

На правах рукописи

Мяделец Михаил Николаевич

**ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОНКОПРОТЕИНА
НУКЛЕОФОЗМИНА/В23
ПРИ СВЕТЛОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ПОЧКИ**

3.3.2 – патологическая анатомия

Автореферат

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Барнаул).

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Бобров Игорь Петрович

Научный консультант:

доктор медицинских наук, доцент

Черданцева Татьяна Михайловна

Официальные оппоненты:

Жукова Наталья Анатольевна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории фармакологических исследований ФГБУН «Новосибирский институт органической химии имени Н.Н.Ворожцова» СО РАН.

Красильников Сергей Эдуардович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н.Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт онкологии и нейрохирургии, директор

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук (Новосибирск)

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2021 г. в _____ час. на заседании совета Д 001.048.05 в ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» <http://frcftm.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор биологических наук

Клиникова Марина Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Рак почки (РП) является одним из наиболее широко распространенных онкологических заболеваний мочевыделительной системы. В мире выявляется около 250 тыс. случаев РП в год (Давыдов М.И. и др., 2010; Алексеев Б.Я. и др., 2012; Pantuck A.J. et al., 2001).

В соответствии с онкологической статистикой в 2015 г. в Российской Федерации на диспансерный учет взяты 21908 больных с впервые установленным диагнозом – рак почки, а среднегодовой прирост показателя заболеваемости обоих полов с 2005 по 2015 г. составил 2,5 % (Александрова Л.М. и др., 2017). В Алтайском крае показатели заболеваемости РП в целом выше, чем по России: соответственно 11,96 и 8,54% (Давыдов М.И. и др., 2010). С 2008 года по 2013 г. в Алтайском крае смертность от РП возросла с 4,3 до 5,5 на 100 тыс. населения. Наиболее высокий пик смертности от РП в Алтайском крае пришелся на 2011 г., когда заболеваемость составила 7,0 на 100 тыс. населения (Ганов Д.И. и др., 2014). В 2016 г. в Алтайском крае число впервые выявленных злокачественных новообразований почки составило 547, из них 312 (57%) у мужчин и 235 (43%) у женщин. Первая стадия заболевания была выявлена в 50,2% случаев, вторая стадия – в 18% случаев, третья стадия – 11% и четвертая – 20,8% случаев (Ганов Д.И. и др., 2017).

РП имеет огромное социальное значение из-за низкой выживаемости больных после лечения, при этом данное заболевание, как правило, в значительной степени резистентно к терапии (Пасечник Д.Г., 2001; Юрин А.Г., 2007). Среди гистологических вариантов РП светлоклеточный тип составляет 70 – 75% всех случаев, являясь основным объектом исследования патологоанатомов (Плешивцев М.А., 2007).

Одним из важнейших направлений онкоурологии и патологической анатомии является поиск факторов, которые могут позволить составить индивидуальный прогноз и определить тактику лечения больных раком почки. Однако, несмотря на активные исследования, на сегодняшний день нет достоверных прогностических факторов, обладающих необходимой чувствительностью и специфичностью, при выборе тактики лечения светлоклеточного рака почки (СРП), что заставляет продолжать исследования в этом направлении. Применение классических прогностических факторов, таких как размер опухоли, стадия заболевания, степень дифференцировки опухолевых клеток далеко не всегда позволяет прогнозировать течение СРП у конкретного пациента (Шустицкий Н.А., 2007). В основе данного явления может лежать широкая гетерогенность молекулярно-биологических характеристик клеточных элементов в разных участках карцином (Черданцева Т.М. и др. 2011; Ljungberg B. et al., 1996; Nenning H. et al., 1997).

Изучение маркеров ядрышкового аппарата опухолевых клеток при СРП представляется перспективным, поскольку морфофункциональная активность ядрышек взаимосвязана с клинико-морфологическими параметрами карцином, маркерами пролиферации, апоптоза и ангиогенеза.

Одним из важнейших белков ядрышка является нуклеофозмин/V23 (Райхлин Н. Т. и др., 2006; Демидова И.А., 2008; Зенит-Журавлева Е.Г. и др., 2012; Дейнеко Н.Л. и др., 2015). Основные функции нуклеофозмина/V23 – участие в промежуточных и поздних стадиях сборки прерибосом (Булычева Т.В., 2000) и транспорт белковых компонентов рибосом из ядра в цитоплазму (Зацепина О.В., 1997; Yu Y. et al., 2006). Нуклеофозмин/V23 также участвует в поддержании генетической стабильности клетки, контролируя восстановление целостности ДНК и дупликацию центромер хромосом во время митоза. Нуклеофозмин активно взаимодействует с геном активатора апоптоза p53 (Colombo E. et al., 2002; Ye K., 2005).

Прогностическое значение экспрессии нуклеофозмина показано при лейомиосаркоме матки (Авдалян А.М. и др., 2015), колоректальном раке (Райхлин Н.Т. и др., 2013; Liu Y. et al., 2012; Yang Y.F. et al., 2014), лимфоме (Букаева И.А. и др., 2012), раке желудка (Zhou F. et al., 2013; Leal M.F. et al., 2014; Li Y. et al., 2014), остром миелоидном лейкозе (Dohner K.

et al., 2005; Zidan M. et al., 2013), раке молочной железы (Karhemo P.R. et al., 2011), раке печени (Tian Q.H. et al., 2006; Yun J.P. et al., 2007) и раке мочевого пузыря (Tsui K.H. et al., 2004).

Интерес к нуклеофозмину/V23 обусловлен также тем, что данный белок может стать перспективной мишенью для молекулярной терапии. Анализ экспрессии нуклеофозмина/V23 и изучение его регуляторных механизмов в опухолевых клетках может способствовать разработке новых таргетных молекулярных препаратов, действие которых было бы направлено на данный регуляторный онкопротеин, участвующий в прогрессии опухолевого роста (Букаева И.А. и др., 2012; Зенит-Журавлева Е.Г. и др., 2012, 2013; Понкратова Д.А. и др., 2015, 2016, 2018; Райхлин Н.Т. и др., 2006). При этом необходимо хорошо изучить взаимосвязи этого белка с клинико-морфологическими и биомолекулярными особенностями опухолей.

Степень разработанности темы исследования. В литературе обнаружена лишь одна работа, в которой исследована экспрессия нуклеофозмина/V23 при раке почки и показано, что экспрессия нуклеофозмина/V23 при почечно-клеточном раке коррелировала со степенью ядерной атипии (Sari A. et al., 2012). Авторы также отмечают, что выявление экспрессии нуклеофозмина/V23 может быть полезным иммуногистохимическим маркером для дифференциального диагноза между онкоцитомой и хромофобным раком почки. Поэтому исследование экспрессии нуклеофозмина/V23 в ядрышках клеток СРП является актуальной задачей.

Цель исследования – изучить характер экспрессии нуклеофозмина/V23 в ядрышках опухолевых клеток для оптимизации прогнозирования послеоперационной выживаемости больных светлоклеточным раком почки.

Задачи исследования:

1. Изучить распределение нуклеофозмина/V23 в ядрышках неизмененного эпителия почки.
2. Изучить взаимосвязь экспрессии нуклеофозмина/V23 в опухолевых клетках светлоклеточного рака почки и клинико-морфологических параметров карциномы.
3. Изучить взаимосвязь экспрессии нуклеофозмина/V23 в опухолевых клетках светлоклеточного рака почки и молекулярно-биологических параметров карциномы: ангиогенеза, митотического индекса, ploидности, экспрессии Ki-67, p53, bcl-2 и ММП-9.
4. Рассчитать общую 5-летнюю выживаемость больных после хирургического лечения в зависимости от экспрессии нуклеофозмина/V23.
5. Провести многофакторный регрессионный анализ по Коксу клинико-морфологических и молекулярно-биологических параметров светлоклеточного рака почки для выявления наиболее прогностически значимых критериев.

Научная новизна. Впервые на обширном операционном материале светлоклеточного рака почки выявлены и систематизированы взаимосвязи экспрессии нуклеофозмина/V23 в ядрышках опухолевых клеток с рядом клинико-морфологических параметров: полом, возрастом, клинической стадией заболевания, размером опухоли, степенью анаплазии по Fuhrman и наличием метастазов. Показано, что интегральная оптическая плотность нуклеофозмина/V23 в ядрышках опухолевых клеток положительно коррелирует со стадией заболевания и размерами опухоли.

