

ИМУНОХИСТОХИМИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЕКСПРЕСИЯТА НА НИСКОМОЛЕКУЛНИТЕ БЕЛТЪЦИ НА СТРЕСА - alphaB-crystallin И Hsp27 - ПРИ ПЪРВИЧНИ БЕЛОДРОБНИ КАРЦИНОМИ

оригинални
статии

Торакална Медицина
Том IV, март 2012, бр.1

Д. Маринова¹, Я. Славова¹, Н. Трифонова², Вл. Максимов¹, Д. Петров¹

Специализирана болница за активно лечение по белодробни болести „Св. София”,

Медицински университет, София¹

Катедра по биология, Медицински факултет, Медицински университет, София²

Резюме

Белтъците на топлинния стрес – Hsp, са с основна функция да променят структурата и взаимодействието между други белтъци. AlphaB-crystallin и Hsp27 са свръхекспресирани при редица тумори при човека и са свързани с пролиферацията, диференциацията, инвазията, метастазирването, клетъчната смърт и разпознаването от имунната система. Целта на настоящето изследване е да се проучи експресията на стресовите протеини alphaB-crystallin и Hsp27 при малигнен епителни белодробни тумори, като се направи опит да се изясни участието им в канцерогенезата.

Изследването включи 105 пациента (72 мъже и 33 жени; средна възраст 56.7 ± 12.3 г.), претърпели оперативно лечение за първични белодробни карциноми – 35 карциноидни тумора (КТ), 20 дребноклетъчни белодробни карциноми (ДКБК), 10 едроклетъчни невроендокринни карциноми (ЕКНЕК), 20 аденокарциноми (АК), 20 плоскоклетъчни карциноми (ПК). Използвани методи: клинично-патологични – хистологичен вид на тумора, Т-статус, N-статус, pTNM-стадий на болестта; имунохистохимични – експресия на alphaB-crystallin и Hsp27; и статистически за обработка на получената информация.

Hsp27 се експресира цитоплазмено при почти всички изследвани белодробни карциноми (97%), което показва, че този белтък играе основна роля в канцерогенезата им. По-важна в случая се оказва ядрената му експресия, която показва различни нива при различните белодробни карциноми – най-изразена при ЕКНЕК, ДКБК, ПК и АК ($p < 0.001$). Hsp27 е потенциална мишена за таргетна терапия при белодробните карциноми.

AlphaB-crystallin се експресира ядрено при 99% от туморите, а цитоплазмено – при 23%. Наблюдават се статистически значими корелации между нивата на количествена ядрена експресия на alphaB-crystallin и наличието на метастази в лимфни възли ($p < 0.001$), стадия ($p = 0.02$), и големината на туморите ($p = 0.04$). Между нивата на цитоплазмена експресия на маркера и стадия също има статистическа зависимост – позитивните тумори са по-често в по-ранен стадий, докато негативните нарастват с покачване на стадия ($p < 0.001$). Тези резултати водят до заключение за основната роля на нискомолекулните белтъци на топлинния стрес в канцерогенезата на белодробните карциноми.

Ключови думи: белтъци на топлинния стрес, белодробен карцином, Hsp27, alphaB-crystallin, имунохистохимия.

IMMUNOHISTOCHEMICAL EXAMINATION OF LOW WEIGHT HEAT SHOCK PROTEINS - alphaB- crystallin AND Hsp27 – EXPRESSION IN PRIMARY LUNG CARCINOMAS

original
articles

IMMUNOHISTOCHEMICAL
EXAMINATION OF LOW WEIGHT HEAT
SHOCK PROTEINS - alphaB-crystallin
AND Hsp27 – EXPRESSION IN
PRIMARY LUNG CARCINOMAS

Thoracic Medicine
Volume IV, March 2012, Issue 1

D. Marinova¹, Y. Slavova¹, N. Trifonova², Vl. Maksimov¹, D. Petrov¹

University hospital for pulmonary diseases "Saint Sofia", Medical University – Sofia¹

Department of biology, Medical faculty, Medical University – Sofia²

Abstract

Main function of heat shock proteins (Hsp) is to change the structure and interactions between other proteins. Overexpression of alphaB-crystallin and Hsp27 is found in number of tumors and is connected with proliferation, differentiation, invasion, metastasis, apoptosis and immune recognition. The aim of this study is to investigate the expression of stress proteins alphaB-crystallin and Hsp27 in malignant epithelial tumors, as we attempt to clarify their involvement in carcinogenesis.

Specimens from surgical resections of 105 patients (72 men, 33 women; age 56.7 ± 12.3) who underwent radical operation for primary lung cancer were investigated – 35 carcinoid tumors, 20 small cell lung carcinomas (SCLC), 10 large cell neuroendocrine carcinomas (LCNEC), 20 adenocarcinomas (AC), 20 squamous cell carcinomas (SCC). Methods: clinico-pathological – histological type, T-status, N-status, pTNM stage; immunohistochemical – expression of alphaB-crystallin and Hsp27; and statistical.

Cytoplasmic expression of Hsp27 was found in almost every examined lung carcinoma (97%), pointing out the main role of this protein in their cancerogenesis. Nuclear expression of Hsp27 is more important with different levels among different lung carcinomas – mostly in LCNEC, SCLC, SCC, and AC ($p < 0.001$). Hsp27 is a potential target for targeted therapy in lung cancer.

Nuclear expression of alphaB-crystallin is found in 99% of tumors, and cytoplasmic expression – in 23%. There is a statistically significant correlation between nuclear expression of alphaB-crystallin and lymph node metastasis ($p < 0.001$), stage ($p = 0.02$), and size of the tumors ($p = 0.04$). There is a statistically significant correlation between cytoplasmic expression of alphaB-crystallin and stage – expressing tumors are more often in earlier stage, and negative tumors are more in advanced stage ($p < 0.001$). We conclude that low weight heat shock proteins play a major role in cancerogenesis of lung cancer.

Key terms: heat shock proteins, lung cancer, Hsp27, alphaB-crystallin, immunohistochemistry

оригинални статии

ИМУНОХИСТОХИМИЧНО
ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЕКСПРЕСИЯТА НА
НИСКОМОЛЕКУЛНИТЕ БЕЛТЪЦИ НА
СТРЕСА - alphaB-crystallin И Hsp27 -
ПРИ ПЪРВИЧНИ БЕЛОДРОБНИ
КАРЦИНОМИ

Торакална Медицина
Том IV, март 2012, бр.1

Въведение:

Клиничното протичане на белодробните тумори се обуславя от техните хистоморфологични и биологични особености. Прогнозата на пациентите с белодробни тумори се свързва с определени клинично-патологични показатели – хистологичния вид на тумора, степента на диференциация, големина на тумора (Т-статус), наличие на метастази в регионални лимфни възли (N-статус) и pTNM-стадий на болестта (6, 8). Посочените показатели, обаче невинаги са достатъчни за пълното и обективно оценяване на белодробните тумори, което налага по-дълбочени проучвания на имунохистохимични и генетични показатели, които биха могли да служат като маркери за определяне на биологичното поведение на тези тумори (11).

Различни фактори (хипертермия, хипоксия, тежки метали, етанол, свободни радикали, инфекциозни агенти, промяна на pH, недостиг на глюкоза и растежни фактори) водят до стрес на клетките (5). Резултат от въздействието на стреса е денатурация и агрегация на различни клетъчни протеини (3), и активиране на т.нар. стресови гени (7). Стресовите протеини се синтезират в условия на клетъчен стрес и се означават като Hsp (Heat shock proteins), а гените отговорни за тяхното синтезиране – стресови гени – Hsp. Концентрацията на протеините – продукти на тези гени, се увеличава в отговор на стресовите фактори, като по този начин се предпазват клетките от разрушителните ефекти на стреса и се ускорява възстановяването им чрез подпомагане ренатурацията на частично денатурираните протеини (9).

Семейството на Hsp се състои от белтъци с общата функция на молекулни „преносители“ (molecular shaperon), т.е. белтъци, способни да променят структурата и взаимодействието между други белтъци (2). Съществуват литературни данни за ролята на AlphaB-crystallin и Hsp27 в патологията на рака. Hsp са свръхекспресирани при редица тумори при човека и са свързани с пролиферацията на туморните клетки, диференциацията, инвазията, метастазирането, клетъчната смърт и разпознаването от имунната система (2).

Целта на нашето изследване е да се проучи експресията на стресовите протеини alphaB-crystallin и Hsp27 при малигнени епителни белодробни тумори, като се направи опит да се изясни участието им в канцерогенезата.

Материал и методи:

Обектът на имунохистохимичното изследване включи общо 105 пациента, претърпели оперативно лечение в различен обем, за малигнени епителни белодробни тумори в Клиниката по гръдна хирургия (КГХ) към СБАЛББ „Св. София“ за периода от април 2008г. до декември 2011г. Пациентите са на средна възраст 56.7 ± 12.3 години в диапазона от 18 до 76 години (64% от пациентите са между 50 и 69 години). Изследвани са 72 мъже (69%) и 33 жени (31%).

Introduction:

The lung cancer clinical course is determined by its histological and biological features.

The prognosis in lung cancer patients is associated by certain clinico-pathological features – histological type, grade, T-status, N-status, and pTNM stage (6, 8). These features are not always sufficient for complete and objective assessment of lung tumors which requires in-depth studies of immunohistochemical and genetic indicators that could serve as markers for determining the biological behavior of these tumors (11).

Various factors (such as hyperthermia, hypoxia, heavy metals, ethanol, free radicals, infectious agents, changing in the pH, lack of glucosis, and growth factors) lead to stress of the cell (5). The result is denaturation and aggregation of various cellular proteins (3) and activation of the so called stress genes - Hsp (7). Under the conditions of stress are synthesized the so called heat shock proteins (Hsp). The concentration of proteins - products of these genes is increased in response to stressors, thus protecting the cells from the damaging effects of stress and accelerating recovery by helping renaturation of partially denatured proteins (9).

