

тельной железы. Фундаментальные исследования. 2012; 12: 426—30.

10. Sutcliffe P., Hummel S., Simpson E. et al. Use of classical and novel biomarkers as prognostic risk factors for localised prostate cancer: A systematic review. *Health Technol. Assess.* 2009; 13 (5): 1—242.
11. Virostko J., Xie J., Hallahan D.E., Arteaga C.L. et al. Molecular imaging paradigm to rapidly profile response to angiogenesis-directed therapy in small animals. *Mol. Imag. Biol.* 2009; 11 (3): 204—12.
12. Nakanishi R., Oka N., Nakatsuji H. et al. Effect of vascular endothelial growth factor and its receptor inhibitor on proliferation and invasion in bladder cancer. *Urol. Int.* 2009; 83: 98—106.
13. Merritt W.M., Sood A.K. Markers of angiogenesis in ovarian cancer. *Dis. Markers.* 2007; 23 (5—6): 419—31.
14. Лавникова Г.А., Гош Т.Е., Талалаева А.В. и др. Гистологический метод количественной оценки степени лучевого повреждения опухоли. *Медицинская радиология.* 1978; 3: 6—9.

REFERENCES

1. Korolev Y. V. Radioresistant cryosurgical treatment of recurrent forms of basal cell skin cancer. *Medical Almanac.* 2010, 2: 294—6 (in Russian).
2. Yevtushenko O.I., Sagan D.L., Kuz'menko A.P. Cryosurgical treatment of colon cancer patients. Ed. O.I. Evtushenka. Kiev: Message 2008.
3. Samedov V.H., Kuz'menko A.P., Zaharychev V.D. Evaluation of Antitumor Effect of Combined Application of Cryoablation and Microwave Hyperthermia in the Experiment. *Problems of Cryobiology.* 2012; 22 (4): 484—90 (in Russian).
4. Shafranov V.V., Taganov A.V., Gladko V.V. et al. Assessment of efficiency of treatment of patients with keloids hems methods low-temperature destructions with use of indicators of desmologitions

- quality of life. *Children's surgery.* 2010; 6: 39—41 (in Russian).
5. Hachisuka J., Doi K., Fuzue M. Combination cryosurgery with hyperthermia in the management of skin metastasis from breast cancer: A case report. *Int. J. Surg. Case Rep.* 2012; 3(2): 68—9.
6. Ahmed H., Moore C., Emberton M. Minimally-invasive technologies in uro-oncology: The role of cryotherapy, HIFU and photodynamic therapy in whole gland and focal therapy of localized prostate cancer. *Surg. Oncol.* 2009; 18(3): 219—32.
7. Gage A., Baust J., Baust J. Experimental cryosurgery investigation in vivo. *Cryobiology.* 2009; 59 (3): 229—43.
8. Kirillov V.A., Stebenyaeva E.E., Demidchik E.P. Comparative morphometric analysis of thyrocytes in a primary tumor and its regional metastases in papillary thyroid gland cancer. *Analyt. Quant. Cytol. Histol.* 2008; 30: 209—17.
9. Maslyakov G. N., Voronina E.S., Fomkin R. N. Morphological methods of research in diagnostics of a cancer of a prostate gland. *Basic researches.* 2012; 12: 426—30 (in Russian).
10. Sutcliffe P., Hummel S., Simpson E. et al. Use of classical and novel biomarkers as prognostic risk factors for localised prostate cancer: A systematic review. *Health Technol Assess.* 2009; 13 (5): 1—242.
11. Virostko J., Xie J., Hallahan D.E., Arteaga C.L. et al. Molecular imaging paradigm to rapidly profile response to angiogenesis-directed therapy in small animals. *Mol. Imag. Biol.* 2009; 11 (3): 204—12.
12. Nakanishi R., Oka N., Nakatsuji H. et al. Effect of vascular endothelial growth factor and its receptor inhibitor on proliferation and invasion in bladder cancer. *Urol. Int.* 2009; 83: 98—106.
13. Merritt W.M., Sood A.K. Markers of angiogenesis in ovarian cancer. *Dis. Markers.* 2007; 23 (5—6): 419—31.
14. Lavnikova G.A., Gosh T.E., Talalayev A.V. et al. Histologic method of a quantitative assessment to fexten to fbeam damage of a tumor. *Med. radiology* 1978; 3: 6—9 (in Russian).

Поступила 08.04.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.24-006.6-091.8-078.33

Д.С. Кобяков¹, В.В. Климачев², А.М. Авдалиян³, И.П. Бобров³, А.Ф. Лазарев³

ВЗАИМОСВЯЗЬ АРГИРОФИЛЬНЫХ БЕЛКОВ ЯДРЫШКООБРАЗУЮЩИХ РАЙОНОВ И АНТИГЕНА КИ-67 С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ И ВЫЖИВАЕМОСТЬЮ ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ ЛЕГКОГО

¹Муниципальное бюджетное лечебно-профилактическое учреждение "Когалымская городская больница", 628481, г. Когалым; ²ГБОУ ВПО "Алтайский государственный медицинский университет", 656038, г. Барнаул; ³Алтайский филиал ФГБУ "Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина" РАМН, 656049, г. Барнаул

Исследованы аргирофильные белки, ассоциированные с ядрышкообразующими районами (Аг-ЯОР-белки) и антиген Ki-67 в аденокарциноме легкого. Определяли опухоли с низким и высоким содержанием Аг-ЯОР-белков и индекса метки (ИМ) Ki-67. Содержание Аг-ЯОР-белков имело связь с клинико-морфологическими параметрами: показателями T, N, размером опухоли до 3 см и более, стадией заболевания. Выживаемость больных аденокарциномой легкого лучше при опухолях с низким содержанием Аг-ЯОР-белков или ИМ Ki-67. Высокая выживаемость связана с низким содержанием Аг-ЯОР-белков и ИМ Ki-67, низкая — с высоким содержанием Аг-ЯОР-белков и ИМ Ki-67, промежуточная — с противоположными значениями содержания Аг-ЯОР-белков и ИМ Ki-67. Размер опухоли, показатель N и содержание Аг-ЯОР-белков имели независимое влияние на выживаемость больных. В аденокарциноме легкого с отсутствием метастазов в лимфатические узлы выживаемость связана с размером опухоли, при наличии метастазов — с содержанием Аг-ЯОР-белков. Взаимное исследование Аг-ЯОР-белков и антигена Ki-67 имеет дифференциально-диагностическое и прогностическое значение при аденокарциноме легкого.

