинико-морфологическими параметрами опухоли, а также результаты сравнения между этими группами представлены в таблице.

В плоскоклеточном раке легкого (ПКР) площадь Аг-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках составила $10,67 \pm 2,78 \text{ мкм}^2$. Отмечалось последовательное увеличение площади Аг-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках при опухолях стадий T_1 , T_2 и T_3 , однако статистически значимое отличие найдено для T_3 по сравнению с T_1 и T_2 . При размере первичной опухоли менее 3 см площадь Аг-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках была меньше, чем в опухоли более 3 см. Найдено статистически значимое увеличение площади Аг-ЯОР-белков

в Ki-67 позитивных клетках в плоскоклеточном раке легкого с наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах по сравнению с опухолью без метастазов (рис. 1 в, г). Площадь Аг-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках последовательно возрастает при I, II и III стадиях заболевания, однако значимые отличия найдены между III и I–II стадиями; между I и II стадиями – на уровне тенденции статистической значимости. Также последовательное увеличение площади Аг-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках прослеживается при снижении дифференцировки опухоли, статистически значимое отличие найдено при высокодифференцированной карциноме по сравнению с умеренно- и низкодифференцированной (рис. 1 а, б). В плоскоклеточном раке легкого площадь Аг-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках имела умеренную корреляцию с показателем T ($r=0,33$, $p<0,001$), наибольшим размером опухоли ($r=0,35$, $p<0,001$), показателем N ($r=0,34$, $p<0,001$), стадией заболевания ($r=0,34$, $p<0,001$) и дифференцировкой ($r=0,25$, $p<0,01$).

При анализе полученных данных установлено, что на отдаленные результаты лечения ПКР оказывает влияние площадь Аг-ЯОР-белков в

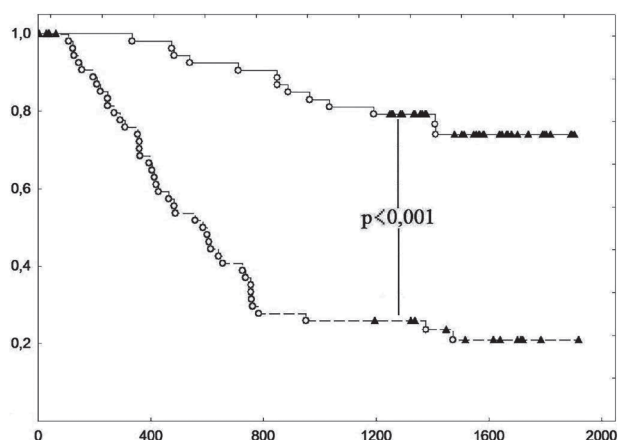


Рис. 2. График выживаемости по Каплану – Мейеру больных плоскоклеточным раком легкого с большой (прерывистая линия) и небольшой (сплошная линия) площадью Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках. По оси абсцисс – время жизни (в днях), по оси ординат – доля выживших больных

Ki-67 позитивных клетках. В проведенном исследовании общая 5-летняя скорректированная выживаемость больных плоскоклеточным раком легкого составила $46,9 \pm 5,2$ %. Случаи с площадью Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках $10,67 \text{ мкм}^2$ и более рассматривались как процессы с большой площадью (57 случаев – 50 %), до $10,67 \text{ мкм}^2$ – с небольшой площадью (56 случаев – 50 %). При небольшой площади Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках показатели выживаемости больных ПКР плоскоклеточным раком легкого равнялись $72,3 \pm 6,7$ %, что значимо выше ($p < 0,001$) по сравнению с группой больных с большой площадью Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках – $19,6 \pm 6,2$ % (рис. 2). При однофакторном регрессионном анализе площадь Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках плоскоклеточного рака легкого имела влияние на выживаемость больных ($\chi^2=37,7$, $\beta=1,79$, стандартная ошибка – 0,32, $p < 0,001$). При проведении многофакторного регрессионного анализа ($\chi^2=60,3$) влияние на выживаемость больных имели площадь Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках ($\beta=1,37$, стандартная ошибка – 0,35, $p < 0,001$) и показатель N ($\beta=1,47$, стандартная ошибка – 0,50, $p=0,003$).