Впервые исследованы взаимосвязи интегральной оптической плотности нуклеофозмина/V23 в ядрышках клеток с молекулярно-биологическими особенностями опухолей: состоянием васкуляризации, параметрами пролиферативной активности (митотическим индексом, ploидностью, индексом мечения Ki-67) и апоптоза (p53, bcl-2) и активностью ММП-9. Установлено, что интегральная оптическая плотность нуклеофозмина/V23 в ядрышках опухолевых клеток положительно коррелирует с митотическим индексом, ploидностью, индексом мечения Ki-67, экспрессией ММП-9 и p53.

Впервые исследована 5-летняя послеоперационная выживаемость больных в сопоставлении с интегральной оптической плотностью нуклеофозмина/V23 в ядрышках клеток карцином

почки со светлой цитоплазмой. Установлена значимость исследования интегральной оптической плотности нуклеофозмина/V23 в многофакторном регрессионном анализе как независимого фактора прогноза. Впервые выявлено, что к независимым факторам прогноза течения светлоклеточного рака почки относятся (в порядке убывания): интегральная оптическая плотность нуклеофозмина/V23; наличие метастазов; интегральная оптическая плотность ММП-9; степень анаплазии по Fuhrman.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты проведенного исследования представляют собой новые знания о патоморфологии и молекулярной биологии светлоклеточного рака почки. Предложен новый подход к оценке злокачественного потенциала светлоклеточного рака почки – анализ интегральной оптической плотности нуклеофозмина/V23 в ядрышках опухолевых клеток.

Полученные результаты могут служить основой для дальнейшего исследования взаимосвязей экспрессии нуклеофозмина/V23 с биомолекулярными и клинико-морфологическими параметрами клеток злокачественных новообразований других локализаций. Данные об экспрессии ядрышкового белка нуклеофозмина/V23 в клетках светлоклеточного рака почки могут иметь прикладное значение и способствовать разработке новых методов диагностики и дополнительных критериев прогноза и лечения данного заболевания.

Методология и методы исследования. Методологически работа основана на применении принципов системного анализа комплекса данных, методов морфологического, иммуногистохимического и морфоденситофотометрического анализа патологических процессов, использовании теоретических разработок и обобщений о типовых патологических процессах. Объект исследования – образцы светлоклеточного рака почки от 83 больных. Предмет исследования – особенности количественных изменений интегральной оптической плотности ядрышкового белка нуклеофозмина/V23 в зависимости от пола, возраста, клинической стадии патологического процесса, размера опухоли, степени анаплазии, метастатического потенциала и биомолекулярных параметров опухолей (ангиогенеза, маркеров пролиферации и апоптоза) у больных светлоклеточным раком почки и установление 5-летней послеоперационной выживаемости пациентов на основе экспрессии нуклеофозмина/V23 в ядрышках опухолевых клеток.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Интегральная оптическая плотность (ИОП) нуклеофозмина/V23 в ядрышках клеток карцином положительно коррелирует с такими важнейшими клинико-морфологическими параметрами светлоклеточного рака почки, как клиническая стадия заболевания, размер опухоли, степень анаплазии по Fuhrman и метастатический потенциал опухоли.

2. ИОП нуклеофозмина/V23 положительно взаимосвязана с такими молекулярно-биологическими параметрами светлоклеточного рака почки, как ангиогенез, экспрессия ММП-9, показатели пролиферации (митотический индекс, плоидность, индекс Ki-67) и маркеры апоптоза (p53, bcl-2).

3. Высокая экспрессия нуклеофозмина/V23 в клетках светлоклеточного рака почки взаимосвязана с 5-летней послеоперационной выживаемостью больных и является независимым фактором прогноза.

Степень достоверности результатов диссертации. Использованы современные методы патоморфологического анализа (метод тканевых матриц, иммуногистохимический анализ, морфометрический и морфоденситофотометрический методы), обработка количественных данных проведена статистическими методами. Предпринятые методические подходы позволяют получать достоверные результаты и соответствуют поставленным цели и задачам исследования. Диссертация выполнена на достаточном по объему операционном материале (образцы опухоли и условно неизменной ткани почки от 83 больных светлоклеточным раком почки) с использованием современного сертифицированного оборудования. Сформулированные научные положения, выводы и практические рекомендации не носят умозрительных заключений, вытекают из результатов работы и основаны на результатах собственных исследований.

Апробация работы. Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на X юбилейном конгрессе Российского общества онкоурологов (Москва, 2015); научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы патологической анатомии» (Новосибирск, 2015); Российской научно-практической конференции с международным участием «Высокие технологии в онкологической практике. 70 лет онкологической службе Алтайского края» (Барнаул, 2016); V съезде Российского общества патологоанатомов (Челябинск, 2017); XXXVII International scientific and practical conference «International scientific review of problems and prospects of modern science and education» (Boston, 2018); X Съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии памяти академика Н.Н.Трапезникова (Сочи, 2018); XIII Международного конгресса Российского общества онкоурологов (Москва, 2018); *International Conference “Scientific research of the SCO countries: synergy and integration”* (Beijing, China, 2018); International Conference “Process Management and Scientific Developments” (Birmingham, United Kingdom, 2019), заседании экспертного научного совета ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Барнаул, 2019).

Публикации. По теме диссертации опубликована 21 работа, из них 2 в ведущих рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 125 странице компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материал и методы исследований», 3 глав с результатами собственных исследований», заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Список литературы содержит 369 источников (98 отечественных и 271 зарубежных авторов). Диссертация иллюстрирована 15 таблицами и 39 рисунками.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В основу работы положены результаты комплексного клинико-морфологического обследования 83 больных светлоклеточного рака почки, находившихся на обследовании и лечении в КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер» г. Барнаула. Средний возраст пациентов составил $57,6 \pm 1,0$ лет (min. – 37; max. – 75; moda – 63). Мужчин в исследовании было 38 (45,8%), женщин – 45 (54,2%). Средний наибольший размер опухолевого узла составил $6,8 \pm 0,4$ см (min. – 2 см; max – 15 см; mediana – 7 см). Отдаленные и регионарные метастазы отмечали в 10 (8,3%) случаях, локализованных опухолей было – 73 (91,7%). Число исследованных опухолей составило – 843.

Используемые классификации. Гистологическая оценка проводилась в соответствии с классификацией 2016 г. ВОЗ. При группировке опухолей по клиническим стадиям патологического процесса новообразования были распределены следующим образом: I стадии (T1N0M0) соответствовали 48 (57,8%) наблюдений; II стадии (T2N0M0) – 8 (9,6%) наблюдений; III стадии (T1N1M0, T2N1M0, T3N0M0, T3N1M0) – 17 (20,5%) наблюдений и IV стадии (T4N0M0, T4N1M0, Тлюбая N2M0, Тлюбая Nлюбая M1) – 10 (12,1%) наблюдений.

Степень злокачественности опухолевых клеток определяли по градации Fuhrman S.A. (1982). При распределении опухолей по степени анаплазии по Fuhrman S.A.: степени анаплазии GI соответствовали 33 (39,8%) опухоли; степени GII – 25 (30,1%); степени GIII – 17 (20,5%) и степени GIV – 8 (9,6%).

Методы патоморфологического анализа. Операционный материал маркировали, фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 24 – 48 ч и после дегидратации заливали в парафин обычным способом. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином. На светооптическом уровне оценивали цитологические особенности клеток, гистоархитектонику опухоли, степень ядерной атипии, явления некроза, склероза и гиалиноза и митотический режим клеток опухоли.

Метод тканевых матриц. В каждом случае из парафиновых блоков (блоков-доноров) после предварительного просмотра гистологического препарата иглой-панчером с внутрен-

ним диаметром 2,0 мм забирали столбики ткани. Столбики ткани (10 – 15 шт.) из парафиновых блоков-доноров помещали в парафиновые блоки-реципиенты размером 20x20 мм. Из парафиновых блоков-реципиентов изготавливали серийные гистологические срезы толщиной 4 мкм и переносили на стекла (с двух парафиновых блоков на одно стекло).

