

МАКРО- И МИКРОМОРФОЛОГИЯ

УДК 618.11-0066:616-0066(045)

РОЛЬ ОПУХОЛЕВОГО СУПРЕССОРА P53 В ВОЗНИКНОВЕНИИ АНГИОГЕННОГО ФЕНОТИПА НЕОПЛАЗМЫ ПРИ ПРОГРЕССИРОВАНИИ РАКА ЯИЧНИКОВ

И.И. Антонеева*, С.Б. Петров**

* ГОУ ВПО «Ульяновский государственный университет»

** ГОУ ВПО «Казанский ГМУ Росздрава»

*На операционно-биопсийном материале первичной опухоли 83 больных раком яичников (РЯ) оценивали параметры сосудистого русла – объем сосудов в % и плотность сосудов на 1 мм² опухоли. Иммуногистохимическим методом с использованием мышиных моноклональных антител p53, клон DO-7, Ig G2b (M7001 DakoCytomation) оценивали уровень экспрессии p53. Установлено, что на разных клинических стадиях РЯ отсутствуют выраженные групповые отличия по оцениваемым параметрам сосудов первичной опухоли, однако имеет место слабая положительная корреляционная связь между объемом и плотностью сосудов со стадией заболевания. В то же время статистически значимо увеличивается количество атипических эпителиальных клеток первичной опухоли, экспрессирующих p53. Это может свидетельствовать об инактивации p53 в опухолевых клетках РЯ и о его стимулирующей роли в развитии неоангиогенеза в динамике прогрессирования опухоли. **Ключевые слова:** рак яичников, неоангиогенез, белок-супрессор p53.*

ROLE OF TUMOR SUPPRESSOR P53 IN GENESIS OF ANGIOGENIC PHENOTYPE OF A NEOPLASM IN COURSE OF OVARIAN CARCINOMA

I.I. Antoneeva*, S.B. Petrov**

*Ulyanovsk State University

**Kazan State Medical University

*The parameters of a vascular bed (vascular volume in % and vascular density on 1 mm² of tumor) were estimated on the operational-biopic aspirate of the primary tumor of 83 patients with the ovary cancer (OC). The immunohistochemical method with the use of mice monoclonal antibodies p53, clone DO-7, IgG2b (M7001 DakoCytomation) has been applied for the estimation of the level of p53 expression. Based on the estimated parameters we can conclude that there is no distinctive group of differences among the different clinical stages of the OC. However, there is a weak positive correlation between the volume and density of vessels and the disease stages. At the same time, the quantity of the atypical epithelial cells of the primary tumor that express p53 is significantly increasing in each subsequent stage. The results of the research show the possible p53 inactivation in the tumor cells and the stimulatory role of p53 in the neoangiogenesis in the course of the tumor progression. **Key words:** ovary cancer, neoangiogenesis, suppressing protein p53.*

Рак яичников (РЯ) считается одной из самых фатальных локализаций гинекологического рака [10]. Ежегодно в России регистрируется 11,7 тыс. злокачественных новообразований яичников и 7,3 тыс. летальных исходов от них [1]. По мнению М.Ф. Fathalla [7], РЯ разовьется у каждой 70-й новорожденной девочки; при этом каждая двадцатая из них погибнет в течение года с момента установки диагноза. К сожалению, на сегодня РЯ далеко не всегда диагностируется на I и II стадиях заболевания, когда лечение наиболее эффективно. В 70% случаев диагности-

руется распространенная стадия РЯ [16]. Подобная ситуация будет сохраняться при одновременном возрастании показателей смертности, в связи с чем данная проблема приобретает также и социальное значение [3].

Появление новых микрососудов способствует росту опухоли, так как при этом ликвидируется недостаток питательных веществ и кислорода, а также увеличивает ее метастатические способности [9]. Исследование различных опухолей человека свидетельствует о зависимости роста опухоли и метастази-

рования от ангиогенной активности первичного очага неоплазмы [8,22].

