

ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ НАУКА – ПРАКТИЧЕСКОМУ ЗДРАВООХРАНЕНИЮ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.24-006.04-092:612.014.1

Панасьян А.У.^{1,2}, Кобяков Д.С.³, Авдалян А.М.¹, Иванов А.А.¹, Лушникова Е.Л.⁴, Бакарев М.А.⁴, Лазарев А.Ф.¹

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЁРОВ АПОПТОЗА (P53, BCL-2, BAX) И ПРОЛИФЕРАЦИИ (KI-67, ТОПОИЗОМЕРАЗЫ II α , АРГИРОФИЛЬНЫХ БЕЛКОВ ЯДРЫШКООБРАЗУЮЩИХ РАЙОНОВ) В НОРМЕ И ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЁГКОГО И ИХ ВЗАИМОСВЯЗЬ С НЕКОТОРЫМИ КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ

¹ Алтайский филиал ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 656049, г. Барнаул, Россия;

² КГБУЗ «Алтайский онкологический диспансер», 656043, г. Барнаул, Россия;

³ МБЛПУ «Когалымская городская больница», 628481, г. Когалым, Россия;

⁴ ФГБНУ «Институт молекулярной патологии и патоморфологии», 630117, г. Новосибирск, Россия

Целью исследования явилось изучение маркёров апоптоза и пролиферации во взаимосвязи с клинико-морфологическими параметрами немелкоклеточного рака лёгкого (НМКРЛ) и в норме. Исследованы 237 операционных материалов НМКРЛ и 10 случаев патологически не изменённой ткани лёгкого. Иммуногистохимическим методом определяли маркёры апоптоза и пролиферации: p53, bcl-2, bax, Ki-67, топоизомеразу II α (ТопоII α). Аргирофильные белки, ассоциированные с ядрышкообразующими районами (Ag-ЯОР-белки), выявляли азотнокислым серебром. При НМКРЛ повышается экспрессия p53, bcl-2, Ki-67, ТопоII α и Ag-ЯОР-белков по сравнению с нормой; снижается экспрессия bax. Экспрессия p53, bcl-2 и bax взаимосвязана с клинико-морфологическими параметрами НМКРЛ: гистогенезом, показателем N и стадией (для bcl-2) или полом (для bax). Экспрессия Ki-67 и ТопоII α взаимосвязана с полом, наибольшим размером опухоли, гистогенезом и дифференцировкой. Ag-ЯОР-белки взаимосвязаны с полом, показателями T и N, наибольшим размером опухоли, стадией, гистогенезом и дифференцировкой. При НМКРЛ экспрессия маркёров апоптоза взаимосвязана с пролиферацией: в p53-положительных опухолях – высокая пролиферация (Ki-67, ТопоII α и Ag-ЯОР-белки), в bcl-2-положительных опухолях – низкая активность ядрышковых организаторов, в bax-положительных опухолях – низкая пролиферативная активность (Ki-67, ТопоII α). При НМКРЛ наблюдается изменение экспрессии маркёров апоптоза (p53, bcl-2 и bax) и пролиферации (Ki-67, ТопоII α и Ag-ЯОР-белков) во взаимосвязи с нормой и клинико-морфологическими параметрами опухоли.

Ключевые слова: пролиферация; апоптоз; немелкоклеточный рак лёгкого.

Для цитирования: Панасьян А.У., Кобяков Д.С., Авдалян А.М., Иванов А.А., Лушникова Е.Л., Бакарев М.А., Лазарев А.Ф. Экспрессия маркёров апоптоза (p53, bcl-2, bax) и пролиферации (Ki-67, топоизомеразы II α , аргирофильных белков ядрышкообразующих районов) в норме и при немелкоклеточном раке лёгкого и их взаимосвязь с некоторыми клинико-морфологическими параметрами. *Российский онкологический журнал*. 2017; 22 (3): 153–157. DOI <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2017-22-3-153-157>
Для корреспонденции: Панасьян Артак Урардович, научный сотрудник отделения по разработке новых методов лечения в торакальной онкологии; 656049, г. Барнаул, ул. Никитина, д. 77. E-mail: urartu26@yandex.ru.

Panasyan A.U.^{1,2}, Kobayakov D.S.³, Avdalyan A.M.¹, Ivanov A.A.¹, Lushnikova E.L.⁴, Bakarev M.A.⁴, Lazarev A.F.¹

EXPRESSION OF MARKERS OF APOPTOSIS (P53, BCL-2, BAX) AND PROLIFERATION (KI-67, TOPOISOMERASE II α , ARGYROPHILIC PROTEINS OF NUCLEOLAR ORGANIZER REGIONS) IN HEALTHY PERSONS AND NON-SMALL CELL LUNG CANCER PATIENTS AND THEIR RELATIONSHIP WITH SOME CLINICAL AND MORPHOLOGICAL PARAMETERS

¹ Altaysky branch of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Barnaul, 656049, Russian Federation;