Обсуждение

В нашем исследовании найдена взаимосвязь площади Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках с клинико-морфологическими параметрами плоскоклеточного рака легкого, однако значимые отличия выявлены при стадиях T₁ и T₂, наибольшем размере опухоли до 3 см, N₀ и высокой дифференцировке опухоли. В литературе также показана взаимосвязь отдельных клинико-морфологических параметров плоскоклеточного рака легкого с Ag-ЯОР-белками в Ki-67 позитивных клетках. В част-

ности, S. Yamaguchi et al. при немелкоклеточном раке легкого выявили увеличение количества Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках при T₄ по сравнению с T₁₋₃, и при N₂₋₃ по сравнению с N₀₋₁ [16]. У больных раком молочной железы обнаружено увеличение количества Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках при опухолях размером более 2 см [7]. Аналогичные данные были получены при раке мочевого пузыря, при котором наблюдалось последовательное увеличение количества Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках в группах T₁, T₂, T₃, но значимые различия – только при T₁ [14]. Однако эти результаты были получены при субъективном морфологическом анализе (визуальный подсчет количества Ag-ЯОР-белков), тогда как в нашем исследовании применялась методика объективного анализа (компьютерная программная оценка изображений).

Нами также выявлено, что показатели отдаленной (5-летней) выживаемости выше у больных плоскоклеточным раком легкого с небольшой площадью Ag-ЯОР-белков. Одно- и многофакторный регрессионный анализ показал, что площадь Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках имела независимое влияние на выживаемость больных плоскоклеточным раком легкого. В литературе аналогичные результаты были представлены при немелкоклеточном раке легкого [5], раке молочной железы [4, 7, 8] и мочевого пузыря [14]. Исследования, посвященные изучению ядрышковых организаторов в злокачественных опухолях, показывают, что содержание Ag-ЯОР-белков является независимым фактором прогноза течения заболевания [10]. Прогностическая значимость содержания Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках связана с разными темпами пролиферации плоскоклеточного рака легкого: при большой площади Ag-ЯОР-белков в Ki-67 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.

Ранее нами было проведено исследование площади Ag-ЯОР-белков и индекса метки Ki-67 в плоскоклеточном раке легкого [2]. При плоскоклеточном раке легкого площадь Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках имела выраженную корреляцию с площадью Ag-ЯОР-белков ($r=0,74$, $p < 0,001$), а с индексом метки Ki-67 – на уровне тенденции статистической значимости ($r=0,17$, $p=0,07$). Корреляции площади Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках и площади Ag-ЯОР-белков с клинико-морфологическими параметрами были одинаковыми. Индекс метки Ki-67 не коррелировал с клинико-морфологическими параметрами. Выживаемость больных плоскоклеточным раком легкого была одинаковой при небольших и больших значениях площади Ag-ЯОР-белков в Ki-67

позитивных клетках и площади Ag-ЯОР-белков. При этом этот показатель был больше при небольшой площади Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках – $72,3 \pm 6,7\%$, по сравнению с небольшим индексом метки Ki-67 – $57,7 \pm 7,9\%$. Уровень выживаемости при большой площади Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках значимо снизился до $19,6 \pm 6,2\%$ по сравнению с большим индексом метки Ki-67 – $38,4 \pm 6,4\%$.

Таким образом, отсутствуют отличия между результатами определения площади Ag-ЯОР-

