

ТЕОРЕТИЧНА МЕДИЦИНА

“Журнал НАМН України”, 2015, т. 21, № 1. — С. 3-11.

УДК 616.61-006.6-02:614.73

А. М. Романенко, С. А. Возианов, С. А. Бойко*, Л. Морелл-Квадрени,
Х.-А. Лопес-Гверреро**, А. Лломбарт-Бош****

Государственное учреждение “Институт урологии НАМН Украины”, 04053 Киев

**Ужгородский национальный университет, 88000 Ужгород*

***Медицинский факультет Валенсийского университета, 46010 Валенсия, Испания*

ПОВРЕЖДЕНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА В ТКАНИ КОНВЕНЦИОННОГО ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОГО РАКА ПОСЛЕ АВАРИИ НА ЧАЭС ПО СРАВНЕНИЮ С АНАЛОГИЧНЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ В ИСПАНИИ

Проведен сравнительный иммуногистохимический анализ экспрессии протеинов Ki-67, p53, mdm2, p21^{WAF1/CIP1}, cyclin D1, cyclin G, p16^{INK4a} и p14^{ARF} в клетках конвенционного почечно-клеточного рака (кПКР) 37 испанских пациентов (г. Валенсия) и у больных с кПКР из Украины — 31 больного из “чистых” зон и 66 больных, проживающих на радиационно загрязненных территориях, а также перитуморальной почечной ткани 18 испанских больных и 12 украинских больных из “чистых” и 24 из загрязненных зон. Выявлена повышенная экспрессия протеинов mdm2, p21^{WAF1/CIP1}, cyclin D1, cyclin G и особенно p14^{ARF} в украинских группах наблюдений, однако вне связи со степенью ядерной атипии опухолевых клеток. Полученные данные показывают, что при хроническом длительном влиянии малых доз ионизирующей радиации происходят активация и повреждение как молекулярных комплексов p53/mdm2/p14^{ARF}, так и *INK4a/ARF* локусов хромосомы 9p21, что приводит, в свою очередь, к разрушению и потере контроля над основными пунктами клеточного цикла с последующим ростом прогрессии и агрессивности новообразований.

Ключевые слова: светлоклеточный почечно-клеточный рак, ионизирующая радиация, p53, mdm2, cyclin D1, cyclinG, p21^{WAF1/CIP1}, p16^{INK4a}, p14^{ARF}.

После аварии на ЧАЭС за период с 1986 по 2011 годы заболеваемость злокачественными опухолями почки существенно возросла с 4,7 до 10,7 на 100 тыс. населения Украины (от 6,0 до 12,7 на

100 тыс. мужского населения и от 3,6 до 6,6 на 100 тыс. женского населения). Конвенционный (светлоклеточный) гистологический тип является наиболее распространенным среди рака почки и

Институт урологии НАМН Украины

С. А. Возианов — директор института, чл.-кор. НАМН Украины

А. М. Романенко — зав. лабораторией патоморфологии, акад. НАМН Украины (romanenkoa5@hotmail.com)

С. А. Бойко — доцент кафедры хирургических болезней Ужгородского национального университета, к.м.н.

Медицинский факультет Валенсийского университета

Отдел патологии

А. Лломбарт-Бош — зав. отделом, профессор

Л. Морелл-Квадрени — доцент, PhD

Отдел молекулярной биологии

Х.-А. Лопес-Гверреро — зав. отделом, профессор

© А. М. Романенко, С. А. Возианов, С. А. Бойко, Л. Морелл-Квадрени, Х.-А. Лопес-Гверреро, А. Лломбарт-Бош, 2015.

составляет около 75 % общего числа этих новообразований [8].

Хорошо известно, что ионизирующая радиация (ИР) активирует многочисленные гены стрессовых сигнальных каскадов, что приводит к активации пролиферативных процессов. Однако лишь небольшая часть этих генов, в частности, гены, контролирующие процессы клеточного цикла, признаны наиболее ранними мишенями, играющими ключевую роль в сигнальном каскаде фенотипических повреждений, обусловленных хроническим действием малых доз ИР [2]. Антиген Ki-67, образующийся в процессе клеточного цикла, является признанным маркером пролиферации, что подтверждается многочисленными публикациями, демонстрирующими связь между Ki-67 и опухолевой прогрессией различных злокачественных новообразованиях, в том числе при раке почки [7, 11].

Существуют также публикации, показывающие, что супрессирующий опухолевый рост ген *p53* является важным “геном-маркером” клеточного ответа на ИР [18]. Ген *p53* регулирует транскрипцию гена *MDM2* (*murine double minute 2 gene*), кодирующего ядерный протеин, способный формировать комплексы как с “диким” типом, так и с мутированным протеином *p53* и таким образом ингибировать супрессирующую опухолевый рост функцию гена *p53* [12]. Функциональная роль комплекса *p53/mdm2* при почечном канцерогенезе остается мало изученной [24].

Как известно, переход от фазы G_1 к фазе S клеточного цикла контролируется циклинзависимыми киназами (*cyclin-dependent kinases* — *CDK*) 4 и 6, которые в комплексе с циклинами (в частности, *suclin D1*) фосфорилируют продукты гена ретинобластомы (*pRb*), индуцируя клетку к вхождению в митоз [6]. В свою очередь, на активность *CDK* влияют их ингибиторы (*CDKI*), среди которых хорошо известен ген *p16^{INK4a}*, формирующий двойные комплексы исключительно с *CDK4* и *CDK6*, ингибируя тем самым их функцию, как и фосфорилирование *pRb* при прохождении фазы G_1 клеточного цикла [9]. Известно также, что *p16^{INK4a}* кодируется в локусе *INK4a/ARF* хромосомы 9p21, состоящем из 4 экзонов с двумя различными транскрипторами в двух альтернативных экзонах — экзоне 1 α и экзоне 1 β . Протеин *p16^{INK4a}* продуцируется транскриптором 1 α , в то время как альтернативный 1 β -транскриптор продуцирует *p14^{ARF}* протеин, который участвует в функции *p53*, связываясь с *mdm2* предотвращает деградацию *p53*, способствуя таким образом развитию процессов апоптоза, индуцированных геном *p53*, или “аресту” процессов роста [21].