² Altai Oncology Center, Barnaul, 656043, Russian Federation;

³ Kogalym City Hospital, Kogalym, 62848, Russian Federation;

⁴ Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology, Novosibirsk, 630117, Russian Federation

Study of markers of apoptosis and proliferation in relation to clinical and morphological parameters in non-small cell cancer (NSCLC) patients and healthy persons. There were investigated 237 surgery samples of NSCLC and 10 cases of normal lung tissues. p53, bcl-2, bax, Ki-67, topoisomerase II α (TopoII α) levels were determined by immunohistochemical method. Argyrophilic proteins associated with nucleolar organizer regions (AgNOR) were detected with silver nitrate. In NSCLC expression of p53, bcl-2, Ki-67, TopoII α , AgNOR increased and expression of bax was lower if compared with the normal tissue. Expression of apoptotic markers (p53, bcl-2, bax) correlated with clinical and morphological parameters of NSCLC: histogenesis, N index and the stage (for bcl-2), gender (for bax). Expression of Ki-67 and TopoII α correlated with gender, largest size of the tumor, histogenesis and differentiation. AgNOR proteins were interrelated with the gender, T and N indices, largest tumor dimension, stage, histogenesis and differentiation. In NSCLC cases the expression of apoptotic markers correlated with proliferation: in p53 positive tumors –

high level of proliferation (Ki-67, TopoIIa, AgNOR), in bcl-2 positive tumors – low AgNOR, in bax positive tumors – low proliferative activity (Ki-67, TopoIIa). In NSCLC there is observed the change in expression of apoptotic markers (p53, bcl-2, bax) and proliferation (Ki-67, TopoIIa, AgNOR) in conjunction with normal tissue and clinical and morphological parameters of tumor.

Key words: *proliferation; apoptosis; non-small cell lung cancer.*

For citation: Panasyan A.U., Kobayakov D.S., Avdalyan A.M., Ivanov A.A., Lushnikova E.L., Bakarev M.A., Lazarev A.F. Expression of markers of apoptosis (p53, Bcl-2, bax) and proliferation (Ki-67, topoisomerase IIa, argyrophilic proteins of nucleolar organizer regions) in healthy persons and non-small cell lung cancer patients and their relationship with some clinical and morphological parameters. *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal. (Russian Journal of Oncology)*. 2017; 22 (3): 153–157. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2017-22-3-153-157>

For correspondence: Artak U. Panasyan, Researcher of the Department for the Development of New Methods of Treatment in Thoracic Oncology, Barnaul, 656049, Russian Federation. E-mail: urartu26@yandex.ru.

Information about authors:

Panasyan A.U., <http://orcid.org/0000-0002-8786-8392>

Kobayakov D.S., <http://orcid.org/0000-0001-5321-7113>

Avdalyan A.M., <http://orcid.org/0000-0002-2229-1713>

Ivanov A.A., <http://orcid.org/0000-0001-5040-8854>

Lushnikova E.L., <http://orcid.org/0000-0003-3283-7932>

Bakarev M.A., <http://orcid.org/0000-0002-9614-592X>

Lazarev A.F., <http://orcid.org/0000-0003-1080-5294>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 26 November 2016

Accepted 22 December 2016

Актуальность. Не менее 80% рака лёгкого приходится на немелкоклеточный рак лёгкого (НМКРЛ), результаты лечения которого и соответственно выживаемость больных с этой патологией далеки от желаемых. В связи с этим актуальным является исследование взаимосвязи клинико-морфологических параметров по системе TNM и молекулярно-биологических маркёров, связанных с клеточным циклом, в норме и при НМКРЛ.

Развитие апоптоза – запрограммированной гибели клетки – возможно двумя путями: рецепторным и митохондриальным. Белок p53 является транскрипционным фактором, регулирующим функцию большинства генов и выполняющим супрессорную функцию (остановка клеточного цикла, репарация ДНК и апоптоз). Bcl-2 – антиапоптотический белок, а bax – проапоптотический белок митохондриального пути активации апоптоза. Активация bax происходит через белок p53, а инактивация – через димеризацию с белком bcl-2.

В настоящее время 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). Для оценки пролиферативной активности общепризнанным и доступным является иммуногистохимическое (ИГХ) определение уровня антигена Ki-67. Антиген Ki-67 выявляется в клетках в позднюю G₁-, S-, G₂-, M-фазы, однако функциональное значение этого ядерного белка в процессе пролиферации до конца не известно. Фермент топоизомеразы IIa (ТороIIa) – белок с ферментативной активностью, участвующий в топологической сборке и распутывании нитей ДНК во время транскрипции, конденсации и сегрегации хромосом. Выявляется в клетках в S-, G₂-, M-фазы клеточного цикла, в связи с чем является также маркёром пролиферативной активности. Аргирофильные белки, ассоциированные с ядрышкообразующими районами (Ag-ЯОР-белки), являются маркёром скорости клеточного цикла. До 75% окрашивания Ag-ЯОР-белков происходит за счёт двух главных аргирофильных белков: C23 (нуклеолин) и B23 (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. Показана обратная зависимость между количественным

содержанием Ag-ЯОР-белков и длительностью клеточного цикла, временем удвоения опухоли.

