

Отдельного обсуждения заслуживает установленный нами факт, что у 15 плодов с СД нами были зарегистрированы патологические КСК в венозном протоке при нормативных значениях толщины ВП. При этом более часто это было зарегистрировано в сроки 11 недель 0 дней – 11 недель 6 дней (у 4 (14,8%) из 27 плодов). В 12 недель 0 дней – 12 недель 6 дней аномальные КСК в ВП при нормативных значениях толщины воротникового пространства были отмечены у 6 (8,3%) из 72 плодов с СД, а в 13–14 недель – у 5 (10,2%) из 49. По-видимому, это можно объяснить тем, что в 11–12 недель беременности толщина ВП может еще не достигнуть наибольших значений, а пик регистрации аномальных КСК в ВП приходится на 10–13 недель [4].

По нашему мнению, оценка ТР в скрининговом режиме пока нецелесообразна. Во-первых, этот маркер обладает чувствительностью менее 50%, а также по причине того, что этот маркер является самым трудоемким из всех пренатальных ультразвуковых маркеров в ранние сроки, требует специальной подготовки и убедительных практических навыков по эхокардиографии плода в 11–14 недель беременности. Кроме этого его включение в комплексное обследование не влияет на суммарную чувствительность пренатальной эхографии в идентификации плодов с СД в конце первого триместра беременности.

Таким образом, чувствительность изолированного использования толщины ВП в наших исследованиях составила 76,4% при СД у плода, а при комбинированном применении оценки толщины ВП, длины НК и КСК в венозном протоке – 86,5%, что позволяет рекомендовать эту схему для применения в ходе скринин-

говых ультразвуковых исследований в 11–14 недель беременности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алтынник Н. А., Медведев М. В. Нормативные значения копчико-теменного размера и толщины воротникового пространства плода в ранние сроки беременности // Ультразвук. диагн. акуш. гин. педиат. – 2001. – Т. 9. № 1. – С. 38–40.
2. Медведев М. В., Алтынник Н. А. Основы ультразвукового скрининга в 11–14 недель беременности: Практическое пособие для врачей. – М.: Реал Тайм, 2009. – 96 с.
3. Алтынник Н. А., Лютая Е. Д. Комбинированное применение оценки толщины воротникового пространства и длины носовых костей плода в пренатальной идентификации синдрома Дауна при скрининговом ультразвуковом исследовании в 11–14 недель беременности // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2012. – № 1 (41). – С. 100–102.
4. Kagan K. O., Valencia C., Livanos P. Tricuspid regurgitation in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11 + 0 to 13 + 6 weeks of gestation // Ultrasound obstet. gynecol. – 2009. – V. 33. – P. 18–22.
5. Maiz N., Valencia C., Kagan K. O., Wright D., Nicolaidis K. H. Ductus venosus Doppler in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11–13 weeks of gestation // Ultrasound obstet. gynecol. – 2009. – V. 33. – P. 512–517.
6. Nicolaidis K. H., Spencer K., Avgidou K., et al. Multicenter study of first-trimester screening for trisomy 21 in 75 821 pregnancies: results and estimation of the potential impact of individual risk-orientated two-stage first-trimester screening // Ultrasound obstet. gynecol. – 2005. – V. 25. – P. 221–226.

Поступила 19.04.2012

Н. Г. БАХМУТСКИЙ, В. А. ПОРХАНОВ, В. Н. БОДНЯ

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ Ki-67 И p53 КАК НЕЗАВИСИМЫЙ ФАКТОР ПРОГНОЗА ДЛЯ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЁГКОГО ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ВИХРЕВОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ

Кафедра онкологии с курсом торакальной хирургии ФПК и ППС ГБОУ ВПО КубГМУ, Россия, 350086, г. Краснодар, ул. 1 Мая, 167, тел. 268-34-03. E-mail: bachnik@mail.ru

В работе изучена экспрессия белков Ki-67 и p53 как независимый прогностический фактор, влияющий на выживаемость при комплексном лечении нерезектабельного местнораспространённого немелкоклеточного рака лёгкого (НМРЛ) с включением в комплекс вихревого магнитного поля (ВМП).