Методы иммуногистохимического исследования. Иммуногистохимическое исследование выполнено на парафиновых срезах опухолей с помощью биотин-стрептавидинового и полимерного иммунопероксидазного метода с моно- и поликлональными антителами. Для каждого антигена оценивали тип специфического окрашивания, который зависел от локализации продукта реакции в клетке (цитоплазматический, ядерный, ядрышковый, смешанный). В исследовании использовали следующие моноклональные антитела и разведения: Nucleophosmin/B23, клон mouse mAb23 («Labvision, разведение 1:10»); CD31 (маркер эндотелиоцитов), клон JC70 («Dako», разведение 1:10); Ki-67, клон MIB-1 («Dako», разведение 1:25); p53 клон DO7 («Dako», разведение 1:25); Bcl-2, клон МКА 124 («Dako», разведение 1:10) и MMP-9 (15W2 «Nowosan», разведение 1:40). Оценку экспрессии маркеров проводили согласно общепринятым методикам и протоколам производителя.

Исследование ангиогенеза. При исследовании плотности микроциркуляторного русла (ПМЦР) карцином микропрепараты фотографировали цифровым фотоаппаратом при увеличении x400, сохраняли снимки в формате JPG и в программе Image Tool 3.0. с помощью инструмента Count and Tag высчитывали среднее количество сосудов по 5 полям зрения.

Морфоденситофотометрические методы исследования. Содержание ДНК в ядрах клеток определяли на компьютерном анализаторе изображений, состоящим из микроскопа Leica DNM, цифровой видеокамеры Leica EC3 (план объектив 100x/0,65, светофильтр 570 нм) с морфометрической программой ВидеоТест Морфология 5.2. Условия освещения и пороги яркости измеряемых объектов (0 – 200 ед.) были одинаковыми для всех измерений. В каждом препарате определяли содержание ДНК в ядрах 25 – 30 интерфазных опухолевых клеток, а также в ядрах 25 малых тканевых лимфоцитов в этом же срезе. Среднее содержание ДНК в ядре лимфоцита принимали за диплоидное значение (2c).

При исследовании интегральной оптической плотности (ИОП) нуклеофозмина/B23 в ядрышках опухолевых клеток морфоденситофотометрическим методом микропрепараты фотографировали цифровым фотоаппаратом при увеличении x1000 и сохраняли снимок в формате JPG. Далее с помощью инструмента «Выделение» в программе Adobe Photoshop 6.0. выделяли наиболее интересные ядрышки и с помощью инструмента «Move» области выделения переносили на отдельный чистый лист и переводили изображения в полутоновый режим. Морфометрию интегральной оптической плотности нуклеофозмина/B23 проводили с помощью программы ВидеоТест-Морфология 5.2.

Аналогичным образом проводили анализ ИОП MMP-9 в цитоплазме опухолевых клеток.

Статистический анализ результатов исследования. Данные о выживаемости пациентов получали из «Канцер-регистра» Алтайского края. Рассчитывали 5-летнюю выживаемость актуриальным способом, после создания специальной базы данных определяли общую выживаемость по Каплан-Мейеру (строили кривые кумулятивной выживаемости) с определением кумулятивной доли выживших, где время оценивали по дням. Достоверность кривых выживания оценивали с помощью логарифмического рангового критерия (log-rank-test).

Все цифровые данные, полученные в работе, подвергали статистической обработке. При этом использовали пакет анализа программы Microsoft Office Excel и прикладную статистическую программу Statistica 10.0. Вычисляли среднее арифметическое и его ошибку. При нормальном распределении данных при проверке статистических гипотез применяли методы параметрической статистики (t-критерий Стьюдента), а если полученные данные не соответствовали критерию нормального распределения, то применяли тест Колмогорова-Смирнова или U-тест Манна – Уитни.

Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Наличие связи между изучаемыми признаками проводили с использованием корреляционного анализа и рассчитывали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r) для оценки силы связи между переменными.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия нуклеофозмина/V23 в неизменной ткани почки. При иммуногистохимическом определении экспрессии нуклеофозмина/V23 на препаратах почки без явлений нефросклероза и воспалительных изменений, забранных из максимально удаленных от опухоли участков, в ядрах нефроцитов экспрессию отмечали исключительно в ядрышках. При этом ядрышки выглядели светло-желтыми или светло-коричневыми. Экспрессия белка определялась практически в 100% клеток. Средняя ИОП нуклеофозмина/V23 составила $496,7 \pm 19,8$ отн. ед., пределы колебаний составили от 85,3 до 926,9 отн. ед., при модальном значении 450 отн. ед. (табл. 1).

Таблица 1. ИОП нуклеофозмина/V23 в визуально неизменной почке и светлоклеточном раке ($M \pm m$)

Параметр	Почка норма	Светлоклеточный рак почки		
		все пациенты	мужчины	женщины
ИОП нуклеофозмина/V23 (отн. ед.)	$496,7 \pm 19,8$	$1023,6 \pm 56,7^*$	$1305,8 \pm 57,9$	$1523,4 \pm 94,4^\#$

Примечание: * – $p = 0,001$ при сравнении с неизменной тканью почки; # – $p = 0,06$ при сравнении с мужчинами.

Экспрессия нуклеофозмина в опухолевых клетках светлоклеточного рака почки без учета клинико-морфологических и биомолекулярных параметров. При изучении экспрессии нуклеофозмина/V23 в опухолевых клетках при СРП наличие онкопротеина, как правило, отмечали в 100% клеток, но содержание протеина на 1 ядро было различно, поэтому нами был проведен количественный анализ ИОП белка в относительных единицах (отн. ед.). Экспрессия нуклеофозмина/V23 выявлялась, прежде всего, в ядрышках в виде окрашивания от светло-коричневого до сиреневого цвета, окрашивание нуклеоплазмы выявляли очень редко. При количественном исследовании ИОП нуклеофозмина/V23 выявлено, что средняя ИОП на 1 ядро составила $1023,6 \pm 56,7$ отн. ед., пределы колебаний – от 118,9 до 15778,3 отн. ед. при модальном значении 871,7 отн. ед. (см. табл. 1).

Иммуногистохимический анализ экспрессии нуклеофозмина/V23 в зависимости от клинико-морфологических параметров светлоклеточного рака почки. При корреляционном анализе взаимосвязи между ИОП нуклеофозмина/V23 и полом больных обнаружено не было ($r=0,07$; $p=0,50$). У мужчин интегральная ИОП нуклеофозмина/V23 на 1 ядро составила $1305,8 \pm 57,9$ отн. ед., пределы колебаний параметров составили от 118,9 до 7301,3 отн. ед., мода – 902 отн. ед. У женщин ИОП белка достоверно не отличалась от показателя у мужчин и составила $1523,4 \pm 94,4$ отн. ед. на 1 ядро, пределы колебаний варьировали от 153,5 до 15578,3 отн. ед., мода – 816,9 отн. ед.

Между ИОП нуклеофозмина/V23 и возрастом пациентов корреляционной взаимосвязи не выявлено ($r=0,07$; $p=0,50$). В возрастной группе от 31 до 40 лет ИОП нуклеофозмина/V23 составила $658,2 \pm 56,5$ отн. ед.; в группе 40 – 49 лет – $2007,7 \pm 197,9$ отн. ед.; в группе 50 – 59 лет – $1227,6 \pm 59,3$ отн. ед.; в группе 60 – 69 лет – $1176,8 \pm 82,5$ отн. ед. и в группе 70 – 79 лет – $2025,5 \pm 273,5$ отн. ед. Таким образом, наименьшее значение ИОП нуклеофозмина/V23 отмечали в возрастной группе от 30 до 39 лет, а наибольшее – в возрасте от 70 до 79 лет.

ИОП нуклеофозмина/V23 коррелировала с клинической стадией заболевания ($r=0,57$; $p=0,0001$). На I стадии патологического процесса средняя ИОП нуклеофозмина/V23 на 1 ядро составила $956,1 \pm 31,4$ отн. ед., при II стадии – $2034,6 \pm 134,3$ отн. ед., при III стадии – $2525,9 \pm 197,5$ отн. ед., при IV стадии – $3825,9 \pm 521,7$ отн. ед. (табл. 2). Результаты исследования показали, что при светлоклеточном раке почки при возрастании клинической стадии происходит достоверное увеличение содержания нуклеофозмина/V23 в клетках опухоли.