Анализ существующей литературы показал противоречивый характер связи маркёров апоптоза (p53, bcl-2 и bax) и пролиферации (Ki-67, ТороIIa и Ag-ЯОР-белков) с клинико-морфологическими параметрами при НМКРЛ: возрастными различиями, стадией процесса, гистогенетическим типом рака, а уровень экспрессии белков в неизменённом бронхоальвеолярном эпителии в мировой литературе освещён крайне скудно, что затрудняет исследование динамических изменений от нормы до развёрнутых стадий рака [1–9]. Кроме того, отсутствуют работы, уточняющие взаимную связь маркёров апоптоза (p53, bcl-2, bax) и пролиферации (Ki-67, ТороIIa, Ag-ЯОР-белков) при НМКРЛ.

Исходя из вышеизложенного, целью работы стало исследование маркёров апоптоза (p53, bcl-2, bax) и пролиферации (Ki-67, ТороIIa, Ag-ЯОР-белков) во взаимосвязи с клинико-морфологическими параметрами НМКРЛ и в норме.

Материал и методы

Исследованы 237 операционных материалов НМКРЛ, 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 35 до 75 лет), мужчин – 203 (86%), женщин – 34 (14%). Патогистологическая характеристика опухолей определена согласно классификации TNM 7-го пересмотра [10] и представлена в табл. 1. В качестве контроля исследованы кусочки патологически неизменённой ткани лёгкого в 10 случаях, полученные из отдалённых от опухоли участков.

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 ИГХ-методом определяли цитокератины 7 (клон SP52), 20 (клон SP33), High Molecular Weight (клон 34βE12), цитокератины 5/6 (клон D5 16B4) в автостейнере Ventana XT (контроль окрашивания – эпидермис кожи и слизистая оболочка желудка). Также окрашивали на Ki-67 (клон MIB-1), ТороIIa (клон JS5B4), p53 (клон DO-7, Dako), bcl-2 (клон 124, Dako) и bax

(клон SP47, SpringBio). В каждом случае исследовали 1000 клеток в 5–7 полях зрения при увеличении в 400 раз. Определяли индекс метки (ИМ) – долю положительно окрашенных клеток от общего количества подсчитанных клеток в процентах (для Ki-67, ТороПа, p53 – ядерное окрашивание, для bcl-2, бах – цитоплазматическое). Для маркёров апоптоза p53, bcl-2 и бах индекс метки более 10% считался положительной экспрессией антигена в опухоли [5].

Для изучения Ag-ЯОР-белков срезы окрашивали азотнокислым серебром по одностадийной методике [11]. Перед окрашиванием срезы автоклавировали при 120 °С в течение 20 мин в 0,01 М цитратном буфере (рН 6,0) [11]. Определяли площадь Ag-ЯОР-белков (в мкм²) в ядрах 100–120 клеток с 10–15 цифровых изображений, полученных при увеличении микроскопа в 1000 раз (объектив 100/1,25 Oil). Компьютерный анализ изображений проводили в программе ImageJ 1.42. В качестве внутреннего контроля окрашивания использовали площадь Ag-ЯОР-белков в ядрах малых лимфоцитов [12]. 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 с помощью программы Statistica 6.0. Так как распределение ИП Ag-ЯОР-белков было параметрическим, то данные представляли в виде среднего и стандартного отклонения. Поскольку распределение ИМ Ki-67 и ТороПа было непараметрическим, то данные представляли в виде медианы и интерквартильного интервала. Применяли непараметрические методы: однофакторный тест Краскела–Уоллиса, *U*-тест Манна–Уитни, двухсторонний критерий Фишера, коэффициент корреляции рангов Спирмена (*r*). Различия оценивали как достоверные при *p* < 0,05.

Результаты

Результат ИГХ-окраски определялся в виде ядерного (Ki-67, ТороПа и p53) или цитоплазматического (bcl-2 и бах) окрашивания. Результат окраски азотнокислым серебром определялся в виде округлых гранул черного цвета (Ag-ЯОР-белки), расположенных на фоне коричневого ядрышка или бледно-желтого ядра (см. рисунок на 4-й полосе вклейки). В ядрах малых лимфоцитов чаще определялась одна гранула серебра, реже две. Средняя площадь Ag-ЯОР-белков в ядре малого лимфоцита равнялась $1,48 \pm 0,12$ мкм².

