

**Российская научно-практическая конференция
с международным участием
«ИННОВАЦИОННЫЕ ПОДХОДЫ В ОНКОЛОГИИ»,
16–17 июня 2015 г., г. Барнаул
(избранные тезисы)**

Авдалян А.М.¹, Климачев В.В.², Бобров И.П.², Круглова Н.М.¹, Лазарев А.Ф.¹, Лушников Е.Л.³, Непомнящих Л.М.³

**ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ
И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ
ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ
НЕРИБОСОМНОГО
ЯДРЫШКОВОГО БЕЛКА
V23/НУКЛЕОФОЗМИНА
В ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ
ОБРАЗОВАНИЯХ ТЕЛА МАТКИ**

¹Алтайский филиал ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина», г. Барнаул, Россия; ²ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Барнаул, Россия; ³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт региональной патологии и патоморфологии», г. Новосибирск, Россия

Исследование аргирофильных белков, ассоциированных с ядрышкообразующими районами (Ag-ЯОР-белков), в патологоанатомической практике началось около 30 лет назад (Roussel P. и соавт., 2010). Одним из ключевых аргирофильных белков клетки является нерибосомный ядрышковый белок V23/нуклеофозмин (NPM, синонимы нуматрин и NO38) с молекулярной массой от 35 до 40 кД, содержание которого в активно пролиферирующих клетках (в первую очередь в малигнизированных) превышает в 20–30 раз содержание в неизменном пуле клеток (Lim M. и соавт., 2006). Его мультифункциональное значение сводится к рибосомальному синтезу, шаперонной функции с ядерно-ядрышковой транслокацией ряда белков, регуляции апоптоза за счет супрессии p53 и p14^{arf} и пролиферации (Szebeni A., 1999). Конечным функциональным актом белка являются антиапоптотическое воздействие и остановка дифференцировки клетки, что в какой-то степени сближает его действие с функциональным значением белков теплового шока (Piao L. и соавт., 2009). К настоящему времени накоплен большой материал, свидетельствующий о диагностической и прогностической значимости исследования NPM при опухолях, однако полученные результаты носят противоречивый характер (Shakalya W. И соавт., 2008).

Гладкомышечные доброкачественные и злокачественные опухоли тела матки с точки зрения эпидемиологии и распространенности являются гетерогенной группой опухолей. На всех этапах морфологического исследования гладкомышечных опухолей возникает большое количество не-

решенных вопросов: речь идет прежде всего о клинико-морфофункциональных характеристиках опухоли, а ответы патолога зачастую носят формальный ответ, не отвечающий современным клиническим подходам терапии данной патологии и техническим возможностям клинической патологии (Politi K. и соавт., 2004; Chen L. и соавт., 2008). Несмотря на многочисленные работы в направлении поиска молекулярных звеньев патогенеза, морфогенетические механизмы процессов становления лейомиомы (ЛМ) и, возможно, ее последующей малигнизации до настоящего времени неизвестны в большей степени ввиду недостаточно всесторонней освещенности клинико-морфофункциональных характеристик как ЛМ, так и лейомиосаркомы (ЛМС) (Leitao M. и соавт., 2004). Что касается клинической и патоморфологической значимости исследования NPM в ЛМ и ЛМС тела матки, и в первую очередь в клетках ЛМС, во взаимосвязи с различными клинико-морфологическими, биомолекулярными параметрами и прогнозом, в настоящее время нет работ, в какой-либо степени осветивших данную проблему, хотя была показана высокая корреляция содержания общих аргирофильных белков в клетках ЛМ и ЛМС с клинико-морфологическими параметрами (Авдалян А.М. и соавт., 2013).

Цель работы – определение взаимосвязи некоторых клинико-морфологических, биомолекулярных характеристик ЛМ и ЛМС тела матки с количественными и качественными параметрами экспрессии NPM опухолевых клеток.

Материал и методы. В исследовании использовали операционный материал от больных ЛМ (45 случаев) и ЛМС (45 случаев), пролеченных за период 1986–2007 гг. в АКОД. Материал проводили по стандартной проводке, готовили срезы 3–4 мкм. Для выявления количества Ag-ЯОР-белков без учета типа срезы окрашивали азотнокислым серебром по одностадийной методике. В каждом случае определяли количество Ag-ЯОР-белков в виде гранул в нуклеолярном и кариоплазматическом кластерах в ядрах на 100–120 случайно выбранных клеток при увеличении в 1000 раз (объектив x100, 1.25, oil). Для оценки качественных и количественных параметров NPM проводили ИГХ-реакцию с антителами к Nucleofosmin в автоматическом иммунопейнере Ventana XT (клон FC-61911, Monosan). Оценивали тип реакции (ядерный, цитоплазматический или нуклеолярный), количество позитивных нуклеол на ядро, оценивали площадь позитивных нуклеол (в мкм²) и интегральную оптическую плотность (IOD) в условных единицах свечения. Компьютерный анализ цифровых изображений проводили с использованием программы ImageJ 1.42. Статистический анализ полученных данных осуществляли в про-

грамме Statistica 6.0. Для оценки корреляций количества NPM с другими патоморфологическими параметрами использовали так называемые пороговые величины, представляющие из себя средний показатель изучаемого критерия. При анализе 10-летней выживаемости использовали кумулятивный пропорциональный анализ по Каплану – Мейеру, многофакторный анализ Кокса. При анализе взаимосвязи изученных параметров NPM в клетках ЛМС с прогнозом все больные были рандомизированы на 2 группы: с благоприятным прогнозом (живы без рецидива и/или метастазирования в течение всего периода исследования) и с неблагоприятным прогнозом (либо умерли в течение исследования, либо имелся рецидив и/или метастазирование за срок исследования).