The Hsp family comprises of proteins with common function as molecular chaperons – proteins involved in the change of the structure of other proteins and in the protein-protein interactions (2). AlphaB-crystallin and Hsp27 have a role in cancer. Hsp is overexpressed in different tumors and is connected with tumor cell proliferation, differentiation, invasion, metastasis, apoptosis, and recognition by the immune system (2).

The aim of our study is to investigate the expression of stress proteins alphaB-crystallin and Hsp27 in malignant epithelial tumors, as we attempt to clarify their involvement in carcinogenesis.

Material and methods:

105 patients were investigated after they underwent surgical treatment for primary lung cancer in the Ward of Thoracic Surgery (WTS), University Hospital for Pulmonary Diseases “St. Sofia”, from April 2008 to December 2011. The patients are with mean age 56.7 ± 12.3 years, ranging from 18 to 76 years (64% - in the range 50-69 years). 72 men (69%) and 33 women (31%) were investigated.

Използвани са няколко основни метода на изследване: клинично-патологични – хистологичен вид на тумора, T-статус, N-статус, pTNM-стадий на болестта; имунохистохимични – експресия на alphaB-crystallin и Hsp27; и статистически за обработка на получената информация.

Хистологичният вид на тумора е определен съгласно последната, четвърта класификация на малигнените епителни тумори на белия дроб на Световната здравна организация (C30) от 2004 г. (11). Всички изследвани тумори са типизирани морфологично в Отделението по Патоморфология към СБАЛББ „Св. София“ (Табл. 1).

Таблица 1. Хистологична характеристика на изследваните случаи.

Хистологичен вид на тумора	Брой
Плоскоклетъчен карцином	20
Аденокарцином	20
Типичен и атипичен карциноиди	35
Дребноклетъчен карцином	20
Едроклетъчен невроендокринен карцином	10
Общ брой	105

T-статус - размерите на първичния тумор са определени в сантиметри, като се измерва най-големия диаметър на туморния възел на фиксиран във формалин материал. В зависимост от двата фактора – големина на тумора и наличие или липса на инвазия на съседни структури, са определени четири T-категории според ревизираната международна класификация за стадиране на белодробния карцином.

N-статус - степента на ангажиране на регионалните лимфни възли е определена след операция чрез хистологично изследване на резецираните лимфни възли. След оперативната интервенция е определен хирургично-патологичен стадий – “pTNM” стадий на болестта, съобразно TNM класификацията от Ревизираната международна система за стадиране на белодробния карцином (10).

Имунохистохимичното изследване се провежда с полимер-базираната визуализираща система EnVision™ FLEX Mini Kit, High pH (Dako, code № K8024).

Принцип: Имунохистохимичната оцветяваща техника позволява визуализация на тъканни и клетъчни антигени. Тази техника се основава на имунореактивността на антителата и химичните свойства на ензимите или ензимните комплекси, които реагират с безцветни субстрат-хромогени, и образуват цветен краен продукт. Понастоящем се използва индиректен метод за визуализация, включващ две стъпки, като най-общо ензим-маркирано вторично антитяло реагира с антиген-свързаното първично антитяло. Най-модерният метод е двуетапният полимер-базиран EnVision™. Тази полимерна система включва декстранов „скелет“, към който са прикрепени множество ензимни молекули, както и вторични антитела с анти-миша, и анти-заешка имуноглобулинова специфичност. Тази универсална система може да се използва за детекция, на което и да е тъканно-свързано първично антитяло от заешки или миши произход.

Methods used: clinico-pathological – histological type, T-status, N-status, pTNM stage; immuno-histochemical – expression of alphaB-crystallin and Hsp27; and statistical.

The histological type of the tumors was determined according to the last, 4th classification of malignant epithelial tumors of the lung of the World Health Organization (WHO) 2004 (11). All tested tumors were morphologically studied in the Department of Pathology, University Hospital for Pulmonary Diseases "St. Sofia" (Tab. 1).

Tab. 1. Histology.

Histological type	Number
Squamous cell cancer	20
Adenocarcinoma	20
Carcinoids	35
Small cell lung cancer	20
Large cell neuroendocrine cancer	10
Total	105

T-status – the size of the primary tumor is defined in centimeters by measuring the largest diameter of the tumor node on formalin fixed material. Depending on two factors – tumor size and presence/absence of invasion of adjacent structures, four categories were identified according to the revised international classification for staging of lung cancer.

N-status - extent of involvement of regional lymph nodes after surgery was determined by histologic examination of resected lymph nodes. The pTNM stage is determined according to the TNM classification of the revised international system for staging lung cancer (10).

The immunohistochemical staining is performed with the polymer-based EnVision™ FLEX Mini Kit, High pH (Dako, code № K8024).

Principle: the immunohistochemical staining technique allows visualization of tissue and cellular antigens. This technique is based on the immunoreactivity of antibodies and chemical properties of enzymes or enzyme complexes, which react with colorless substrate-chromogens to form a colored end product. Currently we use indirect method for visualization, involving two steps, the enzyme-labeled secondary antibody reacts with antigen-related primary antibody. The most modern method is the two-step polymer-based EnVision™. It includes a dextran “skeleton” to which are attached multiple enzyme molecules, and anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies. This universal system can be used to detect any rabbit or mouse tissue-associated primary antibody.

original
articles

IMMUNOHISTOCHEMICAL
EXAMINATION OF LOW WEIGHT HEAT
SHOCK PROTEINS - alphaB-crystallin
AND Hsp27 – EXPRESSION IN
PRIMARY LUNG CARCINOMAS

Thoracic Medicine
Volume IV, March 2012, Issue 1

оригинални статии

ИМУНОХИСТОХИМИЧНО
ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЕКСПРЕСИЯТА НА
НИСКОМОЛЕКУЛНИТЕ БЕЛТЪЦИ НА
СТРЕСА - α -crystallin И Hsp27 -
ПРИ ПЪРВИЧНИ БЕЛОДРОБНИ
КАРЦИНОМИ

Торакална Медицина
Том IV, март 2012, бр.1

Процедура: Основните етапи на процедурата включват – тъканните срези (с дебелина 4 μ m, върху полилизиново стъкло) се депарафинират в ксилол и рехидратират в низходяща редица алкохоли, след което се извършва антигенно възстановяване с апарат PT Link по протокол на производителя (предварително загряване до 65°C, след което покачване на температура до 95°C, 20 min на 95°C, охлаждане до 65°C). Следва промиване с разтвор на миеш буфер и на капване на разтвор блокиращ пероксидазната активност за 5 min, промиване с миеш буфер двукратно, на капване на първичното анти тяло (Табл. 2) за 20 min, промиване двукратно, на капване и инкубация на срезите с уникален ензимно-конюгиран полимер, носещ молекулите на вторичното анти тяло, промиване трикратно с миеш буфер, на капване и инкубиране с хромогена-проявител – 3,3-диаминобензидин за 8 min. Следва промиване с буфер и дестилирана вода, контраоцветяване с хематоксилин, дехидратиране във възходяща редица алкохоли и включване на препаратите с поставяне на покривно стъкло.

Procedure: The main stages of the procedure include – formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections (4 μ m thickness, on polylysine slides) are deparaffinised in hylene and hydrated through graded ethanol, followed by heat-induced epitope retrieval (HIER) with Dako PT Link by protocol of the producer (pre-heating temperature 65°C, procedure temperature 95°C, 20 minutes incubation time, cool to temperature 65°C). This procedure is followed by washing the slides with wash buffer (Tris-buffered saline solution containing Tween 20), after that 5 minutes incubation with peroxidase-blocking reagent, wash with wash buffer twice, 20 minutes incubation with primary antibodies (Tab. 2), wash buffer 2x, 20 minutes incubation with HRP detection reagent (dextran backbone to which a large number of peroxidase (HRP) molecules and secondary antibody molecules have been coupled); wash buffer 3x, 8 minutes incubation with diaminobenzidine (DAB) solution, wash buffer once, distilled water once, counterstaining with hematoxylin, dehydration in grading ethanol and permanent mounting.

Таблица 2. Приложени анти теля:

Анти теля	Код №	Фирма	Клона лност	Клон	Инку бация
p- α -crystallin (hSer 59)-R	Sc-22509-R	St. Cruz Bio	rabbit polyclonal	-	20 минути
Hsp27	Sc-13132	St. Cruz Bio	mouse monoclonal	F-4	20 минути

Tab. 2. Primary antibodies:

Antibody	№	Producer	Clonality	Clone	Incubation
p- α -crystallin (hSer 59)-R	Sc-22509-R	St. Cruz Bio	rabbit polyclonal	-	20 minutes
Hsp27	Sc-13132	St. Cruz Bio	mouse monoclonal	F-4	20 minutes

При всяка серия реакции са прилагани и негативни контроли, при които вместо първично анти тяло е използван нормален заешки или миши серум. Използвани бяха и позитивни контроли – вътрешни и външни, съответни за всяко използвано анти тяло.

p- α -crystallin и Hsp27 са концентрирани анти теля, които преди употреба се разреждат. В случая бяха използвани разреждания 1:300.

Отчитането на имунохистохимичните реакции се извърши в Отделението по Патоморфология към СБАЛББ „Св.София“. Използва се микроскоп на фирмата Carl Zeiss. Количествените измервания се извършиха на увеличение x20 за обектив, и x10 за окуляр. За позитивна реакция се прие тази, при която се наблюдава червено-кафяво оцветяване на определени клетъчни участъци, в зависимост от локализацията на търсения антиген (Табл. 3).

При p- α -crystallin бе наблюдавана основно ядрена, но и цитоплазмена експресия. Оцени се по скала чрез изброяване средно на 500 карциномни клетки за всеки препарат: 0–25% - 1 – с малък брой (нисък процент) позитивни клетки; 26–50% - 2; 51–75% - 3; 76–100% - 4 – с голям брой (висок процент) позитивни клетки. Оцветяването се определи и в зависимост от интензитета като: 0 – липса, 1 – слабо, 2 – умерено или 3 – интензивно. Направи се количествена оценка и на цитоплазмената локализация на антигена, подобно на ядрената експресия на антигена.