Таблица 2. ИОП нуклеофозмина/V23 в зависимости от клинической стадии светлоклеточного рака почки (M±m)

Клиническая стадия	ИОП нуклеофозмина/V23 (отн. ед)
Стадия I (1)	956,1±31,4
Стадия II (2)	2034,6±134,3
Стадия III (3)	2525,9±197,5
Стадия IV (4)	3825,9±521,7

Примечание: $p_{1-2} = 0,000001$; $p_{2-3} = 0,09$; $p_{3-4} = 0,009$.

ИОП нуклеофозмина/V23 коррелировала со степенью анаплазии по Fuhrman ($r=0,70$; $p=0,0001$). При степени анаплазии GI по Fuhrman средняя ИОП нуклеофозмина/V23 на 1 ядро составила 728,1±19,2 отн. ед., при степени анаплазии GII – 862,2±24,6 отн. ед., при степени анаплазии GIII – 2166,9±63,2 отн. ед., при степени анаплазии GIV – 4711,7±364,7 отн. ед. (табл. 3) Результаты исследования свидетельствуют о том, что при светлоклеточном раке почки ИОП нуклеофозмина/V23 увеличивается при возрастании степени анаплазии опухоли.

Таблица 3. ИОП нуклеофозмина/V23 в зависимости от степени анаплазии светлоклеточного рака почки (M±m)

Степень анаплазии по Fuhrman (G)	ИОП нуклеофозмина/V23 (отн. ед)
G I (1)	728,1±19,2
G II (2)	862,2±24,6
G III (3)	2166,9±63,2
G IV (4)	4711,7±364,7

Примечание: $p_{1-2} = 0,000002$; $p_{2-3} = 0,001$; $p_{3-4} = 0,0000001$.

ИОП нуклеофозмина/V23 была взаимосвязана с размером опухолевого узла ($r=0,58$; $p=0,0001$). В клетках опухолей размером < 7 см ИОП нуклеофозмина/V23 на 1 ядро составила 904,2±24,7 отн. ед., а в опухолевых узлах ≥ 7 см ИОП белка достоверно возрастала до 2555,5±149,2 отн. ед. на 1 ядро (табл. 4). Таким образом, при возрастании размеров опухоли возрастала и ИОП нуклеофозмина/V23 на 1 ядро.

Таблица 4. ИОП нуклеофозмина/V23 в зависимости от размера опухоли и наличия метастазов (M±m)

Параметр	Размер опухоли		Метастазы	
	< 7 см	> 7 см	отсутствуют	имеются
ИОП нуклеофозмина/V23 (отн. ед)	904,2±24,7	2555,5±149,2*	1197,3±43,4	3098,3±301,9 [#]

Примечание: * – $p=0,001$ по сравнению с опухолями < 7 см; [#] – $p=0,0000001$ по сравнению с опухолями без метастазов.

ИОП нуклеофозмина/V23 была взаимосвязана с наличием метастазов опухоли ($r=0,40$; $p=0,0001$). В клетках локализованных опухолей ИОП нуклеофозмина/V23 на 1 ядро составила 1197,3±43,4 отн. ед., а в метастатических опухолях ИОП белка достоверно возрастала до 3098,3±301,9 отн. ед. на 1 ядро (см. табл. 4). Таким образом, в ядрах клеток метастазирующих опухолей светлоклеточного рака почки отмечали достоверно более высокую ИОП нуклеофозмина/V23 по сравнению с локализованными опухолями.

Экспрессия нуклеофозмина/V23 в зависимости от состояния ангиогенеза и молекулярно-биологических особенностей светлоклеточного рака почки. Результаты проведенного исследования показали, что ПМЦР в опухоли была взаимосвязана с ИОП нуклеофозмина/V23 в ядрышках клеток опухоли ($r=0,48$; $p=0,0001$). ПМЦР при СРП в среднем составила 35,2±2,7 в 5 полях зрения при увеличении микроскопа х400, пределы колебаний

числа сосудов составили от 3,6 до 101, медиана – 35 сосудов. Поскольку медиана количества сосудов в 5 полях зрения была равна 35, то это значение было выбрано за «критическую точку васкуляризации» опухоли, позволяющую разделить больных на 2 группы. В группе больных с хорошо васкуляризованными карциномами (≥ 35 сосудов в 5 полях зрения) ИОП нуклеофозмина/В23 составила $814,5 \pm 20,3$ отн. ед., а в группе пациентов с плохо васкуляризованными опухолями (< 35 сосудов в 5 полях зрения) ИОП достоверно возростала до $1880,4 \pm 92,6$ отн. ед. (табл. 5). Результаты исследования свидетельствуют о том, что в плохо васкуляризованных карциномах (которые находились в состоянии гипоксии), по сравнению с хорошо васкуляризованными опухолями, отмечали возрастание экспрессии нуклеофозмина/В23.

Таблица 5. ИОП нуклеофозмина/В23 в зависимости от ПМЦР и ИОП ММП-9 (M \pm m)

Параметр	ПМЦР (число)		ИОП ММП-9 (отн. ед.)	
	≥ 35 сосудов	< 35 сосудов	< 1500	≥ 1500
ИОП нуклеофозмина/В23 (отн. ед)	$1880,4 \pm 92,6$	$814,5 \pm 20,3^*$	$755,6 \pm 27,3$	$1507 \pm 89,3^\#$

Примечание: ПМЦР – плотность микроциркуляторного русла; * – $p = 0,0000001$ по сравнению с опухолями с высокой ПМЦР; # – $p = 0,0000001$ по сравнению с опухолями с низкой ИОП ММП-9.

ИОП нуклеофозмина/В23 коррелировала с ИОП ММП-9 в клетках опухоли ($r=0,53$; $p=0,005$). Среди всех исследованных больных разброс значений ИОП ММП-9 составил от 224,3 до 10876,8 отн. ед., в среднем ИОП ММП-9 составила $1507 \pm 89,3$ отн. ед. Опухоль считали низкоактивной в отношении экспрессии ММП-9, если в новообразовании ИОП ММП-9 составляла < 1500 отн. ед. Опухоль считали высокоактивной в отношении экспрессии ММП-9, если ИОП ММП-9 составляла ≥ 1500 отн. ед. При определении ИОП нуклеофозмина/В23 в опухолевых клетках в зависимости от экспрессии ММП-9 в новообразовании показано, что в карциномах с низкой ИОП ММП-9 ИОП нуклеофозмина/В23 составила $755,6 \pm 27,3$ отн. ед., а в карциномах с высокой ИОП ММП-9 ИОП нуклеофозмина/В23 достоверно возростала до $1885,3 \pm 140,8$ отн. ед. (см. табл. 5). Таким образом, в опухолях с высокой активностью ММП-9 по сравнению с опухолями с низкой экспрессией ММП-9 при СРП выявлено увеличение ИОП нуклеофозмина/В23.

ИОП нуклеофозмина/В23 была взаимосвязана с плоидностью опухолевых клеток ($r=0,70$; $p=0,0001$). При микроспектрофотометрическом исследовании показало, что индекс накопления ДНК (ИНДНК) в клетках СРП в среднем составил $4,6 \pm 0,2$, что не является высоким показателем. Диплоидных опухолей ($< 4,5c$) было 61,4%, анеуплоидных опухолей ($\geq 4,5c$) – 38,6%. В группе больных с диплоидными опухолями ИОП нуклеофозмина/В23 составила $770,1 \pm 16,9$ отн. ед., а в группе пациентов с анеуплоидными опухолями ИОП нуклеофозмина/В23 достоверно возростала до $2369,7 \pm 118,6$ отн. ед. (табл. 6). В анеуплоидных опухолях СКР по сравнению с диплоидными происходило увеличение ИОП нуклеофозмина/В23.

Таблица 6. ИОП нуклеофозмина/В23 в зависимости от ИНДНК и ИМ Ki-67 (M \pm m)

Параметр	ИНДНК (с)		ИМ Ki-67 (%)	
	$< 4,5c$	$\geq 4,5c$	$< 8,3$	$\geq 8,3$
ИОП нуклеофозмина/В23 (отн. ед)	$770,1 \pm 16,9$	$2369,7 \pm 118,6^*$	$879,3 \pm 43,6$	$2398,8 \pm 177,2^\#$

Примечание: * – $p = 0,001$ по сравнению с диплоидными опухолями; # – $p = 0,0000001$ по сравнению с опухолями с низким ИМ Ki-67.

