

# ДИНАМІКА ЕКСПРЕСІЇ МАРКЕРА КІ-67 ПІД ВПЛИВОМ НЕОАД'ЮВАНТНОЇ ХЕМОПРОМЕНЕВОЇ ТЕРАПІЇ У ХВОРИХ НА РАК ПРЯМОЇ КИШКИ.

Голотюк В.В.

Івано-Франківський національний медичний університет

**Метою** дослідження було визначити особливості розподілу і динаміку експресії білка Кі-67 в тканині раку прямої кишки (РПК) під впливом неоад'ювантної хіміопроменевої терапії (НХПТ).

**Методи і матеріали.** Обстежено 16 хворих на РПК, які перебували на лікуванні в Івано-Франківському клінічному онкологічному диспансері, з них 10 – з II стадією ( $T_{3-4}N_0M_0$ ) і 6 – з III стадією ( $T_{2-4}N_{1-2}M_0$ ) захворювання. Вік хворих складав  $62,5 \pm 2,17$  років. У всіх хворих була верифікована аденокарцинома I-III ступенів диференціювання. Діагноз, стадію захворювання і наявність метастазів встановлювали відповідно до вимог доказової медицини.

Всі хворі отримали курс НХПТ на фоні хеморадіомодифікації тегафуром з розрахунку 800 мг на добу хворим масою до 70 кг або 1200 мг хворим масою більше 70 кг щодня упродовж усього курсу променевої терапії (ПТ) (13 сеансів фракціями по 3 Гр. до сумарної вогнищевої дози 36-39 Гр. на ділянку пухлини) з наступним хірургічним лікуванням через 4-6 тижнів.

Об'єктом дослідження були фрагменти інтактної кишки біля пухлини і зрізи РПК, отримані під час біопсії на етапі до початку лікування хворих і з операційного матеріалу. Для патогістологічного дослідження операційного матеріалу РПК вирізали по одній тканинній пластинці з периферичної, проміжної та центральної зон пухлини, після чого з них готували парафінові блоки. Виготовляли гістологічні зрізи на трьох рівнях блоку – верхньому, середньому та нижньому; аналізували по 9 зрізів у кожного оперованого хворого. Серійні парафінові зрізи товщиною 4-5 мкм забарвлювали гематоксиліном і еозином. Мікроскопічне дослідження та фотозйомку виконували на мікроскопі Leica DME (Німеччина) при збільшеннях  $\times 40$ ,  $\times 100$ ,  $\times 200$  та  $\times 400$ . Ступінь лікувального патоморфозу оцінювали за Г.О. Лавніковою. Для імуногістохімічного визначення маркера Кі-67 в якості первинних антитіл використовували анти-Кі-67 (Santa Cruz, CA, USA, розведення 1:200), в якості вторинних – Alexa Fluor 546 (Invitrogen, USA, розведення 1:500). Імунопозитивні тканини досліджували з використанням лазерного конфокального скануючого мікроскопа Zeiss LSM 510 з олійно-імерсійним об'єктивом 40X/1.4NA. На кожному зрізі фотографували 5 випадково вибраних полів. Аналіз інтенсивності імуносигналу визначали з використанням програмного забезпечення ImageJ 1.48. Варіаційно-статистичний аналіз проводили за допомогою програми Statistica v.6.1, різницю між показниками вважали достовірною при  $p \leq 0,05$ .

**Результати дослідження та їх обговорення.** Кі-67 – це маркер проліферативної активності клітин, який експресується переважно в кінці G1 та S, G2 фазах клітинного циклу і мітозі, але не визначається у фазі G0 та на початку G1. В тканині інтактної слизової оболонки прямої кишки до лікування загальний рівень експресії Кі-67 в полях зору становив  $33,2 \pm 2,61$  ум.од., при чому експресія маркера була найбільш вираженою в ділянках залозистого кишкового епітелію. Кі-67-позитивні епітеліальні клітини локалізувалися на всьому протязі кишкових крипт з незначним переважанням експресії в базальних їх відділах порівняно з люмінальними. У сполучнотканинній стромі інтактної слизової оболонки експресія Кі-67 була мінімальною.

Через 4-6 тижнів після НХПТ у слизовій оболонці експресія Кі-67 в епітеліоцитах була нерівномірною по окружності крипт та дещо меншої інтенсивності ( $29,7 \pm 3,61$  ум.од.,  $p > 0,05$ ), в тому числі в епітелії базальних відділів крипт. У власній пластинці слизової оболонки виявляли поодинокі Кі-67 позитивні клітини.

У тканині РПК до початку НХПТ експресія Кі-67 носила виражений характер в переважній більшості клітин атипових залозоподібних структур. Її середній рівень складав  $46,08 \pm 3,14$  ум.од., при чому у випадках низького ступеня диференціювання пухлин він був достовірно вищим, ніж у високодиференційованих, складаючи відповідно  $52,65 \pm 4,48$  ум.од. і  $38,01 \pm 2,94$  ум.од. У сполучнотканинній стромі експресія Кі-67 була значно нижчою порівняно з раковим епітелієм, проте більш вираженою в осередках реактивних клітинних інфільтратів.