Нарушения функции *suclin/CDKs* комплексов при канцерогенезе различной локализации, которые ассоциированы с высокой степенью ядерной атипии, большими размерами опухоли и плохим прогнозом, были отмечены и при конвенционном раке почки [5]. Недавно описанный в семействе циклинов *suclin G* является единственным представителем этого семейства, который транскрипционно активируется геном *p53*, что предполагает его возможную роль в контроле роста клетки, детерминированным геном *p53* [15]. *Suclin G* активируется в ответ на повреждение ДНК, его экспрессия описана на ранних стадиях канцерогенеза в молочной железе, предстательной железе, толстом кишечнике, а также при раке *in situ* [15], однако его роль при карциногенезе в почке остается неизвестной.

Настоящее исследование проведено с целью изучения иммуногистохимического профиля группы регуляторов клеточного цикла в конвенционном раке почки и прилежащей к опухоли почечной ткани у украинских пациентов, длительное время подвергающихся действию малых доз ИР. Такое же исследование идентичных молекулярных маркеров в аналогичных новообразованиях проводилось у пациентов Клинического госпиталя университета г. Валенсия (Испания) с использованием метода *tissue microarray* (*TMA*).

Материал и методы. Исследование проведено на парафиновых блоках опухолевой ткани 37 больных с первичным конвенционным почечно-клеточным раком почки (кПКР), прооперированных в Клиническом госпитале университета г. Валенсия (Испания), которые составили 1 группу (контрольную), и 97 больных с кПКР из Украины, прооперированных в Институте урологии НАМН Украины в Киеве, которые вошли во 2 группу — 31 больной из “чистых зон” (без выявляемой загрязненности радионуклидами) и 3 группу — 66 больных, постоянно проживающих на загрязненных радионуклидами территориях. Гистологическому анализу была также подвергнута перитуморальная почечная ткань в 36 украинских и 18 испанских наблюдениях.

Все опухоли оценивали с использованием гистологической *TNM*-классификации, разработанной *International Union Against Cancer (UICC)* [23, 26]. Определение степени ядерной атипии опухолевых клеток проводили по *S. A. Furhman* и соавт. [3]. Особое внимание уделяли наличию в опухоли саркоматоидных изменений, воспалительной инфильтрации, а также выявлению очагов некроза. При изучении перитуморальной почечной ткани исследовали корковое вещество с учетом

изменений базальной мембраны клубочков и дистрофических изменений в эпителии канальцев. В мозговом веществе особое внимание обращали на наличие ядерной атипии — очагов рака *in situ* (CIS) в собирательных трубочках.

Для иммуногистохимического анализа (ИГХ) использован анализ *tissue microarray* (TMA). Были приготовлены 3 различных TMA, содержащие ткань кПКР из групп 1-3. Использован ручной вариант *tissue array instrument* (Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, WI, США). Для гистологической верификации полученные из TMA блоков тканевые срезы (толщиной в 3 мкм) окрашивали гематоксилин-эозином и монтировали на *ChemMate capillary gap microscope* (Dako Cytomation, Denmark slides, Дания). Для ИГХ-исследования были использованы антитела против p53 (DO7, 1:50, Dako-Cytomation), Ki-67 (MIB1, 1:50, Dako-Cytomation), mdm2 (1B10, 1:20, Novocastra), p21^{WAF1/CIP1} (SX118, 1:25, Dako-Cytomation), cyclin D1 (SP4, 1:50, Neomarkers), cyclin G (11C8, 1:20, Novocastra) p16^{INK4a} (F-12, 1:50, S. Cruz Technology), p14^{ARF} (polyclonal, 1:50, Neomarkers). ИГХ-окрашивание было получено с помощью LSAB визуализационной системы (Dako) с использованием в качестве субстрата 3,3'-*diaminobenzidine chromogen*.

ИГХ-индекс определяли с учетом распространенности и интенсивности окрашивания. Интенсивность окрашивания ранжировали по следующим критериям: отсутствие окрашивания (0), слабое (1), среднее (2) и сильное (3) окрашивание. Распространенность окрашивания регистрировали так: 0 — отсутствие окрашивания, 1 — слабое (менее 10 % окрашенных клеток), 2 — среднее (более 10, но менее 50 % окрашенных клеток), 3 — сильное гомогенное окрашивание (более 50 % окрашенных клеток).

Для статистического анализа качественных вариаций использовали тест χ^2 . Метод ANOVA был применен для определения взаимоотношений между качественными и количественными вариациями.

Результаты и их обсуждение. Характеристика больных с кПКР приведена в табл. 1. У украинских больных выявлена достоверно более высокая распространенность низкодифференцированных кПКР, особенно в группе проживающих на радиационно загрязненных территориях ($P = 0,008$). Внутриопухолевая воспалительная инфильтрация гораздо чаще обнаруживалась в испанской группе. Очаги некроза в опухолях достоверно чаще встречались у больных, проживающих на радиационно загрязненных территориях Украины.

