

Таблица 3 — Значение коэффициента экспрессии α -SMA и TФР- β в почечном интерстиции при различных уровнях протеинурии

Уровень суточной протеинурии	Маркер	Минимальное значение	Максимальное значение	Медиана	25-й перцентиль	75-й перцентиль
Протеинурия < 1 г/сут	α -SMA	0,0169	0,2637	0,0882	0,0542	0,1183
	TФР- β	0,0892	0,4562	0,2503	0,1756	0,3974
Протеинурия > 1 г/сут	α -SMA	0,0007	0,3633	0,073	0,0306	0,1092
	TФР- β	0,1089	0,6084	0,2803	0,1985	0,3784

Заключение

Таким образом, миофибробласты играют важную роль в развитии ТИФ, участвуя в синтезе большого количества белков ЭЦМ (например, коллагена IV типа, фибронектина). Наличие взаимосвязи между выраженностью интерстициальной и перигломерулярной экспрессии α -SMA в дебюте заболевания и степенью ТИФ при повторном морфологическом исследовании позволяет рассматривать инфильтрацию миофибробластами в качестве возможного предиктора быстрого прогрессирования хронических болезней почек. Кроме того, одним из неблагоприятных прогностических факторов является увеличение уровня суточной экскреции белка более 1 г, сопровождающееся увеличением экспрессии как α -SMA, так и TФР- β в ткани почек.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Allison, A. Eddy Molecular Insights Into Renal Interstitial Fibrosis / A. Allison // J. Am. Soc. Nephrol. — 1996. — Vol. 7. — P. 2495–2508.
- Agnes, B. Fogo Mechanisms of progression of chronic kidney disease / B. Agnes // Pediatr Nephrol. — 2007. — Vol. 22. — P. 2011–2022.
- Risdon, R. A. Relationship between renal function and histologic changes found in renal biopsy specimens from patients with persistent glomerulonephritis / R. A. Risdon, J. C. Sloper, H. E. de Vardener // Lancet. — 1968. — Vol. 2. — P. 363–366.
- Nath, K. A. The tubulointerstitium in progressive renal disease / K. A. Nath // Kidney International. — 1998. — Vol. 54. — P. 992–994.
- Masaomi, N. Mechanisms of Tubulointerstitial Injury in the Kidney: Final Common Pathways to End-stage Renal Failure / N. Masaomi // Internal Medicine. — 2004. — Vol. 43. — P. 9–17.
- D'Amico, G. Tubulointerstitial damage in glomerular diseases: its role in the progression of renal damage / G. D'Amico, F. Ferrario, M. P. Rastaldi // Am J Kidney Dis. — 1995. — Vol. 26. — P. 124–132.
- Renal Fibrosis: Extracellular Matrix Microenvironment Regulates Migratory Behavior of Activated Tubular Epithelial Cells // M. Zeisberg [et al.] // Am J Pathol. — 2002. — Vol. 160. — P. 2001–2008.
- Muchaneta-Kubara, E. C. El Myofibroblast phenotypes expression in experimental renal scarring / E. C. Muchaneta-Kubara, A. M. Nahas // Nephrol Dial Transplant. — 1997. — Vol. 12. — P. 904–915.
- Furness, P. N. Extracellular matrix and the kidney / P. N. Furness // J Clin Pathol. — 1996. — Vol. 49. — P. 355–359.
- Epithelial-mesenchymal transition (EMT) of renal tubular cells in canine glomerulonephritis / L. Aresu [et al.] // Virchows Arch. — 2007. — Vol. 451. — P. 937–942.
- Normal and Pathologic Soft Tissue Remodeling: Role of the Myofibroblast, with Special Emphasis on Liver and Kidney Fibrosis // A. Desmoulière [et al.] // Laboratory Investigation. — 2003. — Vol. 83, № 1. — P. 1689–1707.
- Фибронектин мочи как показатель процессов фиброобразования в почках при нефрите / Л. В. Козловская [и др.] // Терапевтический архив. — 1999. — № 6. — С. 34–38.
- Transforming growth factor- β 1 differentially mediates fibronectin and inflammatory cytokine expression in kidney tubular cells // W. Qi [et al.] // Am J Physiol Renal Physiol. — 2006. — Vol. 291. — P. 1070–1077.
- Relevance of Periglomerular Myofibroblasts in Progression of Human Glomerulonephritis / S. Oba [et al.] // Am J Kidney Dis. — 1998. — Vol 32, № 3. — P. 419–425.
- Effects of Transforming Growth Factor- β 1 on Renal Extracellular Matrix Components and Their Regulating Proteins // J. A. Douthwaite [et al.] // J Am Soc Nephrol. — 1999. — Vol. 10. — P. 2109–2119.

