

что южные районы города, традиционно рассматриваемые как наиболее экологически неблагоприятные, постепенно утрачивают значение территорий с высоким риском формирования неканцерогенных заболеваний, что проявляется снижением значений рисков в 1,5—2 раза. Это может быть связано как с существенным снижением объемов производств, имеющих место на предприятиях химической отрасли, сосредоточенных в южных районах (ОАО «Химпром», ОАО «Каустик»), так и с более строгим контролем степени очистки промышленных выбросов на ОАО «ЛУКОЙЛ-ВНП», которое относится к предприятиям федерального значения.

В северных районах Волгограда наблюдается прогрессирующее ухудшение экологической ситуации, проявляющееся значительным увеличением неканцерогенных рисков. Вероятнее всего, эта негативная тенденция является следствием морального износа основного производственного оборудования предприятий, сосредоточенных в той части города

(ООО ВГАЗ «СУАЛ», ОАО Тракторная компания «ВГТЗ», ЗАО ВМЗ «Красный Октябрь»).

ЛИТЕРАТУРА

1. Основы оценки риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду / Под ред. Ю. А. Рахманина, Г. Г. Онищенко. — М.: НИИ ЭЧ и ГОС, 2002. — 248 с.

2. Критерии установления минимального риска здоровью населения от загрязнения окружающей среды: Методические рекомендации. — М., 2003. — МосМР 2.1.9.001-03.

Контактная информация

Латышевская Наталья Ивановна — д. м. н., профессор, зав. кафедрой общей гигиены и экологии ВолгГМУ, e-mail: hygiene@bayard.ru

УДК 616-006:616-006.3.04

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОПУХОЛЕЙ СЕМЕЙСТВА САРКОМЫ ЮИНГА

Д. В. Буланов, А. В. Смирнов, В. Л. Загребин*

Московская городская онкологическая больница № 62, кафедра патологической анатомии, кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии ВолгГМУ*

Представлена иммуногистохимическая и молекулярно-биологическая характеристика опухолей семейства саркомы Юинга. Показано, что наряду с дефектами генома, обнаруживаемыми в опухолях, выявлена иммунофенотипическая гетерогенность.

Ключевые слова: опухоли семейства саркома Юинга, маркеры пролиферации, апоптоз, иммуногистохимические характеристики.

IMMUNOHISTOCHEMICAL AND MOLECULAR BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF EWING'S SARCOMA FAMILY TUMORS

D. V. Bulanov, A. V. Smirnov, V. L. Zagrebina

Immunohistochemical and molecular biological characterization of Ewing's sarcoma family tumors is proposed. It is shown that besides genome defects found in tumours, immunophenotypical heterogeneity is noted.

Key words: Ewing's sarcoma family tumors, proliferation, apoptosis, immunohistochemical characteristic.

В последние годы все больше внимания уделяется молекулярным и клеточным маркерам, характеризующим фундаментальные биологические свойства различных опухолей [1, 4]. С конца 1990-х гг. в литературе стал общепринятым термин «опухоли семейства саркомы Юинга» (ОССЮ), объединяющий классическую саркому Юинга кости (КСЮ), ее экстраклеточный аналог — периферическую примитивную нейроэктодермальную опухоль кости (pPNET) и злокачественную мелкоклеточную опухоль торакопуль-

мональной зоны (опухоль Аскина) [1, 6]. Однако, несмотря на значительный прогресс онкологии в области костной патологии, до настоящего времени остается много неясного в вопросах диагностики мелкокруглоклеточных опухолей костей и мягких тканей. Общеизвестно, что патоморфологические особенности ОССЮ, выявляемые при гистологическом исследовании, являются недостаточными для установления окончательного диагноза [7], что диктует необходимость поиска иммуногистохимических и цитоген-