Образование новых микрососудов может происходить путем васкулогенеза [4], интуссупцивального ангиогенеза [17] и неангиогенеза. При этом последний механизм имеет ведущее значение. При неангиогенезе происходят миграция перicyтов от базальной мембраны капилляра, деградация экстрацеллюлярного матрикса вокруг капилляра, миграция эндотелиальных клеток и образование ими трубчочкоподобных структур и, наконец, образование анастомозов с соседними кровеносными сосудами.

Установлено, что не во всех опухолях активируется неангиогенез. Существуют опухоли, развивающиеся аваскулярно, т.е. за счет использования уже существующих микрососудов [18].

Основными результатами активации p53 в клетках являются задержка прохождения по клеточному циклу и апоптоз. Кроме этого, согласно данным литературы, p53 может участвовать в ряде внутриклеточных процессов, а также регулировать секрецию ангиогенных факторов [6,5,15].

Целью проведения исследования была оценка роли опухолевого супрессора p53 в возникновении ангиогенного фенотипа неоплазмы при прогрессировании РЯ.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужил операционно-биопсийный материал первичной опухоли 83 больных РЯ. По стадиям заболевания (FIGO, 1976) больные распределились следующим образом: I стадия была у 4 (4,8%), II – у 6 (7,2%), III – у 40 (48,2%), IV – у 33 (39,8%). В зависимости от гистологической структуры опухоли в исследуемой группе 29 (35%) были отнесены к серозному гистотипу, 23 (28%) – к муцинозному, 16 (19%) – к эндометриоидному, 13 (16%) – к мезонефроидному и 2 (2%) – к неклассифицируемому. Парафиновые срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван Гизону, по Маллори, альциановым синим. Квантитрию составляющих стромы осуществляли в 10 произвольных полях зрения на микроскопе "Reichert Polivar 2" фирмы "Leica" с план-объективом FI APO 10x0,30, совмещенным с цифровой видеокамерой JVC разрешением 800x600 пикселей при помощи анализаторов цифрового изображения "Quantiment 500c" ("Leica").

В иммуногистохимической оценке экспрессии mtp53 использовали мышинные моноклональные антитела p53, клон DO-7, Ig G2b (M7001 DakoCytomation) в разведении 1:100 при времени экспозиции 60 мин. Критерием положительной реакции считалась окраска 10% и более ядер опухолевых клеток.

Полученные в ходе исследования результаты подвергнуты обработке с использованием непараметрических статистических методов. Значимость различий между группами определяли с использованием H-критерия Крускала-Уоллиса. Силу связи между признаками устанавливали ранговой корреляцией Спирмена.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что сосуды в первичных раковых опухолях яичников расположены неравномерно. Большая их часть имеет слаборазвитую соединительнотканную строму и тонкие стенки. В краевых зонах опухоли имеет ме-

сто значительное увеличение числа сосудов, располагающихся иногда пучками, резко расширенных и гиперемированных.

Предшествующие сосуды, в частности, капилляры и вены, являющиеся источником ангиогенеза в раковых опухолях, составляют незначительную часть микроциркуляторного русла эпителиальных злокачественных опухолей яичников. При активации ангиогенеза эндотелиальные клетки приобретают округлую форму, их ядра становятся гиперхромными, деформируются и выступают в просвет сосуда, что приводит к разрыву между соседними эндотелиальными клетками. Наиболее активны в этом плане эндотелиальные клетки мелких капилляров. Нами было показано, что основную массу сосудов микроциркуляторного русла первичных раковых опухолей яичников (порядка 83,3%) составляют капилляры диаметром более 10 мкм (рис.1).

Эндотелиальная выстилка сосудов опухолевой стромы в мелких синусах представлена одной или двумя эндотелиальными клетками, ядра которых выступают в просвет сосуда; цитоплазматические отростки охватывают его по периметру, образуя сплошную трубу. В формирующихся капиллярах базальная мембрана часто не определяется или выявляется прерывистая пластинка (рис.2).

Увеличение калибра вновь образованных кровеносных сосудов опухоли не сопровождается их перестройкой: во всех случаях эти сосуды имеют строение синусов. В краевых зонах опухоли, особенно серозных и муцинозных раков, часто можно встретить целые группы расширенных и заполненных кровью синусов (рис.3).