Поступила 05.05.2009

УДК 618.11-006.6-085:578.264.3

ЭКСПРЕССИЯ МУТАНТНОГО P53 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ХИМИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ РАСПРОСТРАНЕННЫХ ФОРМ РАКА ЯИЧНИКОВ

А. В. Мойсей

Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск

Поиск путей преодоления химиорезистентности опухоли посредством определения молекулярно-биологических маркеров-мишеней с целью применения наиболее эффективных лекарственных препаратов является актуальной проблемой современной онкогинекологии. Целью исследования явилось изучение уровня экспрессии p53 при распространенном раке яичников. Иммуногистохимическим методом определена экспрессия p53 у 80 больных раком яичников III–IV стадии, которым в период с 1999 по 2002 гг. было проведено хирургическое лечение в ГУ «Научно-исследовательский институт онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н.Александрова». Экспрессия p53 выявлена в 61,3 % наблюдений, при этом в 67,3 % случаев химиорезистентной и в 38,8 % химиочувствительной групп. В исследуемых группах больных выявлены статистически значимые различия по интенсивности окрашивания, количеству окрашенных клеток p53 в баллах, по сумме баллов (Score), а также по абсолютному значению окрашенных клеток ($p < 0,05$, критерий Манна-Уитни). Уровень экспрессии p53 выше при серозном, эндометриоидном и недифференцированном вариантах рака яичников химиорезистентной группы.

Ключевые слова: рак яичников, химиорезистентность, мутантный p53 онкопротеин.

**EXPRESSION MUTANT P53 DEPENDING
ON CHEMOSENSITIVITY OF WIDE-SPREAD FORMS OF OVARIAN CANCER**

A. V. Moysey

The Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education, Minsk

Negotiation of chemoresistance by means of molecular target biomarkers for the use of more effective drugs is a relevant problem of modern oncogynaecology. The aim of study is to research the level of p53 expression advanced ovarian cancer. The study group consisted of 80 advanced ovarian cancer patients which underwent medical treatment in National Cancer Center of N.N. Alexandrov of Belarus from 1999 to 2002 year. Identification of p53 expression was carried out with immunohistochemistry. P53 expression was revealed in 61,3 % of cases, meanwhile 67,3 % of chemoresistant cases and in 38,8 % chemosensitive cases. In two studies groups differences in density of staining, quantity p53 staining cells in point system, amount of points (Score) and also ultimate number of staining cells ($p < 0,05$, Mann-Whitney test) are statistically significant. The level of p53 expression is high in serous, endometrial and undifferent forms of chemoresistant group ovarian cancer.

Key words: ovarian cancer, chemoresistance, mutant p53 oncoprotein.

Введение

Ежегодно раком яичников заболевает около 26 тыс. женщин в Соединенных Штатах Америки, 6 тыс. — в Англии, около 850 женщин — в Республике Беларусь [1, 2]. Интенсивный показатель заболеваемости в Республике Беларусь в 2001 г. составил 15,3 на 100 тыс. населения, в 2006 г. — 17,2 на 100 тыс., в то время как показатель смертности за данный промежуток времени был относительно стабильный (в 2001 и 2006 гг. интенсивный показатель составил 9,5 на 100 тыс. населения) [3].