нетических маркеров и определения их прогностической значимости для данного вида опухолей [2, 8]. Предполагается, что учет иммуноморфологических особенностей может послужить важнейшим инструментом выработки стратегии лечения ОССЮ [3, 10].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение иммуногистохимических и молекулярно-биологических характеристик опухолей семейства саркомы Юинга.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования — образцы ткани опухолей 35 больных в возрасте от 16 до 37 лет, взятые до начала лечения, с морфологически верифицированным диагнозом ОССЮ. Исследуемые больные с ОССЮ ($n = 35$) были разделены на 1-ю возрастную группу, которую составили пациенты до 30 лет, и 2-ю возрастную группу — пациенты старше 30 лет. После фиксации образцов тканей опухолей в 10%-м забуференном формалине и гистологической проводки тканей по стандартной методике изготавливали парафиновые срезы, толщиной 3—4 мкм, окрашенные гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое исследование осуществляли авидин-биотин-пероксидазным методом по стандартной методике с применением системы визуализации EnVision™ FLEX Systems «DAKO» (Дания). Оценивали удельное количество позитивно окрашенных клеток с использованием моноклональных антител (АТ) «DAKO» (Дания) к следующим белкам: Вах, Vcl-2, p53, Ki-67, PCNA, хромогранин А (Хр А), синаптофизин, нейронспецифическая-енолаза (NSE), S-100, а также частоту обнаружения исследуемых иммуногистохимических маркеров в ткани опухоли — величину, выраженную в процентах и характеризующую количество случаев больных с ОССЮ, в образцах опухолевой ткани которых обнаружены иммунопозитивные клетки с использованием формулы $v = n^1/n^*100$, где v — частота обнаружения иммуногистохимического маркера, n^1 — количество случаев больных с ОССЮ, в образцах опухолевой ткани которых обнаружены иммунопозитивные клетки для исследуемого иммуногистохимического маркера, n — общее количество больных исследуемой группы.

Удельное количество позитивно окрашенных клеток оценивалось в 10 полях зрения ($\times 400$, минимум в 1000 клеток препарата) стандартизированными методами морфометрии с помощью системы анализа изображений, программы «Видеотест-Морфо-4» (Россия). Микрофотосъемку гистологических препаратов проводили на микроскопе «Axio Scope A1», Carl Zeiss™ (Германия) с использованием цифровой фотокамеры «Canon PowerShot», программного обеспечения AxioVision LE, Carl Zeiss™ (Германия).

Было проведено изучение архивных материалов (истории болезни) для проведения анализа свя-

зей между иммунофенотипом опухоли и клиническими данными о прогрессировании заболевания (продолженный рост опухоли, рецидив) и наличии отдаленных метастазов с выделением соответствующих групп пациентов.

Для выявления трех наиболее характерных для опухолей семейства саркомы Юинга химерных онкогенов (EWS/FLI1 type1, EWS/FLI1 type2, EWS/ERG) использовался метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (Real Time PCR). Материалом для молекулярного исследования служила тотальная рибонуклеиновая кислота (РНК), выделенная из биопсийного материала больных саркомой Юинга ($n = 30$) после фиксации забуференным формалином и парафиновой заливки.

Достаточное количество биопсийного материала для выделения тотальной РНК было получено от 30 больных, вошедших в исследование. 3 образца из 30 были исключены в связи с низким качеством выделенной РНК.

Вариационно-статистическую обработку данных проводили с использованием программы STATISTICA 6.0. Значимыми считали различия, если вероятность ошибки P была меньше 0,05. При проведении корреляционного анализа использовали коэффициент Пирсона для нормальных распределений и коэффициент ранговой корреляции Спирмена для ненормальных распределений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При иммуногистохимическом исследовании серийных парафиновых срезов образцов тканей ОССЮ выявили различную частоту обнаружения изучаемых маркеров: маркер клеточной пролиферации Ki-67 и ядерный фактор PCNA обнаруживались в ОССЮ у всех обследованных пациентов. Более чем у половины пациентов в исследованных биоптатах СЮ была обнаружена экспрессия белков p53, Vcl-2 и Вах, в 62,1; 37,8 и 34,5 % случаев соответственно.

Сравнительная характеристика иммуногистохимических маркеров в изучаемых возрастных группах показала ряд отличий. Так, в биоптатах опухолевой ткани, обработанных АТ к белкам S-100, синаптофизину и хромогранину А, удельное количество иммунопозитивных клеток было достоверно выше на 9,1 % ($p < 0,05$), 9,4 % ($p < 0,05$) и 1,8 % ($p < 0,05$) в группе больных старше 30 лет по сравнению с группой пациентов более молодого возраста (табл. 1).