Ключевые слова: аргирофильные белки ядрышкообразующих районов, Ki-67, аденокарцинома легкого.

RELATIONSHIP BETWEEN ARGYROPHILIC PROTEINS OF NUCLEOLAR ORGANIZER REGIONS AND ANTIGEN KI-67 WITH CLINICAL AND MORPHOLOGICAL PARAMETERS AND SURVIVAL IN LUNG ADENOCARCINOMA

D.S. Kobayakov¹, V.V. Klimachev², A.M. Avdalyan³, I.P. Bobrov³, A.F. Lazarev³¹Kogalymskaya City Hospital, 628481, Kogalym, Russian Federation; ²The Altai State of Medical University of the Ministry of Health of Russia, 656038, Barnaul, Russian Federation; ³Altay branch of N.N.Blokhin Russian Cancer Research Center of the Russian Academy of Medical Sciences, 656049, Barnaul, Russian Federation

Investigated argyrophilic proteins associated with nucleolar organizer regions (Ag-NOR proteins) and Ki-67 antigen in lung adenocarcinoma. Defined tumor with low and high content of Ag-NOR proteins and proliferation index (PI) Ki-67. The content of Ag-NOR proteins had a relationship with the clinical and morphological parameters: parameters T, N, tumor size to 3 cm or more, stage of the disease. Survival of patients with lung adenocarcinoma is better in tumors with a low content of Ag-NOR proteins or PI Ki-67. High survival rate associated with low content of Ag-NOR proteins and PI Ki-67, low - with high content of Ag-NOR proteins and PI Ki-67, intermediate - with opposite values of the content of Ag-NOR proteins and PI Ki-67. Tumor size, parameter N and content of Ag-NOR proteins had an independent effect on survival. In lung adenocarcinoma with no metastasis to lymph nodes survival related to the size of the tumor, with metastases - with content of Ag-NOR proteins. Mutual study of Ag-NOR proteins and antigen Ki-67 has differential diagnostic and prognostic value in lung adenocarcinoma.

Key words: argyrophilic proteins of nucleolar organizer regions, Ki-67, lung adenocarcinoma.

Аденокарцинома легкого составляет не менее трети всех гистологических типов неоплазии этой локализации. На сегодняшний день отдаленные результаты лечения и выживаемости больных аденокарциномой легкого далеки от желаемых. В настоящее время поиску морфологических параметров, связанных с выживаемостью таких больных, посвящено небольшое число работ, что требует дальнейшего изучения и уточнения [1].

Пролиферация — основополагающий процесс в возникновении 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 клеткой фаз митоза (продолжительность клеточного цикла) [2].

Для оценки пролиферативной активности общепризнанным и доступным является иммуногистохимическое определение уровня антигена Ki-67 [3, 4]. В многочисленных экспериментальных и клинических исследованиях показана связь этого маркера с определенными фазами митоза и прогнозом опухоли [2, 5, 6].

В настоящее время исследование аргирофильных белков, ассоциированных с ядрышкообразующими районами (Ag-ЯОР-белков), является общепризнанным 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 [7]. Эти белки выявляются в ядрах клеток на протяжении всего клеточного цикла, количественно увеличиваясь в 1,5—3 раза в S- и G₂-фазах [8]. Показана обратная зависимость между количественным содержанием Ag-ЯОР-белков и длительностью клеточного цикла [9], временем удвоения опухоли [10—13].

Анализ литературы показал противоречивый характер связи антигена Ki-67 и Ag-ЯОР-белков с клинико-морфологическими параметрами и выживаемостью больных со злокачественными опухолями [2, 5, 14—18]. Кроме того, отсутствуют работы, уточняющие взаимную связь антигена Ki-67 и Ag-ЯОР-белков в ядрах кле-

ток с клинико-морфологическими параметрами и выживаемостью при аденокарциноме легкого.

Исходя из вышеизложенного, целью работы стало исследование антигена Ki-67 и содержания Ag-ЯОР-белков во взаимосвязи с клинико-морфологическими параметрами и выживаемостью при аденокарциноме легкого.

Материал и методы

Исследованы 97 операционных материалов аденокарциномы легкого, удаленных за период 2007—2009 гг. в Алтайском краевом онкологическом диспансере (случаи с M1 и множественными опухолями исключены из исследования). Патогистологическая характеристика опухолей определена согласно критериям ВОЗ [19]. Средний возраст пациентов составил 60 лет (от 35 до 75 лет), 69 мужчин и 28 женщин.

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. Иммуногистохимическим методом определяли антиген Ki-67 (клон М1В-1), цитокератины 7 (клон SP52) и 20 (клон SP33) в автоматическом стейнере Ventana XT. Определяли индекс метки (ИМ) Ki-67 — количество положительно окрашенных клеток от общего количества подсчитанных клеток (в процентах). В каждом случае исследовали 1000 клеток в 5—7 полях зрения, при увеличении в 400 раз. Так как распределение ИМ Ki-67 в аденокарциноме легкого было непараметрическим, то меру центральной тенденции представляли в виде медианы, которая составила 20% (интерквартильный интервал 11—38%). Данное значение считали пороговым, что согласуется с данными литературы [6]. Соответственно случаи с ИМ Ki-67 20% и более считались с высоким ИМ Ki-67 (+Ki-67), до 20% — с низким (-Ki-67).

