

Д.С. Кобяков¹, Е.Ю. Бычкова², А.М. Авдалян², И.П. Бобров³, С.А. Лазарев², Н.М. Круглова², Е.Л. Лушникова⁴, А.Ф. Лазарев², Л.М. Непомнящих⁴

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ТОПОИЗОМЕРАЗЫ IIα ВО ВЗАИМОСВЯЗИ С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ И ПРОЛИФЕРАЦИЕЙ (ПО ВЫЯВЛЕНИЮ АРГИРОФИЛЬНЫХ БЕЛКОВ ЯДРЫШКООБРАЗУЮЩИХ РАЙОНОВ И АНТИГЕНА KI-67) ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО

¹Муниципальное бюджетное лечебно-профилактическое учреждение «Когалымская городская больница», 628481, г. Когалым; ²Алтайский филиал ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН, 656049, г. Барнаул; ³ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет», 656038, г. Барнаул; ⁴ФГБУ «Научно-исследовательский институт региональной патологии и патоморфологии» СО РАМН, 630117, г. Новосибирск

Исследованы топоизомераза IIα (ТопоIIα), аргирофильные белки, ассоциированные с ядрышкообразующими районами (Ag-ЯОР-белки) и антиген Ki-67 в плоскоклеточном раке легкого. Определяли опухоли с низким и высоким содержанием ТопоIIα, Ag-ЯОР-белков и Ki-67. Содержание ТопоIIα имело связь с клинико-морфологическими параметрами (показателем T, наибольшим размером опухоли, стадией и дифференцировкой) и маркерами пролиферации (Ag-ЯОР-белками, Ki-67). Выживаемость больных плоскоклеточным раком легкого с низким содержанием ТопоIIα лучше по сравнению с высоким содержанием ТопоIIα. Выживаемость больных зависит от взаимного содержания ТопоIIα и клинико-морфологических параметров (показатель N и стадия заболевания), маркеров пролиферации (Ag-ЯОР-белков). Содержание ТопоIIα и Ag-ЯОР-белков являются независимыми факторами прогноза. Взаимное исследование ТопоIIα с клинико-морфологическими параметрами и содержанием Ag-ЯОР-белков имеет прогностическое значение при плоскоклеточном раке легкого.

Ключевые слова: топоизомераза IIα; аргирофильные белки ядрышкообразующих районов; Ki-67; плоскоклеточный рак легкого.

RESEARCH OF TOPOISOMERASE IIα ACTIVITY IN CONJUNCTION WITH CLINICAL AND MORPHOLOGICAL PARAMETERS AND PROLIFERATION (TO IDENTIFY ARGYROPHILIC PROTEINS OF NUCLEOLAR ORGANIZER REGIONS AND ANTIGEN KI-67) IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE LUNG

D.S. Kobayakov¹, E. Yu. Bychkova², A.M. Avdalyan², I.P. Bobrov³, S. A. Lazarev², N.M. Kruglova², E.L. Lushnikova⁴, A.F. Lazarev², L.M. Nepomnyashchikh⁴

¹Kogalym City Hospital, 628481, Kogalym, Russian Federation; ²Altai branch N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center under the Russian Academy of Medical Sciences, 656049, Barnaul, Russian Federation; ³Altai Medical University, 656038, Barnaul, Russian Federation; ⁴Scientific Research Institute of Regional Pathology and Pathomorphology of the Siberia Region under the Russian Academy of Medical Sciences, 630117, Novosibirsk, Russian Federation

Topoisomerase IIα (TopoIIα), argyrophilic proteins associated with nucleolar organizer regions (Ag-NOR) and antigen Ki-67 in squamous cell carcinoma of the lung were investigated. Defined Tumors with low and high TopoIIα, Ag-NOR and Ki-67 were defined. TopoIIα had a relationship with clinical and morphological parameters (value T, greatest dimension, stage of disease and tumor differentiation) and proliferation markers (Ag-NOR, Ki-67). Survival of patients with squamous cell carcinoma of the lung with low content of TopoIIα is better as compared with high content of TopoIIα. Survival of patients depends on the mutual content of TopoIIα and clinical and morphological parameters (value N, stage of disease), proliferation markers (Ag-NOR). TopoIIα and Ag-NOR are independent prognostic factors. Mutual research of TopoIIα with clinical and morphological parameters and Ag-NOR has prognostic value in squamous cell carcinoma of the lung.