Несовершенство строения стенок синусов приводит к повышению сосудистой проницаемости, разрыхлению базальной мембраны и отслойке эндотелиальных клеток. Появление участков, лишенных эндотелиальной выстилки, приводит к беспрепятственному сообщению сосуда с периваскулярным пространством. А поскольку синусы располагаются и в паренхиме, среди пластов раковых клеток, то возникают условия открытого сообщения раковых клеток с просветом сосуда; раковые клетки попадают в просвет синусных сосудов.

Результаты исследования влияния прогрессирования заболевания на параметры сосудистого русла первичной опухоли при РЯ представлены в табл.1.

Представленные в табл.1 данные не позволяют говорить о выраженных групповых отличиях сосудов первичных опухолей на разных клинических стадиях РЯ, т.к. различия по стадиям статистически незначимы. Однако результаты корреляционного анализа дают основания предполагать слабую положительную корреляционную связь между объемом сосудов в процентах и стадией заболевания ($r=0,2363$) и плотностью сосудов на 1 мм² опухоли и стадией заболевания ($r=0,2458$).

p53 – полифункциональный белок, основная функция которого реализуется в ядре. Ген p53 постоянно транскрибируется и транслируется, однако сам белок быстро деградирует в протеосомах и в клетках большинства тканей находится на пороге детекции [14].

Клетки, экспрессирующие активированный p53, секретируют белковые факторы, подавляющие ангиогенез [5].

Результаты проведенного нами исследования по оценке экспрессии антигена p53 атипичными эпи-

телиальными клетками при прогрессировании РЯ представлены на рис.4.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что при прогрессировании РЯ увеличивается количество атипических эпителиальных клеток опухоли, экспрессирующих p53. При этом достоверность различий между группами статистически значимая ($p=0,0001$), а корреляция со стадией положительная высокая ($r=0,6092$).

Согласно данным литературы [2], во многих опухолях человека обнаружена мутация гена wt53, кодирующего протеин p53, являющаяся диагностическим и неблагоприятным прогностическим признаком [21]. Если активация опухолевого супрессора p53 приводит к ингибированию неоангиогенеза в опухолевом узле [20,11], то его инактивация – важный этап в приобретении опухолевыми клетками способности к стимуляции неоангиогенеза в опухолевом узле [12]. Инактивация p53 возможна как

в результате точечных мутаций и делеции гена wt53 [13,19], так и при нарушении генов, участвующих в регуляции активности p53. При этом p53 либо неспособен активироваться в ответ на стрессы, либо, напротив, его уровень повышен, но это не приводит к запуску соответствующих внутриклеточных процессов.

Представленные в работе данные позволяют с определенной степенью уверенности предполагать активацию неоангиогенеза в первичном опухолевом узле при РЯ, возрастающую в динамике прогрессирования опухоли. Наблюдаемое при этом статистически значимое усиление экспрессии p53 неоплазмой может, видимо, свидетельствовать, с одной стороны, о его инактивации, с другой – о стимулирующей роли в развитии неоангиогенеза при прогрессировании РЯ. При этом в процессе развития опухоли формируется ангиогенный фенотип неоплазмы.

Таблица 1

Параметры сосудистого русла первичной опухоли при раке яичников на различных клинических стадиях заболевания

Показатель стадия	Объем сосудов, %					Сосуды на 1 мм ² опухоли				
	М	m	к.в.	Макс.	Мин.	М	m	к.в.	Макс.	Мин.
I-II стадия n=10	3,81	0,88	0,48	10,7	1,2	20,4	4,71	0,35	59,1	10,2
III стадия n=40	4,06	0,45	0,51	11,4	1,6	22,71	2,17	0,34	61,3	11,8
IV стадия n=33	4,66	0,48	0,46	12,8	2,9	24,43	2,74	0,38	63,2	13,1

Примечание: различие показателей по стадиям статистически незначимо ($p>0,05$).

