

MORPHOFUNCTIONAL ACTIVITY OF NUCLEOLAR APPARATUS AND PROTEIN NUCLEOPHOSMIN/B23 FOR LOCALIZED AND METASTATIC RENAL CELL CARCINOMA

Bobrov I.P.¹, Cherdantseva T.M.², Myadelets M.N.³, Lepilov A.V.⁴, Klimachev I.V.⁵, Dolgatov A.Yu.⁶, Lazarev A.F.⁷, Avdalyan A.M.⁸ (Russian Federation) Email: Bobrov539@scientifictext.ru

¹Bobrov Igor Petrovich – Doctor of Medical Science, Senior Researcher;

²Cherdantseva Tatyana Mikhajlovna – Professor, Doctor of medical Science;

³Myadelets Mikchail Nicolaevich – Assistant;

⁴Lepilov Alexander Vasilevich - Professor, Doctor of medical Science, Head of Department;

⁵Klimachev Ilya Vladimirovich – Assistant;

⁶Dolgatov Andrey Yurievich – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor,

DEPARTMENT OF PATHOLOGICAL ANATOMY,

ALTAI STATE MEDICAL UNIVERSITY;

⁷Lazarev Alexander Fedorovich - Professor, Doctor of medical Science, Director of branch;

⁸Avdolyan Ashot Miruzhanovich – Doctor of Medical Science, Senior Researcher,

ALTAI BRANCH OF RUSSIAN ONCOLOGIC RESEARCH CENTER NAMED AFTERN.N. BLOKHIN,
BARNAUL

Abstract: in this paper the authors have analyzed the features of nucleolar parameters and protein expression of nucleophosmin/B23 in tumor cells in localized and metastatic renal cell carcinoma. Was studied 103 kidney resected with cancer, metastases were found in 16 cases. With silvering method Dascal Y. et al (1980) conducted an analysis of parameters of nucleoli. Medium number nucleoli in one core; the medium number of fibrillar centers (FC) in 1 core; the average number of annular, transitional and nucleolonemic morphofunctional types of nucleoli in 1 core and the average number of FC in 1 nucleolus. Protein expression of nucleophosmin was detected by immunohistochemistry method. It is shown that all parameters nucleolar apparatus and protein expression of nucleophosmin/B23 were significantly higher in metastatic cancer cells compared with localized. Study nucleolar activity and protein expression of nucleophosmin in tumor cells in primary carcinoma may be used when assessing the risk of metastasis in regional lymph nodes on preoperative planning of surgical treatment and prognosis of renal cell carcinoma.

Keywords: nucleolus, nucleophosmin, renal cell carcinoma.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НУКЛЕОЛЯРНОГО АППАРАТА И БЕЛКА НУКЛЕОФОЗМИНА/В23 ПРИ ЛОКАЛИЗОВАННОМ И МЕТАСТАТИЧЕСКОМ РАКЕ ПОЧКИ

Бобров И.П.¹, Черданцева Т.М.², Мяделец М.Н.³, Лепилов А.В.⁴, Климачев И.В.⁵, Долгатов А.Ю.⁶, Лазарев А.Ф.⁷, Авдалян А.М.⁸ (Российская Федерация)

¹Бобров Игорь Петрович – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник;

²Черданцева Татьяна Михайловна – профессор, доктор медицинских наук;

³Мяделец Михаил Николаевич – ассистент кафедры;

⁴Лепилов Александр Васильевич – профессор, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой;

⁵Климачев Илья Владимирович – ассистент кафедры;

⁶Долгатов Андрей Юрьевич – доцент, кандидат медицинских наук,

кафедра патологической анатомии,

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования

Алтайский государственный медицинский университет;

⁷Лазарев Александр Федорович – доктор медицинских наук, профессор, директор филиала;

⁸Авдалян Ашот Миружанович – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник,