После оптимальной циторедуктивной операции с последующей химиотерапией препаратами платины пятилетняя выживаемость увеличивается до 35 %. Применение наиболее эффективных режимов химиотерапии цисплатин/карбоплатин и таксотер в качестве первой линии лечения позволило достичь полной или частичной ремиссии только в 73–78 % случаев [4]. Химиорезистентность распространенных форм рака яичников связана с феноменом множественной лекарственной устойчивости. Поиск путей преодоления химиорезистентности посредством определения экспрессии молекулярно-биологических маркеров-мишеней с целью применения наиболее эффективных лекарственных препаратов является актуальной проблемой современной онкогинекологии. При изучении химиорезистентности важная роль отводится механизмам регулирования препарат-индуцированного апоптоза и их влиянию на химиочувствительность. Одним из ключевых механизмов множественной лекарственной устойчивости является ингибирование апоптоза [5]. Ключевыми белками, которые регулируют состояние апоптоза являются белки семейства Bcl-2, Вах и супрессор опухолевого роста p53. Как известно, ген p53 (белок p53) является фактором транскрипции, регулирующим клеточный цикл. В немутированном состоянии он выполняет функцию супрессора образования

злокачественных опухолей. Согласно гипотетической модели химиорезистентности рака яичников, в химиочувствительных клетках препараты платины увеличивают содержание p53, что способствует увеличению таких проапоптотических факторов, как Вах, Fas [6]. В результате происходит активация как внутреннего (митохондриального), так и внешнего (рецептор-связанного) путей апоптоза. В процесс также включаются каспазы, медиаторы клеточной выживаемости (Xiap, Akt, Flip) и другие белки. В химиорезистентных клетках происходит мутация гена p53, снижение регуляции медиаторов клеточной выживаемости, нарушение каскада каспаз и, следовательно, утрата способности опухолевых клеток отвечать на химиоиндуцированный апоптоз [7].

Цель исследования

Изучение уровня экспрессии мутантного онкогена p53 при распространенном раке яичников III–IV стадии в зависимости от химиочувствительности опухоли.

Материал и метод

Объектом исследования послужили больные распространенным раком яичников III–IV стадии, получившие специальное лечение в онкогинекологическом отделении ГУ «Научно-исследовательский институт онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова» в период с 1999 по 2002 г. Ретроспективно проанализированы истории болезни, протоколы операций и амбулаторные карты 80 больных с гистологически верифицированным раком яичников. Все пациенты получили в качестве адъювантного лечения химиотерапию первой линии с включением препаратов платины и (или) таксанов. Перед началом химиотерапии и последующих двух курсов проводилось контрольное обследование: ультразвуковое исследование органов брюшной полости и малого таза, определение концентрации маркера СА-125, гинекологический осмотр. Для умерших больных имеются

данные о дате и причине смерти. Часть пациентов находится под наблюдением в настоящее время.

Всем пациентам методом иммуногистохимии оценена экспрессия протоонкогена p53. Иммуногистохимическое исследование опухолевого маркера проводилось на фиксированных в формалине и заключенных в парафин опухолевых блоках по стандартной пероксидазной методике с использованием системы визуализации En Vision. Демаскировку антигена проводили на водяной бане при температуре 98 °С. Срезы докрашивали гематоксилином Майера и заключали в балзам. Использовали моноклональные антитела к p53 (разведение 1:200, клон DO-7). Оценку результатов окра-

шивания проводили с применением светового микроскопа (увеличение $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$). Оценивали интенсивность окрашивания в ядрах опухолевых клеток: 0 — нет окраски, 1 — слабая, 2 — умеренная, 3 — сильная и процент окрашенных клеток: 0 — 0 %, 1 — менее 10 %, 2–11 — 50 %, 3–51 — 80 %, 4 — более 81 %. По сумме баллов оценивали уровень экспрессии (Score): максимальный — 7 баллов, высокий уровень экспрессии — 4–6 баллов, низкий — 2–3 балла. Пересмотр гистологических препаратов и оценка иммуногистохимического окрашивания производились одним онкоморфологом.

Клинико-морфологическая характеристика больных представлена в таблице 1.