В ядрах клеток патологически не измененного эпителия альвеол отсутствовала экспрессия p53, bcl-2 и бах. В эпителии бронхов отсутствовали p53-положительные клетки, bcl-2-положительные клетки определялись только в базальном слое (ИМ bcl-2 – менее 10%), бах-положительные клетки определялись во всех слоях (ИМ бах – более 90%). В клетках НМКРЛ положительная экспрессия p53 составила 104 (44%) случая, bcl-2 – 43 (18%) случая и бах – 130 (55%) случаев (рисунок). В клетках НМКРЛ наблюдалось снижение экспрессии бах (по сравнению с эпителием бронхов) и повышение экспрессии p53 и bcl-2 по сравнению с патологически не измененным эпителием альвеол и бронхов (*p* < 0,001).

В ядрах клеток патологически не измененного эпителия альвеол ИМ Ki-67 и ТороПа составил менее 1% (единичные положительные клетки), ИП Ag-ЯОР-белков – $1,31 \pm 0,2$. В эпителии бронхов ИМ Ki-67 составил 4 (1–8)%, ИМ ТороПа – менее 1% (единичные положительные клетки), ИП Ag-ЯОР-белков – $1,85 \pm 0,24$. В клетках НМКРЛ ИМ Ki-67 составил 25 (18–42)%, ИМ ТороПа – 19 (12–27)% и ИП Ag-ЯОР-белков – $6,52 \pm 1,66$ (см. рисунок). В клетках НМКРЛ наблюдалось повышение ИМ Ki-67, ИМ ТороПа и ИП Ag-ЯОР-белков по сравнению с таковыми патологически не измененного эпителия альвеол и бронхов (*p* < 0,001).

При анализе взаимосвязи маркёров найдена корреляция экспрессии p53, bcl-2 и бах с клинико-морфологическими параметрами НМКРЛ: экспрессия bcl-2 и p53 выше при плоскоклеточном раке, экспрессия бах выше при аденокарциноме и раке у женщин, экспрессия bcl-2 выше при отсутствии метастазов (N0) и при I стадии (см. табл. 1). В НМКРЛ гистогенез имел слабую корреляцию с p53, bcl-2 и бах, показатель N и стадия процесса – с bcl-2 (*p* < 0,05). Отсутствовала корреляция между маркёрами апоптоза p53, bcl-2 и бах.

В НМКРЛ найдены статистически значимые отличия ИМ Ki-67 и ТороПа в следующих группах: пол, размер опухоли, гистогенез, дифференцировка. ИП Ag-ЯОР-белков имел отличия при всех клинико-морфологических параметрах рака: пол, показатели T, N, наибольший размер опухоли, стадия заболевания, гистогенез и дифференцировка опухоли (см. табл. 1). ИМ Ki-67 и ТороПа коррелировал с полом, наибольшим размером опухоли, гистогенезом и дифференцировкой (*p* < 0,01). ИП Ag-ЯОР-белков коррелировал с полом, показателем T, наибольшим размером опухоли, показателем N, стадией заболевания, гистогенезом и дифференцировкой (*p* < 0,001). В НМКРЛ найдена корреляция между маркёрами пролиферации – ИП Ag-ЯОР-белков, ИМ Ki-67 и ИМ ТороПа (*p* < 0,001).

Найдено увеличение пролиферации в НМКРЛ с положительной экспрессией p53. При положительной экспрессии bcl-2 уменьшается активность ядрышковых организаторов, а при положительной экспрессии бах – пролиферативная активность (см. ИМ Ki-67 и ТороПа) (табл. 2). В НМКРЛ найдена статистически значимая корреляция между маркёрами апоптоза (p53, bcl-2, бах) и пролиферации (Ki-67, ТороПа, Ag-ЯОР-белков): между ИП Ag-ЯОР-белков и p53, bcl-2; между ИМ Ki-67 и p53, бах; между ИМ ТороПа и p53, бах.

Обсуждение

При НМКРЛ по сравнению с патологически не измененным эпителием изменяется экспрессия маркёров апоптоза (p53, bcl-2 и бах), что, вероятно, приводит к нарушениям в процессе клеточной гибели и иммортализации раковых клеток. Также при НМКРЛ по сравнению с патологически не измененным эпителием увеличивается количество пролиферирующих клеток (по уровню ИМ Ki-67 и ТороПа) и изменяется активность ядрышкового аппарата клетки (ИП Ag-ЯОР-белков), что в сочетании с множеством других механизмов приводит к увеличению пула опухолевых клеток. Эти данные имеют дифференциально-диагностическое значение при исследовании патогистологического материала из легкого. Аналогичные результаты получены в других исследованиях [4, 8, 13–15].

Экспрессия бах и маркёров пролиферации значимо взаимосвязана с полом больных НМКРЛ. Данные, говорящие о том, что рак лёгкого является гормонозависимым, нет, но механизмы его развития во многом связаны с гендерными особенностями образа жизни, что и приводит к гетерогенности опухолевых пулов. Данный факт необходимо учитывать при анализе данных маркёров при НМКРЛ.