Negative controls are applied in each series of reactions by omitting the primary antibody, and instead of it we used normal rabbit or mouse serum. We used also positive controls – internal and external, for each antibody used. As p- α -crystallin and Hsp27 are concentrated antibodies we diluted them before use. In the case were used dilutions 1:300. The evaluation of immunohistochemical reactions was done in the Department of Pathology, University Hospital for Pulmonary Diseases “St. Sofia” by Prof. Yanina Slavova. She examined the slides by light microscopy (Carl Zeiss), magnification x20, x10. For a positive reaction was considered that where there is red-brown staining of certain cell sites, depending on the location of the desired antigen (Tab. 3).

Expression of p- α -crystallin is observed mainly in the nucleus but also in the cytoplasm of the tumor cells. It was evaluated (nuclear and cytoplasmic) by counting an average number of 500 tumor cells for each section: 0–25% - 1 – a small number (low rate) of positive cells; 26–50% - 2; 51–75% - 3; 76–100% - 4 – a large number (high rate) of positive cells. The staining intensity was classified as: 0 – no staining; 1 – weak; 2 – moderate, or 3 – intensive.

Таблица 3. Локализация на изследваните антигени в клетката.

Антитела	Характеристика	Локализация на имуно-хистохимичната реакция
p-alphaB-crystallin (hSer 59)-R	Семейство белтъци индуцирани от топлинния стрес и играещи ролята на молекулни преносители, като поддържат в разтворено състояние денатурираните белтъци. MAPKAPK-2, субстрат на p38 MAPK, фосфорилира alphaB-crystallin на Серин 59, с което го активира. Антиапоптотично действие.	ядрена/цитоплазмена
Hsp27	Белтък, постоянно експресиран в цитоплазмата, който при стрес се открива и в ядрото. Изпълнява ролята на молекулен шаперон (преносител). Антиапоптотично действие.	цитоплазмена/ядрена

Tab. 3. Localization.

Antibody	Features	Localization
p-alphaB-crystallin (hSer 59)-R	Family of induced by stress proteins, playing a role as molecular chaperons by maintaining in solution denaturated proteins. The p38 MAPK substrate, MAPKAPK-2, activates alphaB-crystallin by phosphorylation on serine 59. Antiapoptotic protein.	nuclear/cytoplasmic
Hsp27	A protein expressed in the cytoplasm, found also in the nucleus upon stress. Molecular chaperon. Antiapoptotic protein.	cytoplasmic/nuclear

При Hsp27 бе наблюдавана основно цитоплазмена, но и ядрена експресия. Оцени се по скала чрез изброяване средно на 500 карциномни клетки за всеки препарат: 0–25% - 1 – с малък брой (нисък процент) позитивни клетки; 26–50% - 2; 51–75% - 3; 76–100% - 4 – с голям брой (висок процент) позитивни клетки. Оцветяването се определя и в зависимост от интензитета като: 0 – липса, 1 – слабо, 2 – умерено или 3 – интензивно. Направи се преценка и на ядрената локализация на антигена.

Получените резултати се обработиха със статистическата програма SPSS v.13.0, на операционна система Windows Vista.

Резултати:

Големина на тумора, Т-статус (Таблица 4).

- карциноидни тумори – средната големина на туморите е 2.8+/-1.2 cm, като варира между 0.5 cm и 5.3 cm. При 24 случая (68.6%) туморът е с размери 3 cm и под 3 cm, в 11 случая (31.4%) големината на карцинома надвишава 3 cm. При карциноидните тумори преобладават тези с T1 и T2 статус (86%).
- ДКБК – средната големина на туморите е 5.5 +/- 3.3 cm, като варира между 1.5 cm и 13,5 cm. При 7 случая (35%) туморът е с размери 3 cm и под 3 cm, в 6 случая (30%) големината на карцинома е между 3 и 7 cm, а в 7 случая (35%) е с големина над 7 cm. При пациентите с дребноклетъчен карцином преобладават тези с T3 и T4 статус – 9 пациента (45%).
- ЕКНЕК – средната големина на туморите е 6.2 +/- 3.4 cm, като варира между 2.5 cm и 14 cm. При 2 случая (20%) туморът е с размери 3 cm и под 3 cm, в 5 случая (50%) големината на карцинома е между 3 и 7 cm, а в 3 случая (30%) надхвърля 7 cm. Преобладават пациентите с T2 статус – 5 броя.
- АК – средната големина на туморите е 4.4 +/- 2.1 cm, като варира между 1.3 cm и 8.5 cm. При 6 случая (30%) туморът е с размери 3 cm и под 3 cm, в 11 случая (55%) големината на карцинома е между 3 и 7 cm, а в 3 случая (15%) е с големина над 7 cm. При пациентите с аденокарциноми преобладават тези с T2 статус – 11 пациента (55%).
- ПК – средната големина на туморите е 5.1 +/- 2.5 cm, като варира между 0.8 cm и 13 cm. При 3

Expression of Hsp27 is observed mainly in the cytoplasm but also in the nucleus of the tumor cells. It was evaluated (nuclear and cytoplasmic) by counting an average number of 500 tumor cells for each section: 0–25% - 1 – a small number (low rate) of positive cells; 26–50% - 2; 51–75% - 3; 76–100% - 4 – a large number (high rate) of positive cells. The staining intensity was classified as: 0 – no staining; 1 – weak; 2 – moderate, or 3 – intensive.

Statistical analyses were performed by using the SPSS v.13.0, Windows Vista.

Results:

T-status (Tab. 4)

- carcinoids – average size of tumors is 2.8 ±1.2 cm, ranging between 0.5 cm and 5.3 cm. In 24 cases (68.6%) tumor size is ≤3 cm, in 11 cases (31.4%) >3 cm. In carcinoids those with T1 and T2 status prevail (86%).
- SCLC – average size of tumors is 5.5 ±3.3 cm, ranging between 1.5 cm and 13.5 cm. In 7 cases (35%) size is ≤3 cm, in 6 cases (30%) size between 3 and 7 cm, and in 7 cases (35%) size >7 cm. In patients with SCLC those with T3 and T4 status prevail (45%).
- LCNEC – average size of tumors is 6.2 ±3.4 cm, ranging between 2.5 cm and 14 cm. In 2 cases (20%) tumor size is ≤3 cm, in 5 cases (50%) - between 3 and 7 cm, and in 3 cases (30%) >7cm. The patients with T2 status preveil.
- adenocarcinoma – average size of tumors is 4.4 ±2.1 cm, ranging between 1.3 cm and 8.5 cm. In 6 cases (30%) tumor size is ≤3 cm, in 11 cases (55%) – between 3 and 7 cm, and in 3 cases (15%) >7 cm. The patients with T2 status preveil (55%).
- SCC – average size of tumors is 5.1 ±2.5 cm, ranging between 0.8 cm and 13 cm. In 3 cases (15%)

original
articles

IMMUNOHISTOCHEMICAL
EXAMINATION OF LOW WEIGHT HEAT
SHOCK PROTEINS - alphaB-crystallin
AND Hsp27 – EXPRESSION IN
PRIMARY LUNG CARCINOMAS

Thoracic Medicine
Volume IV, March 2012, Issue 1

оригинални статии

ИМУНОХИСТОХИМИЧНО
ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЕКСПРЕСИЯТА НА
НИСКОМОЛЕКУЛНИТЕ БЕЛТЪЦИ НА
СТРЕСА - alphaB-crystallin И Hsp27 -
ПРИ ПЪРВИЧНИ БЕЛОДРОБНИ
КАРЦИНОМИ

Торакална Медицина
Том IV, март 2012, бр.1

случая (15%) туморът е с размери 3 cm и под 3 cm, в 13 случая (65%) големината на карцинома е между 3 и 7 cm, а в 4 случая (20%) е с големина над 7 cm. При пациентите с плоскоклетъчен карцином преобладават тези с T2 статус – 13 пациента (65%).

При сравняване на различните хистологични видове тумори на база големина на тумора (под 3 cm, между 3-7 cm и над 7 cm) се установи статистически значима разлика (Pearson Chi-Square 28.1, $p < 0.001$).

Метастazi в регионални лимфни възли, N-статус.

- карциноиди – в 32 (91.4%) случая не се установяват метастази в регионалните лимфни възли. В останалите 3 (8.6%) случая се доказват метастази в регионалните лимфни възли – ипсилатерални медиастинални и/или субкаринални лимфни възли (N2).

- ДКБК – в 13 (65%) случая не се установяват (интраоперативно и хистологично) метастази в регионалните лимфни възли. В останалите 7 (35%) случая се доказват метастази в регионалните лимфни възли, като само при един (5%) болен се касае за N1 – наличие на метастази в перибронхиални или в хилусни ипсилатерални лимфни възли. При 6 (30%) пациенти се касае за N2 – наличие на метастази в ипсилатерални медиастинални и субкаринални лимфни възли.

- ЕКНЕК – в 8 (80%) случая не се установяват (интраоперативно и хистологично) метастази в регионалните лимфни възли. В останалите 2 (20%) случая се доказват метастази в регионалните лимфни възли, касае се за 1 случай с N1 и 1 случай с N2.

- АК – в 10 (50%) случая не се установяват (интраоперативно и хистологично) метастази в регионалните лимфни възли. В останалите 10 (50%) случая се доказват метастази в регионалните лимфни възли, като само при един (5%) болен се касае за N1 – наличие на метастази в перибронхиални или в хилусни ипсилатерални лимфни възли. При 9 (45%) пациенти се касае за N2 – наличие на метастази в ипсилатерални медиастинални и субкаринални лимфни възли.

tumor size is ≤ 3 cm, in 13 cases (65%) between 3 and 7 cm, and in 4 cases (20%) > 7 cm. The patients with T2 status prevail (65%).