Таблица 1 — Клинико-морфологические характеристики больных распространенным раком яичников (n = 80)

Характеристики	Число больных
Возраст	
≤ 60	56 (70 %)
> 60	24 (30 %)
Средний возраст	53,9 ± 10,5
Диапазон	20–81
Гистологическая структура:	
серозный	43 (53,8 %)
эндометриодный	23 (28,8 %)
муцинозный	6 (7,4 %)
светлоклеточный	4 (5 %)
недифференцированный	4 (5 %)
Стадия по Figo	
III	48 (60 %)
IV	32 (40 %)
Степень злокачественности опухоли	
GI	9 (11,2 %)
GII	30 (37,5 %)
GIII	39 (48,8 %)
GIV	2 (2,5 %)

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с использованием программы «Statistica 6,0». Согласно современным представлениям о сроках возникновения рецидива заболевания, больные распространенным раком яичников распределены на две группы: I-я группа — химиорезистентная — прогрессирование заболевания выявлено у больных в сроки менее 12 месяцев от окончания лечения, II-я группа — химиочувствительная — прогрессирование заболевания наблюдалось спустя 12 месяцев.

Для сравнительного анализа уровней экспрессии онкопротеина p53 в изучаемых группах применялся непараметрический метод — критерий Манна-Уитни (U, $p < 0,05$). Анализ выживаемости основывался на применении моментного метода Kaplan-Meier. Сравнение показателей выживаемости осуществлялось с использованием Log-rank теста.

Результаты

Экспрессия p53 выявлена у 61,3 % больных распространенным раком яичников, при

этом в химиорезистентной группе — у 67,3 % и в химиочувствительной — у 38,8 % пациентов. Характеристика уровней распределения экспрессии мутантного p53 в изучаемых группах представлена в таблице 2.

Нами получены статистически значимые различия в экспрессии мутантного белка p53 у больных распространенным раком яичников химиочувствительной и химиорезистентной групп (таблица 3).

В каждой из исследуемых групп больных преобладал серозный морфотип опухоли (49,1 % — в химиорезистентной группе, 60 % — в химиочувствительной группе). В химиорезистентной группе опухоль по морфологическому строению была более разнообразна (25,5 % — эндометриодный вариант, 9,1 % — светлоклеточный, 10,9 % — муцинозный, 5,4 % — недифференцированный морфотип и карциносаркома). В химиочувствительной группе больных кроме серозного выявлены эндометриодный (36 %) и недифференцированный варианты опухоли (4 %).

Таблица 2 — Характеристика уровней распределения экспрессии p53 химиорезистентной и химиочувствительной группы

Иммуногистохимическая оценка экспрессии белков	Характеристика распределения в I-й группе (медиана), n = 25	Характеристика распределения во II-й группе (медиана), n = 55
Интенсивность окрашивания p53, баллы	1,56 (95 % ДИ 1,21–1,91)	0,84 (95 % ДИ 0,39–1,2)
Количество окрашенных клеток p53, баллы	1,56 (95 % ДИ 1,2–1,92)	0,96 (95 % ДИ 0,44–1,47)
Сумма баллов (Score)	3,12 (95 % ДИ 2,4–3,81)	1,8 (95 % ДИ 0,86–2,73)
Процент окрашенных клеток p53, %	28,65 (95 % ДИ 20,63–36,6)	19,9 (95 % ДИ 7,99–31,81)

Таблица 3 — Значение p (критерий Манна-Уитни) при сравнении иммуногистохимической оценки p53 химиочувствительной и химиорезистентной групп

Иммуногистохимическая оценка экспрессии p53 химиочувствительной и химиорезистентной групп	Значение p
Интенсивность окрашивания p53, баллы	p = 0,008
Количество окрашенных клеток p53, баллы	p = 0,019
Сумма баллов (Score)	p = 0,011
Процент окрашенных клеток p53, %	p = 0,046

При проведении анализа выживаемости данной категории больных ($p = 0,003$, Log-rank) установлено, что благоприятными гистотипами опухоли являлись эндометриоидный (медиана жизни больных распространенными формами рака яичников составляла 22,7 месяца), серозный (медиана жизни — 22,6 месяца) и светлоклеточный (медиана жизни — 22 месяца). К менее благоприятным отнесли муцинозный (медиана жизни — 5,3 месяца), недифференцированный варианты (медиана жизни — 15,3 месяца) и карциносаркому (медиана жизни — 5 месяцев).