Для изучения Ag-ЯОР-белков срезы окрашивали азотнокислым серебром по одностадийной методике [20]. Перед окрашиванием срезы автоклавировали при 120°C в течение 20 мин в 0,01 М цитратном буфере (pH 6,0) [21]. Докрашивания ядер не проводили, срезы заключали в канадский бальзам. В каждом случае определяли площадь Ag-ЯОР-белков (в мкм²) в ядрах 100—120 случайно выбранных клеток с 10—15 цифровыми изображениями, полученными с соответствующих полей зрения микроскопа при увеличении в 1000 раз (объектив x100,

Для корреспонденции: Кобяков Дмитрий Сергеевич — канд. мед. наук, зав. патологоанатомическим отд-нием; 628481, Тюменская область, Ханты-Мансийский автономный округ — Югра, г. Когалым, ул. Молодежная, 19, e-mail: dskob@yandex.ru.

Таблица 1

Распределение случаев с высоким и низким содержанием Ag-ЯОР-белков и ИМ Ki-67 в аденокарциноме легкого

Характеристика	Количество случаев	-Ag-ЯОР		+Ag-ЯОР	
		-Ki-67	+Ki-67	-Ki-67	+Ki-67
Первичная опухоль					
T1	32 (33)	12 (38)	12 (38)	4 (12)	4 (12)
T2 и T3	65 (67)	21 (32)	10 (15)	9 (14)	25 (39)
< 3 см	46 (47)	20 (43)	15 (33)	6 (13)	5 (11)
> 3 см	51 (53)	12 (23)	8 (16)	8 (16)	23 (45)
Лимфатические узлы					
N -	61 (63)	24 (39)	17 (28)	8 (13)	12 (20)
N +	36 (37)	9 (25)	5 (14)	5 (14)	17 (47)
Стадия					
I	54 (56)	23 (43)	14 (26)	6 (11)	11 (20)
II и III	43 (44)	10 (23)	8 (19)	7 (16)	18 (42)
Степень дифференцировки					
высокая	17 (18)	12 (70)	2 (12)	3 (18)	—
умеренная и низкая	80 (82)	21 (26)	20 (25)	10 (13)	29 (36)

Примечание. В скобках — проценты.

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. В качестве внутреннего контроля окрашивания использовали площадь Ag-ЯОР-белков в ядрах малых лимфоцитов [22]. Находили индекс площади Ag-ЯОР-белков — частное от деления площадей Ag-ЯОР-белков в клетке опухоли и малом лимфоците. Так как распределение индекса площади Ag-ЯОР-белков в аденокарциноме легкого было параметрическим, то меру центральной тенденции представляли в виде среднего значения, которое составило 6,05 (стандартное отклонение 1,78). По аналогии с оценкой ИМ Ki-67 случаи с индексом площади Ag-ЯОР-белков 6,05 и более считались с высоким содержанием Ag-ЯОР-белков (+Ag-ЯОР), до 6,05 — с низким (-Ag-ЯОР).

Статистический анализ полученных данных осуществляли в программе Statistica 6.0. При проверке статистических гипотез применяли двусторонний точный критерий Фишера для таблиц 2x2, коэффициент корреляции рангов Спирмена (*r*). 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 и обсуждение

В аденокарциноме легкого найдена слабая корреляция между индексом площади Ag-ЯОР-белков и ИМ Ki-67 (*r* = 0,32; *p* < 0,001). Кросстабулированное распределение случаев аденокарциномы легкого с высоким и низким содержанием Ag-ЯОР-белков и ИМ Ki-67 в зависимости от морфологических параметров опухоли представлено в табл. 1.

Отмечалось статистически значимое увеличение количества случаев с +Ag-ЯОР в группе опухолей с T2 и T3 по сравнению с T1 — 34 (53%) и 8 (24%) случаев соответственно (*p* = 0,02). Однако при исследовании ИМ