Key words: topoisomerase IIα; argyrophilic proteins of nucleolar organizer regions; Ki-67; squamous cell carcinoma of the lung.

Рак легкого занимает ведущее место в заболеваемости и смертности среди злокачественных новообразований. В группе немелкоклеточного рака легкого наибольшая часть представлена плоскоклеточным раком (практически 75%). Вместе с тем результаты лечения и выживаемости таких больных далеки от желаемых. В связи с чем ведется поиск клинико-морфологических и биомолекулярных параметров, связанных с прогнозом у больных плоскоклеточным раком легкого.

В схемы химиотерапии плоскоклеточного рака легкого включены препараты антрациклинового ряда, ингибирующие фермент топоизомеразу IIα (ТопоIIα), степень активности которой определя-

ет чувствительность опухоли к данным препаратам. ТопоIIα — белок с ферментативной активностью, участвующий в топологической сборке ДНК во время транскрипции, конденсации и сегрегации хромосом. Пик его экспрессии находится в S-, G2-, M-фазах клеточного цикла, в связи с чем маркер коррелирует с пролиферативной активностью [1].

Для оценки пролиферативной активности общепризнанным и доступным является иммуногистохимическое определение уровня антигена Ki-67. Антиген Ki-67 выявляется в клетках в поздние G₁-, S-

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

ТороIIa в плоскоклеточном раке легкого

Характеристика	Количество случаев		ИМ ТороIIa
	абс.	%	
Первичная опухоль			
T 1	22	20	21 (16—26) 1—2 ($p = 0,9$)
T 2	71	64	22 (14—30) 2—3 ($p = 0,01$)
T 3	18	16	26 (22—35) 1—3 ($p = 0,02$)
Наибольший размер			
< 3 см	40	36	19 (15—25) 4—5 ($p = 0,02$)
≥ 3 см	71	64	24 (17—31)
Лимфатические узлы			
N 0	72	65	21 (16—29) 6—7 ($p = 0,2$)
N 1	27	24	23 (14—33) 7—8 ($p = 0,8$)
N 2	10	9	25 (22—27) 6—8 ($p = 0,2$)
N 3	2	2	27 (25—28)
Стадия			
I	55	50	20 (14—27) 10—11 ($p = 0,2$)
II	37	33	23 (17—32) 11—12 ($p = 0,2$)
III	19	17	26 (22—28) 10—12 ($p = 0,008$)
Дифференцировка			
высокая	35	31	19 (15—26) 13—14 ($p = 0,2$)
умеренная	52	47	23 (18—28) 14—15 ($p = 0,2$)
низкая	24	22	26 (21—35) 13—15 ($p = 0,01$)
ИП Ag-ЯОР-белков			
низкий	58	52	20 (16—26) 16—17 ($p = 0,02$)
высокий	53	48	25 (18—31)
ИМ Ki-67			
низкий	50	45	20 (14—24) 18—19 ($p < 0,001$)
высокий	61	55	25 (18—32)

G₂-, M-фазы, однако функциональное значение этого ядерного белка в процессе пролиферации до конца не известно. В многочисленных исследованиях показана связь этого маркера с прогнозом опухоли [1, 2].

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. Эти белки выявляются в ядрах клеток во все фазы клеточного цикла, количественно увеличиваясь в 1,5—3 раза в S- и G₂-фазы [3]. Показана обратная зависимость между количественным содержанием Ag-ЯОР-белков и длительностью клеточного цикла [4], временем удвоения опухоли [5], в том числе и при плоскоклеточном раке легкого [6].

Анализ существующей литературы показал противоречивый характер связи антигена ТороIIa с клинико-морфологическими параметрами, антигеном Ki-67, Ag-ЯОР-белками и выживаемостью больных злокачественными опухолями [2, 7—12]. Кроме того, отсутствуют работы, уточняющие взаимную связь антигена ТороIIa с клинико-морфологическими параметрами, антигеном Ki-67, Ag-ЯОР-белками и прогнозом при плоскоклеточном раке легкого.

Исходя из вышеизложенного, целью работы стало исследование антигена ТороIIa во взаимосвязи с клинико-морфологическими параметрами, антигеном Ki-67, Ag-ЯОР-белками и 5-летней выживаемостью при плоскоклеточном раке легкого.