ИОП нуклеофозмина/В23 была взаимосвязана с ИМ Ki-67 опухолевых клеток ($r=0,71$; $p=0,0001$). Разброс значений ИМ Ki-67 среди всех исследованных больных составил от 1 до 43 %, при этом в среднем уровень экспрессии составил $8,3 \pm 1,2\%$. Опухоль считали высокопролиферативно активной, если метилось 8,3% и более опухолевых клеток и опухоль

считали низко пролиферативно активной, если окрашивалось менее 8,3% опухолевых клеток. Число опухолей с высокой пролиферативной активностью составило 43,4%, с низкой пролиферативной активностью – 56,6%. При определении экспрессии нуклеофозмина/V23 в опухолевых клетках в зависимости от ИМ Ki-67 показано, что в карциномах с низкой пролиферативной активностью средняя ИОП белка нуклеофозмина/V23 составила $879,3 \pm 43,6$ отн. ед., а в опухолях с высокой пролиферативной активностью протеина этот показатель возрастал до $2398,8 \pm 177,2$ отн. ед. (см. табл. 6).

ИОП нуклеофозмина/V23 коррелировала с митотической активностью клеток опухоли ($r=0,69$; $p=0,0001$). Среди всех больных разброс значений митотического индекса (МИ) составил от 0 до 11%, в среднем МИ составил $2,8 \pm 0,4\%$. Опухоль считали высоко митотически активной если МИ составлял $\geq 2,9\%$, если МИ в опухоли составлял $< 2,9\%$, то опухоль считали с низкой митотической активностью. Число опухолей с низким МИ было 56,8%, с высоким МИ – 43,2%. При определении ИОП нуклеофозмина/V23 в опухолевых клетках в зависимости от митотической активности новообразования показано, что в карциномах с низким МИ ИОП белка составила $1091,2 \pm 68,2$ отн. ед., а в карциномах с высоким МИ ИОП достоверно возрастала до $2537 \pm 198,9$ отн. ед.

ИОП нуклеофозмина/V23 коррелировала с индексом мечения (ИМ) p53 клеток опухоли ($r=0,86$; $p=0,0001$). Среди всех исследованных больных разброс значений экспрессии p53 составил от 0 до 61%, в среднем уровень экспрессии составил $9,9 \pm 2,1\%$. Таким образом, опухоль считали p53-позитивной, если в ткани новообразования было окрашено 10% и более опухолевых клеток. Опухоль считали p53-негативной, если в карциномах окрашивалось менее 10% опухолевых клеток. p53-позитивных карцином было 31,6%, p53-негативных карцином – 68,4%. При определении экспрессии нуклеофозмина/V23 в опухолевых клетках в зависимости от ИМ p53 в ядрах опухолевых клеток показано, что в p53-негативных карциномах средняя ИОП белка нуклеофозмина/V23 составила $982,2 \pm 37,7$ отн. ед., а в p53-позитивных опухолях – $3236,7 \pm 233,2$ отн. ед. (табл. 7), т.е. в p53-позитивных СРП по сравнению с p53-негативными опухолями в ядрышках происходило увеличение ИОП нуклеофозмина/V23.

ИОП нуклеофозмина/V23 была взаимосвязана с ИМ bcl-2 клеток опухоли ($r=0,28$; $p=0,1$). Разброс значений экспрессии bcl-2 среди всех исследованных больных составил от 0 до 4 баллов, в среднем уровень экспрессии составил $1,9 \pm 0,2$ балла. Опухоль считали bcl-2-негативной, если в новообразовании экспрессия ингибитора апоптоза bcl-2 составляла от 0 до 2 баллов. Опухоль считали bcl-2-позитивной, если экспрессия ингибитора апоптоза составила от 3 до 4 баллов. Bcl-2-негативных опухолей было 25%, bcl-2-позитивных опухолей – 75%. При определении экспрессии нуклеофозмина/V23 в опухолевых клетках в зависимости от ИМ bcl-2 показано, что в bcl-2-позитивных карциномах средняя ИОП нуклеофозмина/V23 составила $1054,5 \pm 91,5$ отн. ед., а в bcl-2-негативных опухолях этот показатель возрастал до $2057,4 \pm 140,8$ отн. ед. (табл. 7). То есть при светлоклеточном раке почки в bcl-2-негативных опухолях по сравнению с bcl-2-позитивными опухолями отмечали увеличение ИОП нуклеофозмина/V23 в опухолевых клетках.

Таблица 7. ИОП нуклеофозмина/V23 в зависимости от экспрессии p53 и bcl-2 (M±m)

Параметр	ИМ p53		ИМ bcl-2	
	p53(-)	P53(+)	bcl-2 (-)	bcl-2 (+)
ИОП нуклеофозмина/V23 (отн. ед)	$982,2 \pm 37,7$	$3236,7 \pm 233,2^*$	$2057,4 \pm 140,8$	$1054,5 \pm 91,5^\#$

Примечание: * – $p = 0,001$ по сравнению с p53-негативными опухолями; # – $p = 0,00009$ по сравнению с bcl-2-позитивными опухолями.

Анализ 5-летней выживаемости больных. При оценке течения СРП одним из важнейших вопросов является рассмотрение клинико-морфологических параметров карцином, что очень важно для прогнозирования течения заболевания и улучшения лечебных и диагностических мероприятий. Однако, несмотря на значимость классических клинико-

морфологических параметров прогноза СРП, далеко не всегда эти факторы позволяют прогнозировать течение заболевания. Поэтому перед исследователями всегда стоит важная задача разработки новых прогностических критериев, а затем их сопоставление с уже известными, хорошо зарекомендовавшими себя в клинике. Из вышеизложенного вытекает решение о проведении однофакторного анализа с вовлечением как традиционных клинико-морфологических, молекулярно-биологических прогностических факторов, так и ИОП нуклеофозмина/В23.

Пол больных и прогноз. Нами были оценены отдаленные результаты послеоперационной выживаемости у больных СРП в зависимости от пола. Больные были разделены на 2 группы: 1-я группа – мужчины, 2-я группа – женщины. При исследовании 5-летней выживаемости по методу Каплан-Мейер графическое отражение анализа показало, что различий в выживаемости между группами исследования обнаружено не было (log-rank, $p=0,2$). Таким образом, фактор пола больных не явился прогностическим критерием 5-летней выживаемости у больных СРП.

Возраст больных и прогноз. Оценены результаты послеоперационной выживаемости у больных СРП в зависимости от возраста больных. Больные были разделены на 5 групп: 1-я группа – больные с возрасте от 30 до 39 лет; 2-я группа – в возрасте от 40 до 49 лет; 3-я группа – в возрасте от 50 до 59 лет; 4-я группа – в возрасте от 60 до 69 лет, 5-я группа – в возрасте от 70 до 79 лет. При исследовании 5-летней выживаемости по методу Каплан-Мейер графическое отражение анализа показало: при возрасте больных от 30 до 39 лет к 1800-му дню после операции кумулятивная доля выживших составила 1,0 (100%); при возрасте от 40 до 49 лет – 0,60 (60%); при возрасте от 50 до 59 лет – 0,93 (93%); при возрасте от 60 до 69 лет – 0,85 (85%) и при возрасте от 70 до 79 лет – 0,64 (64%). При этом статистических значимых различий в выживаемости между группами обнаружено не было (log-rank, $p=0,06$). Таким образом, фактор возраста больных не явился прогностически значимым критерием 5-летней выживаемости у больных СРП.

Стадия по TNM и прогноз. При оценке отдаленных результатов у больных СРП в зависимости от стадии по TNM больные были распределены на 2 группы. В 1-ю группу вошли больные, у которых была I и II стадия патологического процесса, во 2-ю группу – больные, у которых была III и IV стадия патологического процесса. При исследовании 5-летней выживаемости по методу Каплан-Мейера графическое отражение анализа показало: при I и II стадиях опухолевого процесса к 1800-му дню после операции кумулятивная доля выживших составила 0,85 (85%), при III и IV стадиях патологического процесса кумулятивная доля выживших составила 0,73 (73%). При сравнительном анализе с помощью логарифмического рангового критерия показано, что различия между кривыми выживаемости в группах исследования были не достоверными (log-rank, $p=0,2$). Таким образом, клиническая стадия патологического процесса в нашем исследовании не явилась прогностическим критерием 5-летней выживаемости у больных СРП.