Уровень экспрессии Ki-67 в клетках НМРЛ до воздействия составлял $48,4 \pm 16,7\%$, а после воздействия уменьшился до $32,8 \pm 11,5\%$ ($p < 0,05$). При анализе уровней экспрессии p53 были выявлены следующие цифры: для опухолей перед началом воздействия ВМП уровень экспрессии был равен $41,5 \pm 12,1\%$, после воздействия отмечалось снижение его показателей до $29,7 \pm 10,3\%$ ($p < 0,05$). Эти данные ассоциируются с хорошим прогнозом у больных с НМРЛ, если в комплексной терапии использовать ВМП.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак лёгкого, Ki-67, p53, вихревое магнитное поле.

N. G. BAKHMUTSKY, V. A. PORKHANOV, V. N. BODNYA

EXPRESSION OF THE PROTEINS KI-67 AND P53 AS AN INDEPENDENT FACTOR FORECAST FOR NON-SMALL CELL LUNG CANCER UNDER THE INFLUENCE OF VORTICAL MAGNETIC FIELD

Department of oncology, course of thoracic surgery of KSMU, Russia, 350086, Krasnodar, 1 May street, 167, tel. 268-34-03. E-mail: bachnik@mail.ru

In this paper we studied the expression of proteins Ki-67 and p53 as an independent prognostic factor influencing survival in unresectable locally advanced complex treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) with the inclusion of the complex vortical magnetic fields (VMF). The level of expression of Ki-67 in NSCLC cells before exposure was $48,4 \pm 16,7\%$, while after exposure was reduced to $32,8 \pm 11,5\%$ ($p < 0,05$). In analyzing the expression levels of p53 were identified by the following figures: for tumors before exposure VMF expression level was equal to $41,5 \pm 12,1\%$, after exposure, a decrease of its performance up to $29,7 \pm 10,3$ ($p < 0,05$). These data are associated with good prognosis in patients with NSCLC when used in the treatment of VMP.

Key words: nonsmall cell lung cancer, Ki-67, p53, vortical magnetic field.

Введение

Рак лёгкого (РЛ) остаётся основной причиной смерти от злокачественных новообразований у мужчин. Несмотря на усиление борьбы с курением и достижения в лечении, абсолютное число смертей по-прежнему увеличивается [11].

Немелкоклеточный рак лёгкого (НМРЛ) – одна из наиболее распространённых опухолей с плохим прогнозом. Хирургические резекции играют главную роль в лечении пациентов с I и II стадиями заболевания, но не всегда могут быть использованы для пациентов с III стадией НМРЛ [7]. Лечение больных с нерезектабельным местнораспространённым НМРЛ продолжает развиваться в течение последних двух десятилетий. В 1980 году только использование одной лучевой терапии привело к медиане выживаемости, составляющей около 10 месяцев, и 3-летней выживаемости, составляющей не менее 10%. Рандомизированные исследования III фазы комбинированного лечения показали увеличение медианы выживаемости от 10 до примерно 13 месяцев с добавлением двух циклов химиотерапии на основе цисплатина, проводимых перед лучевой терапией [8, 13].

Таким образом, вопросы комплексного лечения нерезектабельного местнораспространённого НМРЛ окончательно не решены. Требуется новая стратегия лечения для пациентов с НМРЛ [10].

Одной из попыток решения этой задачи является использование методики лечения злокачественных новообразований вихревым магнитным полем (ВМП), разработанной в КубГМУ, новизна которой заключается в одновременном и синхронном воздействии на все органы и системы больного вращающимся, плавно изменяющимся по амплитуде магнитным полем. Реализуется этот метод с помощью установки «Магнитотурботрон» [4]. Актуальную задачу для своих исследований мы видели в обосновании и оценке методики комплексного лечения именно НМРЛ с включением в комплекс лечения помимо традиционных методов, ВМП. Выполнение программы обоснования и оценки лечения возможно только при проведении параллельно экспериментальных и клинических исследований.