Материал и методы

Исследованы 111 операционных материалов плоскоклеточного рака 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 40 до 75 лет); 106 (95%) мужчин и 5 (5%) женщин. Выполнена лобэктомия 67 (60%) пациентам и пневмонэктомия 44 (40%) пациентам. Пред- и постоперационная химиотерапия не проводилась. Патогистологическая характеристика опухолей определена согласно классификации TNM 7-го пересмотра [13] и представлена в табл. 1.

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 ТороIIa (клон JS5B4), антиген Ki-67 (клон MIB-1), цитокератины High Molecular Weight (клон 34BE12) в автоматическом стейнере Ventana XT. Определяли индекс метки (ИМ) ТороIIa и 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.

Для изучения Ag-ЯОР-белков срезы окрашивали азотнокислым серебром по одностадийной методике

[14]. Перед окрашиванием срезы автоклавировали при 120°C 20 мин в 0,01 М цитратном буфере (рН 6,0) [14]. Докрашивание 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 цифровых изображений, полученных с соответствующих полей зрения микроскопа при увеличении в 1000 раз (объектив ×100, 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 [15]. Находили индекс площади (ИП) Ag-ЯОР-белков — частное от деления площадей Ag-ЯОР-белков в клетке опухоли и малом лимфоците.

Статистический анализ полученных данных осуществляли в программе Statistica 6.0. Так как распределение ИМ ТороIIa и Ki-67 было непараметрическим, то меру центральной тенденции представляли в виде медианы, а меру рассеяния в виде интерквартильного интервала. Распределение ИП Ag-ЯОР-белков было параметрическим, поэтому меру центральной тенденции представляли в виде среднего