белков в Ki-67 позитивных клетках и площади Ag-ЯОР-белков при сопоставлении с клинико-морфологическими параметрами и выживаемостью больных плоскоклеточным раком легкого, однако определение площади Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках имеет преимущество по сравнению с индексом метки Ki-67. Площадь Ag-ЯОР-белков в Ki-67 позитивных клетках взаимосвязана с клинико-морфологическими параметрами по системе TNM и показателями выживаемости при плоскоклеточном раке легкого.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гервас П.А., Литвяков Н.В., Попова Н.О., Добродеев А.Ю., Тарасова А.С., Юмов Е.Л., Иванова Ф.Г., Черемисина О.В., Афанасьев С.Г., Гольдберг В.Е., Чердынцева Н.В. Проблемы и перспективы совершенствования молекулярно-генетической диагностики для назначения таргетных препаратов в онкологии // Сибирский онкологический журнал. 2014. № 2. С. 46–55.
2. Кобяков Д.С., Климачев В.В., Авдалян А.М., Бобров И.П., Бычкова Е.Ю., Круглова Н.М., Лазарев А.Ф., Лушникова Е.Л., Непомнящих Л.М. Аргирофильные белки ядрышковых организаторов и пролиферативная активность клеток при плоскоклеточном раке легкого // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2014. № 2. С. 97–102.
3. Abe S., Sukoh N., Ogura S., Kunikane H., Watanabe N., Nakajima I., Takekawa H., Kawakami Y. Nucleolar organiser regions as a marker of growth rate in squamous cell carcinoma of the lung // Thorax. 1992. Vol. 47 (10). P. 778–780.
4. Biesterfeld S., Farokhzad F., Kluppel 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. Vol. 438 (5). P. 478–484.
5. 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. Vol. 11 (3). P. 183–198.
6. 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. Vol. 43 (2). P. 110–116.
7. 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. Vol. 25 (6B). P. 3957–3962.
8. 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. Vol. 31 (2). P. 151–159.
9. 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. Vol. 42 (6). P. 789–793.
10. Pich A., Chiua L., Margaria E. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology // Micron. 2000. Vol. 31 (2). P. 133–141.
11. Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown // J. Cell Physiol. 2000. Vol. 182 (3). P. 311–322.
12. Sirri V., Roussel P., Hernandez-Verdun D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle // Micron. 2000. Vol. 31 (2). P. 121–126.
13. Sobin L., Gospodarowicz M., Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. 7th ed. Oxford, Wiley-Blackwell, 2009. P. 138–146.
14. Tomobe M., Shimazui T., Uchida K., Hinotsu S., Akaza H. Argrophilic nucleolar organizer region in proliferating cell has a predictive value for local recurrence in superficial bladder tumor // J. Urol. 1999. Vol. 162 (1). P. 63–68.
15. Trere D. AgNOR staining and quantification // Micron. 2000. Vol. 31 (2). P. 127–131.
16. 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. Vol. 39 (4). P. 147–152.

Поступила 18.11.14

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Кобяков Дмитрий Сергеевич, кандидат медицинских наук, врач-патологоанатом, Бюджетное учреждение «Когалымская городская больница», Адрес: 628484, Тюменская область, Когалым, Ленинградская, 6-30. E-mail: dskob@yandex.ru
Лазарев Александр Федорович, доктор медицинских наук, профессор, директор Алтайского филиала РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Адрес: 656049, Алтайский край, Барнаул, ул. Никитина, 77. Телефон: 8-3853-632620. E-mail: aoc@ctmed.ru
Лушникова Елена Леонидовна, доктор биологических наук, профессор, заведующая отделом клеточной биологии и морфологии, ФГБУ НИИ региональной патологии и патоморфологии СО РАМН. Адрес: 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2. Телефон: 8 (383)-333-48-45. E-mail: pathol@soramn.ru
Непомнящих Лев Моисеевич, доктор медицинских наук, член-корр. РАН, профессор, директор ФГБУ НИИ региональной патологии и патоморфологии СО РАН. Адрес: 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2. Телефон: 8 (383)-332-31-56. E-mail: pathol@soramn.ru

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки / конфликта интересов, о котором необходимо сообщить

NUCLEAR ORGANIZERS IN KI-67 POSITIVE CELLS OF SQUAMOUS CELL LUNG CANCER: CLINICAL MORPHOLOGICAL PARALLELS AND SURVIVAL

D.S. Kobayakov¹, A.F. Lazarev², E.L. Lushnikova³, L.M. Nepomnyashchikh³

Kogalym Municipal Hospital, Kogalym¹,

Altai branch of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS, Barnaul²

Research Institute of Regional Pathology and Pathomorphology of Siberian Division of the Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk³

19, Molodyezhnaya Street, 628480-Kogalym, Tyumen region, Russia, e-mail: dskob@yandex.ru¹

Abstract

Purpose: to study argyrophilic proteins associated with nucleolar organizer regions (Ag-NOR proteins) in proliferating cells in relationship between the clinical and morphological parameters and survival in squamous cell lung carcinoma. **Materials and methods:** One hundred and thirteen surgical specimens of squamous cell lung cancer were studied using double staining for Ki-67 antigen (MIB-1 clone, DAKO) by immunohistochemistry and for Ag- γ OP-proteins with silver nitrate. **Results:** In squamous cell carcinoma, the Ag-NOR area in Ki-67 positive cells correlated with the clinical and morphological parameters: parameter T, the greatest tumor size, parameter N, stage of the disease and tumor differentiation. When the area of Ag- γ OP-proteins in Ki-67 positive cells was small, the long-term survival rates were higher. The Ag- γ OP area in Ki-67 positive cells is an independent prognostic factor in squamous cell lung cancer.