Оценка отличий экспрессии изучаемых иммуногистохимических маркеров показала, что в исследуемых возрастных группах они, в первую очередь, были характерны для белка p53 и bcl-2 (рис. 1). Экспрессия белка p53 в ОССЮ у больных 1-й группы обнаруживалась в 1,4 раза чаще ($p < 0,05$), в то же время протеин bcl-2 выявлялся в 3,1 раза чаще ($p < 0,05$) у больных 2-й возрастной группы.

Таблица 1

Иммунофенотипическая характеристика ОССЮ в различных возрастных группах больных, %

Маркеры	Удельное количество иммунопозитивных клеток		Частота обнаружения исследуемого маркера	
	< 30 лет (n = 24)	> 30 лет (n = 11)	< 30 лет (n = 24)	> 30 лет (n = 11)
Ki-67	29,3 ± 5,1	34,0 ± 3,4	100	100
PCNA	39,3 ± 3,4	53,5 ± 6,2*	100	100
p53	18,2 ± 5,9	8,0 ± 1,8*	68,4	50*
Bcl-2	2,9 ± 1,8	32,0 ± 5,1*	21,1	70*
Vax	7,9 ± 3,0	5,5 ± 3,9	36,8	30
S-100	7,1 ± 0,8	17,0 ± 3,6*	52,4	90*
Хромо-гранин А	5,7 ± 1,0	7,5 ± 1,8	57,1	70
NSE	56,4 ± 5,2	52,1 ± 6,3	60,2	58,7
Синапто-физин	27,1 ± 3,9	36,5 ± 4,2*	38,9	40,1

*Различия достоверны при $p < 0,05$.

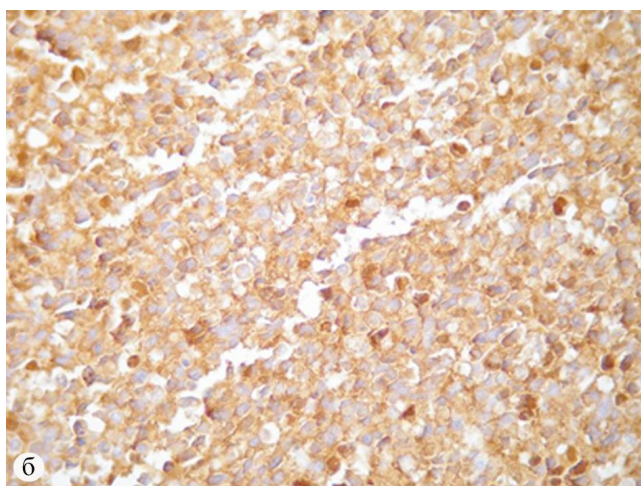
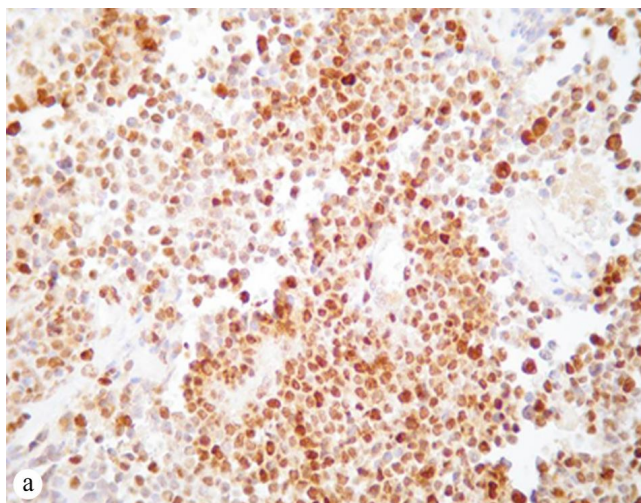


Рис. 1. Саркома Юинга. Экспрессия иммунореактивно-го материала в опухолевых клетках. Авидин-биотиновый метод, антитела к p-53 (а), к bcl-2 (б). Ув. x 400

Установлено, что удельное количество иммунопозитивных клеток в ОССЮ при исследовании экспрессии маркера S-100 на 4,1 % выше ($p < 0,05$) у пациентов с отсутствием метастазов (табл. 2).