Клинические исследования должны были включать изучение независимых прогностических факторов, влияющих на выживаемость больных с НМРЛ. К этим факторам относится экспрессия белка пролиферации Ki-67 и белка p53 в клетках опухоли.

Антитела к Ki-67 применяют для оценки пролиферативной активности многих новообразований: легких, злокачественных лимфом, опухолей молочной, предстательной, поджелудочной желез, гипофиза, толстой кишки [1, 5, 6]. По отношению числа опухолевых Ki-67-позитивных клеток к общему их количеству рассчитывается индекс пролиферативной активности (индекс Ki-67). Обнаружена связь между значениями индекса Ki-67 и степенью гистологической дифференцировки опухоли и клиническим прогнозом при раке легкого,

эндометрия, яичника, мочевого пузыря, опухолях нервной системы. Показано, что индекс Ki-67 является независимым показателем при прогнозировании рецидивов и длительности жизни у больных раком лёгкого, молочной и предстательной желез [3, 6].

В ряде исследований экспрессия p53 была зарегистрирована как прогностический фактор для НМРЛ с довольно противоречивыми результатами. Эти сомнения были развеяны E. Steels, M. Paesmans, T. Berghmans et al. [15], которые представили мета-анализ исследований, проведённых для изучения роли p53 в прогнозе выживаемости при раке лёгких. Было отобрано 79 работ за 1992–1999 годы. Во всех этих сообщениях, касающихся прогностического значения экспрессии p53 для выживания больных раком лёгкого, оценивали экспрессию мутированного гена p53 или его белка иммуногистохимическими и другими методами, а также антителами против p53 в сыворотке крови. Систематический обзор литературы убедительно показал, что мутация гена p53 в клетках рака лёгкого является плохим прогностическим фактором для выживаемости у пациентов с НМРЛ. Анализ выявил сходные черты для каждой подгруппы НМРЛ и помог прояснить ошибки в нескольких сообщениях отдельных авторов. Этот мета-анализ является важной основой для прогностических причин и самого прогноза выживаемости при НМРЛ.

Материалы и методы исследования

Пациенты, опухолевый материал которых использовался в морфологических исследованиях. В исследование было включено 20 пациентов с нерезектабельным местнораспространённым НМРЛ, но гистологическим диагнозом у всех больных был плоскоклеточный рак. Пациентам провели 30 процедур ВМП на установке «Магнитотурботрон» при индукции поля 3мТ и частотой 100 Гц. Впоследствии этим больным проводилась химиотерапия или лучевая терапия, в зависимости от плана лечения, но на момент магнитотерапии они проходили дополнительные исследования, или у них агрессивные методы лечения нельзя было проводить из-за сопутствующих заболеваний. Всем больным перед магнитотерапией и после неё выполняли фиброволоконную бронхоскопию с биопсией. На проведение таких мероприятий было дано устное согласие больного.

Методика выявления антигена Ki-67. Экземпляры опухоли, полученные во время бронхоскопии, были фиксированы в нейтральном забуференном формалине (10%-ный водный раствор; pH = 7,4) и залиты в парафин с приготовлением блоков. Затем получали последовательные тонкие срезы опухоли (толщина 5 мкм), которые размещали на поли-L-лизин-обработанные предметные стёкла. Срезы нагревали до 60–70° в течение 20 минут, затем депарафинировали в ксилоле и регидратировали в 100%-ном и 95%-ном этаноле. Для выявления антигена Ki-67 антителами срезы были промыты дважды в 10 мМ цитратном буфере с pH 6,0