Экспрессия маркёров апоптоза (p53, bcl-2 и бах) взаимосвязана с гистогенезом НМКРЛ, что, вероятно, отражает взаимосвязь особенностей генетических нарушений и гистогенеза опухоли. Эти результаты подтверждаются данными мировой литературы [5, 7]. В нашем исследовании найдена высокая экспрессия белка bcl-2 в опухолях без метастазов и при I стадии НМКРЛ. Аналогичные данные получены в других исследованиях [3, 6]. Нами не найдена корреляция между маркерами апоптоза p53, bcl-2 и бах, что согласуется с данными других

Маркёры апоптоза (p53, bcl-2, bax) и пролиферации (Ki-67, ТопоIIa, Ag-ЯОР-белки) в норме и при НМКРЛ

Характеристика	Количество случаев*	p53*	bcl-2*	bax*	Ki-67	ТопоIIa	Ag-ЯОР-белки
Эпителий альвеолы	10	–	–	–	<1	<1	1,31 ± 0,20
Эпителий бронха	10	–	–	10 (100)	4 (1–8)	<1	1,85 ± 0,24
Мужской пол	203 (87)	93 (46)	38 (19)	104 (51) [§]	30 (19–45) [§]	20 (13–28) [§]	6,71 ± 1,63 [§]
Женский пол	34 (14)	11 (32)	5 (15)	26 (76)	14 (5–22)	11 (3–17)	5,69 ± 1,65
Первичная опухоль							
Т1	63 (27)	25 (40)	14 (22)	32 (51)	22 (15–38)	18 (9–26)	5,89 ± 1,49 [§]
Т2 и Т3	174 (73)	79 (45)	29 (17)	98 (56)	28 (19–43)	20 (12–28)	6,81 ± 1,68
Наибольший размер							
<3 см	98 (41)	36 (37)	21 (21)	50 (51)	22 (13–38) [■]	17 (9–22) [§]	5,84 ± 1,54 [§]
≥3 см	139 (59)	68 (49)	22 (16)	80 (56)	30 (21–45)	22 (13–29)	7,05 ± 1,58
Лимфатические узлы							
N0	150 (63)	62 (41)	34 (23) [#]	85 (57)	27 (26–40)	18 (12–27)	6,27 ± 1,59 [§]
N1–3	87 (37)	42 (48)	9 (10)	45 (52)	29 (20–45)	20 (13–27)	7,06 ± 1,70
Стадии заболевания							
I стадия	120 (51)	51 (43)	30 (25) [■]	68 (57)	26 (16–39)	18 (12–25)	6,23 ± 1,62 [§]
II и III стадии	117 (49)	53 (45)	13 (11)	62 (53)	29 (19–46)	21 (12–28)	6,99 ± 1,64
Гистогенез							
аденокарцинома	109 (46)	39 (36) [#]	13(12) [#]	69 (63) [#]	20 (11–38) [§]	14 (6–21) [§]	6,05 ± 1,78 [§]
плоскоклеточный рак	128 (54)	65 (51)	30 (23)	61 (48)	30 (23–45)	22 (16–29)	6,96 ± 1,46
Дифференцировка							
высокодифференцированная	58 (25)	23 (40)	15 (26)	33 (57)	19 (13–32) [§]	16 (9–23) [■]	5,90 ± 1,54 [§]
умеренно и низкодифференцированная	179 (75)	81 (45)	28 (16)	97 (54)	30 (20–45)	20 (12–28)	6,76 ± 1,66

Примечание. * – абсолютное число (в скобках – проценты); # – $p < 0,05$; ■ – $p < 0,01$; § – $p < 0,001$. Указан достоверный уровень отличий экспрессии маркёров апоптоза и пролиферации при сравнении разных групп внутри клинико-морфологических параметров НМКРЛ (мужской и женский пол, показатели Т1 и Т2-3, наибольший размер опухоли <3 см и ≥3 см, показатель N0 и N1-3, стадия заболевания I и II–III, аденокарцинома и плоскоклеточный рак, высокодифференцированная и умеренно, низкодифференцированная опухоль).

Таблица 2

Взаимосвязь экспрессии маркёров апоптоза (p53, bcl-2, bax) и пролиферации (Ki-67, ТопоIIa, Ag-ЯОР-белки) при НМКРЛ

Экспрессия маркёров апоптоза	Маркёры пролиферации		
	Ki-67	ТопоIIa	Ag-ЯОР-белки
p53 отрицательная	24 (15–38) [■]	17 (11–24) [■]	6,23 ± 1,70 [■]
p53 положительная	31 (21–48)	22 (14–29)	6,98 ± 1,54
bcl-2 отрицательная	28 (18–42)	18 (12–26)	6,69 ± 1,64 [#]
bcl-2 положительная	29 (18–42)	20 (14–28)	5,94 ± 1,66
bax отрицательная	32 (20–53) [■]	20 (13–29) [*]	6,63 ± 1,67
bax положительная	25 (16–37)	18 (11–25)	6,49 ± 1,67

Примечание. * – $p < 0,05$; # – $p < 0,01$; ■ – $p < 0,001$. Указан достоверный уровень отличий экспрессии маркёров пролиферации при сравнении групп с положительной и отрицательной экспрессией соответствующего маркёра апоптоза.