There is a statistically significant difference in tumor size between different lung cancer histological types (Pearson Chi-Square 28.1, $p < 0.001$).

N-status

- carcinoids – in 32 (91.4%) cases no histological evidence of metastasis in regional lymph nodes is found. In the remaining 3 (8.6%) cases there is a histological evidence of lymph node metastasis – in ipsilateral mediastinal or/and in subcarinal lymph nodes (N2).

- SCLC – in 13 (65%) cases no histological evidence of metastasis in regional lymph nodes is found. In the remaining 7 (35%) cases there is metastasis in regional lymph nodes – in one (5%) case with N1 – metastasis in ipsilateral hilar lymph nodes; and in 6 (30%) cases with N2 – in ipsilateral mediastinal or/and in subcarinal lymph nodes.

- LCNEC – in 8 (80%) cases no histological evidence of metastasis in regional lymph nodes is found. In the remaining 2 (20%) cases there is metastasis in regional lymph nodes – 1 case with N1 and 1 case with N2.

- adenocarcinoma – in 10 (50%) cases no histological evidence of metastasis in regional lymph nodes is found. In the remaining 10 (50%) cases there is metastasis in regional lymph nodes – 1 case with N1 (5%) and 9 cases (45%) with N2.

Таблица 4. Разпределение на изследваните пациенти с белодробни тумори по T-статус, N-статус, pTNM-стадий, брой случаи, процент.

			Карциноиди	ДКБК	ЕКНЕК	АК	ПК	Общо
T статус	T1	Брой	14	4	2	4	1	25
		%	40,0%	20,0%	20,0%	20,0%	5,0%	23,8%
	T2	Брой	16	7	5	11	13	52
		%	45,7%	35,0%	50,0%	55,0%	65,0%	49,5%
N статус	T3+T4	Брой	5	9	3	5	6	28
		%	14,3%	45,0%	30,0%	25,0%	30,0%	26,7%
	N0	Брой	32	13	8	10	10	73
		%	91,4%	65,0%	80,0%	50,0%	50,0%	69,5%
pTNM стадий	N1	Брой	0	1	1	1	0	3
		%	,0%	5,0%	10,0%	5,0%	,0%	2,9%
	N2	Брой	3	6	1	9	10	29
		%	8,6%	30,0%	10,0%	45,0%	50,0%	27,6%
I стадий	I стадий	Брой	25	7	4	8	8	52
		%	71,4%	35,0%	40,0%	40,0%	40,0%	49,5%
	II стадий	Брой	7	4	5	2	1	19
		%	20,0%	20,0%	50,0%	10,0%	5,0%	18,1%
III+IV стадий	III+IV стадий	Брой	3	9	1	10	11	34
		%	8,6%	45,0%	10,0%	50,0%	55,0%	32,4%
	Общо	Брой	35	20	10	20	20	105

Tab. 4. Distribution of studied patients with different histological types of lung cancer by T-status, N-status, pTNM-stage, number, percent.

			Carcinoids	SCLC	LCNEC	Adenoc.	SCC	Total
T status	T1	N	14	4	2	4	1	25
		%	40,0%	20,0%	20,0%	20,0%	5,0%	23,8%
	T2	N	16	7	5	11	13	52
		%	45,7%	35,0%	50,0%	55,0%	65,0%	49,5%
N status	T3+T4	N	5	9	3	5	6	28
		%	14,3%	45,0%	30,0%	25,0%	30,0%	26,7%
	N0	N	32	13	8	10	10	73
		%	91,4%	65,0%	80,0%	50,0%	50,0%	69,5%
pTNM stage	N1	N	0	1	1	1	0	3
		%	,0%	5,0%	10,0%	5,0%	,0%	2,9%
	N2	N	3	6	1	9	10	29
		%	8,6%	30,0%	10,0%	45,0%	50,0%	27,6%
I stage	I stage	N	25	7	4	8	8	52
		%	71,4%	35,0%	40,0%	40,0%	40,0%	49,5%
	II stage	N	7	4	5	2	1	19
		%	20,0%	20,0%	50,0%	10,0%	5,0%	18,1%
III+IV stage	III+IV stage	N	3	9	1	10	11	34
		%	8,6%	45,0%	10,0%	50,0%	55,0%	32,4%
	Total	N	35	20	10	20	20	105

• ПК – в 10 (50%) случая не се установяват (интраоперативно и хистологично) метастази в регионалните лимфни възли. В останалите 10 (50%) случая се доказват метастази в ипсилатерални медиастинални и субкаринални лимфни възли (N2).

При сравняване на различните хистологични видове тумори на база N статус се установи статистически значима разлика (Pearson Chi-Square 20.4; p=0.009).

pTNM – стадий

• карциноиди – от проучените случаи преобладават тези с I-ви стадий – 25 случая (71%), във II-ри стадий – 7 болни (20.0%), в IIIA – 3 пациенти (8.6%).

• ДКБК – от проучените случаи преобладават тези с IIIA стадий – 8 случая (40%). Общо в I-ви pTNM-стадий са 7 болни, във II-ри стадий – 4 болни, в IIIA – 8 пациенти и в IV – 1 пациент.

• ЕКНЕК – от проучените случаи преобладават тези с II-ри стадий – 5 случая (50%). Общо в I-ви pTNM-стадий са 4 болни, във II-ри стадий – 5 болни, в IIIB – 1 пациент.

• АК – от проучените случаи преобладават тези с III-ти стадий – 10 случая (52.6%). Общо в I-ви pTNM-стадий са 8 болни, във II-ри стадий – 2 болни, в III-ти – 10 пациента.

• ПК – от проучените случаи преобладават тези с III-ти стадий – 11 случая (55%). Общо в I-ви pTNM-стадий са 8 болни, във II-ри стадий – 1 болен, в III-ти – 11 пациента.

При сравняване на различните хистологични видове тумори на база pTNM стадий се установи статистически значима разлика (Pearson Chi-Square 53.6; p<0.001).

• SCC – in 10 (50%) cases no histological evidence of metastasis in regional lymph nodes is found. In the remaining 10 (50%) there is metastasis in regional lymph nodes (N2).

There is a statistically significant difference in N status between different lung cancer histological types (Pearson Chi-Square 20.4; p=0.009).

pTNM stage

• carcinoids – in I stage – 25 cases (71%), in II stage – 7 cases (20.0%), in IIIA – 3 (8.6%).

• SCLC – patients with IIIA stage prevail – 8 cases (40%). In I stage are 7 cases, in II – 4, in IIIA – 8 and in IV – 1 case.

• LCNEC – patients with II stage prevail – 5 cases (50%). In I stage are 4 cases, in II stage – 5, in IIIB – 1.

• adenocarcinoma – patients with III stage prevail – 10 cases (52.6%). In I stage are 8 cases, in II – 2, in III – 10.

• SCC – patients with III stage prevail – 11 cases (55%). In I stage are 8 cases, in II – 1, in III – 11.

There is a statistically significant difference in pTNM stage between different lung cancer histological types (Pearson Chi-Square 53.6; p<0.001).

original
articles

IMMUNOHISTOCHEMICAL
EXAMINATION OF LOW WEIGHT HEAT
SHOCK PROTEINS - alphaB-crystallin
AND Hsp27 – EXPRESSION IN
PRIMARY LUNG CARCINOMAS

Thoracic Medicine
Volume IV, March 2012, Issue 1

Таблица 5. Разпределение на изследваните пациенти с белодробни тумори (група изследвана само с имунохистохимия) според интензитет на оцветяване с Hsp27, и според процент оцветени клетки – цитоплазмено и съответно ядрено с Hsp27, брой случаи, процент.

			Карци- ноиди	ДКБК	ЕКНЕК	АК	ПК	Общо
Hsp27 интензитет	без оцветяване	Брой	1	1	0	0	0	2
		%	2,9%	5,0%	,0%	,0%	,0%	1,9%
	слабо	Брой	11	7	1	3	2	24
		%	31,4%	35,0%	10,0%	15,0%	10,0%	22,9%
	умерено	Брой	15	8	6	9	10	48
		%	42,9%	40,0%	60,0%	45,0%	50,0%	45,7%
Hsp27 ци- топлазмено количество интервали	интензивно	Брой	8	4	3	8	8	31
		%	22,9%	20,0%	30,0%	40,0%	40,0%	29,5%
	негативно	Брой	1	1	0	0	0	2
		%	2,9%	5,0%	,0%	,0%	,0%	1,9%
	под 25%	Брой	1	8	1	0	0	10
		%	2,9%	40,0%	10,0%	,0%	,0%	9,5%
Hsp27 ядрено количество интервали	26-50%	Брой	1	3	1	1	1	7
		%	2,9%	15,0%	10,0%	5,0%	5,0%	6,7%
	51-75%	Брой	2	2	3	3	2	12
		%	5,7%	10,0%	30,0%	15,0%	10,0%	11,4%
	над 75%	Брой	30	6	5	16	17	74
		%	85,7%	30,0%	50,0%	80,0%	85,0%	70,5%

Tab. 5. Distribution of studied patients with different histological types of lung cancer by intensity of Hsp27 staining, and percent stained cells with Hsp27, number cases, percent.