Повреждения, характерные для ИР в мозговом и реже корковом веществе перитуморальной почечной ткани, выявлялись только в украинских группах на-

блюдений, особенно у проживающих на радиационно загрязненных территориях (табл. 2). В проксимальных канальцах большинства украинских наблюдений выявлялись многочисленные пикнотически сморщенные ядра и дистрофические изменения эпителия. Эпителиальная ядерная атипия в дистальных канальцах, и особенно в собирательных трубочках, чаще обнаруживалась в обеих украинских группах. Собирательные трубочки с многочисленными полями ядерной атипии выявлены у 100 % больных, проживающих на радиационно загрязненных территориях Украины, что достоверно отличается от группы испанцев. Интерстиций мозгового вещества перитуморальной почечной ткани в украинской группе из радиационно загрязненных территорий был отмечен с обширными полями склероза и гиалиноза в 87 % наблюдений. Воспалительная инфильтрация в этой группе наблюдений была слабо выражена, однако при этом в перитуморальной ткани обнаруживалась значительная активация процессов ангиогенеза с обилием множественных новообразованных расширенных микрососудов и наличием обширных кровоизлияний.

Таблица 1

Характеристика пациентов. Эпидемиологические и патогистологические особенности

| Показатель | Испанцы <i>n</i> = 37 | Украинцы | |
|---|--------------------------|------------------------------------|--|
| | | “чистые” зоны, <i>n</i> = 31 | загрязнен- ные зоны, <i>n</i> = 66 |
| Мужчины | 25 | 14 | 43 |
| Женщины | 12 | 17 | 23 |
| Средний возраст (диапазон), лет | 64 (29-81) | 55 (40-73) | 55 (18-80) |
| Годы проведения операции | 2000-2007 | 2000-2011 | 1999-2006 |
| Уровень загрязнения почвы, Ки/км ² [18] | НЗ* | НЗ* | 0,5-30 |
| Средний размер опухоли (диапазон), см | 6,3 (3-12) | 4,9 (3-12) | 7,5 (2-16) |
| Стадия развития опухоли, абс. (%) | | | |
| pT1a | 8 (21,6) | 10 (32,3) | 9 (13,6) |
| pT1b | 11 (29,8) | 18 (58,0) | 22 (33,4) |
| pT2 | 9 (24,3) | 3 (9,7) | 25 (37,9) |
| pT3 | 9 (24,3) | - | 10 (15,1) |
| Степень ядерной атипии, абс. (%) | | | |
| 1 | 14 (37,9) | 12 (38,6) | 9 (13,7) |
| 2 | 16 (43,2) | 12 (38,6) | 23 (34,8) |
| 3 | 5 (13,5) | 5 (16,3) | 23 (34,8) |
| 4 | 2 (5,4) | 2 (6,5) | 11 (16,7) |
| Саркоматоидные изменения, абс. (%) | 3 (8,0) | 10 (32,2) | 20 (30,3) |
| Воспалительные изменения, абс. (%) | 15 (78,0) | 6 (19,3) | 10 (15,1) |
| Некроз, абс. (%) | 8 (21,0) | 9 (29,0) | 43 (65,1) |

Примечание: * — незагрязненная зона.

Таблица 2
Патогистологические изменения перитуморальной ткани почек испанских и украинских больных кПКР, абс. (%)

| Показатель | Испанцы n = 18 | Украинцы | |
|---|-------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| | | “чистые” зоны, n = 12 | загрязнен- ные зоны, n = 24 |
| Корковое вещество | | | |
| Утолщение базальной мембраны | | | |
| Нет | 14 (77,7) | 8 (66,6) | 1 (4,2) |
| <10 % | 4 (22,3) | 4 (33,4) | 1 (4,2) |
| 11-50 % | - | - | 9 (37,4) |
| >50 % | - | - | 13 (54,2) |
| Пикноз ядер | | | |
| Нет | 15 (83,6) | 12 (100) | 2 (8,4) |
| <10 % | 3 (16,4) | - | 12 (50,0) |
| 11-50 % | - | - | 9 (37,4) |
| >50 % | - | - | 1 (4,2) |
| Атипия проксимальных канальцев | | | |
| Нет | 18 (100) | 12 (100) | 5 (20,8) |
| <10% | - | - | 13 (54,2) |
| 11-50% | - | - | 6 (25,0) |
| >50% | - | - | - |
| Атипия дистальных канальцев | | | |
| Нет | 16 (88,8) | 11 (91,7) | - |
| <10 % | 2 (11,2) | 1 (8,3) | 9 (37,4) |
| 11-50 % | - | - | 12 (50,0) |
| >50 % | - | - | 3 (12,6) |
| Мозговое вещество: собирательные трубочки* | | | |
| Апоптоз | | | |
| Нет | 17 (94,4) | 5 (41,6) | 1 (4,3) |
| <10 % | 1 (5,6) | 7 (58,4) | 3 (12,9) |
| 11-50 % | - | - | 17 (74,2) |
| >50 % | - | - | 2 (8,6) |
| Десквамация эпителия | | | |
| Нет | 12 | 7 (58,4) | - |
| <10 % | 3 (16,4) | 5 (41,6) | 7 (30,5) |
| 11-50 % | 3 (16,4) | - | 13 (56,6) |
| >50 % | - | - | 3 (12,9) |
| Дисплазия | | | |
| Нет | 14 (78,0) | 8 (66,6) | - |
| <10 % | 3 (16,4) | 4 (33,4) | 4 (17,6) |
| 11-50 % | 1 (5,6) | - | 13 (56,6) |
| >50 % | - | - | 6 (25,8) |

Примечание: * — собирательные трубочки мозгового вещества почек проанализированы у 23 больных.

