
ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЯ ЯДРЫШКОВЫХ БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ С КАРЦИНОМОЙ ЛЕГКИХ И АДРЕНОКОРТИКАЛЬНЫМ РАКОМ

**Н.Т. Райхлин, И. А. Букаева,
Е.А. Смирнова**

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН
Каширское шоссе, 24, Москва, Россия, 115478

А.В. Филимонюк

Кафедра общей врачебной практики
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 10, Москва, Россия, 117198

Изучены значения при определении степени злокачественности, прогноза, выживаемости онкологических больных, одновременного исследования количества пролиферирующих клеток (индекс Ki-67) и определения скорости клеточной пролиферации — длительности митотического цикла (экспрессия Ag-ОЯОР-белков — B23/нуклеофозмина и C23/нуклеолина) у 16 больных с адренокортикальной карциномой и 20 наблюдений так называемых «малых» раков легкого (до 3 см в диаметре), удаленных у пациентов с известными отдаленными результатами.

Проведенное сравнительное исследование пролиферативной активности клеток в двух группах больных с различным сроком выживаемости после удаления опухоли показало неоднородность индекса Ki-67, определяющего количество пролиферирующих клеток. В первой группе (с благоприятным прогнозом) у части больных индекс Ki-67 в опухолях был высоким, а экспрессия Ag-ОЯОР-белков низкая. В то же время у ряда больных второй группы (с неблагоприятным прогнозом) индекс Ki-67 в опухоли был низким, но экспрессия Ag-ОЯОР-белков высокой.

Следовательно исследование только индекса Ki-67 не всегда свидетельствует о степени злокачественности опухоли и прогнозе заболевания. Ag-ОЯОР-белки и индекс Ki-67 отражают разные аспекты пролиферативной активности клеток: скорость клеточной пролиферации (экспрессия Ag-ОЯОР) и количество пролиферирующих клеток (индекс Ki-67).

Ключевые слова: адренокортикальный рак, пролиферативная активность, маркеры длительности митотического цикла, B23/нуклеофозмин, C23/нуклеолин.

Определение количества пролиферирующих клеток имеет важное, иногда, решающее значение для оценки степени злокачественности новообразований, особенностей их клинического течения, прогноза, выбора оптимального способа лечения, выживаемости больных. Маркером количества пролиферирующих клеток является белок Ki67, локализованный в ядре и принимающей участие в регуляции деления клеток. Однако не всегда между уровнем экспрессии белка Ki67 и темпом роста опухолей выявляется четкая корреляция. В литературе по этому поводу ведется интенсивная дискуссия относительно значения индекса Ki-67 (процента клеток с положительной иммуногистохимической окраской ядер с помощью соответствующих антител). Так, Европейское общество по нейроэндокринным опухолям (European Neuroendocrine Tumor Society, ENETS) рекомендует применение индекса Ki-67. В Европе он широко используется при определении биологического потенциала различных типов опухолей, считается важным фактором про-

гноза и других особенностей новообразований и внесен в последние рекомендации ENETS. Однако Американская объединенная комиссия по злокачественным новообразованиям (American Joint Committee on Cancer, AJCC) и Североамериканское общество по нейроэндокринным опухолям (North American Neuroendocrine Tumor Society, NANETS) не считают индекс Ki-67 надежным критерием. Применение Ki67 в Северной Америке (США, Канада) не является общепризнанным стандартом, а его использование ограничено лишь отдельными учреждениями. Индекс Ki-67 был, есть и остается наиболее объективным маркером количества пролиферирующих клеток, но в чем же причина такой гетерогенности результатов его применения и, соответственно, различной оценки специалистами диагностического значения этого маркера?