по 10 минут и затем охлаждены при комнатной температуре в течение 20 минут. После подавления эндогенной активности пероксидазы 0,3% H_2O_2 (в абсолютном метаноле) в течение 30 минут срезы обрабатывали в течение 2 часов при комнатной температуре 5%-ным бычьим альбумином для блокирования сайтов, связанных с неспецифическими антителами. Стёкла инкубировали в течение ночи при температуре 4° с мышиными моноклональными антителами MIB-1 в разведении 1:100 для обнаружения Ki-67 и дальнейшего оптимального окрашивания. В течение часа срезы затем инкубировали с биотинилированным антимышиным IgG («Vector Lab. Inc.», «Burlingame», CA, США) для Ki-67. Иммуноокрашивание было выполнено биотин-стрептавидин-иммунопероксидазным методом с 3,3-диаминобензидин-тетрагидрохлоридом, как хромогеном («SAB-PO kit», «Nichiri», Токио, Япония). В качестве доокрашивания использовался метиловый зелёный. Для положительного контроля использовали формалин-фиксированные парафиновые срезы плоскоклеточного рака лёгкого, которые окрашивали одновременно. Для отрицательного контроля срезы инкубировали с фетальной телячьей сывороткой вместо первичных антител. Для Ki-67 опухолевые клетки считались положительными, если какое-нибудь ядерное окрашивание присутствовало.

Индекс Ki-67 был определён как процент опухолевых клеток, воспроизводящих ядерную иммунореактивность, и рассчитывался путём подсчёта в каждом срезе числа окрашенных клеток на ядерный Ki-67 в 1000 опухолевых клетках. Изучался один срез от каждой опухоли с увеличением $\times 100$, по крайней мере, в двух или трёх направлениях наугад. Подсчёт клеток проводили при $\times 400$ не менее чем в семи полях зрения.

Методика выявления антигена p53. Иммуногистохимическое окрашивание было выполнено на фиксированных формалином и залитых в парафин образцах тканей плоскоклеточного рака лёгкого с использованием авидин/биотинового метода (ABC Kit Novocastra) с моноклональными антителами против p53 (clone DO-7, Novocastra Lab. Ltd, Newcastle upon Tyne, UK, разбавленные 1:100) и стрептавидин/биотин комплектом (LSAB, Dako Denmark). P53 антитела могут реагировать с дикими и мутантными типами белка p53. Срезы толщиной 5 μ m депарафинировали в силлоле (3х5 мин), проводили через батарею возрастающей крепости этилового спирта (2х10 мин) и промывали в дистиллированной воде (2х5 мин). Иммуногистохимическое окрашивание на p53 проводили с использованием теплоиндуцированного поиска антигена (эпитопа) в микроволновой печи. Депарафинированные срезы погружали в буфер лимонной кислоты, содержащей NP-40 (0,01 M, pH 6,0; Sigma), и нагревали в микроволновой печи (600 Вт) в течение 10 мин, а затем ещё выдерживали в течение 15 мин. Неспецифическая эндогенная реактивность пероксидазы была заблокирована с помощью 2%-ной перекиси водорода на 70%-ном метаноле в течение 10 минут при комнатной температуре (2,28%, 30 сек.). Образцы тканей были обработаны моноклональными первичными антителами против p53 онкопротеина в течение 2 часов при комнатной температуре, а затем инкубировали с вторичными биотинилированными антителами в течение 20 минут. Антиген-антитело-реакция визуализировалась 8-минутной инкубацией с 3,3'-диаминобензидин-тетрахлоридом (DAB) в качестве хромогена. Препараты контрастно докрашивали гематоксилином. Буфер

PBS был использован для последующих промываний и для разведения антител. Отрицательный контроль был выполнен исключением первичных антител. Результаты иммуноокрашивания были оценены при световой микроскопии, оценивали путём подсчёта 1000 клеток в пяти случайно выбранных полях опухоли ($\times 400$). Случай отмечался как положительный, если более 10% раковых клеток имели ядерное окрашивание белка p53.

Результаты исследования

При изучении уровня экспрессии Ki-67 в плоскоклеточном раке лёгкого до воздействия отмечено, что экспрессия этого антигена была равна $48,4 \pm 16,7\%$, а после воздействия в опухолях пациентов с плоскоклеточным раком отмечено её уменьшение до $32,8 \pm 11,5\%$ ($p < 0,05$).

Антитела для p53, используемые в нашем исследовании, распознают оба типа p53: дикий и мутантный, хотя в клетках присутствовали мутантные формы. В плоскоклеточных раках большинство из p53 положительных ядер были отмечены в периферических клетках, тогда как области с ороговением оставались отрицательными. Локализация p53 была исключительно ограничена ядром. Окрашивание для плоскоклеточного рака, как и для всех реактивных раков, было гетерогенным, но не случайным. То есть p53 был обычно сконцентрирован в тех раковых клетках, которые граничили с соседними неопухолевыми структурами. Тогда как в этих структурах окрашенных ядер никогда не видели.