Результаты ИГХ-анализа протеинов Ki-67, p53, mdm2, p21^{WAF1/CIP1}, cyclin D1, cyclin G, p16^{INK4a} и p14^{ARF} в клетках кПКР пациентов всех групп приведены в табл. 3. Распространенность очень яркого ядерного окрашивания Ki-67 в кПКР украинцев была достоверно значительно выше, чем в аналогичных новообразованиях испанцев. При этом наблюдалась положительная корреляция между экспрессией Ki-67 и степенью ядерной атипии — в опухолях с наиболее высокой степенью ядерной

атипии был самый высокий уровень экспрессии Ki-67. В эндотелиальных клетках новообразованных сосудов в 33 % из 66 наблюдений кПКР группы 3 отмечена высокая экспрессия Ki-67.

Таблица 3
Экспрессия регуляторов клеточного цикла в кПКР у испанских и украинских больных, абс. (%)

| Показатель | Испанцы n = 37 | Украинцы | |
|--------------------------|-------------------|--------------------------|------------------------------|
| | | “чистые” зоны, n = 31 | загрязненные зоны, n = 66 |
| p53 | | | |
| Отрицательная | 35 (94,5) | 26 (83,9) | 49 (74,0) |
| <10 % | 2 (5,5) | 3 (9,7) | 4 (6,1) |
| 10-50 % | - | 1 (3,2) | 6 (9,2) |
| >50 % | - | 1 (3,2) | 7 (10,7) |
| Ki-67 | | | |
| Отрицательная | 19 (51,3) | 7 (22,6) | 15 (22,7) |
| <10 % | 16 (43,2) | 11 (35,5) | 22 (33,3) |
| 10-50 % | 2 (5,5) | 13 (41,9) | 12 (18,2) |
| >50 % | - | - | 17 (25,8) |
| mdm2 | | | |
| Отрицательная | 1 (2,7) | 2 (6,4) | 2 (3,6) |
| <10 % | 2 (5,5) | 1 (3,2) | 2 (3,6) |
| 10-50 % | 22 (59,4) | 14 (45,2) | 22 (33,3) |
| > 50 % | 12 (32,4) | 14 (45,2) | 40 (59,5) |
| cyclin D1 | | | |
| Отрицательная | 13 (35,2) | 10 (32,0) | 13 (19,6) |
| < 10 % | 11 (29,7) | 8 (26,0) | 6 (9,2) |
| 10-50 % | 12 (32,4) | 12 (38,8) | 32 (48,5) |
| > 50 % | 1 (2,7) | 1 (3,2) | 15 (22,7) |
| cyclin G | | | |
| Отрицательная | 24 (64,8) | 13 (41,9) | 22 (33,3) |
| <10 % | 7 (18,9) | 7 (22,6) | 12 (18,2) |
| 10-50 % | 6 (16,3) | 9 (29,1) | 25 (37,8) |
| >50 % | - | 2 (6,4) | 7 (10,7) |
| p21 ^{WAF1/CIP1} | | | |
| Отрицательная | 21 (56,7) | 17 (54,8) | 25 (37,8) |
| < 10 % | 9 (24,4) | 6 (19,4) | 11 (16,7) |
| 10-50 % | 7 (18,9) | 6 (19,4) | 19 (28,8) |
| > 50 % | - | 2 (6,4) | 11 (16,7) |
| p16 ^{INK4a} | | | |
| Отрицательная | 6 (16,3) | 7 (22,6) | 17 (25,8) |
| <10 % | 3 (8,1) | 3 (9,7) | 8 (12,2) |
| 10-50 % | 10 (27,0) | 5 (16,1) | 24 (36,2) |
| >50 % | 18 (48,6) | 16 (51,6) | 17 (25,8) |
| p14 ^{ARF} | | | |
| Отрицательная | 8 (21,7) | 3 (9,7) | 5 (7,6) |
| <10 % | 5 (13,5) | 6 (19,4) | 6 (9,2) |
| 10-50 % | 10 (27,0) | 16 (51,5) | 33 (49,9) |
| >50 % | 14 (37,8) | 6 (19,4) | 22 (33,3) |

Экспрессия протеина p53 в большинстве наблюдений испанской группы вообще отсутствовала (лишь в двух наблюдениях выявлялось слабое p53 окрашивание менее чем в 10 % опухолевых клеток). Высокая ядерная экспрессия p53 обнаруживалась в кПКР с наиболее высокими 3 и 4 степенями ядерной атипии в украинской группе из загрязненных территорий. Обнаружена также высокая корреляция между Ki-67 и p53 иммунореактивностью во всех украинских новообразованиях. Более того, сар-

коматоидная трансформация выявлялась в украинских кПКР с высокой экспрессией протеина p53.

Высокая ядерная экспрессия протеина mdm2 (>50 % окрашенных клеток) отмечалась в 42 % наблюдений испанской группы, в 45 % украинской группы из “чистых” и 65 % наблюдений из загрязненных территорий. Однако достоверных различий между этими группами не установлено.

Ядерная экспрессия cyclin D1 была выявлена в 58 %, 61 % и 80 % наблюдений кПКР в испанской и украинских группах, соответственно. Аналогичная тенденция отмечена для ядерной экспрессии cyclin G, которая выявлялась в 35, 58 и 66 % наблюдений кПКР в 1, 2 и 3 группах, соответственно, с достоверными различиями между ними. Кроме того, достоверные различия обнаружены между группами и для ядерной экспрессии протеина p21^{WAF1/CIP1}, которая обнаруживалась в 45 %, 45 % и 62 % наблюдений кПКР в группах 1, 2 и 3, соответственно.

Высокая и среднего уровня ядерная экспрессия p16^{INK4a} обнаружена в новообразованиях всех групп без достоверных различий между ними. Однако высокодостоверные различия между испанской группой и обеими украинскими группами отмечались в отношении ядерной экспрессии протеина p14^{ARF} в 64 %, 70 % и 83 % наблюдений кПКР, соответственно. Примечательно, что в украинской группе из загрязненных территорий обнаруживалась высокая ядерная экспрессия p14^{ARF} также и в эндотелиальных клетках внутриопухолевых сосудов.