Алтайский филиал Российского онкологического центра им. Н.Н. Блохина,

г. Барнаул

Аннотация: в работе авторы провели анализ особенностей параметров нуклеолярного аппарата и экспрессии белка нуклеофомина/В23 в опухолевых клетках при локализованном и метастатическом почечно-клеточном раке. Исследовано 103 почки, резецированных по поводу рака, метастазы были выявлены в 16 случаях. С помощью серебрения по методу Dascal Y. et al (1980) проводили исследование параметров ядрышек: среднее количество ядрышек на 1 ядро; среднее количество фибриллярных центров (ФЦ) на 1 ядро; среднее количество кольцевидных, переходных, нуклеолонемных ядрышек на 1 ядро и среднее количество ФЦ на 1 ядрышко. Экспрессию белка нуклеофомина выявляли иммуногистохимическим методом. Показано, что все параметры нуклеолярного аппарата и экспрессия

белка нуклеофозмина/B23 были достоверно выше в клетках метастатического рака по сравнению с локализованным. Изучение нуклеолярной активности и экспрессия белка нуклеофозмина в опухолевых клетках в первичной карциноме могут быть использованы при оценке риска развития метастазов в регионарные лимфатические узлы на дооперационном этапе, планировании объема хирургического лечения и прогнозировании течения рака почки.

Ключевые слова: ядрышко, нуклеофозмин, рак почки.

Ядрышко – это самая динамичная структура клетки и каждый его морфологический вариант отражает уровни трех основных процессов, связанных с биогенезом рибосом: синтез прерибосомальной РНК, процессинг и миграцию рибонуклеопротеидных частиц в нуклеоплазму [1]. Для дифференцированных интерфазных клеток наиболее характерны ядрышки кольцевидного типа, а для активно пролиферирующих и синтезирующих нуклеолонемные нуклеолы. Промежуточное положение между кольцевидными и нуклеолонемными типами занимают нуклеолы переходного типа [2]. Способность к ассоциации ядрышковых организаторов, наряду с амплификацией рибосомных генов, приводит к образованию функционально активных типов ядрышек из менее активных, путем их слияния [3]. Одним из основных признаков уровня морфофункциональной активности ядрышка является количество фибриллярных центров (ФЦ). Так, для кольцевидного ядрышка характерен один крупный ФЦ, для нуклеолонемного 5 и более ФЦ, а для переходного типа промежуточное число ФЦ (от 2 до 4).

Белок нуклеофозмин (B23) является мультифункциональным протеином и по современным данным это основной аргентофильный белок ядрышка. Морфофункциональная активность белка B23 тесно взаимосвязана с регуляцией клеточного цикла. Данный протеин слабо экспрессируется покоящимися клетками (в фазе G₀), но его количество начинает увеличиваться сразу же после стимуляции клеток к делению и прогрессивно возрастает вплоть до G₂-периода [4].

Морфофункциональная активность нуклеолярного аппарата клеток при метастазировании исследована в опухолях некоторых локализаций [5, 6, 7, 8]. Так, данными Toshikazu Matsuo (1993) показано, что при раке желудка количество ядрышковых организаторов возрастало в опухолях, которые имели метастазы в регионарные лимфатические узлы. Гиперэкспрессия нуклеофозмина была взаимосвязана с наличием метастазов при раке толстой кишки и плоскоклеточной карциноме полости рта [9, 10]. В то же время при раке желудка при наличии метастазов в первичной опухоли наблюдали уменьшение экспрессии нуклеофозмина [11].

Исследований активности нуклеолярного аппарата клеток первичной опухоли рака почки при метастазировании в литературе нами не обнаружено.

Целью данного исследования явилось изучение морфофункциональной активности нуклеолярного аппарата и активности белка нуклеофозмина/B23 в опухолевых клетках локализованного и метастатического почечно-клеточного рака почки (ПКР).