			Histology					
			Carci- noids	SCLC	LCNEC	Ade- noc.	SCC	Total
Hsp27 intensity	no staining	N	1	1	0	0	0	2
		%	2,9%	5,0%	,0%	,0%	,0%	1,9%
	weak	N	11	7	1	3	2	24
		%	31,4%	35,0%	10,0%	15,0%	10,0%	22,9%
	moderate	N	15	8	6	9	10	48
		%	42,9%	40,0%	60,0%	45,0%	50,0%	45,7%
Hsp27 cytoplasmic staining	intensive	N	8	4	3	8	8	31
		%	22,9%	20,0%	30,0%	40,0%	40,0%	29,5%
	no staining	N	1	1	0	0	0	2
		%	2,9%	5,0%	,0%	,0%	,0%	1,9%
	≤25%	N	1	8	1	0	0	10
		%	2,9%	40,0%	10,0%	,0%	,0%	9,5%
Hsp27 nuclear staining	26-50%	N	1	3	1	1	1	7
		%	2,9%	15,0%	10,0%	5,0%	5,0%	6,7%
	51-75%	N	2	2	3	3	2	12
		%	5,7%	10,0%	30,0%	15,0%	10,0%	11,4%
	>75%	N	30	6	5	16	17	74
		%	85,7%	30,0%	50,0%	80,0%	85,0%	70,5%

ОРИГИНАЛНИ СТАТИИ

ИМУНОХИСТОХИМИЧНО
ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЕКСПРЕСИЯТА НА
НИСКОМОЛЕКУЛНИТЕ БЕЛТЪЦИ НА
СТРЕСА - alphaB-crystallin И Hsp27 -
ПРИ ПЪРВИЧНИ БЕЛОДРОБНИ
КАРЦИНОМИ

Торакална Медицина
Том IV, март 2012, бр.1

Hsp27 (Табл. 5):

В 103 (97%) от изследваните 105 тумора се установи наличие на цитоплазмена експресия в туморните клетки на маркера Hsp27. В 70.5% от случаите, повече от 75% от туморните клетки експресират цитоплазмено маркера. Наблюдавано бе и съчетание на цитоплазмената експресия с ядрена такава в 47 (45.6% от туморите с цитоплазмена експресия) от изследваните тумори, като в 44 от тези случаи бе оцветено ядрото на по-малко от 25% от туморните клетки. В 31 случая (29.5%) цитоплазменото оцветяване е силно интензивно, а умерено – в 48 (45.7%) случая.

В групата на карциноидните тумори в 34 случая (97.1%) се установи различна по степен експресия на маркера от туморните клетки, като в най-много случаи – 30 (85.7%) – го експресират повече от 75% от клетките. По отношение на интензитета на експресията на маркера най-често е слаба експресия – 11 тумора (31.4%) или със средна – 15 (42.9%). По отношение на ядрена експресия такава бе наблюдавана само в 10 (28.6%) от случаите, в по-малко от 25% от клетките.

В групата на ДКБК (Фиг. 1) от 20 тумора в 19 случая (95%) се наблюдава експресия предимно в по-малко от 50% от туморните клетки – в 11 случая (55%), а в 6 случая (30%) се оцветяват повече от 75% от туморните клетки. Наблюдаван беше най-често слаб или умерен интензитет на цитоплазмено оцветяване (съответно в 35% и 40% от ДКБК). По отношение на ядреното оцветяване, такова бе наблюдавано в 10 (50%) от случаите и то в по-малко от 25% от туморните клетки.

В групата на ЕКНЕК (Фиг. 2) всички изследвани тумори – 10 броя (100%) – показаха цитоплазмена експресия за маркера, като експресия се наблюдава предимно в повече от 50% от клетките – 8 случая (80%). Интензитета на оцветяването бе предимно умерено или интензивно (съответно 60% и 30%). По отношение на ядрено оцветяване – всички тумори имаха и ядрена експресия на маркера в по-малко от 25% от туморните клетки.

В групата на аденокарциномите всички изследвани тумори – 20 броя (100%) – показаха цитоплазмена експресия и то предимно в пове-

Hsp27 (Tab. 5):

Cytoplasmic expression of Hsp27 was observed in 103 (97%) of the studied 105 tumors. In 70.5% of the cases >75% of tumor cells express Hsp27. In 47 (45.6% of tumors with cytoplasmic expression) cases there is a combination with nuclear expression of the marker. In 44 of these cases the nuclear expression is found in less than 25% of the tumor cells. In 31 (29.5%) cases the cytoplasmic staining is intensive, and in 48 (45.7%) – moderate.

In 34 cases (97.1%) from the group of carcinoid tumors cytoplasmic expression is with varying degrees, in most cases – 30 (85.7%) – the expression is in >75% of tumor cells. Regarding the intensity of expression most often it is weak – 11 tumors (31.4%) or medium – 15 (42.9%). With regard to nuclear expression it is observed only in 10 (28.6%) cases in less than 25% of the cells.

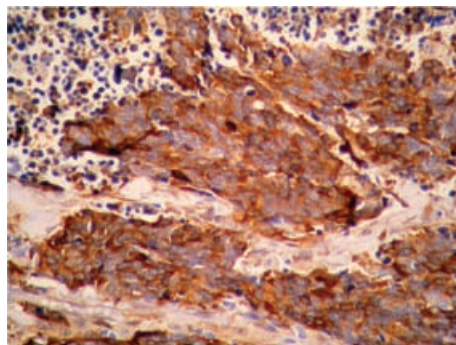
In the group of SCLCs (Fig. 1) from 20 tumors in 19 cases (95%) is observed expression; it is mainly in less than 50% of the tumor cells – in 11 cases (55%), and in 6 cases (30%) – in more than 75% of the cells. Regarding the intensity of expression most often it is weak or moderate (35%; 45%). With regard to nuclear expression it is observed in 10 (50%) of cases, in less than 25% of the tumor cells.

In the group of LCNEC (Fig. 2) all of the studied tumors – 10 (100%) – have cytoplasmic expression of Hsp27, mainly in more than 50% of tumor cells – in 8 of 10 cases (80%). The intensity is most often moderate or intensive (60%, 30%). Regarding the nuclear expression – all tumors have also a nuclear expression of the marker in less than 25% of tumor cells.

In the group of adenocarcinomas all of the studied tumors – 20 (100%) – have cytoplasmic expression of Hsp27, mainly in more than 75%

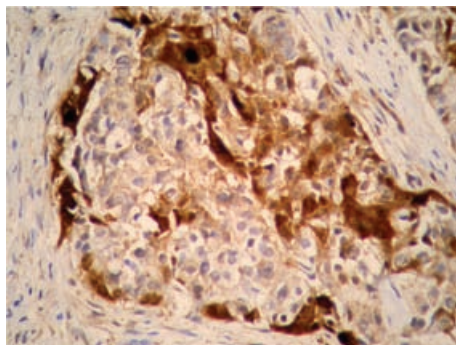
Фигура 1. Дребноклетъчен карцином с вариращ интензитет на цитоплазмена експресия на Hsp27 (от слаба до интензивна) в 100% от клетките, x40, x2.5.

Fig. 1. SCLC with varying intensity of cytoplasmic expression of Hsp27 (from weak to intensive) in 100% of the cells, x40, x2.5.



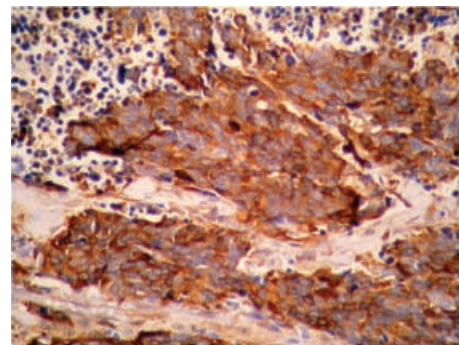
Фигура 2. Едроклетъчен невроендокринен карцином с вариращ интензитет на експресия на Hsp27 (от слаба до интензивна) в 100% от клетките, x40, x2.5.

Fig. 2. LCNEC with varying intensity of cytoplasmic expression of Hsp27 (from weak to intensive) in 100% of tumor cells, x40, x2.5.



Фигура 3. Плоскоклетъчен карцином, умерена 100% цитоплазмена експресия и 1% ядрена на Hsp27, x40, x2.5.

Fig. 3. SCC, moderate intensity, 100% cytoplasmic expression and 1% nuclear expression of Hsp27, x40, x2.5.



че от 75% от туморните клетки (16 случая – 80%). По отношение на интензитета на оцветяване най-често са с умерена интензивност – 9 (45%) случая, по-рядко е силно интензивно оцветяване – 8 (40%) случая. По отношение на ядреното оцветяване, такова бе наблюдавано в 3 случая (15%) и в повече от 25% от туморните клетки, и в 4 случая – в по-малко от 25% от клетките – общо 7 случая (35%).

В групата на плоскоклетъчните карциноми (Фиг. 3) всички тумори експресираха маркера, като в 17 случая (85%) повече от 75% от туморните клетки го експресират. По отношение на интензитета на оцветяването – най-голяма е групата на умерено оцветените тумори – в 10 случая (50%), а в 8 (40%) оцветяването бе силно интензивно. По отношение на ядреното оцветяване такова се наблюдава в 10 (50%) случая в по-малко от 25% от туморните клетки.

Не се наблюдава значима разлика между групите тумори по отношение на интензитет на оцветяването, но има разлика по отношение на процента оцветени цитоплазмено клетки (103.18; $p < 0.001$) – карциноидите, АК и ПК са с експресия предимно в 100% от клетките докато при ДКБК и ЕКНЕК се наблюдава изразена клоналност на експресията, както и по отношение на процента клетки с ядрено оцветяване (78.0; $p < 0.001$) – карциноидите предимно са без оцветяване, докато при ЕКНЕК – във всички случаи се наблюдава такова, докато при ДКБК и ПК по равно са без и със оцветяване. Намери се връзка между интензитета на оцветяване с Hsp27 и големината на тумора (175.3; $p < 0.001$) – по-големите тумори са с по-голям интензитет на оцветяване. Количествена цитоплазмена експресия на Hsp27 зависи и от стадия (46.4; $p = 0.048$).

AlphaB-crystallin (Табл. 6)

В 99 (94.3%) от изследваните 105 тумора се установи наличие на ядрена експресия в туморните клетки на маркера p-alphaB-crystallin. В 56.2% от случаите повече от 75% от туморните клетки експресират ядрено маркера. Наблюдавано бе и

of tumor cells – in 16 cases (80%). The intensity is most often moderate or intensive (45%, 40%). Regarding the nuclear expression – 3 tumors (15%) also have a nuclear expression of the marker in more than 25% of tumor cells, and in 4 cases – in less than 25% - in total in 7 cases (35%).