В многочисленных работах установлено, что на пролиферативную активность оказывает существенное влияние скорость прохождения клетками фаз митотического цикла, одним из важных регуляторов и соответственно маркером которой являются аргирофильные белки областей ядрышковых организаторов (Ag-ОЯОР-белки) — В23/нуклеофозмин и С23/нуклеолин. Чем выше экспрессия Ag-ОЯОР-белков, тем больше скорость прохождения клетками митотического цикла и наоборот, чем экспрессия этих белков ниже, тем меньше скорость митотического цикла.

Учитывая вышесказанное, задачей данного исследования явилось изучение значения при определении степени злокачественности, прогноза, выживаемости онкологических больных, одновременного исследования количества пролиферирующих клеток (индекс Ki-67) и изучения скорости клеточной пролиферации — длительности митотического цикла (экспрессия Ag-ОЯОР-белков — В23/нуклеофозмина и С23/нуклеолина).

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили 16 аденокортикальных карцином и 20 наблюдений так называемых «малых» раков легкого (до 3 см в диаметре), удаленных у больных с известными отдаленными результатами. Все больные были разбиты на две группы. В первую группу вошли 8 больных аденокортикальным раком, срок жизни которых превышал 20 месяцев и колебался от 32 месяцев до 77, их средняя продолжительность жизни была равна 56,12 месяцев и 16 больных раком легкого, прослеженных в течение 3—5 лет после операции и оставшихся в живых. Во вторую группу также вошли 8 больных аденокортикальным раком, срок жизни которых не превышал 20 месяцев и колебался от 1 месяца до 19, их средняя продолжительность жизни была равна 9,25 месяцев и 4 больных раком легкого, скончавшихся в первые 2 года после операции. Выявление Ag-ОЯОР-белков провели с применением гистохимической реакции с нитратом серебра. Интенсивность реакции оценивали по среднему количеству гранул серебра на одно ядро в каждой группе опухолей. Иммуногистохимическое исследование В23/нуклеофозмина, С23/нуклеолина и белка Ki67 проводили с применением соответствующих моноклональных антител. Оценку иммуногистохимической реакции проводили визуально с учетом интенсивности окрашивания и количества окрашенных клеток. Статистическую обработку данных и определение достоверности проводили по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследования. *Гистохимическое и иммуногистохимическое исследование.* Все опухоли первой группы больных аденокортикальным раком с благоприятным течением характеризовались умеренной или низкой экспрессией Ag-ОЯОР-белков — В23/нуклеофозмина и С23/нуклеолина. Среднее число гранул серебра составляло $3,8 \pm 0,43$ гранулы на ядро опухолевых клеток. В 6 опухолях этой группы индекс Ki-67 составлял в среднем $5,5\% \pm 0,18$. В этой группе больных аденокортикальным раком с благоприятным течением было две опухоли, особенностью которых являлся высокий индекс Ki-67, достигавший соответственно 10% и 26,4%. При этом уровень экспрессии Ag-ОЯОР-белков В23/нуклеофозмина и С23/нуклеолина был низким. Опухоли второй группы больных аденокортикальным раком с неблагоприятным течением характеризовались высокой экспрессией исследованных Ag-ОЯОР-белков — В23/нуклеофозмина и С23/нуклеолина. Среднее число гранул серебра на 1 ядро клетки этих опухолей составляло $15,5 \pm 0,66$ гранулы, что достоверно превышало в 4,07 раз показатели, регистрируемые в опухолях первой группы ($P < 0,001$). При иммуногистохимическом исследовании высокий уровень экспрессии В23/нуклеофозмина и С23/нуклеолина был отмечен в большинстве случаев, умеренная экспрессия была отмечена в 1 наблюдении. В большинстве опухолей (в 6 из 8) этой группы индекс Ki-67 составлял в среднем $32,9 \pm 0,67\%$, что превышало в 5,9 раз значения, установленные для опухолей первой группы больных. Выявленные различия в уровне экспрессии антигена Ki-67 в опухолях разных групп больных были достоверны ($P < 0,001$). В двух опухолях этой группы больных индекс Ki-67 был значительно снижен и составлял 2,6% и 6,8%. Вместе с тем в этих двух опухолях, как и в других опухолях этой группы, отмечался высокий уровень экспрессии Ag-ОЯОР-белков-В23/нуклеофозмина и С23/нуклеолина. В результате проведенного исследования «малых» раков легких человека были получены следующие данные: 1-я группа. Больные раком легкого с благоприятным течением. Продолжительность жизни 3—5 лет после операции. Часть опухолей этой группы характеризовалась высоким индексом Ki67, который составлял $42,4 \pm 8,45\%$ и находился в пределах от 30 до 60% и низкой экспрессией Ag-ОЯОР-белков В23/нуклеофозмина и С23/нуклеолина в среднем $21,2 \pm 0,93$; 2-я группа. Больные раком легких с неблагоприятным прогнозом, скончавшиеся в течение первых 2 лет после операции. Три опухоли этой группы характеризовались высокой экспрессией Ag-ОЯОР-белков — В23/нуклеофозмина и С23/нуклеолина. Среднее число гранул серебра составляло $40,5 \pm 2,29$ на ядро. Индекс Ki67 в этих опухолях был умеренный, составлял $22,7 \pm 2,11\%$, находясь в пределах от 18 до 25%. В одной опухоли и экспрессия Ag-ОЯОР-белков и индекс Ki-67 были высокими. Выявляемые различия в уровне экспрессии Ag-ОЯОР-белков и индекса Ki67 в группах больных с различной выживаемостью были достоверны (соответственно $p < 0,001$ и $p < 0,002$).