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования послужили 103 почки, резецированных по поводу рака в Алтайском филиале РОНЦ им. Н.Н. Блохина Росздрава России. Регионарные и отдаленные метастазы были обнаружены в 16 случаях. Средний возраст больных составил 59,1±0,9 лет. Мужчин было 49 (47,6%), женщин – 54 (52,4%). Выполняли гистохимическое и иммуногистохимическое окрашивание ядрышковых организаторов. Гистохимическое окрашивание ядрышек проводили по методу Daskal Y., et al., 1980 [12], в нашей модификации [13]. Докраску ядра осуществляли 1% раствором метилового зеленого. Высчитывали следующие параметры нуклеолярного аппарата: среднее количество ядрышек на 1 ядро; среднее количество ФЦ на 1 ядро; среднее количество кольцевидных (КЯд), переходных (ПЯд) и нуклеолонемных (НЯд) морфофункциональных типов ядрышек на 1 ядро и среднее количество ФЦ на 1 ядрышко.

Иммуногистохимическое исследование нуклеофозмина/B23 проводили с применением моноклональных антител – nucleophosmin p/B23, клон mouse mAb23 (фирма «Labvision»). Оценивали интегральную оптическую плотность нуклеофозмина в ядрышке с использованием системы компьютерного анализа изображений, состоящей из микроскопа Leica DME, цифровой камеры Leica EC3 (Leica Microsystems AG, Германия), персонального компьютера и программного обеспечения ВидеоТест-Морфология 5.2. Количество протеина B23 выражали в условных единицах (у.е.).

Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 6.0. При сопоставлении средних величин использовали критерий значимости Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Коррелятивные взаимоотношения оценивали с помощью критерия Пирсона.

Результаты и их обсуждение

При окраске нитратом серебра ядрышки опухолевых клеток имели коричневатую окраску, на фоне которой были четко видны ФЦ в виде округлых или продолговатых гранул черного цвета.

Результаты подсчета показали, что в клетках локализованного рака количество ядрышек составило 1,5±0,02, а в опухолях с наличием метастазов число ядрышек достоверно возрастало до 1,9±0,05 на 1

ядро ($p = 0,0000001$) (табл. 1).

При рассмотрении распределения морфофункциональных типов ядрышек показано, что количество КЯд в клетках локализованных опухолей составило $26,5\% \pm 2,5$, а в метастатических оно достоверно уменьшалось до $5,0\% \pm 1,4$ ($p = 0,0001$) (рис. 1). Уменьшение числа КЯд коррелировало с наличием метастазов ($r = -0,40$; $p = 0,0001$).

Число ПЯд в локализованных опухолях составило $48,8\% \pm 2,6$, а в метастатических оно было равно $22,9\% \pm 3,6$ ($p = 0,00002$). Количество ПЯд было взаимосвязано с наличием метастазов ($r = -0,44$; $p = 0,0001$). Число ФЦ в ПЯд локализованных опухолей составило $2,8 \pm 0,02$, в метастазирующих оно достоверно увеличивалось до $3,0 \pm 0,05$ ($p = 0,02$).

Содержание НЯд в локализованных опухолях было равно $24,7\% \pm 3,4$, а в метастатических оно возрастало до $72,1\% \pm 4,05$ ($p = 0,0000001$) (рис. 1). Возрастание содержания НЯд в ядрах клеток опухолей коррелировало с наличием метастазов ($r = 0,57$; $p = 0,0001$). При этом содержание ФЦ в НЯд локализованных опухолей было равно $7,0 \pm 0,1$, а в метастазирующих опухолях оно возрастало до $12,3 \pm 0,3$ ($p = 0,001$).