Размер опухолевого узла и прогноз. При исследовании 5-летней выживаемости больных по методу Каплан-Мейера в зависимости от размера опухоли графическое отражение анализа показало: при размере опухолевого узла < 7 см к 1800-му дню после операции кумулятивная доля выживших составила 0,93 (93%), при размере опухоли > 7 см кумулятивная доля выживших составила 0,56 (56%). При сравнительном анализе с использованием логарифмического рангового критерия показано, что различия между кривыми выживаемости в данных группах исследования достоверны (log-rank; $p=0,0008$). Таким образом, размер опухолевого узла явился прогностическим критерием 5-летней выживаемости у больных СРП.

Степень атипии ядра по Furrhman и прогноз. Проведено сопоставление выживаемости в зависимости от степени анаплазии опухоли по Furrhman S.A. Больные были разделены таким образом: 1-ю группу составили пациенты со степенями анаплазии GI-GII, а 2-ю группу – больные с опухолями степени анаплазии GIII-GIV. При исследовании 5-летней выживаемости по методу Каплан-Мейер графическое отражение анализа показало: в 1-й группе к

1800-му дню после операции кумулятивная доля выживших составила 0,92 (92%), а во 2-й группе выживаемость больных уменьшалась до 0,60 (60%). При сравнительном анализе с помощью логарифмического рангового критерия показано, что различия между кривыми выживаемости в группах исследования достоверны (log-rank, $p=0,003$). Таким образом, степень анаплазии опухоли по Fuhrman явилась фактором прогноза 5-летней послеоперационной выживаемости больных СРП.

Наличие регионарных и дистантных метастазов и прогноз. При исследовании 5-летней выживаемости больных по методу Каплан-Мейер графическое отражение анализа показало: в локализованных карциномах к 1800-му дню после операции кумулятивная доля выживших составила 0,92 (92%), а в метастатических кумулятивная доля выживших составила 0,29 (29%). При сравнительном анализе с помощью логарифмического рангового критерия различия между кривыми выживаемости были достоверны (log-rank, $p=0,00001$). Таким образом, наличие регионарных и отдаленных метастазов явилось прогностическим критерием 5-летней выживаемости у больных СРП.

ПМЦР в опухоли и прогноз. Оценены отдаленные результаты послеоперационной выживаемости у больных СРП в зависимости от ПМЦР в опухоли. Пациенты были разделены на 2 группы: 1-я группа – больные, у которых ПМЦР в опухоли была > 35 сосудов в 5 полях зрения при увеличении $\times 400$, 2-я группа – больные, у которых ПМЦР была < 35 сосудов. При исследовании 5-летней выживаемости по методу Каплан-Мейера графическое отражение анализа показало: при ПМЦР > 35 сосудов к 1800-му дню после операции кумулятивная доля выживших составила 0,89 (89%), при ПМЦР < 35 сосудов кумулятивная доля выживших составила 0,74 (74%). При сравнительном анализе с использованием логарифмического рангового критерия выявлено, что различия между кривыми выживаемости в группах исследования были не достоверны (log-rank; $p = 0,2$). Таким образом, ПМЦР в опухоли не являлась прогностическим критерием 5-летней выживаемости больных СРП.

ИОП ММП-9 в опухоли и прогноз. При исследовании 5-летней выживаемости по методу Каплан-Мейера графическое отражение анализа показало: при ИОП ММП-9 в клетках опухоли < 1500 отн. ед. к 1800-му дню после операции кумулятивная доля выживших составила 1,0 (100%), при ИОП ММП-9 в клетках опухоли > 1500 отн. ед. кумулятивная доля выживших составила 0,43 (43%). При сравнительном анализе с использованием логарифмического рангового критерия выявлено, что различия между кривыми выживаемости в группах исследования достоверны (log-rank; $p=0,02$), т.е. ИОП ММП-9 в клетках опухоли явилась прогностическим критерием 5-летней выживаемости больных СРП.

Плоидность опухоли и прогноз. При исследовании 5-летней выживаемости по методу Каплан-Мейер графическое отражение анализа показало: при плоидности ДНК $< 4,5c$ к 1800-му дню после операции кумулятивная доля выживших составила 0,96 (96%), при плоидности $\geq 4,5c$ кумулятивная доля выживших составила 0,66 (66%). При сравнении кривых выживаемости больных этих групп с использованием логарифмического рангового критерия выявлено, что различия данных достоверны (log-rank, $p=0,009$). Таким образом, плоидность клеток опухоли явилась прогностическим критерием 5-летней выживаемости больных СРП.

Митотический индекс (МИ) и прогноз. При МИ в опухоли $< 2,8\%$ к 1800-му дню после операции кумулятивная доля выживших составила 0,89 (89%), при МИ $\geq 2,8\%$ кумулятивная доля выживших составила 0,46 (46%). При сравнительном анализе кривых выживаемости с использованием логарифмического рангового критерия выявлены достоверные различия между исследованными группами (log-rank, $p=0,01$). Таким образом, митотический индекс явился прогностическим критерием 5-летней выживаемости у больных СРП.

Экспрессия Ki-67 и прогноз. Поскольку при исследовании пролиферативной активности по ИМ Ki-67 медиана ИМ Ki-67 в опухоли составила 8% позитивных клеток, данное значение нами было взято за «критическую прогностическую точку». Когда ИМ Ki-67 в опухоли был $< 8\%$, тогда к 1800 дню после операции кумулятивная доля выживших составила 0,97 (97%), а когда ИМ Ki-67 был $\geq 8\%$, тогда кумулятивная доля выживших составила 0,67

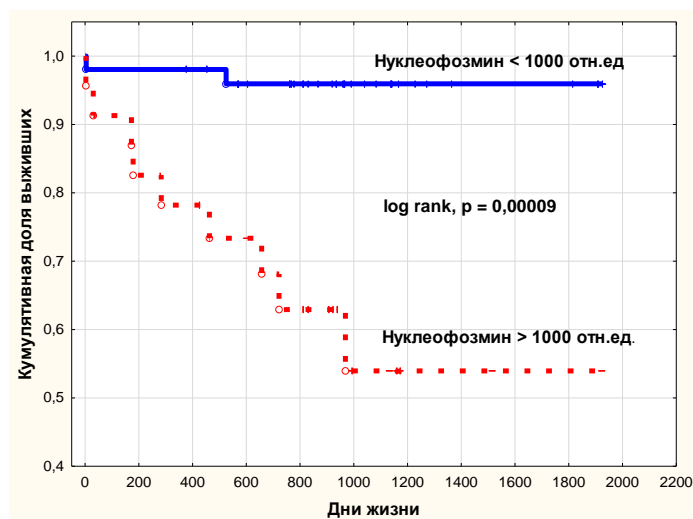
(67%). При оценке достоверности кривых выживания с помощью логарифмического рангового критерия получены достоверные различия (log-rank, $p=0,001$). Таким образом, ИМ Ki-67 явился прогностическим критерием 5-летней выживаемости у больных СПР.

Экспрессия p53 и прогноз. При ИМ p53 < 10% к 1800-му дню после операции кумулятивная доля выживших составила 0,97 (97%), а при ИМ p53 \geq 10%, кумулятивная доля выживших составила 0,59 (59%). При сравнении кривых выживаемости этих групп больных с использованием логарифмического рангового критерия установлено, что различия между данными не достоверны (log-rank, $p=0,2$). Таким образом, экспрессия p53 в опухолевых клетках не оказалась значимым прогностическим критерием 5-летней выживаемости у больных СПР.

Экспрессия Vcl-2 и прогноз. Когда ИМ vcl-2 в новообразованиях равнялся 3 - 4 баллам, к 1800-му дню после операции кумулятивная доля выживших составила 0,66 (66%), а когда ИМ vcl-2 равнялся 0 – 2 баллам, кумулятивная доля выживших составила 0,60 (60%). При сравнительном анализе кривых выживаемости с использованием логарифмического рангового критерия обнаружено, что полученные данные не достоверны (log-rank, $p=0,2$). Таким образом, экспрессия vcl-2 в опухолевых клетках не явилась значимым прогностическим критерием 5-летней выживаемости у больных СПР.