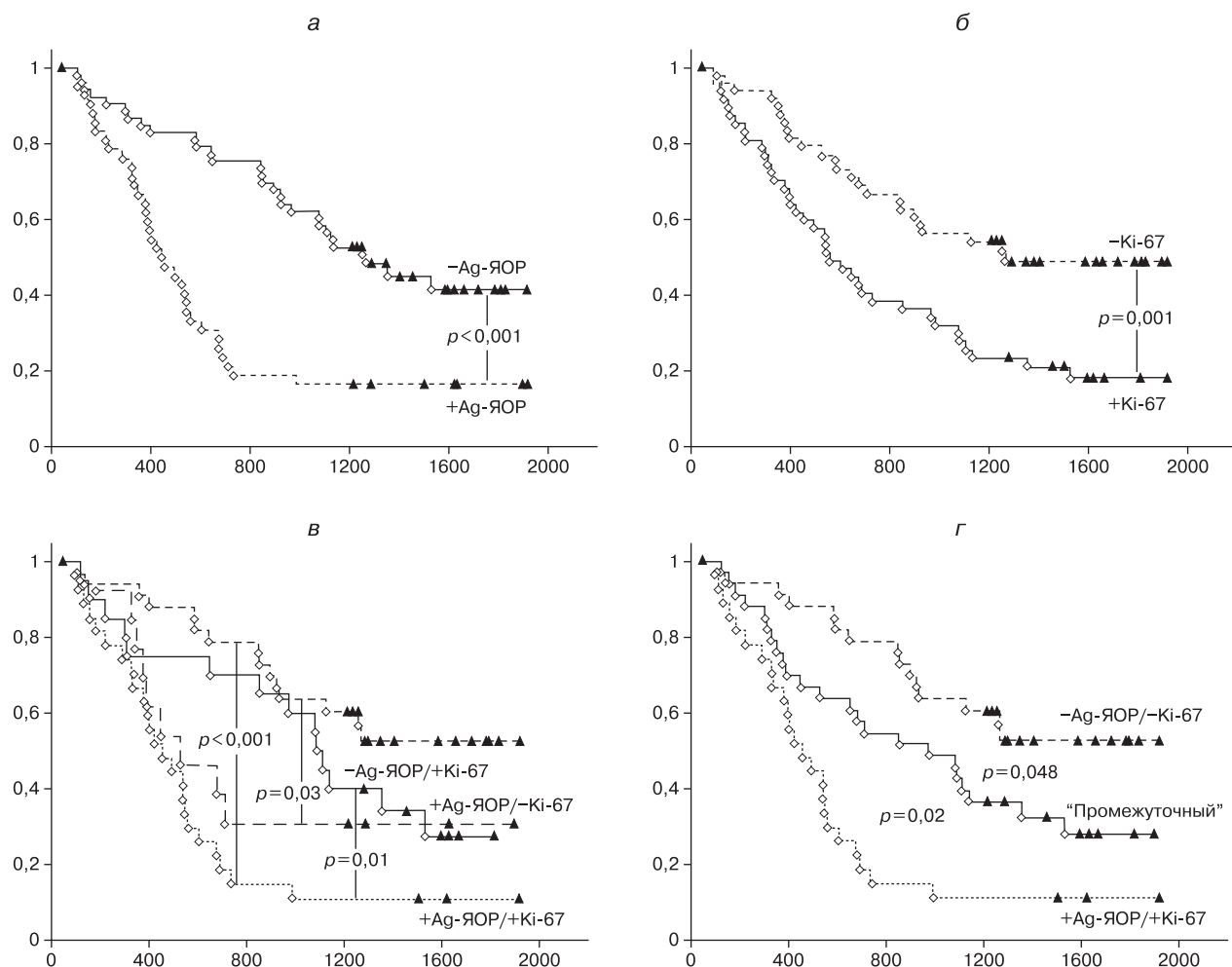
Таблица 2

Содержание Ag-ЯОР-белков, ИМ Ki-67 и пятилетняя общая скорректированная выживаемость в аденокарциноме легкого

Характеристика	Количество случаев		Пятилетняя общая скорректированная выживаемость, %
	абс.	%	
Содержание Ag-ЯОР-белков			
низкое	55	57	39,0±8,2
высокое	42	43	13,1±5,6
ИМ Ki-67			
низкий	46	47	44,6±8,4
высокий	51	53	16,7±6,1
Тип опухоли по содержанию Ag-ЯОР-белков и ИМ Ki-67			
1-й тип: -Ag-ЯОР/-Ki-67	33	34	46,5±10,8
2-й тип: -Ag-ЯОР/+Ki-67	22	23	33,6±10,9
3-й тип: +Ag-ЯОР/-Ki-67	13	13	15,0±11,7
4-й тип: +Ag-ЯОР/+Ki-67	29	30	6,9±5,1
"промежуточный" тип	35	36	24,9±9,0

Ki-67 статистически значимого различия не получено в этих группах — 35 (54%) и 16 (50%) случаев соответственно. В аденокарциноме легкого с размером первичной опухоли более 3 см количество случаев с +Ag-ЯОР больше, чем в опухоли менее 3 см — 31 (61%) и 11 (24%) случаев соответственно (*p* < 0,001). Также количество случаев с +Ki-67 больше в опухолях размером более 3 см по сравнению с небольшими опухолями (соответственно 31 (61%) и 20 (44%) случаев), однако разница статистически недостоверна. Количество случаев с +Ag-ЯОР достоверно больше в группе опухолей с наличием метастазов в лимфатические узлы по сравнению с опухолями без метастазов — соответственно 22 (61%) и 20 (33%) случаев (*p* = 0,01). Количество случаев с +Ki-67 достоверно не различается между этими группами — соответственно 22 (61%) и 29 (48%) случаев. Во II и III стадиях заболевания количество случаев с +Ag-ЯОР достоверно больше, чем в I стадии — соответственно 25 (58%) и 17 (31%) случаев (*p* = 0,01). Количество случаев с +Ki-67 достоверно не различается между этими группами — соответственно 26 (61%) и 25 (46%) случаев. Количество случаев с +Ag-ЯОР и +Ki-67 больше в группе умеренно- и низкодифференцированных опухолей по сравнению с высокодифференцированными опухолями: для Ag-ЯОР-белков — 39 (49%) и 3 (18%) случая соответственно; для ИМ Ki-67 — 49 (61%) и 2 (12%) случая соответственно. Однако сравнение этих данных статистическими методами некорректно ввиду наличия единичных наблюдений.

Содержание Ag-ЯОР-белков в аденокарциноме легкого имело слабую корреляцию с показателем T (*r* = 0,31; *p* = 0,01), размером первичной опухоли до 3 см и более (*r* = 0,36; *p* < 0,001), показателем N (*r* = 0,34; *p* = 0,006) и стадией заболевания (*r* = 0,33; *p* = 0,008). ИМ Ki-67 не имел взаимосвязи с вышеперечисленными показателями. Степень дифференцировки аденокарциномы легкого имела слабую корреляцию с содержанием Ag-ЯОР-белков (*r* = -0,31; *p* = 0,01) и ИМ Ki-67 (*r* = 0,39; *p* < 0,001). На ранних стадиях развития аденокарциномы легкого (T1, размер опухоли менее 3 см, N0, стадия I) содержание Ag-ЯОР-белков в клетках опухоли меньше по сравнению с последующими стадиями процесса. Также в опу-



Графики выживаемости по Каплану—Мейеру больных аденокарциномой легкого.

a — с низким и высоким содержанием Ag-ЯОР-белков; *б* — с низким и высоким ИМ Ki-67; *в* — при четырех типах опухоли (по взаимному содержанию Ag-ЯОР-белков и ИМ Ki-67); *г* — при трех типах опухоли (по взаимному содержанию Ag-ЯОР-белков и ИМ Ki-67). По оси абсцисс — время жизни (в днях), по оси ординат — доля выживших больных.