In the group of SCC (Fig. 3) all of the studied tumors have cytoplasmic expression of Hsp27, mainly in more than 75% of tumor cells – in 17 cases (85%). The intensity is most often moderate – in 10 (50%) or intensive – in 8 (40%). Regarding the nuclear expression – 10 tumors (50%) also have a nuclear expression of the marker in less than 25% of tumor cells.

There is no statistically significant difference between group of tumors in terms of intensity of expression, but differs in terms of percentage of cells with cytoplasmic expression (103.18; $p < 0.001$) – carcinoids, adenocarcinomas and SCC are mainly with 100% expression, while in cases with SCLC and LCNEC marked clonality of expression is observed. There is a statistically significant difference between different group of tumors in terms of percentage of cells with nuclear expression (78.0; $p < 0.001$) – carcinoids are mostly with no staining, SCLC and SCC are equally with or without staining, while LCNECs express the marker in all cases. There is a statistically significant association between intensity of expression of Hsp27 and tumor size (175.3; $p < 0.001$) – intensive staining is most often in larger in size tumors. There is association between cytoplasmic expression of Hsp27 and pTNM stage (46.4; $p = 0.048$).

AlphaB-crystallin (Cryab) (Tab. 6)

Nuclear expression of p-Cryab was observed in 99 (94.3%) of the studied 105 tumors. In 56.2% of the cases >75% of tumor cells express p-Cryab. In 23 (23% of tumors with nuclear expression) cases there is a combination with cytoplasmic

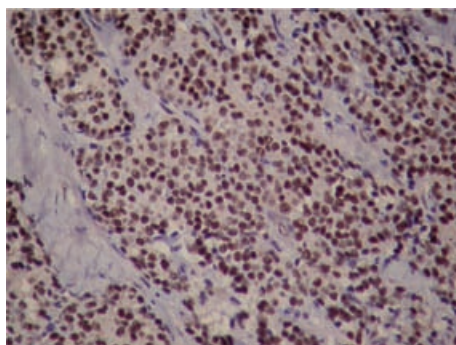
original articles

IMMUNOHISTOCHEMICAL
EXAMINATION OF LOW WEIGHT HEAT
SHOCK PROTEINS - alphaB-crystallin
AND Hsp27 – EXPRESSION IN
PRIMARY LUNG CARCINOMAS

Thoracic Medicine
Volume IV, March 2012, Issue 1

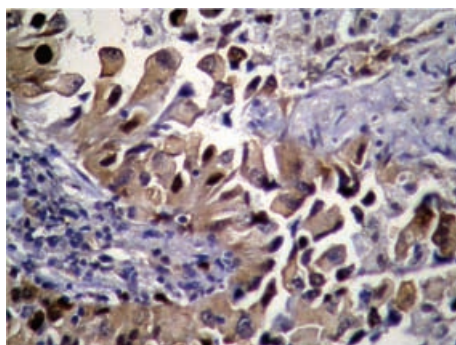
Фигура 4. Атипичен карциноид, слаб интензитет на оцветяване с alphaB-crystallin, 75% от клетките го експресират, x40, x2.5.

Fig. 4. Atypical carcinoid, weak intensity expression of p-Cryab in 75% of tumor cells, x40, x2.5.



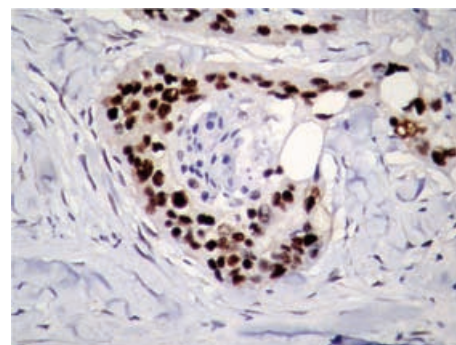
Фигура 5. Ацинарно-папиларен аденокарцином – в 80% от клетките се наблюдава ядрена експресия на alphaB-crystallin, в 50% и цитоплазмена; x40, x2.5.

Fig. 5. Adenocarcinoma, acinar-papillar – in 80% of the tumor cells with nuclear expression of p-Cryab and in 50% – with cytoplasmic; x40, x2.5.



Фигура 6. Плоскоклетъчен карцином, интензивна 100% ядрена експресия на p-alphaB-crystallin, x40, x2.5.

Fig. 6. SCC, intensive 100% nuclear expression of p-Cryab, x40, x2.5.



оригинални
статии

ИМУНОХИСТОХИМИЧНО
ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЕКСПРЕСИЯТА НА
НИСКОМОЛЕКУЛНИТЕ БЕЛТЪЦИ НА
СТРЕСА - alphaB-crystallin И Hsp27 -
ПРИ ПЪРВИЧНИ БЕЛОДРОБНИ
КАРЦИНОМИ

Торакална Медицина
Том IV, март 2012, бр.1

съчетание на ядрена експресия с цитоплазмена такава в 23 (23% от туморите с ядрена експресия) от изследваните тумори, като в 16 от тези случаи бе оцветена цитоплазмата на по-малко от 25% от туморните клетки. В 42 случая (40%) ядреното оцветяване е силно интензивно, а умерено – в 48 (45.7%) случая.

В групата на карциноидните тумори (Фиг. 4) от 35 тумора в 29 случая (82.9%) се установи различна по степен експресия на маркера от туморните клетки, като над 50% от клетките го експресират в 24 (63%) случая. По отношение на интензитета на експресията на маркера се срещат предимно със средна – 18 (51.4%) и със силна – 4 (11.4%). По отношение на цитоплазмената експресия такава бе наблюдавана само в 6 (17.1%) от случаите, в по-малко от 50% от клетките.

В групата на ДКБК от 20 тумора във всички случаи се откри ядрена експресия на маркера – като под и над 50% от клетките го експресираха съответно в 8 (40%) случая и в 12 (60%). Наблюдаван беше следния интензитет на ядрено оцветяване – в 11 случая (55%) интензитета е умерен и в 9 случая (45%) – силно интензивно оцветяване. По отношение на цитоплазменото оцветяване, такова бе наблюдавано само в 1 (5%) от случаите и то в по-малко от 25% от туморните клетки.

В групата на ЕКНЕК всички изследвани тумори – 10 броя (100%) – показаха ядрена експресия за маркера, като експресия се наблюдава под и над 50% съответно в 6 (65%) и 4 (35%) случая. Интензитета на оцветяването бе предимно в 6 случая (60%) – умерено и в 3 случая (30%) – интензивно. По отношение на цитоплазмено оцветяване – само един от туморите имаше експресия и то в по-малко от 25% от туморните клетки.

expression of the marker. In 16 of these cases the cytoplasmic expression is found in less than 25% of the tumor cells. In 42 (40%) cases the nuclear staining is intensive, and in 48 (45.7%) – moderate.

In 29 cases (82.9%) from the group of carcinoid tumors (Fig. 4) nuclear expression is with varying degrees, in most cases – 24 (63%) – the expression is in >50% of tumor cells. Regarding the intensity of expression most often it is moderate – 18 tumors (51.4%) or intensive – 4 (11.4%). With regard to cytoplasmic expression it is observed only in 6 (17.1%) of the cases in less than 50% of the cells.

In the group of SCLCs from 20 tumors in all cases is observed nuclear expression – in less than 50% of the tumor cells – in 8 cases (40%), and in more than 50% - in 12 (60%) cases. Regarding the intensity of expression most often it is moderate or intensive (55%; 45%). With regard to cytoplasmic expression it is observed in only 1 (5%) of the cases in less than 25% of the tumor cells.

In the group of LCNEC all of the studied tumors – 10 (100%) – have nuclear expression of Cryab, in less or more than 50% of tumor cells – 6 (65%) and 4 (35%) respectively. The intensity is most often moderate – in 6 (60%) cases - or intensive – in 3 (30%) cases. Regarding the cytoplasmic expression it is found in only 1 of the cases, in less than 25% of the tumor cells.

Таблица 6. Разпределение на изследваните пациенти с белодробни тумори (група изследвана само с имунохистохимия) според интензитет на оцветяване с Hsp27, и според процент оцветени клетки – цитоплазмено и съответно ядрено с Hsp27, брой случаи, процент.

			Карциноиди	ДКБК	ЕКНЕК	АК	ПК	Общо
alphaB-crystallin интензитет	без оцветяване	Брой	6	0	0	0	0	6
		%	17,1%	,0%	,0%	,0%	,0%	5,7%
	слабо	Брой	7	0	1	0	1	9
		%	20,0%	,0%	10,0%	,0%	5,0%	8,6%
	умерено	Брой	18	11	6	11	2	48
количество интервали		%	51,4%	55,0%	60,0%	55,0%	10,0%	45,7%
	интензивно	Брой	4	9	3	9	17	42
		%	11,4%	45,0%	30,0%	45,0%	85,0%	40,0%
	негативно	Брой	6	0	0	0	0	6
		%	17,1%	,0%	,0%	,0%	,0%	5,7%
alphaB-crystallin ядрено количество интервали	под 25%	Брой	5	2	2	0	0	9
		%	14,3%	10,0%	20,0%	,0%	,0%	8,6%
	26-50%	Брой	2	6	4	0	3	15
		%	5,7%	30,0%	40,0%	,0%	15,0%	14,3%
	51-75%	Брой	6	4	3	2	1	16
alphaB-crystallin цитоплазмено количество интервали		%	17,1%	20,0%	30,0%	10,0%	5,0%	15,2%
	над 75%	Брой	16	8	1	18	16	59
		%	45,7%	40,0%	10,0%	90,0%	80,0%	56,2%
	негативно	Брой	29	19	9	7	18	82
		%	82,9%	95,0%	90,0%	35,0%	90,0%	78,1%
alphaB-crystallin цитоплазмено количество интервали	под 25%	Брой	4	1	1	9	1	16
		%	11,4%	5,0%	10,0%	45,0%	5,0%	15,2%
	26-50%	Брой	2	0	0	2	1	5
		%	5,7%	,0%	,0%	10,0%	5,0%	4,8%
	51-75%	Брой	0	0	0	2	0	2
alphaB-crystallin цитоплазмено количество интервали		%	,0%	,0%	,0%	10,0%	,0%	1,9%

Tab. 6. Distribution of studied patients with different histological types of lung cancer by intensity of alphaB-crystallin staining, and percent stained cells with alphaB-crystallin, number of cases, percent.