Результаты. Результатом иммуногистохимической реакции с антителами к NPM была ядрышковая локализация выявляемого белка, что было вполне логичным и сопоставимым с данными мировой литературы. Полученные данные показали, что различные варианты ЛМ не отличались друг от друга по количественным и качественным характеристикам NPM. В то же время были выявлены значимые различия изученных параметров NPM в ЛМ и ЛМС. Индекс NPM, интегральная оптическая плотность и площадь позитивных нуклеол были значимо выше в ЛМС относительно ЛМ ($65,9 \pm 3,5$ и $54,1 \pm 4,3\%$, 18450 ± 216 и 13257 ± 947 IOD, $1,2 \pm 0,1$ и $0,9 \pm 0,05$ мкм² соответственно). В ЛМС в зависимости от гистологического типа была выявлена статистически значимая дисперсия данных: минимальными количественными показателями характеризовался веретенноклеточный тип ЛМС: площадь позитивных нуклеол и интегральная оптическая плотность были значимо меньше, чем при ЛМС эпителиоидноклеточной и с большим количеством многоядерных клеток ($72,8 \pm 2,7$ и $64,9 \pm 3,9\%$, 30006 ± 320 и 12826 ± 145 IOD, $1,8 \pm 0,2$ и $0,9 \pm 0,09$ мкм² соответственно). В то же время не было выявлено значимых различий между гистологически различными типами ЛМС по индексу NPM и количеству позитивных нуклеол в ядрах опухолевых клеток.

При поиске взаимосвязи характеристик NPM с клинико-морфологическими характеристиками ЛМ и ЛМС были получены интересные данные. Значимых различий NPM между возрастными группами ни при ЛМ, ни при ЛМС найдено не было. Размер ЛМ также не был взаимосвязан с параметрами NPM. В то же время при ЛМС до 7 см IOD позитивных нуклеол и соответственно количество белка было значимо меньше, чем в опухолях более 7 см. Также при увеличении степени злокачественности ЛМС значимо увеличивались индекс IOD NPM в клетках опухоли (14681 ± 157 и 23161 ± 427 IOD соответственно). При прогрессировании стадии заболевания от I до II происходило увеличение индекса NPM и значимое снижение IOD-позитивных нуклеол NPM ($75,4 \pm 3,3$ и $62,8 \pm 5,2\%$, и 19974 ± 345 и 15402 ± 165 IOD соответственно).

При анализе прогностической значимости количественных и качественных характеристик NPM

в клетках ЛМС было выявлено, что рост индекса и IOD NPM сопряжен с неблагоприятным исходом. Так, в случаях благоприятного исхода (больные живы на момент исследования) индекс и IOD NPM составили $61,8 \pm 3,3$ и 16925 ± 36 % соответственно, а при неблагоприятном исходе (больные погибли на момент исследования) – $72,6 \pm 4,4\%$ и 20536 ± 291 соответственно, $\chi^2=5,9$; $p=0,002$.

Что касается сопоставлений с биомолекулярными маркерами систем пролиферации и апоптоза и рецепторного статуса опухоли, было выявлено, что в ЛМ оставались относительно стабильными параметры NPM при увеличении пролиферативного индекса Ki-67, но значимо увеличивался индекс NPM и IOD при росте экспрессии p53 и при негативном рецепторном статусе.

Вместе с тем в ЛМС происходили радикально противоположные динамики: при росте Ki-67 снижался индекс и IOD NPM. При росте p53 происходил сонаправленный рост индекса и IOD NPM. При позитивном же рецепторном статусе ЛМС индекс и IOD были выше, чем при негативном.

Выводы

1. Преобладающим типом реакции с NPM в клетках ЛМ и ЛМС различных гистологических типов была ядрышковая. Цитоплазматическая, ядерная и смешанные типы реакции нами не были отмечены ни в одном случае.

2. Индекс НФС, интегральная оптическая плотность и площадь позитивных нуклеол были значимо выше в ЛМС относительно ЛМ: $65,9 \pm 3,5$ и $54,1 \pm 4,3\%$, 18450 ± 216 и 13257 ± 947 IOD, $1,2 \pm 0,1$ и $0,9 \pm 0,05$ мкм² соответственно.

3. Значимо высокими количественными и качественными показателями NPM характеризовался гистологический тип ЛМС эпителиоидноклеточный и с большим количеством многоядерных клеток относительно веретенноклеточного варианта: $72,8 \pm 2,7$ и $64,9 \pm 3,9\%$, 30006 ± 320 и 12826 ± 145 IOD, $1,8 \pm 0,2$ и $0,9 \pm 0,09$ мкм² соответственно.

4. Была обнаружена корреляция размера, степени злокачественности (по FNCLCC) и стадии (по FIGO) с IOD NPM (увеличение при опухоли более 7 см и по мере увеличения степени злокачественности; снижение показателя от I ко II стадии процесса) при ЛМС ($r=3,6-5,9$). При ЛМ не было обнаружено значимых корреляций клинико-патологических параметров с характеристиками NPM ($r=3,1$).

5. При анализе взаимосвязи NPM с экспрессией Ki-67, p53 и рецепторного статуса в ЛМ и ЛМС были обнаружены обратные взаимосвязи: в ЛМ при увеличении Ki 67 и p53 происходил рост индекса и IOD NPM, а при позитивном рецепторном статусе также происходил рост этих показателей. В ЛМС, напротив, при увеличении индекса Ki-67 и p53 происходило снижение индекса и IOD NPM, а при позитивном рецепторном статусе происходило снижение этих показателей.

При многофакторном прогностическом анализе по Коксу параметры индекса и IOD NPM были значимыми, но не независимыми параметрами 10-летней выживаемости при $\chi^2=5,9$.