Уровень экспрессии мутантного p53 при серозном гистотипе рака яичников в химиорезистентной группе варьировал от 4 до 90 % и в среднем составил 40,5 %. Отсутствие окрашивания отмечено у 29,6 % больных данной группы. В химиочувствительной группе уровень экспрессии варьировал от 10 до 82 % и в среднем составил 38,3 %, при этом в 60 % случаев окрашивания микропрепаратов не отмечено.

При эндометриоидном гистотипе уровень экспрессии мутантного p53 в химиорезистентной группе варьировал от 9 до 90 % и в среднем составил 49,9 %, при этом отсутствие окрашивания отмечено у 28,6 % больных данной группы и в 33,3 % микропрепаратов химиочувствительной группы. Для второй группы больных уровень экспрессии p53 варьировал от 5 до 84 % и в среднем составил 23 %. Сумма баллов (Score) и процент положительно окрашенных клеток при недифференцированном гистотипе химиорезистентной группы были высокими (в одном случае Score 7 соответствовало 100 %, в другом — Score 5 — 45 %). У больных химиочувствительной группы при недифференцированном морфотипе отмечено отсутствие экспрессии мутантного протеина p53.

Светлоклеточный вариант опухоли у больных химиочувствительной группы в 40 % случаев не окрашивался антителами p53. У 60 % больных данной категории уровень экспрессии варьировал от 10 до 26 % и в среднем составил 17 %. При муцинозном варианте опухоли экспрессия p53 выявлена в 33,3 % случаев (от 4 до 9 %), в остальных наблюдениях экспрессии онкопротеина не отмечено. При карциносаркоме яичников у больных химиорезистентной группы уровень экспрессии мутантного p53 составил 21 %.

Обсуждение

Как известно, химиотерапия является одним из главных способов лечения рака яичников, однако клинической проблемой неудовлетворительных результатов ее применения остается химиорезистентность опухоли. Для преодоления низкой чувствительности опухолевых клеток к химиопрепаратам большое внимание уделяется изучению маркеров апоптоза, в частности, мутантного онкогена p53. Несмотря на то, что p53 является наиболее изучаемой молекулой канцерогенеза рака яичников, до сих пор четких данных о его роли в процессе развития химиорезистентности в современной литературе не имеется. Согласно мнению отдельных ученых, изменения в данном онкогене связаны с плохим прогнозом [8], в то время как другие исследователи не прослеживают взаимосвязи между экспрессией p53 и выживаемостью больных [9]. Между тем, в более поздних исследованиях при отсутствии статистически значимых различий отмечена связь экспрессии p53 с такими клинико-морфологическими характеристиками, как стадия, степень злокачественности и гистологический подтип опухоли, что подтверждает участие p53 в развитии рака яичников. При этом установлено, что мутантный онкоген p53 связан с ответом опухоли на проводимое лече-

ние и выживаемостью больных. Однако единого мнения о характере взаимосвязи этих процессов до сих пор нет [10]. Определение экспрессии мутантного p53 в зависимости от химиочувствительности опухоли является важным для использования его в качестве молекулы-мишени для назначения препаратов направленного действия. В настоящее время ведутся исследования по использованию ONYX-015 на основе аденовируса [11].

Определение химиочувствительности опухоли до назначения адъювантной химиотерапии является весьма важным для выбора высокоэффективного лечения. В данном исследовании показаны статистически значимые различия в уровнях экспрессии мутантного p53 в химиочувствительной и химиорезистентной группах больных распространенным раком яичников ($p < 0,05$). При этом отмечено, что уровень экспрессии данного онкогена выше при серозном, эндометриодном и недифференцированном вариантах рака яичников химиорезистентной группы.

Заключение

В результате проведенного исследования экспрессия p53 выявлена у 61,3 % больных распространенным раком яичников, при этом в химиорезистентной группе — у 67,3 % и в химиочувствительной — у 38,8 % пациенток. В исследуемых группах установлены статистически значимые различия по интенсивности окрашивания ($p = 0,008$), количеству окрашенных клеток p53 в баллах ($p = 0,019$), по сумме баллов (Score, $p = 0,011$), а также по абсолютному значению окрашенных клеток опухоли ($p = 0,046$). Более благоприятными гистотипами опухоли явились эндометриодный, серозный и светлоклеточный. К менее благоприятным отнесли муцинозный, недифференцированный варианты и карциносаркому.