Важно отметить, что статистически достоверная корреляция между экспрессией протеинов p53, mdm2, p21^{WAF1/CIP1}, cyclin D1, cyclin G, p16^{INK4a} и p14^{ARF} и стадиями прогрессии новообразований отсутствовала.

При ИГХ-анализе перитуморальной почечной ткани низкая ядерная экспрессия протеина p53 лишь в мозговом веществе с очагами ядерной атипии выявлена только в группах украинских пациентов (табл. 4). Слабая ядерная экспрессия Ki-67 в эпителии канальцев и собирательных трубочек отмечена в 16 % случаев испанской группы и в 41 % случаев украинской группы из чистых территорий, тогда как в 79 % случаев украинской группы из загрязненных территорий обнаруживалась высокая ядерная экспрессия Ki-67 в зонах ядерной атипии собирательных трубочек мозгового вещества. Наиболее высокая распространенность экспрессии mdm2 определялась в 45 % наблюдений украинской группы из загрязненных территорий с достоверными различиями между группами. Аналогичные корреляции установлены при ядерной экспрессии cyclin D1 и cyclin G. Что касается ядерной экспрессии p16^{INK4a}, то она была позитивной с распространенностью окрашивания >25 % клеток во всех наблюдениях перитуморальной ткани: испанская

группа — 61 % случаев, украинская группа из “чистых” территорий — 75 % и из загрязненных территорий — 29 % случаев. Резкое повышение ядерной экспрессии p14^{ARF} в дистальных канальцах и собирательных трубочках с ядерной атипией эпителия было выявлено в 11 %, 25 % и 87 % наблюдений в группах 1, 2 и 3, соответственно, с наиболее высоким окрашиванием (>50 % клеток) в перитуморальной ткани украинской группы из загрязненных территорий. Следует отметить, что именно в украинских наблюдениях во многих эндотелиальных клетках, фибробластах и лимфоцитах отмечен высокий уровень ядерной экспрессии протеинов p14^{ARF}, cyclin G, mdm2 и в меньшей мере — p16^{INK4a} (см. табл. 4).

Таблица 4

Экспрессия регуляторов клеточного цикла в перитуморальной почечной ткани у испанских и украинских больных, абс. (%)

| Показатель | Испанцы n = 18 | Украинцы | |
|--------------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| | | “чистые” зоны, n = 12 | загрязнен- ные зоны, n = 24 |
| p53 | | | |
| Отрицательная | 18 (100) | 11 (91,6) | 16 (66,7) |
| <10 % | - | 1 (8,4) | 7 (29,1) |
| 10-50 % | - | - | 1 (4,2) |
| >50 % | - | - | - |
| Ki-67 | | | |
| Отрицательная | 15 (83,3) | 7 (58,3) | 5 (20,8) |
| 10 % | 3 (16,7) | 5 (41,7) | 7 (29,1) |
| 10-50 % | - | - | 8 (33,4) |
| >50 % | - | - | 4 (16,7) |
| mdm2 | | | |
| Отрицательная | 3 (16,7) | 5 (41,7) | 1 (4,2) |
| <10 % | 3 (16,7) | 4 (33,3) | 3 (12,5) |
| 10-50 % | 12 (66,6) | 2 (16,6) | 9 (37,4) |
| >50 % | - | 1 (8,4) | 11 (45,9) |
| cyclin D1 | | | |
| Отрицательная | 17 (94,5) | 12 (100) | 18 (75,0) |
| <10 % | 1 (5,5) | - | 4 (16,7) |
| 10-50 % | - | - | 2 (8,3) |
| >50 % | - | - | - |
| cyclin G | | | |
| Отрицательная | 8 (44,0) | 3 (25,0) | 3 (12,5) |
| <10 % | 5 (28,0) | 4 (33,3) | 4 (16,7) |
| 10-50 % | 5 (28,0) | 4 (33,3) | 9 (37,4) |
| >50 % | - | 1 (8,4) | 8 (33,4) |
| p21 ^{WAF1/CIP1} | | | |
| Отрицательная | 18 (100) | 12 (100) | 18 (75,0) |
| <10 % | - | - | 4 (16,7) |
| 10-50 % | - | - | 2 (8,3) |
| >50 % | - | - | - |
| p16 ^{INK4a} | | | |
| Отрицательная | - | - | 1 (4,2) |
| <10 % | 2 (11,0) | - | 4 (16,7) |
| 10-50 % | 11 (61,0) | 11 (91,6) | 19 (79,1) |
| >50 % | 5 (28,0) | 1 (8,4) | - |
| p14 ^{ARF} | | | |
| Отрицательная | - | - | - |
| <10 % | 5 (28,0) | 2 (16,6) | - |
| 10-50 % | 11 (61,0) | 7 (58,4) | 3 (12,5) |
| >50 % | 2 (11,0) | 3 (25,0) | 21 (87,5) |

Приведенные в нашей работе данные свидетельствуют о высокой экспрессии генов — важных регуляторов клеточного цикла — в конвенционном (светлоклеточном) почечно-клеточном раке и в перитуморальной почечной ткани украинских пациентов, которые проживают на загрязненных радионуклидами территориях, и в связи с этим (в отличие от аналогичных больных из Испании) на протяжении многих лет подвергаются воздействию малых доз ИР.