Обсуждение рнзудбтатов. Исследование пролиферативной активности клеток можно разделить на три этапа. Первый этап охватывает время до 60-х годов XX столетия, когда процессы репродукции клеток исследовались лишь подсчетом митотических фигур на гистологических или цитологических препаратах и оп-

ределением митотического индекса тканей. В эти годы на основании радиоавтографических исследований было сформулировано учение о митотическом цикле, пролиферативном пуле, кинетике клеточной популяции. Второй этап относится к 60—70-м годам прошлого века. В это время одним из главных достижений в изучении пролиферативной активности клеток явилось учение о длительности (скорости) прохождения митотического цикла и его отдельных фаз, которая, как было установлено, может значительно колебаться в разных органах, тканях, клетках в норме и в патологических условиях, при различных воздействиях. Третий этап можно отнести к 90-м годам XX века, когда были открыты многие механизмы регуляции пролиферативной активности и, в частности, был установлен один из основных регулятор скорости прохождения клетками митотического цикла — Ag-ОЯОР-белки — 23/нуклеофозмин и C23/нуклеолин. Проведенное сравнительное исследование пролиферативной активности клеток аденокортикальных раков и так называемых «малых» раков легкого в двух группах больных с различным сроком выживаемости после удаления опухоли показало неоднородность индекса Ki-67, определяющего количество пролиферирующих клеток. В первой группе (с благоприятным прогнозом) у части больных индекс Ki-67 в опухолях был высоким, а экспрессия Ag-ОЯОР-белков низкая. В то же время у ряда больных второй группы (с неблагоприятным прогнозом) индекс Ki-67 в опухоли был низким, но экспрессия Ag-ОЯОР-белков высокой.

Следовательно исследование только индекса Ki-67 (количество пролиферирующих клеток) не всегда свидетельствует о степени злокачественности опухоли и прогнозе заболевания. Ag-ОЯОР-белки и индекс Ki-67 отражают разные аспекты пролиферативной активности клеток: скорость клеточной пролиферации (экспрессия Ag-ОЯОР) и количество пролиферирующих клеток (индекс Ki-67).