Установлено, что экспрессия факторов пролиферации Ki-67 и PCNA в ОССЮ обнаружена одинаково часто при наличии или отсутствии метастазов. Белок p53 в 1,7 раза чаще ($p < 0,05$) был выявлен в опухолях у больных с метастазами. В первичной опухоли частота обнаружения экспрессии маркера bcl-2 определялась на 11 % реже при наличии метастазов. Наиболее выраженные отличия были обнаружены при исследовании маркера vax: отсутствие метастазов у больных с ОССЮ ассоциировалось с его обнаружением в ткани опухоли у 53,3 % больных, в то время как при наличии метастазов данный белок был обнаружен лишь в 14,3 % случаев. Частота обнаружения экспрессии белка p53 в опухоли при наличии метастазов была в 2,4 раза выше, чем при их отсутствии ($p < 0,05$).

Таблица 2

Иммунофенотипическая характеристика ОССЮ больных при наличии или отсутствии метастазов, %

Маркеры	Удельное количество иммунопозитивных клеток		Частота обнаружения исследуемого маркера	
	отсутствие Mts (n = 17)	выявление Mts (n = 18)	отсутствие Mts (n = 17)	выявление Mts (n = 18)
Ki-67	28,0 ± 2,9	32,5 ± 4,1	100	100
PCNA	42,5 ± 3,2	45,0 ± 6,9	100	100
p53	8,7 ± 3,0	21,1 ± 5,7*	46,7	78,6*
Bcl-2	16,0 ± 3,5	15,0 ± 5,6	46,7	35,7
Vax	10,7 ± 1,8	3,2 ± 1,3*	53,3	14,3*
S-100	12,9 ± 1,8	8,8 ± 1,2*	71,4	56,3
Хромо-гранин А	7,9 ± 1,1	5,3 ± 0,9	78,6	50,0*
NSE	54,4 ± 4,6	55,3 ± 5,2	60,2	58,7
Синапто-физин	28,6 ± 3,1	31,3 ± 3,0	38,9	40,1

*Различия достоверны при $p < 0,05$.

При сравнительной оценке удельного количества иммунопозитивных клеток и частоты обнаружения изучаемых иммуногистохимических маркеров при различном течении заболевания были выявлены наиболее значимые в прогностическом плане белки Vax, S-100, Хр А, p53 и Bcl-2. При этом у пациентов с относительно благоприятным течением заболевания удельное количество позитивно окрашенных клеток и частота их обнаружения для маркера Vax, S-100, Хр А были достоверно выше, чем у пациентов с прогрессированием заболевания (табл. 3). Напротив, значимое увеличение удельного количества иммунопозитивных клеток и частоты их обнаружения в ОССЮ для маркеров p53 и Bcl-2 демонстрировало прямые корреляционные связи с прогрессированием заболевания.

Таблица 3

Имунофенотипическая характеристика ОССЮ больных с ремиссией или прогрессированием заболевания, %

Маркеры	Удельное количество иммунопозитивных клеток		Частота обнаружения исследуемого маркера	
	ремиссия (n = 18)	прогрессирование (n = 17)	ремиссия (n = 18)	прогрессирование (n = 17)
Ki-67	29,0 ± 3,8	31,8 ± 2,5	100	100
PCNA	44,0 ± 4,3	43,7 ± 2,8	100	100
p-53	7,5 ± 4,8	21,3 ± 6,2*	42,9	80,0*
Bcl-2	7,9 ± 5,1	17,7 ± 5,0*	28,6	46,7*
Bax	11,8 ± 3,5	2,7 ± 2,0*	50,0	20,0*
S-100	16,3 ± 4,4	5,0 ± 0,8*	86,7	40,0*
Хр А	8,7 ± 1,1	4,3 ± 1,1*	86,7	40,0*
NSE	56,1 ± 4,9	53,7 ± 5,0	60,2	58,7
Синапто-физин	27,2 ± 3,7	32,7 ± 4,2	38,9	40,1

*Различия достоверны при $p < 0,05$.

Результаты молекулярно-генетического исследования показали, что в 5 случаях из 27 (18,7 %) не удалось выявить транскриптов ни одного из исследуемых генов, что, в целом, соответствует мировым данным: устойчивые транслокации выявляются в среднем у 85 % пациентов с доказанным диагнозом саркомы Юинга [10].