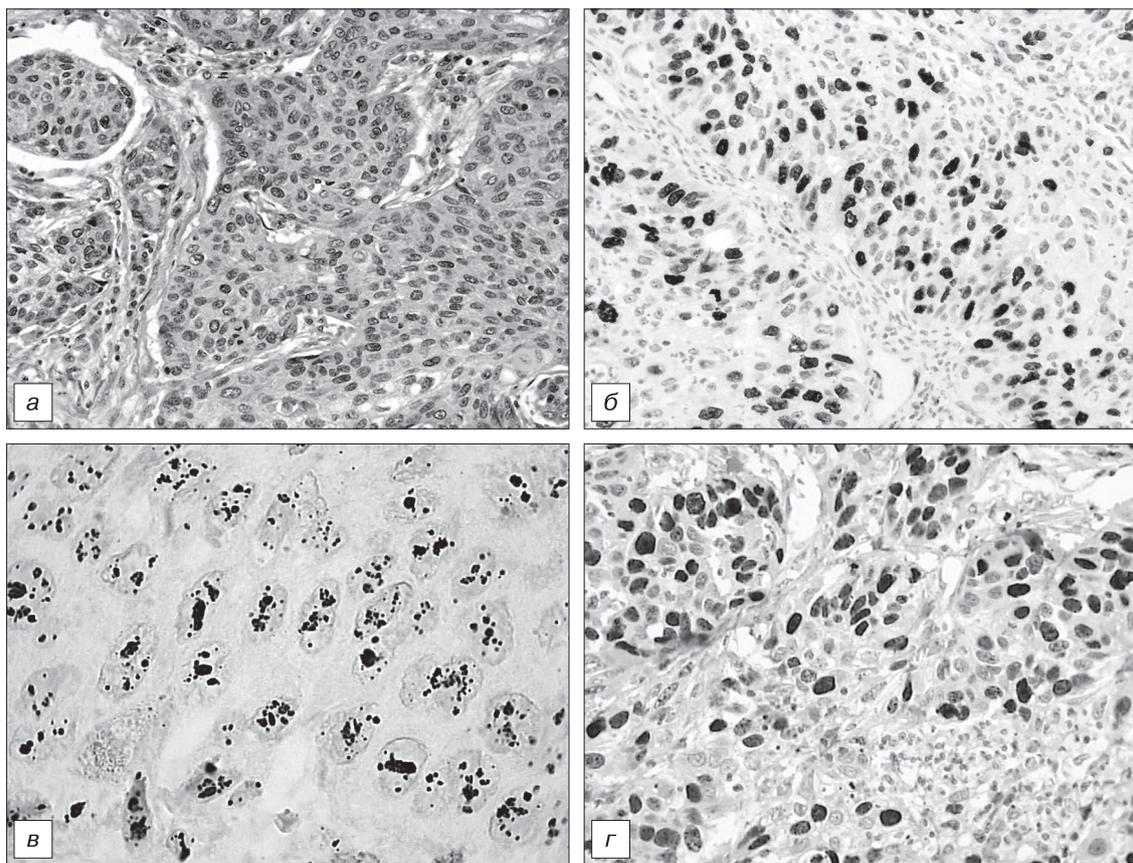


Рис. 1. Умерено дифференцированный плоскоклеточный рак легкого (а) с высоким содержанием ТороПа (б), Ag-ЯОР-белков (в) и Ki-67 (г). а — окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$; б, г — иммуногистохимический метод, $\times 400$; в — окраска азотнокислым серебром, $\times 1000$.

значения, а меру рассеяния в виде стандартного отклонения. При проверке статистических гипотез применяли непараметрические методы: U-тест Манна—Уитни, коэффициент корреляции рангов Спирмена (r). Определяли общую скорректированную выживаемость больных за 5-летний период после операции, использовали метод Каплана—Мейера, логарифмический ранговый тест, регрессионную модель Кокса. Достоверность полученных критериев оценивали при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результат иммуногистохимической окраски ТороПа и Ki-67 определялся в виде окрашивания ядер клеток коричневого цвета, от светлого до темного оттенка в зависимости от фазы клеточного цикла с пиком экспрессии в G2 и M (рис. 1, б, г). Результат окраски срезов азотнокислым серебром определялся в виде округлых гранул черного цвета (Ag-ЯОР-белки), расположенных на фоне коричневого ядрышка или бледно-желтого ядра (рис. 1, в).

ИМ ТороПа в плоскоклеточном раке легкого составил 22% (16—28%). Данное значение считали пороговым; соответственно, случаи с ИМ ТороПа 22% и более считались с высоким ИМ ТороПа (+ТороПа), до 22% — с низким (-ТороПа). ИМ Ki-67 в плоскоклеточном раке легкого составил 30% (23-45%). Данное значение считали пороговым, что согласуется с данными литературы [7]. Соответственно, случаи с ИМ Ki-67 30% и более считались с высоким ИМ

Ki-67 (+Ki-67), до 30% — с низким (-Ki-67). Индекс площади Ag-ЯОР-белков в плоскоклеточном раке легкого составил $6,98 \pm 1,48$. По аналогии с оценкой ИМ ТороПа и Ki-67, случаи с ИП Ag-ЯОР-белков 6,98 и более считались с высоким ИП Ag-ЯОР-белков (+Ag-ЯОР), до 6,98 — с низким (-Ag-ЯОР).

Результаты определения ТороПа в эпителиальных клетках плоскоклеточного рака легкого в связи с морфологическими параметрами опухоли, а также результаты сравнения между этими группами представлены в табл. 1.

Отмечалось последовательное увеличение ИМ ТороПа в плоскоклеточном раке легкого в группах T1, T2, T3, однако статистически значимое различие получено только между T3 и T1, T2. Также отмечалось достоверное отличие ИМ ТороПа между опухолями до 3 см и более 3 см. ИМ ТороПа возрастал в группах N0, N1, N2, N3 (показатель N), однако, статистически значимого различия не было получено. Достоверное отличие ИМ ТороПа получено между I и III стадией заболевания, высоко- и низкодифференцированной опухолью. Статистически значимые различия ИМ ТороПа получены в группах с низким и высоким ИП Ag-ЯОР-белков и ИМ Ki-67. ИМ ТороПа в плоскоклеточном раке легкого имел слабую корреляцию с показателем T ($r = 0,20$; $p = 0,04$), наибольшим размером опухоли ($r = 0,23$; $p = 0,02$), стадией ($r = 0,24$; $p = 0,01$), ИП Ag-ЯОР-белков ($r = 0,23$; $p = 0,02$) и умеренную корреляцию с ИМ Ki-67 ($r = 0,39$; $p < 0,001$). Таким образом, возрастание ак-