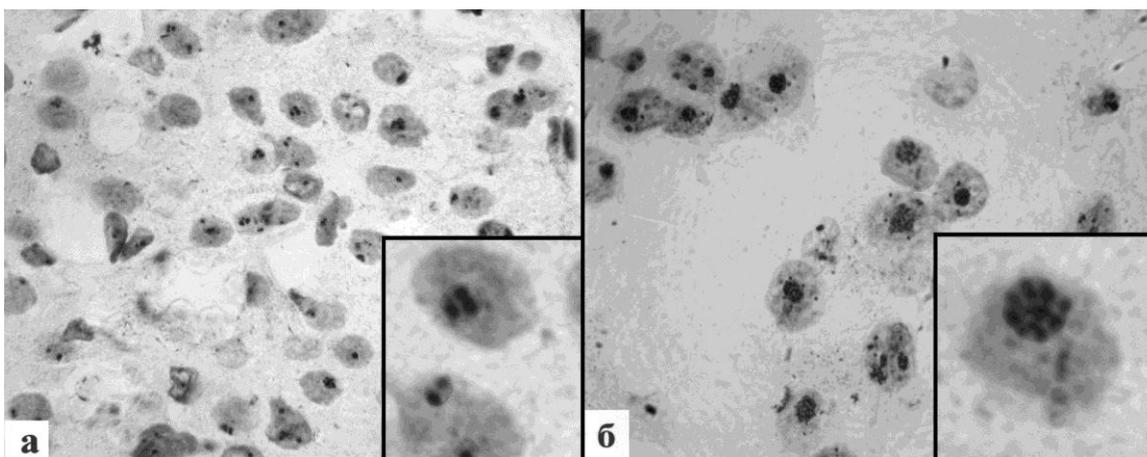


Рис. 1. Нуклеолярный аппарат локализованного и метастатического рака почки: а - ядрышки кольцевидного и переходного типа в ядрах опухолей без метастазов. б - ядрышки нуклеолономного типа в ядрах клеток метастазирующих опухолей. Окраска нитратом серебра по Y.Daskal. Увеличение $\times 1000$

В опухолях без наличия метастазов среднее число ФЦ составило $5,0 \pm 0,1$, а в метастазирующих оно достоверно возрастало до $17,5 \pm 0,4$ ($p = 0,001$) (табл.). Количество гранул серебра на 1 ядро было взаимосвязано с наличием метастазов ($r = 0,68$; $p = 0,0001$).

Таблица 1. Параметры активности нуклеолярного аппарата опухолевых клеток ПКР в зависимости от наличия или отсутствия метастазов

Параметры нуклеолярной активности	Наличие метастазов	
	M(0)	M(+)
Среднее число ядрышек на 1 ядро	$1,5 \pm 0,02^*$	$1,9 \pm 0,05^*$
Среднее количество КЯд на 1 ядро (%)	$26,5\% \pm 2,5^*$	$5,0\% \pm 1,4^*$
Среднее количество ПЯд на 1 ядро (%)	$48,8\% \pm 2,6^*$	$22,9\% \pm 3,6^*$
Среднее количество НЯд на 1 ядро (%)	$24,7\% \pm 3,4^*$	$72,1\% \pm 4,05^*$
Среднее количество ФЦ на 1 ПЯд	$2,8 \pm 0,02^*$	$3,0 \pm 0,05^*$
Среднее количество ФЦ на 1 НЯд	$7,0 \pm 0,1^*$	$12,3 \pm 0,3^*$
Среднее число ФЦ на 1 ядро	$5,0 \pm 0,1^*$	$12,3 \pm 0,3^*$

Примечание: $*p < 0,05$.

Для более детальной оценки морфофункциональной активности клеток по данным серебрения ядрышковых организаторов опухолевые клетки были нами распределены на группы в зависимости от числа ФЦ. Сравнительное сопоставление распределения клеточных элементов локализованных опухолей с метастатическими в зависимости от числа ФЦ выявило принципиально различный характер их группировки. В локализованных опухолях большинство клеток (72%) имело от 1 до 5 ФЦ и 28 % клеток содержали от 6 до 30 ФЦ. Гистограмма, характеризующая распределение клеток отличалась сдвигом влево, одновершинностью и высоким пиком. Иной вид имела гистограмма карцином с наличием метастазов. Большинство клеток (99,3%) принадлежало к классам клеток содержащих от 6 до 51 более ФЦ. Гистограмма, была растянута вправо за счет клеточных элементов с большим содержанием ФЦ на 1 ядро. Другими особенностями гистограммы были многовершинность и отсутствие высоких пиков, что

является отражением широкой вариабельности клеточных элементов метастазирующих опухолей по количеству ФЦ (рис. 2).