Экспрессия нуклеофозмина/V23 и прогноз. При ИОП нуклеофозмина/V23 в карциномах < 1000 отн. ед. к 1800-му дню после операции кумулятивная доля выживших составила 0,97 (97%), при ИОП нуклеофозмина/V23 на 1 ядро \geq 1000 отн. ед. кумулятивная доля выживших составила 0,54 (54%). При сравнении кривых выживаемости этих групп больных с использованием логарифмического рангового критерия показано, что различия данных были достоверны (log-rank, $p=0,00009$) (рисунок). Таким образом, ИОП нуклеофозмина/V23 в опухолевых клетках явилась значимым прогностическим критерием 5-летней выживаемости у больных СПР.

При исследовании 5-летней выживаемости больных по Каплан-Мейер достоверную статистическую значимость показали следующие клиничко-морфологические и молекулярно-биологические параметры (в порядке убывания значимости признака): наличие регионарных и отдаленных метастазов ($p=0,00001$); ИОП нуклеофозмина/V23 ($p=0,00009$); размер опухоли ($p=0,0008$); экспрессия Ki-67 в опухолевых клетках ($p=0,001$); степень анаплазии по Fuhrman ($p=0,003$); плоидность клеток опухоли ($p=0,009$); митотический индекс ($p=0,01$); ИОП ММП-9 в опухоли ($p=0,02$). Не оказались значимыми такие прогностические факторы, как пол больных ($p=0,2$), возраст больных ($p=0,06$), клиническая стадия по TNM ($p=0,2$), ПМЦР в опухоли ($p=0,2$), экспрессия p53 в опухолевых клетках ($p=0,2$); экспрессия маркера vcl-2 в опухолевых клетках ($p=0,2$).



Кумулятивная пропорция 5-летней послеоперационной выживаемости больных СПР в зависимости от ИОП нуклеофозмина/V23.

Многофакторный регрессионный анализ выживаемости больных. Проведен многофакторный регрессионный анализ по Коксу для выявления независимых факторов прогноза СРП. В многофакторный анализ были введены все достоверно значимые данные, полученные при анализе 5-летней послеоперационной выживаемости больных (табл. 8).

Таблица 8. Результаты многофакторного регрессионного анализа влияния клиничко-морфологических и биомолекулярных параметров на выживаемость больных СРП

Факторы прогноза	β	Стандартная ошибка	t	p
ИОП белка нуклеофозмина/V23	3,93	1,21	3,23	0,001
Размер опухоли	0,85	0,79	1,06	0,29
Наличие метастазов	-2,92	1,03	-2,83	0,005
Степень анаплазии по Furrman	1,67	0,76	2,19	0,03
ИОП ММП-9	3,31	1,34	2,46	0,01
ИНДНК	-0,73	1,03	-0,70	0,48
Митотический индекс	1,34	0,89	1,51	0,13
ИМ Ki-67	-0,05	1,04	-0,05	0,96

Примечание: полужирным шрифтом выделены статистически достоверные параметры.

Проведение прогностического многофакторного регрессионного анализа выживаемости больных по Коксу позволило выявить значимые маркеры ($\chi^2=40,35$; $df=8$; $p=0,000001$). Значимыми маркерами оказались (в порядке убывания параметра t):

1. ИОП белка нуклеофозмина/V23 ($t=3,23$; $p=0,001$);
2. Наличие регионарных и отдаленных метастазов ($t=-2,83$; $p=0,005$);
3. ИОП ММП-9 ($t=2,46$; $p=0,01$);
4. Степень анаплазии по Furrman ($t=2,19$; $p=0,03$).

Таким образом, на основании многофакторного прогностического регрессионного анализа по Коксу клиничко-анатомических, молекулярно-биологических параметров показано, что ИОП нуклеофозмина в ядрышках опухолевых клеток является независимым фактором прогноза СРП, и поэтому может быть применен как дополнительный фактор при разработке прогностических моделей.

ВЫВОДЫ

1. По данным микроспектрофотометрического анализа, в ядрышках неизмененного эпителия почки интегральная оптическая плотность ядрышкового белка нуклеофозмина/V23 характеризуется невысокими значениями и в среднем составляет $496,7 \pm 19,8$ отн. ед. на 1 ядро (при модальном значении 450 отн. ед.). Интегральная оптическая плотность нуклеофозмина/V23 в опухолевых клетках светлоклеточного рака почки увеличена в 2,3 раза ($1023,6 \pm 56,7$ отн. ед. на 1 ядро, при модальном значении 871,7 отн. ед.).

2. Интегральная оптическая плотность нуклеофозмина/V23 коррелирует со стадией заболевания ($r=0,57$; $p=0,0001$) и размерами опухоли ($r=0,58$; $p=0,0001$): на III и IV стадиях и в опухолях большого размера (> 7 см) этот показатель увеличен (соответственно в 8,5 и 5,7 раза).

3. Плотность микроциркуляторного русла в светлоклеточном раке почки умеренно коррелирует с интегральной оптической плотностью нуклеофозмина/V23 ($r=0,48$; $p=0,0001$). При плотности микроциркуляторного русла < 35 сосудов в 5 полях зрения интегральная оптическая плотность нуклеофозмина/V23 достоверно снижена. Экспрессия ММП-9 в клетках опухоли положительно коррелирует с интегральной оптической плотностью нуклеофозмина/V23 ($r=0,53$; $p=0,005$).

4. Интегральная оптическая плотность нуклеофозмина/V23 положительно коррелирует с митотическим индексом ($r=0,71$; $p=0,0001$), ploидностью ($r=0,70$; $p=0,0001$) и индексом

мечения Ki-67 ($r=0,71$; $p=0,0001$). Увеличение интегральной оптической плотности нуклеофозмина/B23 свидетельствует о возрастании пролиферативной активности опухоли при светлоклеточном раке почки.

5. Интегральная оптическая плотность нуклеофозмина/B23 в клетках светлоклеточного рака почки положительно коррелирует с экспрессией супрессора апоптоза p53 ($r=0,86$; $p=0,0001$). В ядрышках эпителиальных клеток p53-позитивных и bcl-негативных опухолей интегральная оптическая плотность нуклеофозмина/B23 достоверно увеличена.

6. К неблагоприятным факторам прогноза 5-летней послеоперационной выживаемости больных относятся (в порядке убывания их значимости): наличие метастазов ($p=0,00001$); интегральная оптическая плотность нуклеофозмина/B23 ($p=0,00009$); размер опухоли ($p=0,0008$); экспрессия Ki-67 в опухолевых клетках ($p=0,001$); степень анаплазии по Fuhrman ($p=0,003$); плоидность клеток опухоли ($p=0,009$); митотический индекс ($p=0,01$); интегральная оптическая плотность ММП-9 в опухоли ($p=0,02$).

7. По данным многофакторного регрессионного анализа по Коксу, к независимым факторам прогноза течения светлоклеточного рака почки относятся (в порядке убывания параметра t): интегральная оптическая плотность нуклеофозмина/B23 ($t=3,23$; $p=0,001$); наличие метастазов ($t=2,83$; $p=0,005$); интегральная оптическая плотность ММП-9 ($t=2,46$; $p=0,01$); степень анаплазии по Fuhrman ($t=2,19$; $p=0,03$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Патоморфологическое исследование биопсийного и операционного материала при светлоклеточном раке почки наряду с традиционными методами должно включать определение экспрессии ядрышкового протеина нуклеофозмина/B23.

2. При определении активности нуклеофозмина/B23 в опухоли следует определять не только число меченых клеток, но и интегральную оптическую плотность белка в ядрышках.

3. При оценке прогноза светлоклеточного рака почки, наряду с традиционными факторами прогноза, в прогностические модели следует включать интегральную оптическую плотность нуклеофозмина/B23.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Бобров И.П., Черданцева Т.М., Климачев В.В., Лазарев А.Ф., Мяделец М.Н., Авдалян А.М. Прогностическое значение исследования экспрессии протеина нуклеофозмина/B23 при раке почки // Материалы X юбилейного конгресса Российского общества онкоурологов. – Москва, 2015. – С. 96 – 97.

2. Климачев В.В., Бобров И.П., Черданцева Т.М., Лазарев А.Ф., Мяделец М.Н., Авдалян А.М. Коэкспрессия белков нуклеофозмина/B23 и p53 при раке почки – неблагоприятный фактор прогноза // Материалы X юбилейного конгресса Российского общества онкоурологов. – Москва, 2015. – С. 103 – 104.