лях без солидизации (высокодифференцированные) по сравнению с опухолями с разной степенью солидизации (умеренно и низкодифференцированные) минимально содержание Ag-ЯОР-белков и ИМ Ki-67. Таким образом, имелась связь активности ядрышковых организаторов с клинико-морфологическими параметрами аденокарциномы легкого (в отличие от антигена Ki-67, где связь отсутствовала), что указывает на связь опухолевой прогрессии с рибосомальным синтезом клетки.

На основании полученных данных выделены четыре типа аденокарциномы легкого в зависимости от содержания Ag-ЯОР-белков и ИМ Ki-67 (табл. 2).

С выделенными типами опухолей наблюдалась слабая корреляция основных морфологических параметров аденокарциномы легкого: показателя Т ($r=0,31$; $p=0,01$), размера опухоли до 3 см и более ($r=0,36$; $p < 0,001$), показателя N ($r=0,31$; $p=0,01$), стадии процесса ($r=0,30$; $p=0,03$) и отсутствие корреляции со степенью дифференцировки опухоли.

Общая скорректированная выживаемость больных аденокарциномой легкого за пятилетний период после операции составила $30,4 \pm 5,3\%$. Выживаемость больных аденокарциномой легкого имела статистически значимое различие в зависимости от содержания Ag-ЯОР-белков и ИМ Ki-67 (см. табл. 2; рис. *a, б*). Наблюдалось последовательное уменьшение выживаемости от 1-го типа опухолей

ко 2, 3 и 4-му типу. Статистически значимые отличия выживаемости больных получены только между 1-м и 4-м, 1-м и 3-м, 4-м и 2-м типами (см. табл. 2; рис. *в*). Исходя из полученных данных, 2-й и 3-й типы аденокарциномы легкого объединены в "промежуточный" тип, в котором содержание Ag-ЯОР-белков и ИМ Ki-67 имело противоположные значения (-Ag-ЯОР+/Ki-67 и +Ag-ЯОР-/Ki-67). Выживаемость больных с "промежуточным" типом опухолей статистически значимо отличалась от таковой при опухолях 1-го и 4-го типов и имела промежуточное значение (см. табл. 2; рис. *г*).

При проведении многомерного регрессионного анализа показатель Т, степень дифференцировки, ИМ Ki-67, данные о выделении четырех или трех типов опухолей (по взаимному содержанию Ag-ЯОР-белков и ИМ Ki-67) не имели влияния на выживаемость больных аденокарциномой легкого. Большее влияние на выживаемость имели размер опухоли по сравнению с показателем Т ($\chi^2=46,6$, $\chi^2=42,8$ соответственно), а также сочетание размера опухоли и показателя N по сравнению со стадией процесса ($\chi^2=46,6$, $\chi^2=45,2$ соответственно). Таким образом, три критерия — размер опухоли (до 3 см или более), показатель N (отсутствие или наличие метастазов в лимфатические узлы), содержание Ag-ЯОР-белков (низкое или высокое) — имели независимое влияние на выживаемость больных аденокарциномой легкого, из которых

Таблица 3

Регрессионный анализ по Коксу и факторы прогноза в аденокарциноме легкого

Фактор прогноза	β	Стандартная ошибка	p
Показатель N	1,06	0,26	0,00006
Размер опухоли	0,78	0,27	0,01
Содержание Ag-ЯОР-белков	0,71	0,29	0,03
Отсутствие метастазов:			
размер опухоли	1,36	0,40	0,0008
содержание Ag-ЯОР-белков	0,33	0,39	0,40
Наличие метастазов:			
размер опухоли	0,26	0,36	0,47
содержание Ag-ЯОР-белков	1,06	0,47	0,02

показатель N имел наибольшее значение (табл. 3). Исходя из этого, исследовано влияние на выживаемость размера опухоли и содержания Ag-ЯОР-белков в опухолях с отсутствием и наличием метастазов в лимфатические узлы. В аденокарциноме легкого с отсутствием метастазов выживаемость больных была связана только с размером опухоли ($\chi^2=15,6, p < 0,001$), и наоборот, с наличием метастазов — только с содержанием Ag-ЯОР-белков ($\chi^2=8,2, p=0,02$) (см. табл. 3).

В нашем исследовании найдена корреляция содержания Ag-ЯОР-белков и ИМ Ki-67 в аденокарциноме легкого, что согласуется с данными исследований опухолей молочной железы [23], желудка [24], толстой кишки [25]. Однако только содержание Ag-ЯОР-белков в клетках аденокарциномы легкого было связано с целым рядом клинко-морфологических параметров по системе TNM: показателями T, N, размером первичной опухоли до 3 см и более, стадией заболевания. S. Kaneko и соавт. [26] получили аналогичные выводы при исследовании ядрышковых организаторов при раке легкого.

Выживаемость больных аденокарциномой легкого с -Ag-ЯОР или -Ki-67 достоверно выше по сравнению с опухолями с +Ag-ЯОР или +Ki-67. Такая взаимосвязь активности ядрышковых организаторов и количества Ki-67 положительных клеток с выживаемостью больных со злокачественной опухолью прослежена и в других исследованиях [2, 5, 15, 17, 18]. По данным литературы, взаимосвязь активности ядрышковых организаторов с выживаемостью больных карциномой разных органов и гистогенеза значительно чаще прослеживается при определении площади Ag-ЯОР-белков с помощью компьютерного анализа изображений, чем при визуальном подсчете количества Ag-ЯОР-белков.