Таким образом, для наиболее полной оценки значения пролиферативной активности при решении разных аспектов диагностики опухолей (различия доброкачественного и злокачественного роста, определения степени злокачественности опухолей, выживаемости больных, прогноза и пр.) необходимо исследование не только фракции пролиферирующих клеток (их количества — индекс Ki67), но и скорости клеточной пролиферации — скорости прохождения клетками митотического цикла (уровень экспрессии Ag-ОЯОР-белков-B23/нуклеофозмина и C23/нуклеолина).

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Заварзин А.А. Исследование клеточных циклов и метаболизма нуклеотиновых кислот при дифференциации клеток. — М.: Л., 1964. — С. 37—51.
- [2] Райхлин Н.Т., Букаева И.А., Пробатова Н.А., Смирнова Е.А. Аргирофильные белки областей ядрышковых организаторов — маркеры скорости клеточной пролиферации // Арх. пат. — 2006. — Т. 68. — Вып. 3. — С. 47—51.
- [3] Райхлин Н.Т., Букаева И.А., Смирнова Е.А. и др. Значение экспрессии ядрышковых аргирофильных белков и антигена Ki-67 в определении пролиферативной активности клеток и прогноза «малого» (t1) рака легкого // Арх. пат. — 2008. — Т. 70. — Вып. 3. — С. 15—18.

- [4] Райхлин Н.Т., Букаева И.А., Филимонюк А.В. и др. Значение оценки пролиферативного потенциала (соотношение количества пролиферирующих клеток и длительности митотического цикла) в определении степени злокачественности и прогноза при адренокортикальном раке // Арх. пат. — 2011. — Т. 73. — № 5. — С. 43—47.
- [5] Klimstra D.S., Modlin J.R., Adsay N.V. et al. Pathology reporting of neuroendocrine tumors: application of the delphic consensus process to the development of a minimum pathology data set // Am. J. Surg. Pathol. — 2010. — Vol. 34. — N 3. — P. 300—311.
- [6] McNicol A.M., Struther A.J., Nolan C.E. et al. Proliferation in Adrenocortical Tumors: Correlation with Clinical Outcome and p53 Status // Endocr. Pathol. — 1997. — Vol. 8. — N 1. — P. 29—36.

DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC VALUE OF NUCLEOLAR PROTEINS IN THE REGULATION OF TUMOR CELLS PROLIFERATION IN PATIENTS WITH LUNG CARCINOMA AND ADRENOCORTICAL CANCER

**N.T. Reikhlin, I.A. Bukaeva,
E.A. Smirnova**

Russian Cancer Research Center n. a. N. Blokhin
Kashirskoye hw, 24, Moscow, Russia, 115478

A.V. Filimonyuk

Department of general practice
Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklay str., 10 Moscow, Russia, 117198

We studied correlation between the degree of malignancy, prognosis, survival of oncological patients, and the number of proliferating cells (Ki-67 index), the rate of cell proliferation, the continuance of the mitotic cycle (and the expression of Ag-OYAOR-proteins-B23/nucleofosmine S23/nukleoline) in 16 patients with adrenocortical carcinoma and in 20 cases of “small” lung cancer (up to 3 cm in diameter), whose tumors were removed and long-term results were evaluated.

The comparative study of proliferative activity of cells in the two groups of patients with different survival period after tumor removal showed the heterogeneity of Ki-67 index, which determined the number of proliferating cells. In the first group of patients (with a good prognosis) Ki-67 index was high, and expression of Ag-OYAOR proteins was low. At the same time, in the second group of patients, whose prognosis was poor, Ki-67 index in the tumor was low, but the expression of Ag-OYAOR-protein was high.

So, we can make a conclusion, that it is impossible to discuss the degree of malignancy of the tumor and the prognosis, based only on Ki-67 index. Ag-OYAOR-protein and Ki-67 index reflect different aspects of cell proliferation: the rate of cell proliferation (Ag-OYAOR expression) and the number of proliferating cells (Ki-67 index).

Key words: adrenocortical carcinoma, proliferate activity, markers of the continuance of the mitotic cycle, B23/nucleofosmine, S23/nukleolina.