При анализе уровней экспрессии p53 были выявлены следующие цифры: для опухолей перед началом воздействия ВМП уровень экспрессии был равен $41,5 \pm 12,1\%$, после воздействия отмечалось снижение его показателей до $29,7 \pm 10,3$ ($p < 0,05$).

Обсуждение

Пролиферативная активность опухоли является потенциально полезным индикатором для предсказания прогноза заболевания. Всё это подтверждает и развивает данные открытия, зарегистрированного нами [2].

Далее для подтверждения основного вывода об угнетении пролиферативной активности опухолевых клеток было проведено ИГХ-изучение экспрессии белка пролиферации Ki-67 в опухолях пациентов с НМРЛ, подвергавшихся воздействию ВМП. Известно, что этот белок (антиген Ki-67) определяется только в делящихся клетках. Убедительные доказательства необходимости Ki-67 в клеточной пролиферации были получены в экспериментах с клеточными культурами. Ki-67 присутствует в ядрах клеток на всех стадиях жизненного цикла, за исключением G0 и начальной стадии G1 [12]. Таким образом, его экспрессия должна коррелировать с другими показателями пролиферативной активности.

Проведенное нами исследование по выявлению экспрессии Ki-67 в опухолях, подвергавшихся воздействию ВМП, указало на снижение накопления этого белка. При изучении уровня экспрессии Ki-67 в плоскоклеточном раке лёгкого до воздействия отмечено, что экспрессия этого антигена была равна $48,4 \pm 16,7\%$, а после воздействия в опухолях пациентов с плоскоклеточным раком отмечено её уменьшение до $32,8 \pm 11,5\%$ ($p < 0,05$). Это ещё раз свидетельствует о более благоприятном прогнозе у больных НМРЛ, если в комплекс их лечебных мероприятий будет включено ВМП.

Далее в процессе изучения факторов, влияющих на прогноз при НМРЛ, наше внимание привлёк ген p53, известный как хранитель целостности генома, играющий важную роль в регуляции апоптоза. Изменения в гене p53 являются наиболее широко описанными генетическими изменениями в неоплазмах человека, в том числе и в РЛ. Мутации в гене p53 приводят к синтезу изменённого белка p53, не способного контролировать репарацию ДНК или активацию апоптоза после сублетальных повреждений клетки, которые вызывают стойкое повреждение ДНК [14]. p53-положительные опухоли показали чёткую связь с выживанием, пациенты с p53 позитивными опухолями имели значительно худший прогноз. Это согласуется с результатами при изучении РЛ многими исследователями [9]. С другой стороны, есть такие исследования, которые не нашли никаких различий в выживаемости между p53-положительными и p53-негативными опухолями. Мы же основывались на данных крупных мета-анализов, таких как у E. Steels, M. Paesmans, T. Berghmans et al. [15], которые чётко показали взаимосвязь накопления p53 и прогноза при НМРЛ.

Мы получили достоверные данные о снижении экспрессии мутированного p53 в опухолях, подвергавшихся воздействию ВМП. При анализе уровней экспрессии p53 были выявлены следующие цифры: для опухолей перед началом воздействия ВМП уровень экспрессии был равен $41,5 \pm 12,1\%$, после воздействия отмечалось снижение его показателей до $29,7 \pm 10,3$ ($p < 0,05$). Эти данные, полученные нами, ассоциируются с хорошим прогнозом у больных с РЛ, если в комплексной терапии также использовать ВМП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коган Е. А., Швец С. И., Коваленко В. Л., Соболева Ю. В. Соотношение процессов пролиферации, апоптоза, ангиогенеза и метастазирования в различных гистогенетических типах рака лёгкого // *Арх. пат.* – 2004. – № 6. – С. 33–38.
2. Порханов В. А., Бахмутский Н. Г., Бодня В. Н. Закономерность изменения пролиферативной активности опухолевых клеток под воздействием вихревого магнитного поля на организм человека. Диплом научного открытия № 335 // *Научные открытия, идеи, гипотезы (1992–2007)*. – М., 2008. – С. 316.
3. Райхлин Н. Т., Букаева И. А., Смирнова Е. А. и др. Значение экспрессии ядрышковых аргирофильных белков и анти-

гена Ki-67 в определении пролиферативной активности клеток и прогноза «малого» (T1) рака лёгкого // *Арх. пат.* – 2008. – № 3. – С. 15–17.