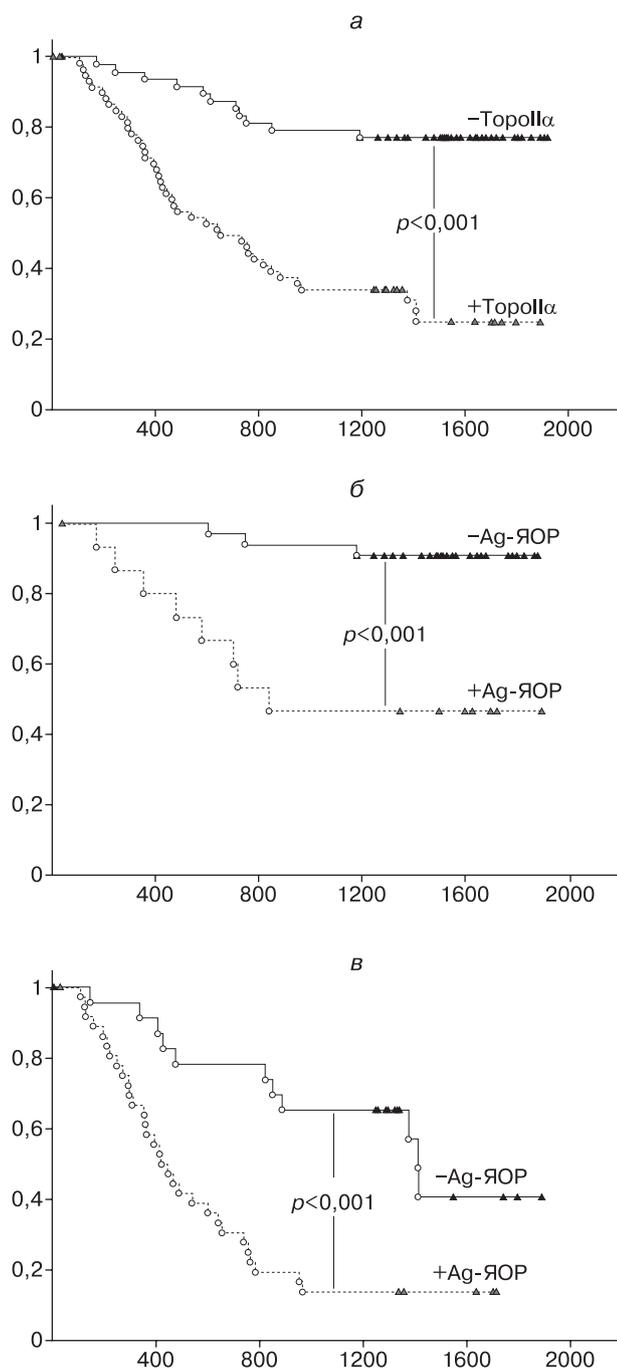


Рис. 2. Графики выживаемости по Каплану—Мейеру больных плоскоклеточным раком легкого.

a — с низким и высоким содержанием ТороIIа; *б* — с низким содержанием ТороIIа и низким/высоким содержанием Ag-ЯОР-белков; *в* — с высоким содержанием ТороIIа и низким/высоким содержанием Ag-ЯОР-белков. По оси абсцисс — время жизни (в днях), по оси ординат — доля выживших больных.

тивности ТороIIа в процессе роста, при увеличении стадии заболевания и снижении дифференцировки плоскоклеточного рака легкого связано, вероятно, с увеличением пролиферативной активности опухоли и изменением функциональных процессов мутированной ДНК. Найденная нами корреляция ИМ ТороIIа с активностью ядрышковых организаторов и в большей степени с антигеном Ki-67 подтверждает

значимость исследования ТороIIа в качестве маркера пролиферативной активности опухоли.

Общая скорректированная выживаемость больных плоскоклеточным раком легкого за 5-летний период после операции составила $49,0 \pm 5,0\%$. Выживаемость больных плоскоклеточным раком легкого имела статистически значимое различие в зависимости от содержания ТороIIа: с -ТороIIа 5-летняя выживаемость составила $74,8 \pm 6,6\%$, с +ТороIIа — $24,8 \pm 6,6\%$ (рис. 2, *a*).