В зависимости от взаимного содержания Ag-ЯОР-белков и ИМ Ki-67 выделены четыре типа аденокарциномы легкого и найдено последовательное уменьшение выживаемости в ряду: -Ag-ЯОР/-Ki-67, -Ag-ЯОР/+Ki-67, +Ag-ЯОР/-Ki-67, +Ag-ЯОР/+Ki-67. Сходные актуаральные кривые выживаемости, на основе взаимного содержания Ag-ЯОР-белков и ИМ Ki-67, получены M. Logenzato и соавт. [27] при исследовании рака молочной железы. Н.Т. Райхлин и соавт. [14] в исследовании 20 случаев "малого" рака легкого (размером до 3 см) показали, что для больных с продолжительностью жизни 3—5 лет характерен тип -Ag-ЯОР/+Ki-67, а с продолжительностью жизни до 2 лет характерен тип +Ag-ЯОР/-Ki-67. В нашем исследовании не получено статистически значимого различия в выживаемости больных аденокарциномой легкого типов -Ag-ЯОР/+Ki-67 и +Ag-ЯОР/-Ki-67. Поэтому эти два типа были объединены в

один (с противоположными значениями содержания Ag-ЯОР-белков и ИМ Ki-67), в котором выживаемость достоверно отличалась от -Ag-ЯОР/-Ki-67-типа и +Ag-ЯОР/+Ki-67-типа и имела промежуточное значение.

При проведении многомерного регрессионного анализа три критерия — размер опухоли, состояние лимфатических узлов, содержание Ag-ЯОР-белков — имели независимое влияние на выживаемость больных. Многочисленные исследования, посвященные изучению активности ядрышковых организаторов в злокачественных опухолях, также указывают, что содержание Ag-ЯОР-белков является независимым фактором прогноза [18, 23]. В аденокарциноме легкого с отсутствием метастазов в лимфатические узлы выживаемость больных была связана с размером опухоли, а при наличии метастазов — с содержанием Ag-ЯОР-белков. Вероятно, выживаемость больных аденокарциномой легкого без метастатического потенциала связана со скоростью роста первичной опухоли (локальным увеличением размера), а с появлением метастатического потенциала — со скоростью клеточного цикла раковых клеток как в первичной опухоли, так и в метастазах.

Таким образом, взаимное определение содержания Ag-ЯОР-белков и ИМ Ki-67 имеет дифференциально-диагностическое и прогностическое значение при аденокарциноме легкого.

Выводы

1. В аденокарциноме легкого содержание Ag-ЯОР-белков связано с клинко-морфологическими параметрами по системе TNM: показателями T, N, размером первичной опухоли до 3 см и более, стадией заболевания.
2. Выживаемость больных аденокарциномой легкого с низким содержанием Ag-ЯОР-белков или ИМ Ki-67 лучше по сравнению с высоким содержанием Ag-ЯОР-белков или ИМ Ki-67.
3. Выживаемость больных аденокарциномой легкого высокая с типом -Ag-ЯОР/-Ki-67, низкая с типом +Ag-ЯОР/+Ki-67, промежуточная с типами Ag-ЯОР/+Ki-67 и +Ag-ЯОР/-Ki-67.
4. Размер опухоли, состояние лимфатических узлов, содержание Ag-ЯОР-белков — независимые факторы прогноза при аденокарциноме легкого. В аденокарциноме легкого с отсутствием метастазов в лимфатические узлы выживаемость больных связана с размером опухоли, а при наличии метастазов — с содержанием Ag-ЯОР-белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лактионов К.К., Давыдов М.И., Полоцкий Б.Е., Зборовская И.Б., Богатырев В.Н., Никуличев Л.А. и др. Прогностические и предсказывающие факторы у больных немелкоклеточным раком легкого. Практическая онкология. 2006; 7(3): 145—53.
2. van Diest P.J., Brugal G., Baak J.P. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. J. Clin. Pathol. 1998; 51(10): 716—24.
3. Шацева Т.А., Мухина М.С. Антиген Ki-67 в оценке опухолевой пролиферации. Его структура и функция. Вопросы онкологии. 2004; 50(2): 157—64.
4. Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J. Cell Physiol. 2000; 182(3): 311—22.
5. Brown D.C., Gatter K.C. Ki-67 protein: the immaculate deception? Histopathology. 2002; 40(1): 2—11.
6. Jakobsen J.N., Sorensen J.B. Clinical impact of Ki-67 labeling index in non-small cell lung cancer. Lung Cancer. 2013; 79(1): 1—7.
7. Roussel P., Hernandez-Verdun D. Identification of AgNOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity. Exp. Cell Res. 1994; 214(2): 465—72.