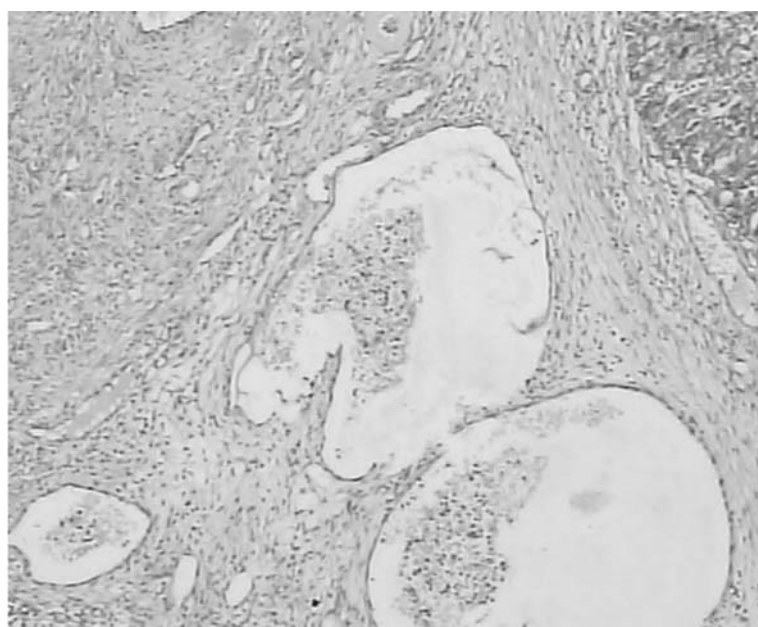


Рис. 1. Крупный синусный сосуд основания опухоли. Г/Э, ув.150.

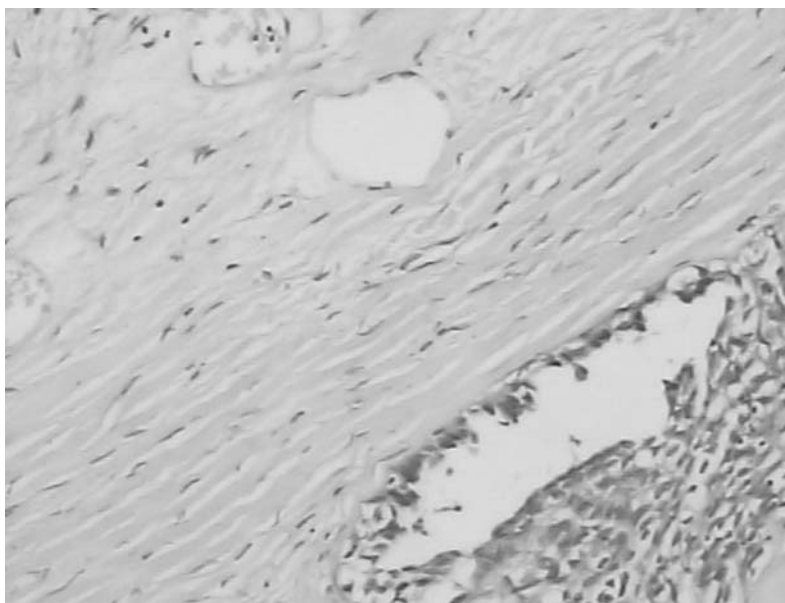


Рис. 2. Синусный сосуд с дефектом эндотелиальной выстилки. Г/Э, ув.600.