			Histology					
			Carci-noids	SCLC	LCNEC	Ade-noc.	SCC	Total
alphaB-crystallin intensity	no staining	N	6	0	0	0	0	6
		%	17,1%	,0%	,0%	,0%	,0%	5,7%
	weak	N	7	0	1	0	1	9
		%	20,0%	,0%	10,0%	,0%	5,0%	8,6%
	moderate	N	18	11	6	11	2	48
alphaB-crystallin nuclear staining		%	51,4%	55,0%	60,0%	55,0%	10,0%	45,7%
	intensive	N	4	9	3	9	17	42
		%	11,4%	45,0%	30,0%	45,0%	85,0%	40,0%
	no staining	N	6	0	0	0	0	6
		%	17,1%	,0%	,0%	,0%	,0%	5,7%
alphaB-crystallin nuclear staining	≤25%	N	5	2	2	0	0	9
		%	14,3%	10,0%	20,0%	,0%	,0%	8,6%
	26-50%	N	2	6	4	0	3	15
		%	5,7%	30,0%	40,0%	,0%	15,0%	14,3%
	51-75%	N	6	4	3	2	1	16
alphaB-crystallin cytoplasmic staining		%	17,1%	20,0%	30,0%	10,0%	5,0%	15,2%
	>75%	N	16	8	1	18	16	59
		%	45,7%	40,0%	10,0%	90,0%	80,0%	56,2%
	no staining	N	29	19	9	7	18	82
		%	82,9%	95,0%	90,0%	35,0%	90,0%	78,1%
alphaB-crystallin cytoplasmic staining	≤25%	N	4	1	1	9	1	16
		%	11,4%	5,0%	10,0%	45,0%	5,0%	15,2%
	26-50%	N	2	0	0	2	1	5
		%	5,7%	,0%	,0%	10,0%	5,0%	4,8%
	51-75%	N	0	0	0	2	0	2
alphaB-crystallin cytoplasmic staining		%	,0%	,0%	,0%	10,0%	,0%	1,9%

В групата на аденокарциномите (Фиг. 5) всички изследвани тумори – 20 броя (100%) – показва ядрена експресия – в 2 случая – между 51% и 75% от туморните клетки, и 18 случая (90%) – в повече от 75% от туморните клетки. По отношение на интензитета на оцветяване – най-често са с умерена интензивност – 11 (55%) случая, порядко е силно интензивно оцветяване – 9 (45%) случая. По отношение на цитоплазменото оцветяване, такова бе наблюдавано в 13 случая (65%) – 9 случая (45%) с до 25%, 2 случая (10%) с между 26% и 50%, и 2 случая (10%) с над 50%.

В групата на плоскоклетъчните карциноми (Фиг. 6) всички тумори експресираха маркера, като в 16 случая (80%) повече от 75% от туморните клетки го експресират. По отношение на интензитета на оцветяването – най-голяма е групата на интензивно оцветените тумори – в 17 случая (85%), в 2 (10%) оцветяването бе умерено, и в 1 случай – слабо по интензитет оцветяване. По отношение на цитоплазменото оцветяване такова се наблюдава в 2 случая (10%) в по-малко от 50% от клетките.

Наблюдава се значима разлика между групите тумори по отношение на интензитет на оцветяването (45.9; $p < 0.001$), има разлика и по отношение на процента оцветени ядрено клетки (122.4; $p = 0.03$) – най-голям брой от АК и ПК са със 100% експресия на маркера, най-много негативни има сред карциноидите, а при ДКБК и ЕКНЕК са с клонална експресия. Наблюдава се и разлика по отношение на процента клетки с цитоплазмено оцветяване (32.1; $p = 0.001$) – при АК преобладават случаите с такова оцветяване, докато при другите хистологични типове – има единични случаи. Между нивата на количествена експресия на маркера и N-статус има статистически значима разлика (94.1; $p < 0.001$), както и между него и големината на тумора (15.6; $p = 0.04$), и между него и стадия (38.7; 0.02). Между нивата на цитоплазмена експресия на маркера и стадия има също статистически значима разлика (98.8; $p = 0.001$) – негативните тумори нарастват на брой с покачване на стадия, докато позитивните са повече на брой в по-ранните стадии.

Обсъждане:

В подробен обзор за ролята на Hsp при рак, D. Ciocca и S. Calderwood, правят заключение, че тази група протеини имат главна роля в различни аспекти на туморната прогресия и отговор на лечение. Те може да служат за ефективни биомаркери за карциногенеза в някои тъкани и да показват степента на диференциация и агресивност при някои видове рак. Експресията на Hsp27 има прогностична стойност – свързва се с лоша прогноза при рак на стомаха, черния дроб, простатата и остеосаркома (2). Свърхекспресия на alphaB-crystallin е доказана при глиома, бъбречни тумори, рак на гърдата и дуктален карцином in situ (4). Hsp са подходящи мишени за терапия, тъй като са свързани с туморната прогресия и с отговора на лечение. Като цяло изследванията на тази група протеини продъл-

In the group of adenocarcinomas (Fig. 5) all of the studied tumors – 20 (100%) – have nuclear expression – mainly in more than 75% of tumor cells – in 18 cases (90%). The intensity is most often moderate or intensive (55%, 45%). Regarding the cytoplasmic expression it is observed in 13 tumors (65%) – in 9 (45%) cases in less than 25%, in 2 cases (10%) between 25% and 50%, and in 2 cases (10%) in more than 50% of the tumor cells.

In the group of SCC (Fig. 6) all of the tumors have nuclear expression, mainly in more than 75% of tumor cells – in 16 cases (80%). The intensity is most often intensive – in 17 (85%), moderate in 2 (10%), and weak – in 1 case. Regarding the cytoplasmic expression it is found in 2 (10%) cases in less than 50% of the tumor cells.

There is a statistically significant difference between histological groups regarding intensity of expression (45.9; $p < 0.001$), regarding percent of cells with nuclear expression (122.4; $p = 0.03$) – in adenocarcinomas and SCC groups most of the cases 100% of the cells express p-Cryab, in carcinoid tumors group most of the cases are with no expression, in SCLC and LCNEC groups in most cases the expression is clonal – in less than 75% of the cells; regarding percent of cells with cytoplasmic expression (32.1; $p = 0.001$) – in adenocarcinomas group predominate cases with cytoplasmic expression, and in all other tumor groups – there are isolated cases. There is a statistically significant difference between percentage of nuclear expressing cells and N-status (94.1; $p < 0.001$), tumor size (15.6; $p = 0.04$), pTNM stage (38.7; $p = 0.02$); also between cytoplasmic expression and pTNM stage (98.8; $p = 0.001$) – the number of tumors with no staining increase in the advanced stages, while the expressing tumors are more often in earlier stages.

Discussion:

In a detailed review of the role of Hsp in cancer, D. Ciocca and S. Calderwood, conclude that this group of proteins has a major role in various aspects of tumor progression and in response to treatment (2). They can serve as effective biomarkers for carcinogenesis in some tissues, to show the grade of differentiation and the aggressiveness in some cancers. The expression of Hsp27 has a predictive value – it is associated with poor prognosis in gastric cancer, liver cancer, prostate cancer, and osteosarcoma (2). Overexpression of alphaB-crystallin has been demonstrated in glioma, kidney tumors, breast cancer and ductal carcinoma in situ (4). Hsp are suitable targets for therapy because they are associated with tumor progression and response to treatment. There is ongoing research in the direction of obtaining more information

original articles

IMMUNOHISTOCHEMICAL
EXAMINATION OF LOW WEIGHT HEAT
SHOCK PROTEINS - alphaB-crystallin
AND Hsp27 – EXPRESSION IN
PRIMARY LUNG CARCINOMAS

Thoracic Medicine
Volume IV, March 2012, Issue 1

оригинални статии

ИМУНОХИСТОХИМИЧНО
ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЕКСПРЕСИЯТА НА
НИСКОМОЛЕКУЛНИТЕ БЕЛТЪЦИ НА
СТРЕСА - alphaB-crystallin И Hsp27 -
ПРИ ПЪРВИЧНИ БЕЛОДРОБНИ
КАРЦИНОМИ

Торакална Медицина
Том IV, март 2012, бр.1

жават в насока получаване на повече информация за това каква точно е ролята на Hsp в нарушенията, водещи до туморен растеж, инвазия, и метастазиране. Това ще подпомогне лечението с таргетна терапия, насочена срещу Hsp (2).

В 97% от изследваните с имунохистохимия тумори се наблюдава цитоплазмена експресия на стресовия протеин Hsp27. В почти половината от туморите се наблюдава и ядрена експресия на маркера. Цитоплазмената експресия бе в повечето случаи (71%) в повече от 75% от туморните клетки, докато ядрената – почти винаги в по-малко от 25% от клетките. Карциноидните тумори, АК и ПК експресират по-често маркера в повече от 75% от туморните клетки (съответно 86%, 80%, 85%), докато при ДКБК и ЕКНЕК се наблюдава изразена клоналност (30%, 50% с експресия над 75% от туморните клетки) ($p < 0.001$). Доказано е че Hsp27 се транслоцира от цитоплазмата в ядрото при стрес, т.е. при неговата активация (2). По отношение на ядрената експресия се установи че карциноидните тумори са предимно без експресия (29% от случаите са позитивни), при АК ядрената експресия бе в 35% от изследваните тумори (в тази група тя се наблюдава в 15% от случаите в повече от 50% от клетките), ДКБК и ПК са в половината си случаи със експресия (50%, 50%), докато при ЕКНЕК всички тумори имат и ядрена експресия на маркера ($p < 0.001$). Hsp27 се експресира при почти всички изследвани белодробни карциноми, което показва че този белтък играе главна роля в канцерогенезата им. По-важна в случая се оказва ядрената му експресия, която показва различни нива при различните белодробни карциноми – най-изразена е при ЕКНЕК, ДКБК, ПК и АК. Hsp27 е потенциална мишена за таргетна терапия при белодробните карциноми.