В плоскоклеточном раке легкого с -ТороIIа и +ТороIIа выживаемость больных имела статистически значимые различия в зависимости от клинико-морфологических параметров — показателя N и стадии заболевания (табл. 2). На выживаемость больных плоскоклеточным раком легкого с -ТороIIа и +ТороIIа оказывала влияние активность ядрышковых организаторов в клетках опухоли — в одной и той же группе выживаемость выше при низком ИП Ag-ЯОР-белков (см. табл. 2, рис. 2, *б, в*), что является отражением связи активности ядрышковых организаторов с продолжительностью клеточного цикла. Выживаемость больных с -ТороIIа и +ТороIIа не имела статистически значимых различий в зависимости от ИМ Ki-67. Таким образом, выживаемость больных плоскоклеточным раком легкого зависит как от содержания ТороIIа, так и от клинико-морфологических параметров по системе TNM (показателя N, стадии заболевания) и ИП Ag-ЯОР-белков.

При проведении одномерного регрессионного анализа содержание ТороIIа в плоскоклеточном раке легкого имело влияние на выживаемость больных ($\chi^2 = 27,2$; $\beta = 1,59$, стандартная ошибка 0,34, $p < 0,001$). При проведении многомерного регрессионного анализа только содержание ТороIIа ($\chi^2 = 61,4$; $\beta = 1,0$, стандартная ошибка 0,38, $p < 0,01$) и ИП Ag-ЯОР-белков ($\chi^2 = 61,4$; $\beta = 1,31$, стандартная ошибка 0,33, $p < 0,001$) влияли на выживаемость больных.

В нашем исследовании найдена корреляция ТороIIа с ИМ Ki-67 в плоскоклеточном раке легкого, что согласуется с данными исследований рака легкого

Таблица 2

Общая 5-летняя скорректированная выживаемость больных в зависимости от содержания ТороIIа и клинико-морфологических параметров, ИП Ag-ЯОР-белков, ИМ Ki-67 в плоскоклеточном раке легкого (логарифмический ранговый тест)

Характеристика	-ТороIIа			+ТороIIа		
	<i>n</i>	выживаемость, %	<i>p</i>	<i>n</i>	выживаемость, %	<i>p</i>
Лимфатические узлы						
N 0	39	$83,9 \pm 6,6$	$< 0,01$	33	$35,8 \pm 10,5$	$< 0,001$
N 1—3	11	$25,8 \pm 15,6$		28	$9,0 \pm 5,7$	
Стадия						
I	33	$82,5 \pm 7,5$	0,02	22	$35,0 \pm 14,1$	0,02
II—III	17	$47,6 \pm 13,3$		39	$14,5 \pm 7,0$	
ИП Ag-ЯОР-белков						
низкий	34	$86,2 \pm 6,8$	$< 0,001$	24	$41,4 \pm 13,2$	$< 0,001$
высокий	16	$37,2 \pm 13,7$		37	$12,3 \pm 5,6$	

Примечание. *n* — количество случаев.

го [8]. Также найдена умеренная корреляция ТороПа с содержанием Ag-ЯОР-белков. Таким образом, ТороПа является маркером пролиферативной активности при плоскоклеточном раке легкого.

Содержание ТороПа в плоскоклеточном раке легкого взаимосвязано с показателем Т, наибольшим размером опухоли, стадией и дифференцировкой. Взаимосвязь ТороПа с клинико-морфологическими параметрами также показана в исследовании плоскоклеточного рака гортани [16]. Однако Н. Erguden и соавт. [10] не нашли связи между содержанием ТороПа и клинико-морфологическими параметрами при раке легкого.

Выживаемость больных плоскоклеточным раком легкого с -ТороПа достоверно выше по сравнению с опухолями с +ТороПа. Такая взаимосвязь содержания ТороПа с выживаемостью больных прослежена и в других исследованиях на материале рака легкого и гортани [8, 9, 16]. Однако в исследовании Н. Erguden и соавт. [10] не найдено связи выживаемости больных раком легкого и ТороПа.

Выживаемость больных в группах -ТороПа и +ТороПа зависит также от клинико-морфологических параметров по системе TNM (показателя N и стадии заболевания) и от активности ядрышковых организаторов. Таким образом, для получения более точных актуально-реальных кривых выживания больных плоскоклеточным раком легкого необходимо данные исследования ТороПа соотносить с клинико-морфологическими параметрами и другими методами исследования пролиферации (исследование активности Ag-ЯОР-белков).