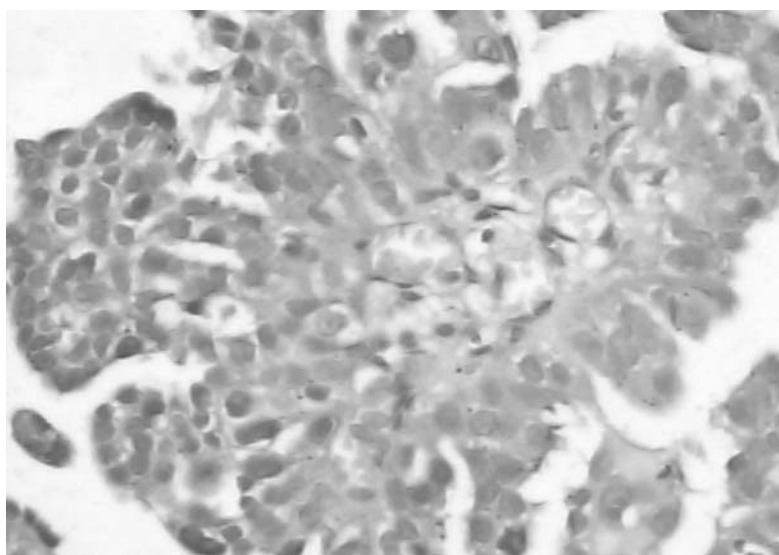


Рис. 3. Пучок сосудов сосочка серозного рака. Г/Э, ув.600.

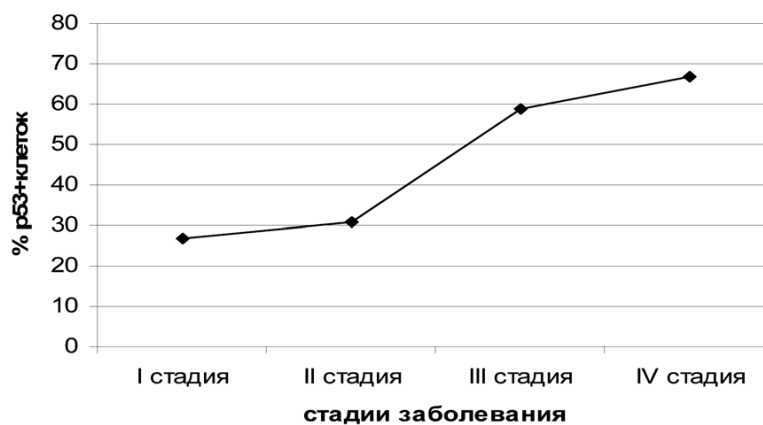


Рис. 4. Динамика процентного содержания атипических эпителиальных клеток яичника, экспрессирующих p53 при прогрессировании РЯ.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Злокачественные новообразования в России и странах СНГ в 2001г./ Под ред. М.И. Давыдова, Е.М. Аксель. – М.: Медицинское информативное агентство, 2003. – С.293.
2. Райхлин, Н.Т. Регуляция и проявление апоптоза в физиологических условиях и в опухолях / Н.Т. Райхлин, А.Н. Райхлин // Вопросы онкологии. – 2002. – Т.48. – №2. – С. 159-171.
3. Awada, A. Ovarian cancer: state of the art and future directions / A. Awada, J. Klastersky // Eur J Gynaecol Oncol. – 2004. № 25(6). – С.673.
4. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation / J.R. Crosby, W.E. Kaminski, G. Schatteman et al // Circ Res. – 2000. № 87(9);728-30.
5. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1 / K.M. Dameron, O.V. Volpert, M.A. Tainsky, N. Bouck // Science. – 1994. Sep 9;265(5178):1582-4.
6. The p53 tumor suppressor gene inhibits angiogenesis by stimulating the production of thrombospondin / K.M. Dameron, O.V. Volpert, M.A. Tainsky, N. Bouck // Cold Spring Harb Symp Quant Biol. – 1994;59:483-9.
7. Fathalla, M.F. Contraception and women's health / M.F. Fathalla // Br.Med.Bull. – 1993. – Vol.49(1). – P.245-251.
8. Folkman, J. // N.Eng.J.Med.1971. V.285. P.1182.
9. Folkman, J. // .J.Natl.Inst.1990. V.82. P.4.
10. Greenlu, R.T.. // Cancer statistics/ R.T. Greenlu, T. Murray – 2000. – Vol.4(2). – P.108.
11. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours / T.G. Graeber, C. Osmanian, T. Jacks et al. // Nature. – 1996 Jan 4;379(6560):88-91.
12. Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells / S. Grugel, G. Finkenzeller, K. Weindel et al. // J Biol Chem. – 1995 Oct 27;270(43):25915-9.
13. p53 mutations in human cancers / M. Hollstein, D. Sidransky, B Vogelstein, C.C. Harris // Science. – 1991 Jul 5;253(5015):49-53.
14. Ichihara, A. Roles of proteasomes in cell growth / A. Ichihara, K.Tanaka // Mol Biol Rep. 1995;21(1):49-52.
15. Stress-induced secretion of growth inhibitors: a novel tumor suppressor function of p53 / E.A. Komarova, L. Diatchenko, O.W. Rokhlin et al. // Oncogene. – 1998 Sep 3;17(9):1089-96.
16. Histologic types of epithelial ovarian cancer: have they differ risk factors? / A.W. Kurian, R.R. Balise, V. McGuire, A.S. Whittemore // Gynecol. Oncol. – 2005. – Vol.96. №2. – P.520-530.
17. Kurz, H. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function / H. Kurz, P.H. Burri, V.G. Djonov // News Physiol Sci. – 2003. Apr,18:65-70.
18. Tumor angiogenesis, the p53 antigen, and cervical metastasis in squamous carcinoma of the tongue / D.A. Leedy, D.R. Trune, J.D. Kronz et al. // Otolaryngol Head Neck Surg. – 1994. – 111(4):417-22.
19. Levine, A. The p53 tumour suppressor gene / A.J. Levine, J. Momand, C.A. Finlay // Nature. – 1991. – 6;351(6326):453-6.
20. Mukhopadhyay, D. Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression / D. Mukhopadhyay, L. Tsiokas, V.P. Sukhatme // Cancer Res. – 1995. – Dec 15;55(24):6161-5.
21. Pellegata, N. The significance of p53 mutations in human cancers / N. Pellegata, G. Ranzani // Europ. J. Histochem. – 1996. – Vol. 40. – P. 273-282.
22. Weidner, N. Angiogenesis as a predictor of clinical outcome in cancer patients / N. Weidner // Hum Pathol. – 2000 Apr;31(4):403-5.