В 21 из 22 (95,4 %) позитивных случаев ОССЮ определялась транслокация EWS/FLI1 type1, в одном случае — транслокация EWS/FLI1 type2. Транслокация типа EWS/ERG в данной группе больных выявлена не была. Наиболее часто выявляемый тип мутации — t(11;22)(q24;q12), обнаруживаемый в опухолях семейства саркомы Юинга. На рис. 2 представлена электрофотограмма фрагментов, характерных для EWS/FLI1 type1 и EWS/FLI1 type2. Согласно полученным данным, выявление специфических транслокаций в ОССЮ с помощью Real-time ПЦР является надежным диагностическим методом, позволяющим подтвердить или установить диагноз, как минимум, в 80 % случаев.

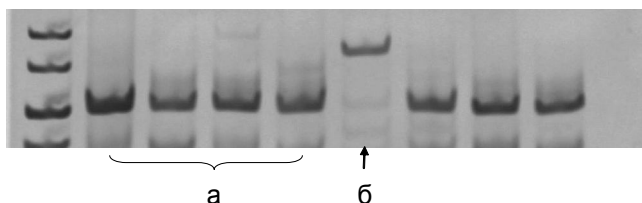


Рис. 2. Саркома Юинга. Метод полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Фрагменты, соответствующие специфическим транслокациям EWS/FLI1 type1 (а) и EWS/FLI1 type2 (б)

Выявление значимых различий в удельном количестве иммунореактивных клеток и частоты их обнаружения при исследовании белков контролирующих про-

цессы апоптоза объясняется, на наш взгляд, тем, что белки семейства Bcl-2 [индукторы апоптоза (Bax), либо его ингибиторы (Bcl-2)] находятся в постоянном динамическом равновесии, образуя гомо- и гетеродимеры, что в конечном счете влияет на развитие апоптоза клеток [2]. Механизм регуляции этого процесса целесообразно рассматривать с позиции структурно-функциональных взаимоотношений между белками этого семейства с учетом выраженности мутаций гена p53. Регуляция функциональной активности белков семейства Bcl-2 посредством определенных сигнало-передающих молекул и путей, активируемых ими, является перспективной задачей с целью воздействия на опухолевую клетку [6, 11].

В последние годы экспрессия белков p53 и bcl-2 была исследована в различных злокачественных новообразованиях. Установлено, что частота обнаружения маркера p53 в ОССЮ составила 66,6 % (44 из 66 случаев) [9], что в целом совпадает с результатами нашего исследования, однако экспрессия белка bcl-2 была выявлена у 70,1 % больных (в 47 из 66 случаев), что отличается от полученных нами результатов (37,8 %). Скорее всего, данные различия объясняются неодинаковыми выборками больных по количеству, возрастному составу и свидетельствуют о большей воспроизводимости результатов при изучении экспрессии проапоптозного белка p53 в исследуемой группе опухолей. В то же время, несмотря на отсутствие статистически достоверных связей, характеризующих выживаемость больных с ОССЮ и экспрессию в образцах опухолевой ткани белка Bcl-2 [9], согласно полученным нами данным, выявлены прямые корреляционные связи между ростом удельного количества p53 и Bcl-2-иммунопозитивных клеток и частоты их обнаружения в ОССЮ в группе больных с прогрессированием заболевания по сравнению с пациентами в состоянии ремиссии. Несмотря на установление связей между степенью выраженности экспрессии ряда белков и клиническим течением ОССЮ, показано, что исследование одного какого-либо иммуногистохимического маркера не обеспечивает необходимой базы для прогнозирования течения заболевания [8, 10, 11]. Результаты нашего исследования позволяют предложить для дифференциальной диагностики ОССЮ использовать наряду с качественными иммуноморфологическими методами количественную оценку изучаемых маркеров, а также Real Time PCR для выявления специфических транслокаций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. При сравнительной оценке иммунофенотипа ОССЮ выявлено, что наиболее прогностически значимой является экспрессия белков Bax, S-100, Хр А, p53 и Bcl-2 с определением удельного количества иммунопозитивных клеток при высокой частоте обнаружения изучаемых иммуногистохимических маркеров.

2. Выявлено, что маркеры пролиферации Ki-67 и PCNA обнаружены во всех образцах ОССЮ. Экспрес-

сия проапоптозного мутантного белка p53 и антиапоптозного митохондриального белка Bcl-2 характеризовалась меньшей частотой обнаружения и низким удельным количеством иммунопозитивных клеток в опухолевой ткани при достоверных различиях данных параметров в опухолях пациентов исследуемых возрастных групп, что свидетельствует о необходимости комплексного подхода в оценке иммунофенотипа опухоли с учетом возраста пациентов.