На фоні застосованого лікування інтенсивність експресії Кі-67 різко знижувалась в середньому до  $32,45 \pm 1,19$  ум.од. ( $p < 0,001$ ) та мала нерівномірний характер розподілу серед епітеліоцитів залозоподібних структур. У частині випадків в дистрофічно-змінених ракових структурах експресія дослідженого маркера виявлялась лише в поодиноких клітинах, у некротично-змінених раковій паренхімі експресія Кі-67 була повністю відсутня. У випадках III-IV ступенів лікувального патоморфозу рівень експресії Кі-67 був суттєво нижчим порівняно з патоморфозом I-II ступенів. В ділянках вираженої десмопластичної реакції стромы, особливо в осередках розростання

грануляційної тканини, експресію досліджуваного маркера виявляли у клітинах реактивного лімфоцитарно-макрофагального інфільтрату та в ендотелії судин мікроциркуляторного русла.

Підвищену експресію Ki-67 характеризують як біологічну ознаку, що сприяє розвитку місцевих рецидивів і віддалених метастазів навіть у клінічно сприятливих випадках на ранніх стадіях розвитку багатьох локалізацій і гістологічних типів злоякісних новоутворів. Нами виявлено зниження експресії Ki-67 в тканині РПК під впливом НХПТ і встановлено негативну кореляцію між експресією Ki-67 та рівнем відповіді на передопераційну ХПТ.

**Висновки.** Таким чином, експресію маркера Ki-67 доцільно використовувати для моніторингу ефективності ХПТ на етапах комбінованого і комплексного лікування хворих на РПК, а її високий рівень до лікування, будучи притаманним для новоутворів з низьким ступенем диференціювання, корелює з рівнем злоякісного потенціалу пухлини.

## **ПОКАЗАТЕЛИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА В МИТОХОНДРИЯХ НЕФРОЦИТОВ КРЫС ПРИ ГИПЕРЭЛЕМЕНТОЗЕ КОБАЛЬТА**

Горбач Т.В., Мартынова С.Н.

Харьковский национальный медицинский университет

За последнее время в нашей стране значительно увеличилось число заболеваний почек, возникающих в результате длительного поступления в организм экотоксикантов (экодетерминированная нефропатия). Токсикантами, поражающими почку, нередко оказываются различные металлы. В экспериментальных исследованиях установлено, что кобальт (Co) может накапливаться в почках. Сведений о влиянии солей кобальта на метаболические процессы в почках нет.

**Целью** нашей работы явилось изучение активности процессов ПОЛ и показателей энергетического обмена в митохондриях нефроцитов крыс при внутрижелудочном введении раствора хлорида кобальта.

Исследования проведены на 3-х месячных крысах-самцах линии Вистар, содержащихся в стандартных условиях вивария на сбалансированном питании. Животным на протяжении месяца ежедневно внутрижелудочно вводили раствор хлорида кобальта (3 мг/мл, из расчета 1 мл на 100 г массы тела). Контрольной группе животных ежедневно в течение месяца вводили физиологический раствор (по 1 мл). Через 15 дней и через 30 дней животных выводили из эксперимента путем декапитации под легким эфирным наркозом. Почки быстро извлекали и охлаждали 3-5 минут на «сахарозном льду». Митохондрии получали по методу Kamatch и соавт. в модификации Лемешко. Активность пируватдегидрогеназы, НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы определяли спектрофотометрическими методами. Перекисное окисление липидов митохондрий почек исследовали в разных средах (с добавлением 0,5 мМ аскорбата, 0,4 мМ НАДФН) при концентрации белка митохондрий – 1 мг/мл МДА по методу Владимирова.

Изучение активности митохондриальных ферментов показало, что через 15 дней после введения раствора хлорида кобальта достоверно снижается активность пируватдегидрогеназы и изоцитратдегидрогеназы при сохраненной активности сукцинатдегидрогеназы.

Через месяц с момента начала введения солей кобальта отмечается дальнейшее снижение активности ферментов. Наиболее значительные изменения – в активности пируватдегидрогеназы. Установленные нами изменения в активности ферментов свидетельствуют о снижении скорости синтеза АТФ и, вследствие этого, развитии энергодефицитного состояния.

Выявленные нами особенности энергетического обмена могут быть связаны с перераспределением ионов металлов в тканях и с активацией перекисного окисления липидов, вызванной введением Co. Изучение скорости накопления малонового диальдегида при перекисном окислении липидов митохондрий почек показало, что на 15 день с момента начала эксперимента аскорбат- и НАД-зависимые процессы перекисного окисления липидов несколько повышаются, однако изменения недостоверны, т.е. можно говорить лишь о тенденции активации ПОЛ в митохондриях. На 30-е сутки с момента начала эксперимента НАД-зависимое перекисное окисление достоверно снижается.