исследований [3] и указывает на их независимую экспрессию в НМКРЛ.

Пролиферативная активность (Ki-67, ТопоIIa) увеличивается при увеличении размера и солидизации опухоли (умеренная/низкая по сравнению с высокой дифференцировкой), а также в плоскоклеточном раке по сравнению с аденокарциномой. Активность ядрышкового аппарата клетки взаимосвязана со всеми клинико-морфологическими параметрами НМКРЛ. Наши результаты подтверждаются данными других исследований [1, 2, 9]. Эти данные могут быть использованы в качестве дополнительного дифференциально-диагностического критерия при разграничении клинико-морфологических параметров по системе TNM в НМКРЛ. Найденная нами корреляция между маркёрами пролиферации подтверждает значимость их совместного исследования при изучении пролиферативного потенциала НМКРЛ.

Для p53-положительного НМКРЛ характерна высокая пролиферативная активность (Ki-67, ТопоIIa) и активность ядрышковых организаторов. Y. Ohmura и соавт. также нашли взаимосвязь экспрессии p53 и Ki-67 [6]. Поскольку не менее чем в 70% p53-положительного НМКРЛ определяются точечные мутации гена p53, то возникновение мутации в гене p53 приводит как к снижению апоптоза, так и к увеличению пролиферации, что проявляется в более неблагоприятном прогнозе при та-

ких опухолях. При bcl-2-положительном НМКРЛ найдена низкая активность ядрышковых организаторов, а при bax-положительном – низкая пролиферативная активность (Ki-67, ТороIIa). Полученные данные согласуются с благоприятным прогнозом при bcl-2-положительном НМКРЛ. Данный факт, а также высокая экспрессия bcl-2 при N0 и I стадиях рака труднообъяснимы, поскольку bcl-2 – это антиапоптотический белок. Поэтому наши данные в какой-то степени объясняют данный феномен.

Таким образом, при НМКРЛ наблюдается изменение экспрессии маркеров апоптоза (p53, bcl-2, bax) и пролиферации (Ki-67, ТороIIa, Ag-ЯОР-белков) во взаимосвязи с нормой и с клинико-морфологическими параметрами опухоли.

Выводы

1. При НМКРЛ изменяется экспрессия маркеров апоптоза и пролиферации по сравнению с нормой: повышается экспрессия p53, bcl-2 и снижается экспрессия bax; повышается уровень пролиферации по экспрессии Ki-67, ТороIIa и Ag-ЯОР-белков.
2. Экспрессия маркеров апоптоза (p53, bcl-2 и bax) взаимосвязана с клинико-морфологическими параметрами НМКРЛ: гистогенезом, показателем N и стадией (для bcl-2), полом (для bax). Экспрессия Ki-67 и ТороIIa взаимосвязана с полом, наибольшим размером опухоли, гистогенезом и дифференцировкой. Ag-ЯОР-белки взаимосвязаны с полом, показателями T и N, наибольшим размером опухоли, стадией, гистогенезом и дифференцировкой.
3. При НМКРЛ экспрессия маркеров апоптоза взаимосвязана с пролиферацией: в p53-положительных опухолях – высокая пролиферация (Ki-67, ТороIIa и Ag-ЯОР-белков), в bcl-2-положительных опухолях – низкая активность ядрышковых организаторов, в bax-положительных опухолях – низкая пролиферативная активность (Ki-67, ТороIIa).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коган Е.А., Швец С.И., Коваленко В.Л., Соболева Ю.В. Соотношение процессов пролиферации, апоптоза, ангиогенеза и метастазирования в различных гистогенетических типах рака легкого (иммуногистохимическое исследование). *Арх. патол.* 2004; 66(6): 33–8.
2. 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. *J. Clin. Oncol.* 2000; 30(11): 478–86.
3. Groeger A.M., Esposito V., De Luca A., Cassandro R., Tonini G., Ambrogio V. et al. Prognostic value of immunohistochemical expression of p53, bax, Bcl-2 and Bcl-xL in resected non-small-cell lung cancers. *Histopathology.* 2004; 44(1): 54–63.
4. Jeanmart M., Lantuejoul S., Fievet F., Moro D., Sturm N., Brambilla C. et al. Value of immunohistochemical markers in preinvasive bronchial lesions in risk assessment of lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9(6): 2195–203.
5. Lai R.S., Wang J.S., Hsu H.K., Chang H.C., Lin C.H., Lin M.H. Prognostic evaluation of the expression of p53 and bcl-2 oncoproteins in patients with surgically resected non-small cell lung cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2002; 32(10): 393–7.
6. Ohmura Y., Aoe M., Andou A., Shimizu N. Telomerase activity and Bcl-2 expression in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6(8): 2980–7.
7. Poleri C., Morero J.L., Nieva B., Vazquez M.F., Rodriguez C., de Titto E. et al. Risk of recurrence in patients with surgically resected stage I non-small cell lung carcinoma: histopathologic and immunohistochemical analysis. *Chest.* 2003; 123(6): 1858–67.
8. Porebska I., Wyrodek E., Kosacka M., Adamiak J., Jankowska R., Harlozinska-Szymrka A. Apoptotic markers p53, Bcl-2 and Bax in primary