В настоящее время известно, что хронически и постоянно действующие малые дозы ИР вызывают повреждение ДНК, а также индуцируют инициацию трансиндукционных каскадов, нарушающих клеточный гомеостаз. Геномную нестабильность клеток, вызванную радиацией и передающуюся на соседние неповрежденные клетки, относят к так называемым *bystander*-эффектам [1, 13]. К немногочисленным генам, которые активируются действием ИР, относятся гены, ассоциируемые с арестом клеточного цикла, контролем роста и сигнальным каскадом клеток [22]. Полученные данные свидетельствуют о высоком уровне экспрессии протеинов генов *p53*, *p21^{WAF1/CIP1}*, *Ki-67*, *mdm2*, *cyclin D1* и *cyclin G* в украинских кПКР по сравнению с аналогичными новообразованиями испанской группы. При этом частое отсутствие достоверных различий между украинскими группами из “чистых” и загрязненных территорий объясняется, возможно, тем, что Украина не относится к экологически благополучным государствам. Такие факторы, как прогрессивное химическое загрязнение окружающей среды не позволяет украинскую группу пациентов, проживающих на так называемых чистых территориях, отнести к классической контрольной группе, которой являются испанские пациенты.

Выявленная в украинских кПКР высокая экспрессия протеина *p53* в 23 % наблюдений в сочетании с высокой экспрессией *Ki-67* позволяет утверждать, что ген *p53* участвует в контроле процессов роста и клеточной пролиферации при кПКР у таких больных. Большинство авторов, однако, указывают на редко встречающуюся экспрессию *p53* в кПКР (от 0 до 4 %) [20, 25]. Важно отметить, что высокая экспрессия *p53* в украинских кПКР во всех наблюдениях ассоциировалась с саркоматоидной трансформацией, а в некоторых опухолях — и с высокой экспрессией *mdm2*. Известно, что *mdm2* и дикий тип *p53* вовлечены в механизм отрицательной обратной связи, который срабатывает при стрессовом воздействии на клеточный гомеостаз [24]. В ответ на хроническое воздействие малых доз ИР *p53* активируется протеинами *p14^{ARF}* и *mdm2*, что приводит к формированию молекулярных комплексов *p53/mdm2/p14^{ARF}*, которые

никогда нами не выявлялись в испанской группе и очень редко обнаруживались в кПКР украинской группы из чистых территорий. Наличие этих комплексов подтверждает тот факт, что ген *p53*, оставаясь в ядре, активирует другие гены, участвующие в процессах пролиферации, что подтверждалось высоким индексом *Ki-67*. Более того, *p53*, в свою очередь, активирует *mdm2* способный, как известно, ингибировать *p53* двумя разными путями. Первый путь — *mdm2* может непосредственно связываться с *p53* с последующим блокированием процессов транскрипции и стимуляцией процессов деградации. Второй путь — *mdm2* может вызывать деградацию *p53*, связывая его с убиквитином [16]. Наши данные подтверждают возможное повреждение функций обоих генов — как *p53*, так и *mdm2*, что в итоге приводит к нарушению функции отрицательной обратной связи вследствие хронического действия малых доз ИР. Инактивацию дикого типа *p53*, согласно нашим данным, можно объяснить нарушениями функции протеинов-регуляторов *mdm2* и *p14^{ARF}*. Оба указанных протеина обнаруживали высокую иммуноэкспрессию в большинстве украинских кПКР из группы, проживающих на загрязненных территориях.

Кроме того, как показали наши исследования, независимо от статуса *p53* отмечалась высокая экспрессия *cyclin D1* и *cyclin G*. При этом распространенность окрашивания и уровни экспрессии *cyclin G*, и особенно *cyclin D1*, были достоверно выше в обеих украинских группах наблюдений. Как известно, *cyclin D1* является главным регулятором прогрессии клеточного цикла, особенно в G_1 -фазе, и рассматривается, как онкоген, индуцирующий процессы злокачественной трансформации [15]. Что касается *cyclin G*, то он известен как наиболее ранняя мишень для гена *p53*, а в условиях повреждения ДНК — как негативный регулятор гена *p53* [14]. Таким образом, полученные нами данные подтверждают идею важной онкогенной роли *cyclin D1* и *cyclin G*, существенно возрастающей в условиях длительного воздействия малых доз ИР [15].

Мы полагаем, что одной из наиболее интересных и важных “находок” в нашем исследовании является выявленная гиперэкспрессия протеина *p14^{ARF}* в 88 % кПКР у украинских пациентов, хронически и длительно облучаемых малыми дозами ИР. Как упоминалось выше, *INK4a/ARF* locus хромосомы 9p21 кодирует два протеина, регулирующих клеточный цикл: *p16^{INK4a}* и *p14^{ARF}*, которые активируют протеины генов ретинобластомы (*Rb*) и *p53*, соответственно. Эти протеины составляют часть сети, которая разрушается в первую очередь в большинстве, если не во всех формах рака [10].

Локус *INK4a/ARF* первым отвечает на стрессы, к которым относится и ИР, лимитируя клеточную пролиферацию и модулируя процессы индуцированного онкогенами апоптоза [10]. Интересно отметить, что высокая экспрессия $p14^{ARF}$ ассоциировалась со средней или низкой экспрессией $p53$ и с высокой экспрессией протеина *mdm2* в большинстве кПКР. Эти данные позволяют утверждать, что протеины *mdm2* и $p14^{ARF}$, регулирующие функцию гена *p53*, играют ключевую роль в его активации в условиях длительного стресса, обусловленного малыми дозами ИР.