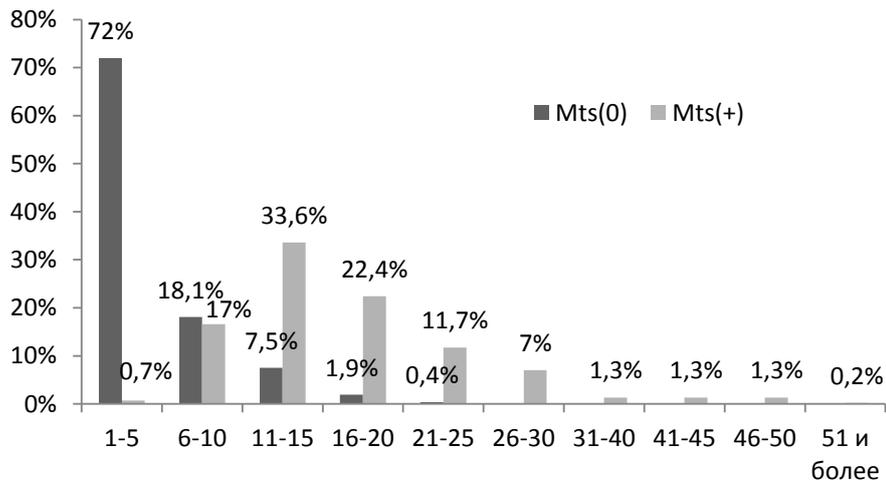


Рис. 2. Гистограмма, характеризующая распределение клеток по числу ФЦ на 1 ядро в метастазирующих Mts (+) опухолях и в опухолях без метастазов Mts (-). По оси абсцисс – количество гранул серебра на 1 ядро; по оси ординат – процентное содержание клеток

При иммуногистохимической окраске ядрышек на белок нуклеофозмин/B23 ядрышки опухолей при локализованном ПКР окрашивались в светло-коричневый или темно-коричневый цвет. Интегральная оптическая плотность белка на 1 ядрышко при этом составила $1339,45 \pm 198,1$ у.е. В клетках метастатического рака почки ядрышки выглядели темно-коричневыми или черными, а оптическая плотность белка достоверно возрастала по сравнению с локализованным раком почки до $2674,45 \pm 45,6$ у.е. на 1 ядрышко (рис. 3, 4). Экспрессия нуклеофозмина/B23 была взаимосвязана: с наличием регионарных и отдаленных метастазов ($r = 0,36$; $p = 0,01$), с числом ФЦ в ядрышках ($r = 0,79$; $p = 0,0001$) и количеством НЯд в клетках опухоли ($r = 0,59$; $p = 0,002$). В наиболее активных НЯд с большим количеством ФЦ оптическая плотность белка доходила до $15779,1$ у.е.

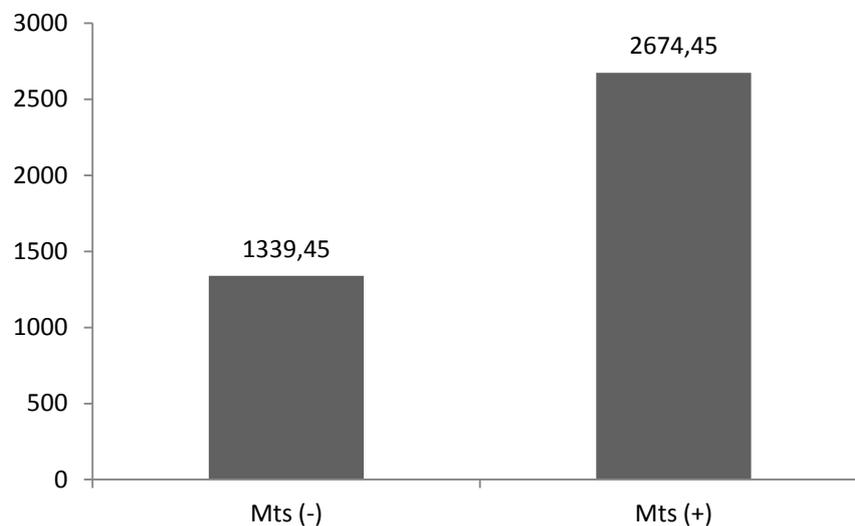


Рис. 3. Гистограмма, характеризующая интегральную оптическую плотность экспрессии белка нуклеофозмина/B23 в метастазирующих Mts (+) опухолях и опухолях без метастазов Mts (-). По оси абсцисс – наличие метастазов; по оси ординат – интегральная оптическая плотность нуклеофозмина/B23