4. Синицкий Д. А., Синицкий С. Д. Установка для лечения вихревым магнитным полем. Патент (Россия) № 2063254, МКИ А61N2/04. – 1996.

5. Угоров А. В., Семиглазов В. Ф., Пожарисский К. М. Иммуногистохимическое изучение клеток рака молочной железы с использованием маркеров пролиферации // *Арх. пат.* – 2000. – Вып. 2. – С. 26–30.

6. Bai X. Z., Masters J. R., O'Donoghue N. et al. Prognostic markers in clinically localized prostate cancer // *Int. j. oncol.* – 1999. – Vol. 14. – P. 785–791.

7. Cersosimo R. J. Lung cancer: a review // *Am. j. health-syst. ph.* – 2002. – № 59. – P. 611–642.

8. Dillman R. O., Herndon J., Seagren S. L. et al. Improved survival in stage III non-small-cell lung cancer: Seven-year follow-up of cancer and leukemia group B (CALGB) 8433 trial // *J. natl. cancer inst.* – 1996. – № 88. – P. 1210–1215.

9. Harpole D. J., Herndon J. E., Wolfe W. G. et al. A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small lung cancer utilizing presentation, histopathology, and oncoprotein expression // *Cancer res.* – 1995. – № 55. – P. 51–56.

10. Huang C., Liu D., Masuya D. Clinical application of biological markers for treatments of resectable non-small-cell lung cancer // *Br. j. cancer.* – 2005. – V. 92. № 7. – P. 1231–1239.

11. Jemal A., Murray T., Samuels A., et al. Cancer statistics, 2003 // *CA cancer j. clin.* – 2003. – № 53. – P. 5–26.

12. Nguyen V. N., Mirejovsky P., Mirejovsky T. et al. Expression of cyclin D1, Ki-67 and PCNA in non-small cell lung cancer: prognostic significance and comparison with p53 and bcl-2 // *Acta histochem.* – 2000. – № 102. – P. 323–338.

13. Sause W., Kolesar P., Taylor S. I. et al. Final results of phase III trial in regionally advanced unresectable non-small cell lung cancer: radiation therapy oncology group, eastern cooperative oncology group, and southwest oncology group // *Chest.* – 2000. – № 117. – P. 358–364.

14. Soussi T. The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation // *Ann. NY acad. sci.* – 2000. – № 910. – P. 121–137.

15. Paesmans M., Berghmans T. et al. Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis // *Eur. respir. j.* – 2001. – № 18 (4). – P. 705–719.

Поступила 15.05.2012

А. Т. БЕЛИКОВА, В. Б. БРИН, Т. В. ЗАКС, К. М. КОЗЫРЕВ

ВЛИЯНИЕ ГАЛАВИТА НА ФУНКЦИОНАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЧЕК, ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ ПРИ НЕФРОПАТИЧЕСКОМ ТИПЕ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО АМИЛОИДОЗА

Кафедра нормальной физиологии и патологической анатомии
ГБОУ ВПО СОГМА Минздравсоцразвития РФ,
Россия, 362019, РСО – Алания, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, 40,
тел. 8672534617. E-mail: nosma@dol.ru

Однократное подкожное введение нативной человеческой плазмы вместе с адьювантом Фрейнда в равных пропорциях по 0,1 мл в 5 точек сирийским хомякам вызывает развитие нефропатического типа генерализованного амилоидоза, выработанную протеинурию, снижение показателей электролитно- и водовыделительной функций почек, активацию процессов перекисного окисления липидов. Одновременное введение нативной человеческой плазмы вместе с адьювантом Фрейнда и