8. Sirri V., Roussel P., Hernandez-Verdun D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron*. 2000; 31(2): 121—6.
9. 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.
10. Trere D., Pession A., Montanaro L., Chieco P., Derenzini M. AgNOR protein expression and tumor growth rate of human carcinoma xenografts growing subcutaneously in nude mice. *Eur. J. Histochem*. 1997; 41(Suppl. 2): 153—4.
11. Derenzini M., Sirri V., Trere D., Ochs R. The quantity of nucleolar proteins nucleolin and protein B23 is related to cell doubling time in human cancer cells. *Lab. Invest*. 1995; 73(4): 497—502.
12. Ofner D., Hittmair A., Marth C., Ofner D., Totsch M., Daxenbichler G. et al. Relationship between quantity of silver-stained nucleolar organizer regions associated proteins (Ag-NORs) and population doubling time in ten breast cancer cell lines. *Pathol. Res. Pract*. 1992; 188(6): 742—6.
13. 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): 63—8.
14. Райхлин Н.Т., Букаева И.А., Смирнова Е.А., Гуревич Л.Е., Делекторская В.В., Полоцкий Б.Е. и др. Значение экспрессии ядрышков аргирофильных белков и антигена Ki-67 в определении пролиферативной активности клеток и прогноза "малого" (T1) рака легкого. *Архив патологии*. 2008; 70(3): 15—8.
15. Carvalho P.E., Antonangelo L., Bernardi F.D., Leao L.E., Rodrigues O.R., Capelozzi V.L. Useful prognostic panel markers to express the biological tumor status in resected lung adenocarcinomas. *Jpn J. Clin. Oncol*. 2000; 30(11): 478—86.
16. Matheus R.S., Bernardi F. Del C., Gallo C. P., da Silva A. P., Rodrigues O. R., Capelozzi M. et al. Nuclear markers (star volume, mitotic index, AgNOR and Ki-67) of the primary tumor and its metastasis in non-small cell lung carcinomas. *Pathol. Res. Pract*. 2004; 200(1): 13—23.
17. Rodrigues O.R., Antonangelo L., Yagi N., Minamoto H., Schmidt Júnior A.F., Capelozzi V.L. et al. Prognostic significance of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) in resected non-small cell lung cancer (NSCLC). *Jpn J. Clin. Oncol*. 1997; 27(5): 298—304.
18. Pich A., Chiusa L., Margaria E. Prognostic relevance of Ag-NORs in tumor pathology. *Micron*. 2000; 31(2): 133—41.
19. Travis W.D., Brambilla E., Muller-Hermelink H.K., Harris C.C., eds. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon: IARC Press; 2004.
20. Ploton D., Menager M., Jeannesson P., Himber G., Pigeon F., Adnet J.J. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem. J*. 1986; 18(1): 5—14.
21. Aubele M., Biesterfeld S., Derenzini M., Hufnagl P., Martin H., Ofner D. et al. Guidelines of AgNOR quantitation. *Zbl. Pathol*. 1994; 140(1): 107—8.
22. Derenzini M., Trere D. Standardization of interphase Ag-NOR measurement by means of an automated image analysis system using lymphocytes as an internal control. *J. Pathol*. 1991; 165(4): 337—42.
23. Ceccarelli C., Trere D., Santini D., Taffurelli M., Chieco P., Derenzini M. AgNORs in breast tumours. *Micron* 2000; 31(2): 143—9.
24. Giuffrè G., Mormandi F., Barresi V., Bordi C., Tuccari G., Barresi G. Quantity of AgNORs in gastric endocrine carcinoid tumours as a potential prognostic tool. *Eur. J. Histochem*. 2006; 50(1): 45—50.
25. Кобяков Д.С. Сравнительный анализ пролиферативной активности эпителиальных клеток аденомы и рака толстой кишки: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Томск; 2006.
26. Kaneko S., Ishida T., Sugio K., Yokoyama H., Sugimachi K. Nucleolar organizer regions as a prognostic indicator for stage I non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 1991; 51(15): 4008—11.
27. 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): 151—9.

REFERENCES

1. Laktionov K.K., Davydov M.I., Polotskiy B.E., Zborovskaya I.B., Bogatyrev V.N., Nikulichev L.A. et al. Prognostic and predictive factors in patients with non-small cell lung cancer. *Prakticheskaya onkologiya*. 2006; 7 (3): 145—53 (in Russian).
2. van Diest P.J., Brugal G., Baak J.P. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J. Clin. Pathol*. 1998; 51(10): 716—24.
3. Shatseva T.A., Mukhina M.S. Ki-67 antigen in the assessment of tumor proliferation. Its structure and function. *Voprosy onkologii*. 2004; 50(2): 157—64 (in Russian).
4. Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol*. 2000; 182(3): 311—22.
5. Brown D.C., Gatter K.C. Ki-67 protein: the immaculate deception? *Histopathology*. 2002; 40(1): 2—11.
6. Jakobsen J.N., Sorensen J.B. Clinical impact of Ki-67 labeling index in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2013; 79(1): 1—7.
7. Roussel P., Hernandez-Verdun D. Identification of AgNOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity. *Exp. Cell Res*. 1994; 214(2): 465—72.
8. Sirri V., Roussel P., Hernandez-Verdun D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron*. 2000; 31(2): 121—6.
9. 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.
10. Trere D., Pession A., Montanaro L., Chieco P., Derenzini M. AgNOR protein expression and tumor growth rate of human carcinoma xenografts growing subcutaneously in nude mice. *Eur. J. Histochem*. 1997; 41(Suppl. 2): 153—4.
11. Derenzini M., Sirri V., Trere D., Ochs R. The quantity of nucleolar proteins nucleolin and protein B23 is related to cell doubling time in human cancer cells. *Lab. Invest*. 1995; 73(4): 497—502.
12. Ofner D., Hittmair A., Marth C., Ofner D., Totsch M., Daxenbichler G. et al. Relationship between quantity of silver-stained nucleolar organizer regions associated proteins (Ag-NORs) and population doubling time in ten breast cancer cell lines. *Pathol. Res. Pract*. 1992; 188(6): 742—6.
13. 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): 63—8.
14. Raykhlin N.T., Bukaeva I.A., Sмирнова Е.А., Гуревич Л.Е., Делекторская В.В., Полоцкий Б.Е. et al. The value of the expression of argyrophilic nucleolar protein and Ki-67 antigen in determining cell proliferation and prognosis of "small" (T1) lung cancer. *Архив патологии*. 2008; 70(3): 15—8 (in Russian).
15. Carvalho P.E., Antonangelo L., Bernardi F.D., Leao L.E., Rodrigues O.R., Capelozzi V.L. Useful prognostic panel markers to express the biological tumor status in resected lung adenocarcinomas. *Jpn J. Clin. Oncol*. 2000; 30(11): 478—86.
16. Matheus R. S., Bernardi F. Del C., Gallo C. P., da Silva A. P., Rodrigues O. R., Capelozzi M. et al. Nuclear markers (star volume, mitotic index, AgNOR and Ki-67) of the primary tumor and its metastasis in non-small cell lung carcinomas. *Pathol. Res. Pract*. 2004; 200(1): 13—23.
17. Rodrigues O.R., Antonangelo L., Yagi N., Minamoto H., Schmidt Júnior A.F., Capelozzi V.L. et al. Prognostic significance of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) in resected non-small cell lung cancer (NSCLC). *Jpn J. Clin. Oncol*. 1997; 27(5): 298—304.
18. Pich A., Chiusa L., Margaria E. Prognostic relevance of Ag-NORs in tumor pathology. *Micron*. 2000; 31(2): 133—41.
19. Travis W.D., Brambilla E., Muller-Hermelink H.K., Harris C.C., eds. World Health Organization classification of tumours. Pa-