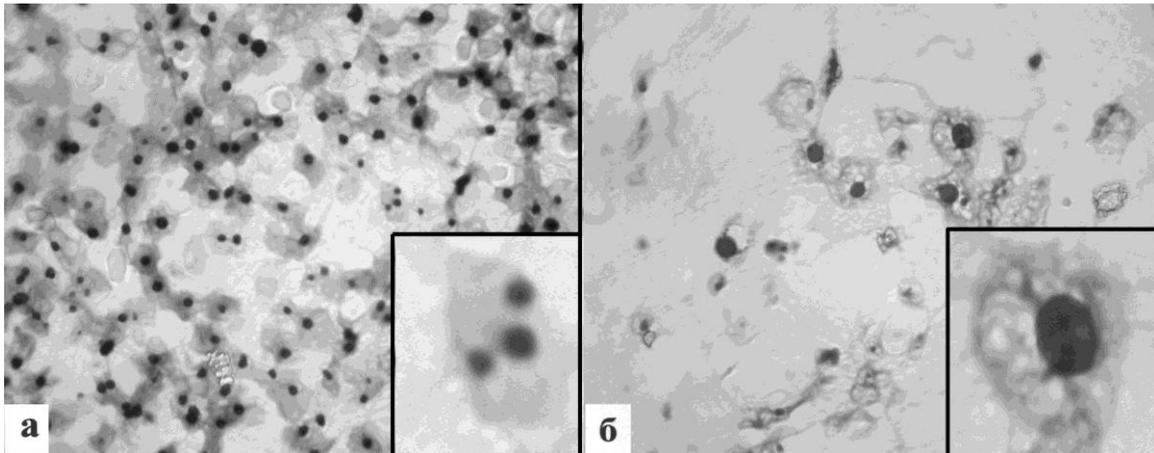


Рис. 4. Экспрессия белка нуклеофозмина/B23 в клетках локализованного и метастатического рака почки: а - низкая экспрессия белка нуклеофозмина/B23 в ядрышках клеток локализованного рака почки; б - гиперэкспрессия белка нуклеофозмина/B23 в ядрышках клеток метастатического рака почки. Иммуногистохимическая реакция. Увеличение $\times 1000$

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что значения изученных нуклеолярных маркеров достоверно возрастали в первичных опухолях с метастазами по сравнению с локализованными новообразованиями. Констатируя данный факт, мы считаем возможным присоединиться к мнению тех авторов [14, 15], которые считают, что метастазирование злокачественных опухолей в целом и ПКР в частности осуществляется за счет определенных клонов опухолевых клеток, имеющих большую потенцию к злокачественному росту. Чем больше опухолевая клетка содержит нуклеолонемных ядрышек, ФЦ на 1 ядро и чем выше содержание в ядрышках белка нуклеофозмина/B23, тем выше злокачественность рака почки. Широкая вариабельность клеточных популяций опухоли по активности нуклеолярного аппарата является результатом патологической эволюции опухолевых клеток при ПКР и составляет звено патогенеза селекции клеток с высоким метастатическим потенциалом. В метастазах такие пулы опухолевых клеток приобретают еще более выраженные злокачественные свойства. Поэтому нахождение субпопуляций опухолевых клеток с высокими показателями ядрышковой активности и гиперэкспрессией белка нуклеофозмина/B23 в первичной опухоли может указывать на риск развития метастазов и неблагоприятный прогноз течения заболевания. Изучение морфофункциональной активности нуклеол и экспрессии ядрышкового белка нуклеофозмина/B23 в опухолевых клетках может быть использовано при оценке риска развития метастазов на дооперационном этапе, планировании объема хирургического лечения и при прогнозировании течения почечно-клеточного рака.