По отношение на маркера alphaB-crystallin се установи ядрена експресия в 99% от туморите, като в повече от 50% от случаите позитивни са повече от 75% от туморните клетки. В 1/4 (23%) от туморите се установи и цитоплазмено оцветяване, предимно в по-малко от 25% от клетките. Наблюдаваха се следните различия между отделните групи карциноми – сред карциноидните тумори има най-много негативни случаи – 17% (в 65% от туморите се наблюдава експресия в повече от 75% от клетките), АК и ПК са с най-голям процент на случаи с експресия в повече от 75% от туморните клетки (90%, 80%), докато при ДКБК и ЕКНЕК експресията е главно клонална (експресия в повече от 75% от клетките, едва в 40% за ДКБК и в 10% за ЕКНЕК) ($p = 0.03$). По отношение на цитоплазмената експресия на маркера такава бе наблюдавана най-вече сред АК ($p = 0.001$) – в 65% от случаите – докато при другите групи карциноми се експресира в единични случаи – в 17% от карциноидите; в 10% от ПК; 10% от ЕКНЕК; 5% от ДКБК. Между нивата на

about what exactly is the role of Hsp in tumor growth, invasion and metastasis. This will help to target therapy treatment directed against Hsp (2).

Cytoplasmic expression of Hsp27 was observed in 97% of the cases. In almost half of the tumors nuclear expression was observed. In most cases the cytoplasmic expression (71%) was present in more than 75% of tumor cells, while nuclear expression was present almost always in less than 25% of the cells. Carcinoid tumors, adenocarcinomas and SCC express Hsp27 more often and in more than 75% of tumor cells (86%, 80%, 85%), while in SCLC and LCNEC cases, a marked clonality (30%, 50% expression over 75 % of tumor cells) ($p < 0.001$) is observed. It has been shown that Hsp27 is translocated from the cytoplasm to the nucleus under stress conditions (2). With respect to nuclear expression is found that carcinoid tumors are mostly without expression (29% of cases were positive), in adenocarcinomas nuclear expression is observed in 35% of the tumors (in this group it was observed in 15% of cases in more than 50% of cells), SCC and SCLC are in half of their cases with expression (50%, 50%), while in LCNEC all tumors have also nuclear markers ($p < 0.001$). Hsp27 is expressed in almost all studied lung cancers, indicating that this protein plays a major role in their carcinogenesis. More important, in this case Hsp27 proved its nuclear expression, showing different levels in various lung cancers – it is most pronounced in LCNEC, SCLC, SCC and adenocarcinomas. Hsp27 is a potential target for target therapy in lung carcinomas. With regard to alphaB-crystallin nuclear expression is found in 99% of tumors, and in more than 50% of positive cases, there is expression in more than 75% of tumor cells. In 1/4 (23%) of tumors is found cytoplasmic expression, mainly in less than 25% of the cells.

Regarding the expression of Cryab the following differences between groups of cancers were observed - carcinoid tumors are mostly without expression – 17 (in 65% of the tumors is observed expression of more than 75% of the cells), adenocarcinomas and SCC are in most cases expressing the marker in more than 75% of tumor cells (90%, 80%), while SCLC and LCNEC expression is primarily clonal (expression in more than 75% of tumor cells in just 40% of SCLC and in 10% of LCNEC) ($p = 0.03$). Regarding the cytoplasmic expression of this marker, it was observed mainly among adenocarcinomas ($p = 0.001$) - in 65% of cases - while in other groups of carcinomas it is expressed in individual cases - in 17% of carcinoids, in 10% of SCC, in 10% of LCNEC, and in 5% of SCLC. Between the levels of nuclear expression and the presence of metastases in lymph nodes there is a statistically significant correlation ($p < 0.001$), as also between nuclear expression and pTNM stage ($p = 0.02$), and tumor size ($p = 0.04$), confirming data of R. Cherneva et al. (1). Between the levels

количествена ядрена експресия на маркера и наличието на метастази в лимфни възли има статистически значима корелация ($p < 0.001$), както и между него и стадия ($p = 0.02$), и големината на туморите ($p = 0.04$), което потвърждава данните на Р. Чернева и съавтори (1). Между нивата на цитоплазмена експресия на маркера и стадия също има статистическа зависимост ($p < 0.001$) – позитивните тумори са по-често в по-ранен стадий, докато негативните нарастват с покачване на стадия – маркер за добра прогноза. Тези резултати водят до заключение за основната роля на нискомолекулните белтъци на топлинния стрес в канцерогенезата на белодробните карциноми.

Изводи:

Hsp27 се експресира при почти всички изследвани белодробни карциноми, което показва, че този белтък играе основна роля в канцерогенезата им. По-важна в случая се оказва ядрената му експресия, която показва различни нива при различните белодробни карциноми – най-изразена при ЕКНЕК, ДКБК, ПК и АК. Hsp27 е потенциална мишена за таргетна терапия при белодробните карциноми.

AlphaB-crystallin се експресира ядрено при 99% от туморите, а цитоплазмено – при 23%. Наблюдават се статистически значими корелации между нивата на количествена ядрена експресия на alphaB-crystallin и наличието на метастази в лимфни възли, стадия, и големината на туморите. Между нивата на цитоплазмена експресия на маркера и стадия също има статистическа зависимост – позитивните тумори са по-често в по-ранен стадий, докато негативните нарастват с покачване на стадия, т.е. наличието на цитоплазмена експресия има потенциална благоприятна прогностична стойност. Тези резултати водят до заключение за основната роля на нискомолекулните белтъци на топлинния стрес в канцерогенезата на белодробните карциноми.

Изследванията в областта на карциногенезата ще подпомогнат разбирането на биологията на рака, което е от значение за лечението на определени пациенти, в точното време с правилното лекарство и дозировка.

Настоящото изследване е извършено по проект от конкурса „Млад изследовател“ – договор №18-Д/2010г., към Съвет за Медицинска Наука, Медицински университет – София.

of cytoplasmic expression and pTNM stage there is also a statistically significant relationship ($p < 0.001$) – positive tumors are more common in earlier stage, while negative increase in advanced stage – a marker of good prognosis. These results lead to a conclusion about the essential role of low molecular weight heat shock proteins in carcinogenesis of lung cancer.

Conclusions:

Hsp27 is expressed in almost all cases of the examined lung cancers, suggesting that this protein plays a major role in their carcinogenesis. More important in this case it proved its nuclear expression, showing different levels in various lung cancer types – the most pronounced in LCNEC, SCLC, SCC and adenocarcinomas. Hsp27 is a potential target for target therapy in lung carcinomas. AlphaB-crystallin nuclear expression is found in 99% of tumors and cytoplasmic expression in 23%. There are statistically significant correlations between levels of nuclear expression of alphaB-crystallin and the presence of metastases in lymph nodes, the pTNM stage, and the size of tumors. Between the levels of cytoplasmic expression and the pTNM stage there is a statistical dependence – positive tumors are more often at an earlier stage, while negative increase with advanced stage, eventually presence of cytoplasmic expression has a potential favorable prognostic value. These results lead to a conclusion about the essential role of low molecular weight heat shock proteins in carcinogenesis of lung carcinomas. Studies on carcinogenesis will help understanding of the biology of cancer, which is essential for the treatment of certain patients at the right time with proper medication and dosage.

This study was possible with the financial support of Council for Medical Science, Medical University – Sofia, project contract №18-D/2010 year.

Книгопис:

References:

1. Cherneva R, Petrov D, Georgiev O, et al (2010). Expression profile of small heat-shock protein alphaB-crystallin in operated-on non-small-cell lung cancer patients: clinical implication. *Eur J Cardiothorac Surg* 37(1):44-50.
2. Ciocca DR, Calderwood SK (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress & Chaperones*, 10(2): 86-103.
3. Glover JR, Lindquist S (1998). Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 94: 73-82.
4. Grunberger-Saal SK, Parsons R (2006). Is the small heat shock protein alphaB-crystallin an oncogene? *J Clin Invest* 116 (1): 30-32.
5. Hall HK, Karem KL, Foster JW (1995). Molecular responses of microbes to environmental pH stress. *Adv Microb Physiol* 37: 229-272.
6. Mooi WJ (1996): Common Lung Cancer. In Hasleton P, (ed.): *Spencer's Pathology of the Lung*, 5th ed. New York: McGraw-Hill, Inc., 1009-1064.
7. Morimoto RI (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 12: 3788-3796.
8. Mountain CF (1995). New prognostic factors in lung cancer. *Biologic prophets of cancer cell aggression*. *Chest* 108:246-254.
9. Parsell DA, Lindquist S (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27: 437-496.
10. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C (2009). *TNM classification of malignant tumors*. 7th Ed. Wiley-Blackwell, New York.
11. Travis WD, Brambila E, Muler-Hermelink HK, Harris CC (2004). *Pathology and Genetics: Tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. Lyon: IARC.

original articles

IMMUNOHISTOCHEMICAL
EXAMINATION OF LOW WEIGHT HEAT
SHOCK PROTEINS - alphaB-crystallin
AND Hsp27 – EXPRESSION IN
PRIMARY LUNG CARCINOMAS

Thoracic Medicine
Volume IV, March 2012, Issue 1

Кореспонденция:

д-р Дора Маринова
СБАЛББ „Света София“
бул. „Акад. Иван Гешов“ №19
1431 София

Correspondence:

Dr. Dora Marinova
University Hospital for Pulmonary
Diseases “St. Sofia”
19 acad. Iv. Geshov blv.
1431 Sofia, Bulgaria

e-mail: dmusic@abv.bg