- lung cancer. *In Vivo.* 2006; 20(5): 599–604.
9. Rodrigues O.R., Antonangelo L., Yagi N., Minamoto H., Schmidt Junior 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.
10. Sobin L., Gospodarowicz M., Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours.* 7th Ed. Oxford, Wiley-Blackwell. 2009: 138–46.
11. Trere D. AgNOR staining and quantification. *Micron.* 2000; 31(2): 127–31.
12. 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.
13. Лазарев А.Ф., Бобров И.П., Климачев В.В., Лубенников В.А. Характеристика ядрышкового аппарата опухолевых клеток при раке желудка. *Арх. патол.* 2002; 64(6): 30–2.
14. Лазарев А.Ф., Кобыяков Д.С., Климачев В.В., Авдальян А.М., Бобров И.П. Аргирофильные белки районов ядрышковых организаторов в аденомах с различной степенью дисплазии и аденокарциноме толстой кишки. *Арх. патол.* 2010; 72(4): 16–20.
15. D'Amico T.A., Aloia T.A., Moore M.B.H., Herndon J.E., Brooks K.R., Lau C.L. et al. Molecular biologic substaging of stage I lung cancer according to gender and histology. *Ann. Thorac. Surg.* 2000; 69(6): 882–6.

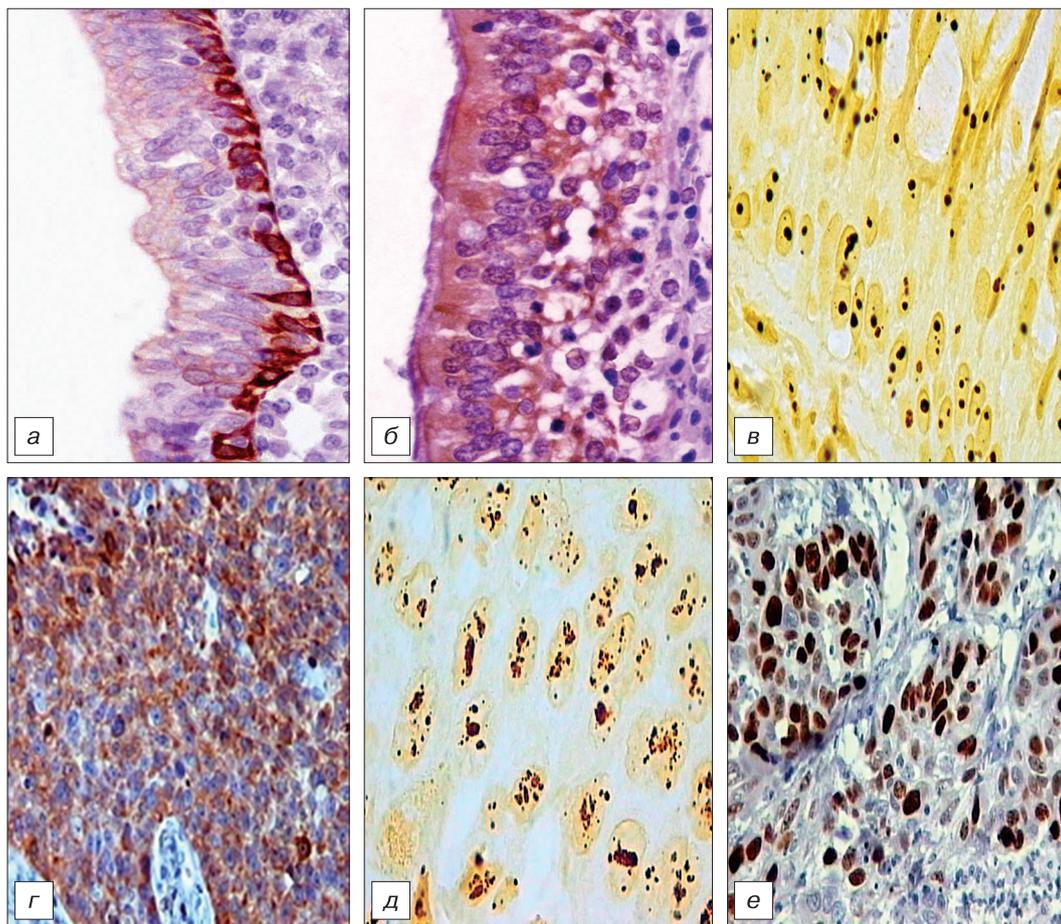
REFERENCES

1. Kogan E.A., Shvets S.I., Kovalenko L.V., Soboleva Yu. V. Ratio of the processes of proliferation, apoptosis, angiogenesis and metastasis in various histogenetic types of lung cancer (immunohistochemical study). *Ark. pat.* 2004; 66(6): 33–8. (in Russian)
2. 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. *J. Clin. Oncol.* 2000; 30(11): 478–86.
3. Groeger A.M., Esposito V., De Luca A., Cassandro R., Tonini G., Ambrogio V. et al. Prognostic value of immunohistochemical expression of p53, bax, Bcl-2 and Bcl-xL in resected non-small-cell lung cancers. *Histopathology.* 2004; 44(1): 54–63.
4. Jeanmart M., Lantuejoul S., Fievet F., Moro D., Sturm N., Brambilla C. et al. Value of immunohistochemical markers in preinvasive bronchial lesions in risk assessment of lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9(6): 2195–203.
5. Lai R.S., Wang J.S., Hsu H.K., Chang H.C., Lin C.H., Lin M.H. Prognostic evaluation of the expression of p53 and bcl-2 oncoproteins in patients with surgically resected non-small cell lung cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2002; 32(10): 393–7.