Список литературы / References

1. Челидзе П.В., Зацепина О.В. Морфофункциональная классификация ядрышек // Успехи современной биологии, 1988. № 2. С. 252-268.
2. Арвеладзе Ю.Р. Оценка функционального состояния эндотелиоцитов сосудов микроциркуляторного русла у белых крыс // Морфология, 2001. № 6. С. 27-29.
3. Жданова Н.С. Слияние ядрышек и ассоциации акроцентрических хромосом в клетках человека // Цитология, 1974. № 9. С. 1095-1099.
4. Sirri V., Roussel P., Gendron M.C., Hernandez-Verdun D. The amount of the two major AgNOR proteins, nucleolin and protein B23 is cell – cycle dependent // Cytometry, 1997. Vol. 28. P. 147-156.
5. Лазарев А.Ф., Бобров И.П., Климачев В.В., Авдалян А.М. Морфометрические особенности ядрышкового аппарата клеток рака желудка при метастазировании в регионарные лимфатические узлы // Проблемы клинической медицины, 2005. № 1. С. 18-21.
6. Лазарев А.Ф., Авдалян А.М., Бобров И.П., Климачев В.В., Круглова Н.М. Клинико-морфологические факторы риска развития рецидива и метастазирования лейомиосаркомы тела матки // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена, 2013. № 1. С. 27-33.
7. Tashikazu M. Studies on the utility of sequential staining technique using PCNA and AgNORs for assessing the degree of malignancy of gastric carcinoma // Acta med. Nagasak., 1993. Vol. 38. P. 226-231.
8. Ikeguchi M., Katano K., Oka A., Tsujitani S., Maeta M., Kaibara N. Number of argyrophilic nucleolar organiger regions is a good indicator of lymph node metastasis in patients with esophageal carcinoma // Langenbecks Arch. Chir., 1995. Vol. 380. P. 197-202.
9. Yang Y.F., Zhang X.Y., Yang M., He Z.H., Peng N.F., Xie S.R., Xie Y.F. Prognostic role of nucleophosmin in colorectal carcinomas // Asian. Pac. J. Cancer Prev., 2014. Vol. 15. P. 2021-2026.

10. *Coutinho-Camillo C.M., Lourenço S.V., Nishimoto I.N., Kowalski L.P., Soares F.A.* Nucleophosmin, p53, and Ki-67 expression patterns on an oral squamous cell carcinoma tissue microarray // *Hum. Pathol.*, 2010. Vol. 41. P. 1079-1086.
11. *Leal M.F., Mazzotti T.K., Calcagno D.Q., Cirilo P.D., Martinez M.C., Demachki S., Assumpção P.P., Chammas R., Burbano R.R., Smith M.C.* Deregulated expression of Nucleophosmin 1 in gastric cancer and its clinicopathological implications // *BMC Gastroenterol.*, 2014. Jan 10;14:9. doi: 10.1186/1471-230X-14-9.
12. *Daskal Y., Smetana K., Buch H.* Evidence from studies on segregated nucleoli that nucleolar silver stained proteins C23 and B23 are in fibrillar components // *Exp. Cell Res.*, 1980. Vol.127. P. 285-291.
13. *Бобров И.П., Авдалян А.М., Klimachev B.B., Лазарев А.Ф., Гервальд В.Я., Долгатов А.Ю., Самуйленкова О.В., Ковригин М.В., Кобяков Д.С.* Модификация гистохимического метода выявления ядрышковых организаторов на гистологических срезах // *Архив патологии*, 2010. № 3. С. 35-37.
14. *Киселева Е.Г.* Гетерогенность опухоли и механизмы естественной резистентности при метастазировании // *Экспериментальная онкология*, 1988. №1. С. 3-8.
15. *Лобанов С.В.* Значение опухолевой гетерогенности в метастазировании // *Вопросы онкологии*, 1992. № 4. С. 396-405.