3. Исследование генетических транслокаций методом Real Time PCR свидетельствует, что устойчивые транслокации выявляются в среднем у 85 % пациентов с диагнозом саркомы Юинга, характерным является определение транслокации EWS/FLI1 type 1.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Иванова Н. М., Дзампаев А. З.* Злокачественные опухоли костей. Руководство под редакцией М. Д. Алиева. — М.: Издательская группа РОНЦ, 2008. — С. 295—356.
2. *Киселев Л. П.* Молекулярная диагностика и интенсификация химиотерапии прогностически неблагоприятных форм саркомы Юинга у детей: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Минск, 2007. — 21 с.

3. *Леенман Е. Е., Кочурова Н. В., Белогурова М. Б. и др.* // *Вопр. онкол.* — 2003. — Т. 49, № 2. — С. 21—25.
4. *Писарев В. Б., Голуб Б. В., Смирнов А. В. и др.* // *Архив патологии.* — 2008. — № 4. — С. 17—20.
5. *Bacci G., Balladelli A., Forni C., et al.* // *J. Bone Joint Surg. Br.* — 2007. — Vol. 89, № 9. — P. 1229—1233.
6. *Berghuis D., de Hooge A. S., Santos S. J.* // *J. Pathol.* — 2009. — Vol. 218. — P. 222—231.
7. *Hancock J. D., Lessnick S. L.* // *Cell Cycle.* — 2008. — Vol. 7. — P. 250—256.
8. *Iwamoto Y.* // *Jpn. J. Clin. Oncol.* — 2007. — Vol. 37, № 2. — P. 79—89.
9. *Kavalari R., Ziva Pohar Marincek Z. P., Jereb B., et al.* // *Med Sci Monit.* — 2009. — Vol. 15, № 8. — P. 442—452.
10. *Maire G., Brown C. W., Bayani J.* // *Cancer Genet Cytogenet.* — 2008. — Vol. 181. — P. 81—92.
11. *Scotlandi K., Remondini D., Castellani G., et al.* // *Journal of Clinical Oncology.* — 2009. — Vol. 27, № 13. — P. 2209—2216.

Контактная информация

Буланов Дмитрий Владимирович — врач-патологоанатом Московской городской онкологической больницы № 62, e-mail: patros-ru@yandex.ru

УДК 616-058:616-052:616-001.5

ОСОБЕННОСТИ МЕДИКО-СОЦИАЛЬНОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПАЦИЕНТОВ С ПЕРЕЛОМАМИ ПРОКСИМАЛЬНОГО ОТДЕЛА ПЛЕЧЕВОЙ КОСТИ

Н. В. Полунина, А. В. Скороглядов, А. Ю. Васильев

Российский государственный медицинский университет им. Н. И. Пирогова

Представлены результаты медико-социальной оценки пациентов с травмами проксимального отдела плечевой кости, в том числе изучены возраст, социальное положение, сопутствующая патология. Проведен анализ особенностей травматического повреждения верхней конечности и причины получения травмы. Показано влияние изученных медико-социальных характеристик на длительность пребывания пациентов в стационаре. Сделан вывод о необходимости учитывать рассмотренные характеристики при лечении пациентов с травмами.

Ключевые слова: травма, возраст, сопутствующая патология, характер травмы, длительность стационарного лечения.

PECULIARITIES OF MEDICO-SOCIAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH PROXIMAL HUMERUS FRACTURES

N. V. Polunina, A. V. Skoroglyadov, A. Y. Vasiliev

Results of medico-social evaluation of patients with proximal humerus fractures are presented. Such characteristics as age, social status and concomitant pathology were investigated. An analysis of peculiarities and causes of traumatic injury of upper extremity was conducted. It was shown that these characteristics influence the duration of hospital treatment period. A conclusion was made that during management of patients with proximal humerus fractures it is necessary to take these characteristics into consideration.

Key words: trauma, age, concomitant pathology, character of trauma, duration of hospital treatment period.

Травматизм не только в нашей стране, но и в других экономически развитых странах имеет достаточно высокую распространенность, являясь одной из ве-

дущих причин временной утраты трудоспособности, развития инвалидности и, нередко, смертности, особенно среди лиц молодого трудоспособного возраста.