6. Ohmura Y., Aoe M., Andou A., Shimizu N. Telomerase activity and Bcl-2 expression in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6(8): 2980–7.
7. Poleri C., Morero J.L., Nieva B., Vazquez M.F., Rodriguez C., de Titto E. et al. Risk of recurrence in patients with surgically resected stage I non-small cell lung carcinoma: histopathologic and immunohistochemical analysis. *Chest.* 2003; 123(6): 1858–67.
8. Porebska I., Wyrodek E., Kosacka M., Adamiak J., Jankowska R., Harlozinska-Szymrka A. Apoptotic markers p53, Bcl-2 and Bax in primary lung cancer. *In Vivo.* 2006; 20(5): 599–604.
9. Rodrigues O.R., Antonangelo L., Yagi N., Minamoto H., Schmidt Junior 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.
10. Sobin L., Gospodarowicz M., Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours.* 7th Ed. Oxford, Wiley-Blackwell. 2009: 138–46.
11. Trere D. AgNOR staining and quantification. *Micron.* 2000; 31(2): 127–31.
12. 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.
13. Lazarev A.F., Bobrov I.P., Klimachev V.V., Lubennikov V.A. Characterization of the nucleolar apparatus of tumor cells in gastric cancer. *Ark. pat.* 2002; 64(6): 30–2. (in Russian)
14. Lazarev A.F., Kobayakov D.S., Klimachev V.V., Avdalyan A.M., Bobrov I.P. Argyrophilic proteins of nucleolar organizers regions in adenomas with varying degrees of dysplasia and adenocarcinoma of the colon. *Ark. pat.* 2010; 72(4): 16–20. (in Russian)
15. D'Amico T.A., Aloia T.A., Moore M.B.H., Herndon J.E., Brooks K.R., Lau C.L. et al. Molecular biologic substaging of stage I lung cancer according to gender and histology. *Ann. Thorac. Surg.* 2000; 69(6): 882–6.

Поступила 26.11.16

Принята к печати 22.12.16

К ст. А.У. Панасьяна и соавт.



Маркёры апоптоза и пролиферации в норме и при НМКРЛ: экспрессия bcl-2 (а), vax (б) и Ag-ЯОР-белков (в) в патологически не изменённой слизистой оболочке бронха; экспрессия bcl-2 (г), Ag-ЯОР-белков (д) и Ki-67 (е) при умеренно-дифференцированном плоскоклеточном раке (а, б, г, е – иммуногистохимический метод, увеличение в 400 раз; в, д – окраска азотнокислым серебром, увеличение в 1000 раз).

К ст. А.О. Сосновцевой и соавт.

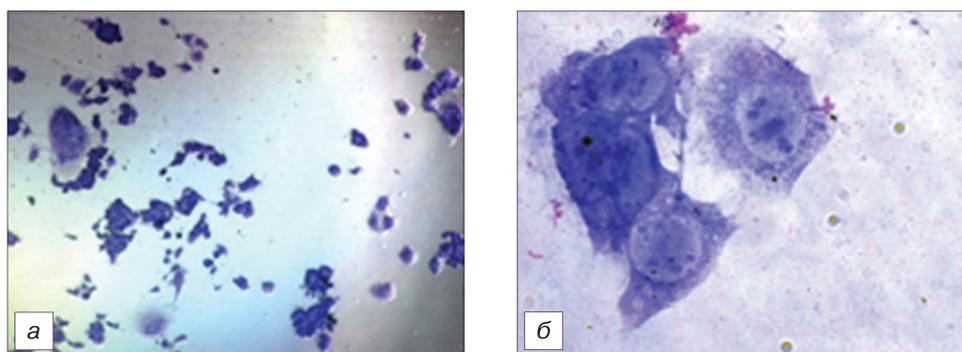


Рис. 1. Цитоморфологическая картина клеток 9-го пассажа нейробластомы человека (JMR-32). Окраска: гематоксилин-эозин. Ув.: справа – 50, слева – 400.