В нашем исследовании выявлено положительную корреляцию между степенью выраженности перитуморальной радиационной атипической нефропатии, проявляющейся в виде многочисленных очагов эпителиальной ядерной атипии в украинской группе из загрязненных территорий, и экспрессией протеинов *Ki-67*, *mdm2*, $p14^{ARF}$ и *cyclin G*. Очаги перитуморальной радиационной атипической нефропатии средней и высокой степени выраженности отличались наиболее высокой экспрессией протеинов $p53$, *Ki-67*, $p14^{ARF}$ и *mdm2*. В противоположность этому, в перитуморальной почечной ткани испанских пациентов отмечены низкие уровни экспрессии протеинов *mdm2*, $p14^{ARF}$ и *cyclin G* (слабая интенсивность окрашивания), а также полное отсутствие окрашивания протеинов $p53$, *Ki-67*, $p21^{WAF1/CIP1}$ и *cyclin D1* по сравнению с перитуморальной почечной тканью аналогичных украинских больных.

Обнаружение в эндотелии опухолевых сосудов высокой ядерной экспрессии $p14^{ARF}$ и *Ki-67* в сочетании с повышением экспрессии $p14^{ARF}$, *mdm2* и *cyclin G* в сосудистых эндотелиальных клетках,

фибробластах и иммунных клетках в перитуморальной почечной ткани украинских больных 3 группы свидетельствует о том, что хроническое долговременное действие малых доз ИР активирует пролиферативные процессы и во многих других клетках-мишенях. Можно предположить, что повреждение микроокружения в перитуморальной почечной ткани, обусловленное хроническим облучением малыми дозами ИР, может потенциально способствовать развитию отдельных компонентов почечно-клеточного канцерогенеза, например активировать регуляцию процессов ангиогенеза или опухолевой прогрессии.

В заключение следует отметить, что нарушение экспрессии протеинов генов *p53*, $p21^{WAF1/CIP1}$, *Ki-67*, *cyclin D1* и *cyclin G* в клетках кПКР украинских пациентов, проживающих на загрязненных радионуклидами территориях, связаны с процессами нарастающей опухолевой прогрессии, обусловленной постоянным и долговременным действием малых доз ИР. Важно отметить, что повреждения регуляции клеточного цикла облученных клеток ускоряют в них процессы промоции путем увеличивающейся возможности появления генетических мутаций. Кроме того, настоящее исследование подтверждает ранее полученные нами данные [19] и демонстрирует, что *INK4a/ARF* локус входит в состав механизма "gate keeper", который в первую очередь отвечает на постоянно действующие стимулы малых доз ИР, ведущие к потере контроля над основными пунктами клеточного цикла, с последующей общей дерегуляцией митотического цикла, что приводит к опухолевой прогрессии.

Список использованной литературы

1. Azzam E. I., Toledo S. M., Little J. B. Stress signaling from irradiated to non-irradiated cells // *Curr. Cancer Drug Targets*. — 2004. — 4. — P. 53-64.
2. Fornace A. J., Jr, Amundson S. A., Bittner M. et al. The complexity of radiation stress responses: analysis by informatics and functional genomics approaches // *Gene Expr.* — 1999. — 7. — P. 387-400.
3. Fuhrman S. A., Lesky L. C., Limas C. Prognosis significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma // *Am. J. Surg. Pathol.* — 1982. — 6. — P. 655-663.
4. Gurova K. V., Hill J. E., Razorenova O. V. et al. *p53* pathway in renal cell carcinoma is repressed by a dominant mechanism // *Cancer Res.* — 2004. — 64. — P. 1951-1958.
5. Hedberg Y., Ljungberg B., Roos G., Landberg G. Expression of cyclin D1, D3, E and p27 in human renal cell carcinoma analysed by tissue microarray // *Br. J. Cancer.* — 2003. — 88. — P. 1417-1423.
6. Johnson D. G., Walker C. L. Cyclins and cell cycle checkpoints // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 1999. — 39. — P. 295-312.
7. Kausch I., Jiang H., Ewerdtwalbesloh N. et al. Inhibition of *Ki-67* in a renal cell carcinoma severe combined immunodeficiency of mouse model is associated with induction of apoptosis and tumor growth inhibition // *BJU Int.* — 2005. — 95. — P. 416-420.
8. Kovacs G., Akhtar M., Beckwith B. J. et al. The Heidelberg classification of renal cell tumours // *J. Pathol.* — 1997. — 183. — P. 131-133.
9. Liggett W. H., Sidransky D. Role of the *p16* tumor suppressor gene in cancer // *J. Clin. Oncol.* — 1998. — 16. — P. 1197-1206.
10. Lowe S. W., Sherr C. J. Tumor suppression by *INK4a-ARF*: progress and puzzles // *Curr. Opin. Genet. Dev.* — 2003. — 13. — P. 77-83.
11. Martin B., Paesmans M., Mascaux C. et al. *Ki-67* expression and patients survival in lung cancer: systematic review of the literature with meta-analysis // *Br. J. Cancer.* — 2004. — 91. — P. 2018-2025.
12. Momand J., Wu H. H., Dasgupta G. *Mdm2* — master regulator of *p53* tumor suppressor protein // *Gene.* — 2000. — 242. — P. 15-29.