УДК [611.717.9:611-019] - 053.8(045)

ОСТЕОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ФАЛАНГ II ПАЛЬЦА КИСТИ ВЗРОСЛЫХ ЛЮДЕЙ В АСПЕКТЕ СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ

Т.С. Бикбаева, Ю.А. Неклюдов, В.Н. Николенко

ГОУ ВПО «Саратовский ГМУ Росздрава»

*На 150 паспортизированных комплектах правых кистей взрослых людей проведена остеометрия фаланг II-V пальцев. Выделены различные варианты фаланг по длине, высоте основания и высоте головки, а также соотношения их основных морфометрических параметров, которые могут использоваться судебно-медицинскими экспертами при определении принадлежности фаланг конкретному пальцу. **Ключевые слова:** остеометрия, фаланги пальцев кисти.*

OSTEOMETRIC PARAMETERS OF ADULTS INDEX FINGER'S PHALANXES IN THE ASPECT OF EXAMINATION IN FORENSIC MEDICINE

T.S. Bikbaeva, Ju. A. Nekludov, V.N. Nikolenko

Saratov State Medical University

*Morphometric measuring of II-V finger's phalanxes were held on 150 pasportized sets of right hands. Different variations of phalanxes in length, base height and head's height, and also their main morphometric parameters were determined. **Key words:** osteometry, finger's phalanxes.*

Идентификация личности по фрагментированным костным останкам является одной из наиболее сложных проблем судебной медицины (Пашкова В.И., Рубежанский А.Ф., Найнис Й.-В. Й., Стрелец Н.Н., 1962; 1979; Чикунов В.И., Медведева Н.Н., Аверченко И.В., Филиппов А.А., 2004). Большинство костей скелета человека индивидуально по форме. При экспертизе фрагментированных костей человека первоначально устанавливают их лока-

лизацию в скелете (Звягин В.Н., Самоходская О.В., Иванова Н.В. и соавт., 1997). При этом возникает проблема определения положения однотипных костей, таких как позвонки, ребра, плюсневые и пястные кости, фаланги пальцев (Еременко Е.А., Звягин В.Н., 2003). Кости кисти, в частности, фаланги не имеют анатомических признаков принадлежности к стороне тела. Более того, не существует надежных признаков, которые позволили бы отнес-