- thology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon: IARC Press; 2004.
20. *Ploton D., Menager M., Jeannesson P., Himber G., Pigeon F., Adnet J.J.* Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem. J.* 1986; 18(1): 5—14.
 21. *Aubele M., Biesterfeld S., Derenzini M., Hufnagl P., Martin H., Ofner D.* et al. Guidelines of AgNOR quantitation. *Zbl. Pathol.* 1994; 140(1): 107—8.
 22. *Derenzini M., Trere D.* Standardization of interphase Ag-NOR measurement by means of an automated image analysis system using lymphocytes as an internal control. *J. Pathol.* 1991; 165(4): 337—42.
 23. *Ceccarelli C., Trere D., Santini D., Taffurelli M., Chieco P., Derenzini M.* AgNORs in breast tumours. *Micron* 2000; 31(2): 143—9.
 24. *Giuffre G., Mormandi F., Barresi V., Bordi C., Tuccari G., Barresi G.* Quantity of AgNORs in gastric endocrine carcinoid tumours as a potential prognostic tool. *Eur. J. Histochem.* 2006; 50(1): 45—50.
 25. *Kobyakov D.S.* Comparative analysis of the proliferative activity of the epithelial cells of adenomas and colon cancer. *Dr. med. sci. Diss. Tomsk; 2006* (in Russian).
 26. *Kaneko S., Ishida T., Sugio K., Yokoyama H., Sugimachi K.* Nucleolar organizer regions as a prognostic indicator for stage I non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1991; 51(15): 4008—11.
 27. *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): 151—9.

Поступила 26.04.13

© И.В. БЕРЕЗОВСКИЙ, С.Д. ФОКЕЕВ, 2013

УДК 616.37-006.6-092:612.112.91-092.9

И.В. Березовский, С.Д. Фокеев**ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА ЭЛАСТАЗЫ НЕЙТРОФИЛОВ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ МЫШЕЙ ПРИ РАКЕ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

ГБОУ ВПО "Алтайский государственный медицинский университет" Минздрава России, 656038, г. Барнаул

Ингибитор эластазы нейтрофилов (ZD0892) повышает выживаемость мышей в эксперименте при раке поджелудочной железы. Этот эффект усиливается при совместном применении ZD0892 с кселодой (антиметаболит, противоопухолевый препарат для приема внутрь, производное фторпиримидина карбамата) за счет торможения роста первичной опухоли поджелудочной железы.

Ключевые слова: рак поджелудочной железы, выживаемость, ингибитор эластазы нейтрофилов, кселода.

THE INFLUENCE OF NEUTROPHIL ELASTASE INHIBITORS ON MICE WITH THE PANCREATIC CANCER SURVIVAL DURING EXPERIMENT.

I.V. Berezovsky, S. D. Fokeev

The Altai State of Medical University of the Ministry of Health of Russia, 656038, Barnaul, Russian Federation

Inhibitor neutrophil elastase (ZD0892) increases mice survival with the pancreatic cancer in experiment. This effect amplifies at application of ZD0892 with xelody (antimetabolite, antineoplastic drug, fluoropyrimidine carbamate derivative), which inhibits primary tumor growing in the pancreatic cancer.

Key words: pancreatic cancer, survival, inhibitor neutrophil elastase, xelody.

Одной из проблем рака поджелудочной железы являются поздняя диагностика и его выявление в запущенных стадиях, что отражается на низком проценте радикально пролеченных больных [1]. Все это, а также раннее метастазирование первичной опухоли при отсутствии клинических проявлений на начальных стадиях заболевания предрасполагают к плохому прогнозу [2]. Имеются данные, что на развитие злокачественной опухоли влияют нейтрофилы человека [3, 6]. Нейтрофилы стимулируют развитие рака поджелудочной железы, но чаще всего это действие они оказывают на более поздних стадиях заболевания [3—5].

Цель исследования — изучить влияние ингибитора эластазы нейтрофилов на выживаемость мышей с раком поджелудочной железы в эксперименте.

Для корреспонденции: *Фокеев Сергей Дмитриевич* — д-р мед. наук, проф. каф. факультетской хирургии им. проф. И.И. Неймарка с курсом хирургии ФПК и ППС; 656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40, e-mail: fokeev.sergey@yandex.ru.

Материал и методы

Для определения роли ингибитора эластазы нейтрофилов в прогрессии панкреатической аденокарциномы использовалась специальная модель протоковой аденокарциномы поджелудочной железы — 6606 PDA у мышей. В эксперименте использованы 60 животных в возрасте 8—12 нед массой 20—25 г. Мышам в стерильных условиях проводился наркоз (Pentobarbitalnarkose — 60 мг/кг), они фиксировались (рис. 1), затем выполнялась срединная лапаротомия, выделялась головка поджелудочной железы (рис. 2) и непосредственно в нее вводили 250 тыс. клеток протоковой аденокарциномы поджелудочной железы — 6606 PDA (рис. 3).

После введения опухолевых клеток лапаротомная рана ушивалась. Через 2 нед после инъекции опухолевых клеток в головку поджелудочной железы с помощью специальной иглы в желудок ежедневно в одной и той же дозе вводились препараты — физиологический раствор, ингибитор эластазы нейтрофилов, кселода и