13. *Morgan W.F.* Is there a common mechanism underlying genomic instability, bystander effects and other non-targeted effects of exposure to ionizing radiation? // *Oncogene*. — 2003. — **22**. — P. 7094-7099.
14. *Ohtsuka T., Jensen M. R., Kim K. T., Lee S. W.* The negative role of cyclin G in ATM-dependent p53 activation // *Oncogene*. — 2004. — **23**. — P. 5405-5408.
15. *Perez R., Wu N., Klipfel A. A., Beart R. W.* A better cell cycle target for gene therapy of colorectal cancer: cyclin G. // *J. Gastrointest. Surg.* — 2003. — **7**. — P. 884-889.
16. *Perri M. H.* Mdm2 in the response to radiation // *Molecular Cancer Res.* — 2004. — **2**. — P. 9-19.
17. *Raes F., De Cort M., Graziani G.* Multi-factoral nature of radioactivity deposition on soil after the Chernobyl accident // *Health Phys.* — 1991. — **61**. — P. 271-282.
18. *Renan M. J.* Point mutations, deletions and radiation carcinogenesis // *Radiat. Res.* — 1992. — **131**. — P. 227-228.
19. *Romanenko A., Morell-Quadreny L., Lopez-Guerrero J. A.* et al. The INK4a/ARF-locus: role in cell cycle control for renal cell epithelial tumor growth after the Chernobyl accident // *Virchows Arch.* — 2004. — **445**. — P. 298-304.
20. *Sejima T., Miyagawa I.* Expression of Bcl2, p53 oncoprotein and proliferating cell nuclear antigen in renal cell carcinoma // *Eur. Urol.* — 1998. — **35**. — P. 242-248.
21. *Sharpless N. E., De Pinho R. A.* p53. Good cop/Bad cop // *Cell*. — 2002. — **110**. — P. 9-12.
22. *Snyder A. R., Morgan W. F.* Gene expression profiling after irradiation: clues to understanding acute and persistent responses? // *Cancer Metastasis Rev.* — 2004. — **23**. — P. 259-268.
23. *TNM Classification of malignant tumors*, 6th ed. / Eds: L. H. Sobin, C. Wittekind. — New York: John Wiley & Sons, 2002. — 365 p.
24. *Ushida T., Gao J.-P., Wang C.* et al. Clinical significance of p53, mdm2 and bcl2 proteins in renal cell carcinoma // *Urology*. — 2002. — **59**. — P. 615-620.
25. *Vasavade S. P., Novick A. C., Williams B. R. G.* p53, Bcl-2 and Bax expression in renal cell carcinoma // *Urology*. — 1998. — **51**. — P. 242-248.
26. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs* / Eds: J. N. Eble, G. Sauter, J. I. Epstein, I. A. Sesterhenn. — Lyon: IARC Press, 2004. — 359 p.

Получено 1.12.2014

ПОШКОДЖЕННЯ РЕГУЛЯТОРІВ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ В ТКАНИНІ КОНВЕНЦІЙНОГО НИРКОВО-КЛІТИННОГО РАКУ ПІСЛЯ АВАРІЇ НА ЧАЕС ПОРІВНЯНО З АНАЛОГІЧНИМИ НОВОТВОРАМИ В ІСПАНІЇ

А. М. Романенко, С. О. Возіанов, С. А. Бойко*, Л. Морелл-Квадрені**,
Х.-А. Лопес-Гверреро**, А. Лломбарт-Бош**

Державна установа “Інститут урології НАМН України”, 04053 Київ

*Ужгородський національний університет, 88000 Ужгород

**Медичний факультет Валенсійського університету, 46010 Валенсія, Іспанія

Проведено порівняльний імуногістохімічний аналіз експресії протеїнів Ki-67, p53, mdm2, p21^{WAF1/CIP1}, cyclin D1, cyclin G, p16^{INK4a} і p14^{ARF} у клітинах конвенційного нирково-клітинного раку (кНКР) 37 іспанських пацієнтів (м. Валенсія) і у хворих із кНКР із України — 31 хворий з “чистих” зон і 66 хворих, які проживають на радіаційно забруднених територіях, а також перитуморальної ниркової тканини 18 іспанських хворих і 12 українських хворих з “чистих” і 24 із забруднених зон. Виявлено підвищену експресію протеїнів mdm2, p21^{WAF1/CIP1}, cyclin D1, cyclin G і особливо p14^{ARF} в українських групах спостережень, проте без зв'язку зі ступенем ядерної атипії пухлинних клітин. Отримані дані показують, що при хронічному довгостроковому впливі малих доз іонізуючої радіації відбуваються активація й пошкодження як молекулярних комплексів p53/mdm2/p14^{ARF}, так і *INK4a/ARF* локусів хромосоми 9p21, що призводить, у свою чергу, до руйнування та втрати контролю над основними пунктами клітинного циклу з наступним зростанням прогресії та агресивності новотворів.

**INJURY OF REGULATORS OF CELL CYCLE IN TISSUE OF CONVENTIONAL
RENAL CELL CANCER AFTER CHERNOBYL ACCIDENT COMPARED
TO SIMILAR NEOPLASMS IN SPAIN**

A. M. Romanenko, S. A. Vozianov, S. A. Boiko*, L. Morell-Quadreny,
J.-A. Lopez-Guerrero **, A. Llombart-Bosch****

State Institution "Institute of Urology NAMS Ukraine", 04053 Kyiv

*Uzhgorod National University, 88000 Uzhgorod

**Medical School of Valencia University, 46010 Valencia, Spain

Comparative immunohistochemical analysis of expression of Ki-67, p53, mdm2, p21^{WAF1/CIP1}, cyclin D1, cyclin G, p16^{INK4a} and p14^{ARF} proteins was conducted in the cells of conventional renal cell cancer (cRCC) of 37 Spanish patients (Valencia) and of cRCC patients in Ukraine — from intact zones (n = 31), from radiation-contaminated areas (n = 66), as well as in the cells of peritumoral kidney tissue of 18 Spanish patients and 12 and 24 Ukrainian patients from intact and contaminated areas, respectively. The results obtained revealed increased expression of mdm2, p21^{WAF1/CIP1}, cyclin D1, cyclin G and especially p14^{ARF} proteins in Ukrainian patients, however, with no relationship to the level of nuclear atypia of tumor cells. Chronic long-term exposure to low-dose ionizing radiation was found to lead to activation and damage of both p53/mdm2/p14^{ARF} molecular complexes and *INK4a/ARF* locuses of 9p21 chromosome, which could lead to disruption and loss of control over key cell cycle checkpoints with subsequent increase in the progression and aggressiveness of neoplasms.