Key words: nuclear organizers, Ki-67, survival, squamous cell lung carcinoma.

REFERENCES

1. Gervas P.A., Litviakov N.V., Popova N.O., Dobrodeev A.Yu., Tarasova A.S., Yumov E.L., Ivanova F.G., Cheremisina O.V., Afanasyev S.G., Goldberg V.E., Cherdynseva N.V. Problem and perspective to improve molecular testing to choose appropriate target therapy // *Sibirskij onkologicheskij zhurnal*. 2014. № 2. P. 46–55. [in Russian]
2. Kobayakov D.S., Klimachev V.V., Avdalyan A.M., Bobrov I.P., Bychkova E.Y., Kruglova N.M., Lazarev A.F., Lushnikova E.L., Nepomnyashchikh L.M. Argyrophilic proteins of nucleolar organizer regions and proliferative activity of cells in squamous cell carcinoma of the lung // *Kletochnye tehnologii v biologii i medicine*. 2014. № 2. P. 97–102. [in Russian]
3. Abe S., Sukoh N., Ogura S., Kunikane H., Watanabe N., Nakajima I., Takekawa H., Kawakami Y. Nucleolar organizer regions as a marker of growth rate in squamous cell carcinoma of the lung // *Thorax*. 1992. Vol. 47 (10). P. 778–780.
4. Biesterfeld S., Farokhzad F., Kluppel 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. Vol. 438 (5). P. 478–484.
5. 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. Vol. 11 (3). P. 183–198.
6. 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. Vol. 43 (2). P. 110–116.
7. Kidogawa H., Nanashima A., Yano H., Matsumoto M., Yasutake T., Nagayasu T. Clinical significance of double staining of MIB-1 and Ag-NORs in primary breast carcinoma // *Anticancer Res*. 2005. Vol. 25 (6B). P. 3957–3962.
8. 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. Vol. 31 (2). P. 151–159.
9. 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. Vol. 42 (6). P. 789–793.
10. Pich A., Chiusa L., Margaria E. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology // *Micron*. 2000. Vol. 31 (2). P. 133–141.
11. Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown // *J. Cell Physiol*. 2000. Vol. 182 (3). P. 311–322.
12. Sirri V., Roussel P., Hernandez-Verdun D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle // *Micron*. 2000. Vol. 31 (2). P. 121–126.
13. Sobin L., Gospodarowicz M., Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. 7th ed. Oxford, Wiley-Blackwell, 2009. P. 138–146.
14. 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. Vol. 162 (1). P. 63–68.
15. Trere D. AgNOR staining and quantification // *Micron*. 2000. Vol. 31 (2). P. 127–131.
16. 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. Vol. 39 (4). P. 147–152.

ABOUT THE AUTHORS

Kobayakov Dmitriy Sergeevich, M.D., PhD, Budget institution «Kogalymskaya City Hospital» 628481, Kogalym. E-mail: dskob@yandex.ru

Lazarev Aleksandr Fedorovich, MD, DSc, Professor, Director of the Altai branch N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, 656049, Barnaul. Tel.: 8-3853-632620. E-mail: aoc@ctmed.ru

Lushnikova Elena Leonidovna, DSc, Professor, FGBU (Federal State Budgetary Institution) Research Institute of regional pathology and pathomorphology SO (Siberian Department) RAMS, 630117, Novosibirsk. Tel.: 8 (383)-333-48-45. E-mail: pathol@soramn.ru

Nepomnyashchikh Lev Moiseevich, MD, DSc, Associate Member of RAS, Professor, Director of the FGBU (Federal State Budgetary Institution) Research Institute of regional pathology and pathomorphology SO (Siberian Department) RAMS, 630117, Novosibirsk. Tel.: 8 (383)-333-48-45. E-mail: pathol@soramn.ru