Полученные данные свидетельствуют о высокой научной и практической значимости определения уровня экспрессии мутантного он-

когена p53 у больных распространенным раком яичников с целью выявления химиорезистентности опухоли и коррекции адъювантной химиотерапии, при этом иммуногистохимический метод окраски и оценки экспрессии мутантного онкогена p53 достаточно прост, а технология его выполнения относительно доступна для специалистов не только республиканских, но и областных медицинских учреждений.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Surveillance procedures for patients treated for epithelial ovarian cancer: a review of literature / A. Gadducci [et al.] // Int. J. Gynecol. Cancer. — 2007. — Vol. 17. — P. 21–31.
2. Приказ Министерства здравоохранения РБ № 80 «Алгоритмы диагностики и лечения злокачественных новообразований». — Мн., 2007. — 327 с.
3. Злокачественные новообразования в Беларуси 1996–2006 гг. / под ред. А. А. Граковича, И. В. Залуцкого. — Мн.: БелЦМТ, 2007. — 179 с.
4. Практическая онкология: избранные лекции заболевающих / под ред. С. А. Тюлядина, В. М. Моисеенко. — СПб.: Центр ТОММ, 2004. — 784 с.
5. Dysfunctional apoptosome activation in ovarian cancer: implications for chemoresistance / Rebecca J. Liu [et al.] // Cancer Research. — 2002. — Vol. 62. — P. 924–931.
6. P53 is a determinant of X-linked inhibitor of apoptosis protein / M. Fraser [et al.] // Akt-mediated chemoresistance in human ovarian cancer cells // Cancer research. — 2003. — Vol. 63. — P. 7081–7088.
7. Prognostic significance of p53 mutation and p53 overexpression in advanced epithelial ovarian cancer: a gynecologic oncology group study / L. Havrilesky [et al.] // J. Clin. Oncol. — 2003. — Vol. 21. — P. 3814–3825.
8. Evidence for a dose-response effect between p53 (but not p21WAF/Cip1) protein concentrations, survival, and responsiveness in patients with epithelial ovarian cancer treated with platinum-based chemotherapy / M. Levesque [et al.] // Clin. Cancer Res. — 2000. — Vol. 6. — P. 3260–3270.
9. Factors influencing p53 expression in ovarian cancer as a biomarker of clinical outcome in multi-centre studies / P. Graeff [et al.] // Br. J. Cancer. — 2006. — Vol. 95. — P. 627–633.
10. P53 gene status and response to platinum/paclitaxel-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma / C. Lavarino [et al.] // J. Clin. Oncol. — 2000. — Vol. 18. — P. 3936–3945.
11. Molecular prognostic markers in ovarian cancer: toward patient — tailored therapy / A. P. G. Crigns [et al.] // Int. J. Gynecol. Cancer. — 2006. — Vol. 16. — P. 152–165.

Поступила 05.05.2009

УДК 617.582.5: 616 – 001.513

ЦЕРВИКОКАПИТАЛЬНОЕ ЭНДОПРОТЕЗИРОВАНИЕ ПРИ МЕДИАЛЬНЫХ ПЕРЕЛОМАХ ШЕЙКИ БЕДРЕННОЙ КОСТИ

Д. В. Чарнаштан, В. И. Николаев

Гомельский государственный медицинский университет

За период с 2005 по 2008 гг. однополюсные эндопротезы были имплантированы 62 больным с медиальными переломами шейки бедренной кости (МПШБК). В разные сроки после операции умерло 16 больных. Таким образом, обследуемую группу составили 45 больных (один больной исключен из группы вследствие наличия ДЦП). Всем прооперированным больным были имплантированы металлические однополюсные эндопротезы: Мура (с цементной фиксацией ножки) — 28 (62,2 %), Мура — ЦИТО — 12 (26,7 %), Эталон — 5 (11,1 %).

Клинико-рентгенологические результаты лечения изучены у 45 больных, в сроки от 6 месяцев после операции до 3,5 лет.

Функция тазобедренного сустава оценивалась по шкале Д'Абинье-Постелу в модификации Чанли. Выяснилось, что при оценке состояния больных в клинике преобладает боль (в среднем 3,5 балла) и ограничен-