3. Черданцева Т.М., Бобров И.П., Климачев В.В., Лазарев А.Ф., Мяделец М.Н., Авдалян А.М. Недостаточность кровоснабжения вызывает гиперэкспрессию онконуклеофозмина/B23 в клетках рака почки // Материалы X юбилейного конгресса Российского общества онкоурологов. – Москва, 2015. – С. 116 – 117.

4. Бобров И.П., Черданцева Т.М., Климачев В.В., Лазарев А.Ф., Мяделец М.Н., Авдалян А.М. Прогностическое значение исследования экспрессии ядрышкового протеина нуклеофозмина/B23 при раке почки // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы патологической анатомии». – Новосибирск, 2015. – С. 44 – 46.

5. Бобров И.П., Черданцева Т.М., Климачев В.В., Лазарев А.Ф., Мяделец М.Н., Авдалян А.М. Гипоксия вызывает гиперэкспрессию онкопротеина нуклеофозмина/B23 в клетках

почечно-клеточного рака // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы патологической анатомии». – Новосибирск, 2015. – С. 46 – 48.

6. Бобров И.П., Черданцева Т.М., Мяделец М.Н., Климачев В.В., Лазарев А.Ф., Авдалян А.М., Казарцев А.В., Долгатов А.Ю. Влияние состояния неоангиогенеза на экспрессию нуклеофозмина/B23 и активность нуклеолярного аппарата клеток почечно-клеточного рака // **Современные проблемы науки и образования.** – 2015. – № 5. – <https://s.science-education.ru/pdf/2015/5/489.pdf>

7. Бобров И.П., Черданцева Т.М., Климачев В.В., Лазарев А.Ф., Мяделец М.Н., Авдалян А.М., Лушникова Е.Л. Прогностическая значимость определения экспрессии ядрышкового белка нуклеофозмина/B23 при раке почки // Высокие технологии в онкологической практике. 70 лет онкологической службе Алтайского края: материалы Российской научно-практической конф. с международным участием. – Барнаул, 2016. – С. 178 – 179.

8. Бобров И.П., Черданцева Т.М., Климачев В.В., Лазарев А.Ф., Мяделец М.Н., Авдалян А.М., Лушникова Е.Л. Роль гипоксии в гиперэкспрессии онкопротеина нуклеофозмина/B23 при почечно-клеточном раке // Высокие технологии в онкологической практике. 70 лет онкологической службе Алтайского края: материалы Российской научно-практической конференции с международным участием. – Барнаул, 2016. – С. 179 – 180.

9. Бобров И.П., Черданцева Т.М., Климачев В.В., Климачев И.В., Мяделец М.Н., Крючкова Н.Г., Авдалян А.М., Лепилов А.В., Лушникова Е.Л. Прогностическая значимость определения экспрессии ядрышкового белка нуклеофозмина/B23 при раке почки // Материалы V Съезда Российского общества патологоанатомов. – Челябинск, 2017. – С. 47 – 48.

10. Бобров И.П., Черданцева Т.М., Климачев В.В., Климачев И.В., Мяделец М.Н., Крючкова Н.Г., Авдалян А.М., Лепилов А.В., Лушникова Е.Л. Состояние ангиогенеза и экспрессия онкопротеина нуклеофозмина/B23 при почечно-клеточном раке // Материалы V съезда Российского общества патологоанатомов. – Челябинск, 2017. – С. 48 – 49.

11. Bobrov I.P., Cherdantseva T.M., Myadelets M.N., Lepilov A.V., Klimachev I.V., Dolgатов A.Yu., Lazarev A.F., Avdalyan A.M. Morphofunctional activity of nucleolar apparatus and protein nucleophosmin/B23 for localized and metastatic renal cell carcinoma // XXXVII international scientific and practical conference «International scientific review of problems and prospects of modern science and education» // International Scientific Review (Boston, USA). – 2017. – Vol. 39, № 8. – P. 47 – 53.

12. Bobrov I.P., Cherdantseva T.M., Myadelets M.N., Lepilov A.V., Klimachev I.V., Dolgатов A.Yu., Lazarev A.F., Avdalyan A.M. Influence condition of neoangiogenesis at expression of protein nucleophosmin/B23 and activity nucleolar apparatus of renal cells cancer / XXXVII International scientific and practical conference «International scientific review of problems and prospects of modern science and education» // International Scientific Review (Boston, USA). – 2017. – Vol. 39, № 8. – P. 53 – 58.

13. Бобров И.П., Черданцева Т.М., Мяделец М.Н., Климачев И.В., Климачев В.В., Долгатов А.Ю., Лепилов А.В., Авдалян А.М., Лазарев А.Ф., Таранина Т.С. Плотность распределения Т-лимфоцитов в опухоли и ангиогенез при светлоклеточном раке почки // Вестник научных конференций. – 2018. – № 4 – 1. – С. 19 – 21.

14. Черданцева Т.М., Бобров И.П., Казарцев А.В., Мяделец М.Н., Климачев И.В., Авдалян А.М., Круглова Н.М., Климачев В.В. Прогностическое значение активности ММП-9 в 5-летней послеоперационной выживаемости пациентов с раком почки // Материалы X Съезда онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии памяти академика Н.Н. Трапезникова // Евразийский онкологический журнал. – 2018. – Т. 6, № 1. – С. 253.

15. Бобров И.П., Черданцева Т.М., Мяделец М.Н., Климачев И.В., Климачев В.В., Лепилов А.В., Долгатов А.Ю., Авдалян А.М., Лушникова Е.Л., Молодых О.П. Влияние процессов неоангиогенеза и морфофункциональной активности проангиогенных факторов на экспрессию нуклеофозмина/B23 при светлоклеточном раке почки // Вестник научных конференций. – 2018. – № 8 – 2 (36). – С. 18 – 21.

16. Бобров И.П., Черданцева Т.М., Мяделец М.Н., Климачев И.В., Климачев В.В., Лепилов А.В., Долгатов А.Ю., Авдалян А.М., Лушникова Е.Л., Молодых О.П. Прогностическое значение экспрессии ядрышкового белка нуклеофозмина/B23 при светлоклеточном раке почки // Вестник научных конференций. – 2018. – № 8 – 2 (36). – С. 21 – 24.

17. Черданцева Т.М., Бобров И.П., Варламов С.В., Мяделец М.Н., Климачев И.В., Авдалян А.М., Ганов Д.И., Лазарев А.Ф. Прогностическое значение исследования матриксной металлопротеиназы-9 при почечно-клеточном раке // **Онкоурология.** – 2018. – № 3. – С. 17 – 24.

18. Бобров И.П., Черданцева Т.М., Климачев В.В., Климачев И.В., Мяделец М.Н., Лепилов А.В., Долгатов А.Ю., Лазарев А.Ф., Авдалян А.М. Прогностическое значение экспрессии ядрышкового протеина нуклеофозмина/B23 при светлоклеточном раке почки // Материалы XIII Международного конгресса Российского общества онкоурологов. – Москва, 2018. – С. 72 – 73.

19. Bobrov I.P., Cherdanceva T.M., Myadelec M.N. Morphofunctional activity of nucleolar apparatus and protein nucleophosmin/B23 for localized and metastatic renal cell carcinoma // Scientific research of the SCO countries: Synergy and integration. – Beijing, China, 2018, Pt 1. – P. 148 – 153.

20. Бобров И.П., Мяделец М.Н., Климачев И.В., Долгатов А.Ю., Лепилов А.В., Черданцева Т.М., Крючкова Н.Г., Авдалян А.М., Лушникова Е.Л., Молодых О.П. Онкопротеин нуклеофозмин/B23 при светлоклеточном раке почки: взаимосвязи с клинико-анатомическими факторами прогноза // Бюллетень медицинской науки. – 2019. – № 1. – С. 26 – 32.

21. Myadelec M.N., Bobrov I.P., Lepilov A.V. Oncoprotein nucleophosmin/B23 in the presence of renal clear cell carcinoma: clinical-anatomical factors of prognosis // Materials of the International Conference «Process Management and Scientific Developments». – Birmingham, United Kingdom, 2019. – P. 69 – 78.

Соискатель

Мяделец М.Н.