При проведении регрессионного анализа содержание ТороПа и Ag-ЯОР-белков являются независимыми факторами прогноза в плоскоклеточном раке легкого. S. Yan и соавт. [8] при исследовании рака легкого также показали, что содержание ТороПа является независимым фактором прогноза. Вероятно, высокое содержание ТороПа отражает высокий пролиферативный потенциал опухоли и нарушения в топологической сборке мутированной ДНК.

Таким образом, определение содержания ТороПа во взаимосвязи с клинико-морфологическими параметрами и содержанием Ag-ЯОР-белков имеет прогностическое значение при плоскоклеточном раке легкого.

Выводы

1. В плоскоклеточном раке легкого содержание ТороПа имело связь с клинико-морфологическими параметрами (показателем Т, наибольшим размером опухоли, стадией и дифференцировкой) и маркерами пролиферации (Ag-ЯОР-белки, Ki-67).

2. Выживаемость больных плоскоклеточным раком легкого с низким содержанием ТороПа лучше по сравнению с высоким содержанием ТороПа.

3. Выживаемость больных плоскоклеточным раком легкого зависит от взаимного содержания ТороПа и клинико-морфологических параметров (показатель N и стадия заболевания), маркеров пролиферации (Ag-ЯОР-белков).

4. Содержание ТороПа и Ag-ЯОР-белков в плоскоклеточном раке легкого являются независимыми факторами прогноза.

ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Beresford M.J., Wilson G.D., Makris A. Measuring proliferation in breast cancer: practicalities and applications. *Breast Cancer Res.* 2006; 8 (6): 216.
2. Martin B., Paesmans M., Mascaux C., Berghmans T., Lothaire P., Meert A.P. et al. Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: systematic review of the literature with meta-analysis. *Br. J. Cancer.* 2004; 91 (12): 2018—25.
3. Sirri V., Roussel P., Hernandez-Verdun D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron.* 2000; 31 (2): 121—6.
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. 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.
6. Abe S., Sukoh N., Ogura S., Kunikane H., Watanabe N., Nakajima I. et al. Nucleolar organiser regions as a marker of growth rate in squamous cell carcinoma of the lung. *Thorax.* 1992; 47 (10): 778—80.
7. 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.
8. Yan S., Shun-Chang J., Li C., Jie L., Ya-Li L., Ling-Xiong W. Topoisomerase II alpha expression and the benefit of adjuvant chemotherapy for postoperative patients with non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* 2010; 10: 621—30.
9. Dingemans A.C., van Ark-Otte J., Span S., Scagliotti G.V., van der Valk P., Postmus P.E. et al. Topoisomerase IIalpha and other drug resistance markers in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2001; 32 (2): 117—28.
10. Erguden H.C., Koksall D., Demirag F., Bayiz H., Mutluay N., Berktaş B. et al. The association of topoisomerase 2α expression with prognosis in surgically resected non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *J. Thorac. Dis.* 2012; 4 (4): 352—7.
11. Antonangelo L., Bernardi F. D., Capelozzi V.L., Takagaki T.Y., Younes R.N., Yagi N. et al. Morphometric evaluation of argyrophilic nucleolar organizer region is useful in predicting long-term survival in squamous cell carcinoma of the lung. *Chest.* 1997; 111 (1): 110—4.
12. Bernardi F.D., Antonangelo L., Beyruti R., Takagaki T., Saldiva P.H., Capelozzi V.L. A prognostic model of survival in surgically resected squamous cell carcinoma of the lung using clinical, pathologic, and biologic markers. *Mod. Pathol.* 1997; 10 (10): 992—1000.
13. Sobin L., Gospodarowicz M., Wittekind C. eds. *TNM classification of malignant tumours.* 7th ed. Oxford: Wiley—Blackwell, 2009: 138—46.
14. Trere D. AgNOR staining and quantification. *Micron.* 2000; 31 (2): 127—31.
15. 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.
16. Shvero J., Koren R., Shvili I., Yaniv E., Sadov R., Hadar T. Expression of human DNA Topoisomerase II-alpha in squamous cell carcinoma of the larynx and its correlation with clinicopathologic variables. *Am. J. Clin. Pathol.* 2008; 130 (6): 934—9.

Поступила 16.01.14
Received 16.01.14